



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

“Meccanismi epigenetici nella terapia e nella resistenza del cancro al seno”
“Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance”

Tesi di Laurea di:

Emiliana Pia Imbrice

Docente Referente

Chiar.mo Prof.
Oliana Carnevali

Sessione: Ottobre
Anno Accademico: 2022-2023

→ La **ghiandola mammaria**, è un **epitelio ghiandolare esocrino**. Nei mammiferi è in grado di produrre latte.

→ Regolata dal **Sistema Nervoso Endocrino**, presente sia nelle femmine che nei maschi, nonostante in quest'ultimi risulta essere progredita.

→ Il carcinoma alla mammella è la **neoplasia** maligna più frequente nelle donne.

→ Il **cancro** è una malattia sia **genetica** che **epigenetica**. I **meccanismi epigenetici** regolano molteplici aspetti della biologia del cancro, dalla crescita e l'invasione alla modulazione della risposta immunitaria.

→ Per contrastare la malattia, viene utilizzata la **terapia endocrina**, tuttavia nel 25% dei casi si è osservato, dopo il trattamento, la presenza di cellule **resistenti**.

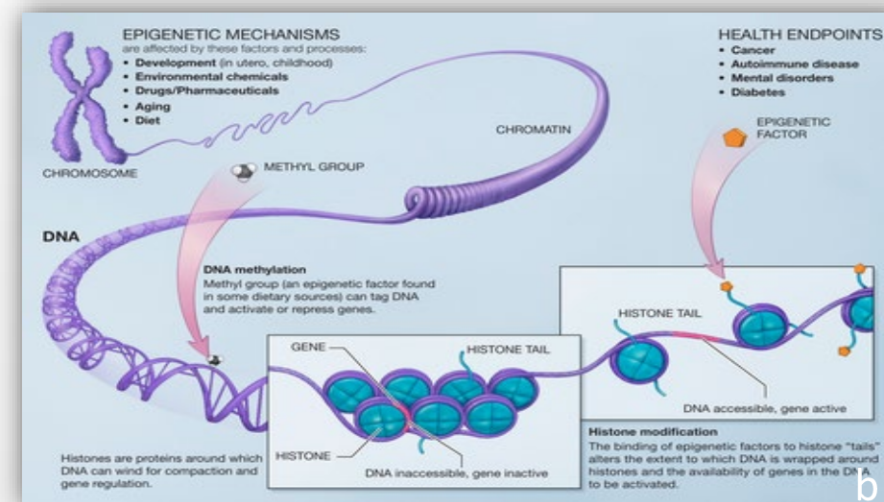


Figura 1:
(a) Neoplasia mammella
(b) Principali meccanismi epigenetici

Fonte: Fig. 1 A <https://www.toscanomedical.it/>

Fig. 1 B <http://commonfund.nih.gov/epigenomics/figure.aspx>

Il carcinoma mammario

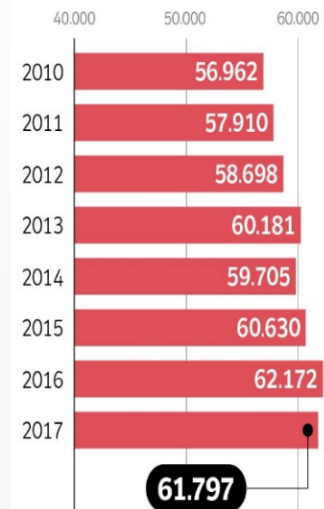
→ I geni, che garantiscono e controllano la crescita e il funzionamento di una cellula, possono nel tempo accumulare **mutazioni** che impediscono il normale sviluppo.

→ Le **neoplasie** della ghiandola mammaria colpiscono soprattutto il tessuto epiteliale a partire dalle cellule dei **lobuli** che costituiranno la parete dei **dotti**.

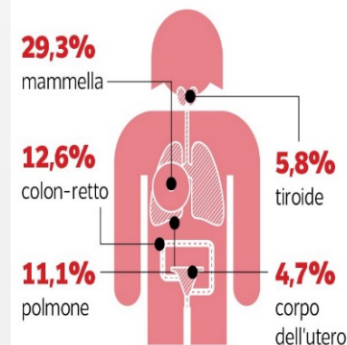
→ Le neoplasie maligne sono suddivise in **carcinoma in situ** e **cancro invasivo**:

- Il **carcinoma in situ** è caratterizzato dalla proliferazione di cellule tumorali all'interno di dotti o lobuli, senza invadere il tessuto stromale. Si distingue a sua volta in:
 - **Carcinoma duttale in situ**;
 - **Carcinoma lobulare in situ**
- Il **carcinoma invasivo**, è in grado di oltrepassare la struttura mammaria e invade altre aree corporee.

Numero di ricoveri per interventi chirurgici per tumore alla mammella



I 5 tumori più frequentemente diagnosticati tra le donne



Fonte: Agenas

PROBABILITÀ DI SVILUPPO TUMORE AL SENO



SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI DALLA DIAGNOSI



QUALI SONO I FATTORI DI RISCHIO?



Figura 2: Statistiche sullo sviluppo del carcinoma mammario dal 2010 al 2017

Meccanismi molecolari nello sviluppo del carcinoma mammario

→ Lo sviluppo della ghiandola mammaria è mediato da una serie di vie di segnalazione e regolatorie. Alcuni **segnali ormonali** coordinano l'equilibrio tra autorinnovamento, differenziazione e integrità dei tessuti.

→ **L'ipermetilazione** del promotore DKK3 (inibitore della via WNT), comporta un aumento di **E-caderina** con conseguente aumento del **rinnovamento cellulare**, della **proliferazione** e la **recidiva** della malattia.

→ **La via SHH**, è un altro importante percorso di sviluppo che se deregolamentato contribuisce **alla tumorigenesi al seno**. **L'ipometilazione** del promotore del ligando HH o del suo recettore a valle, porta ad una maggiore attivazione ligando-dipendente e alla divisione cellulare incontrollata.

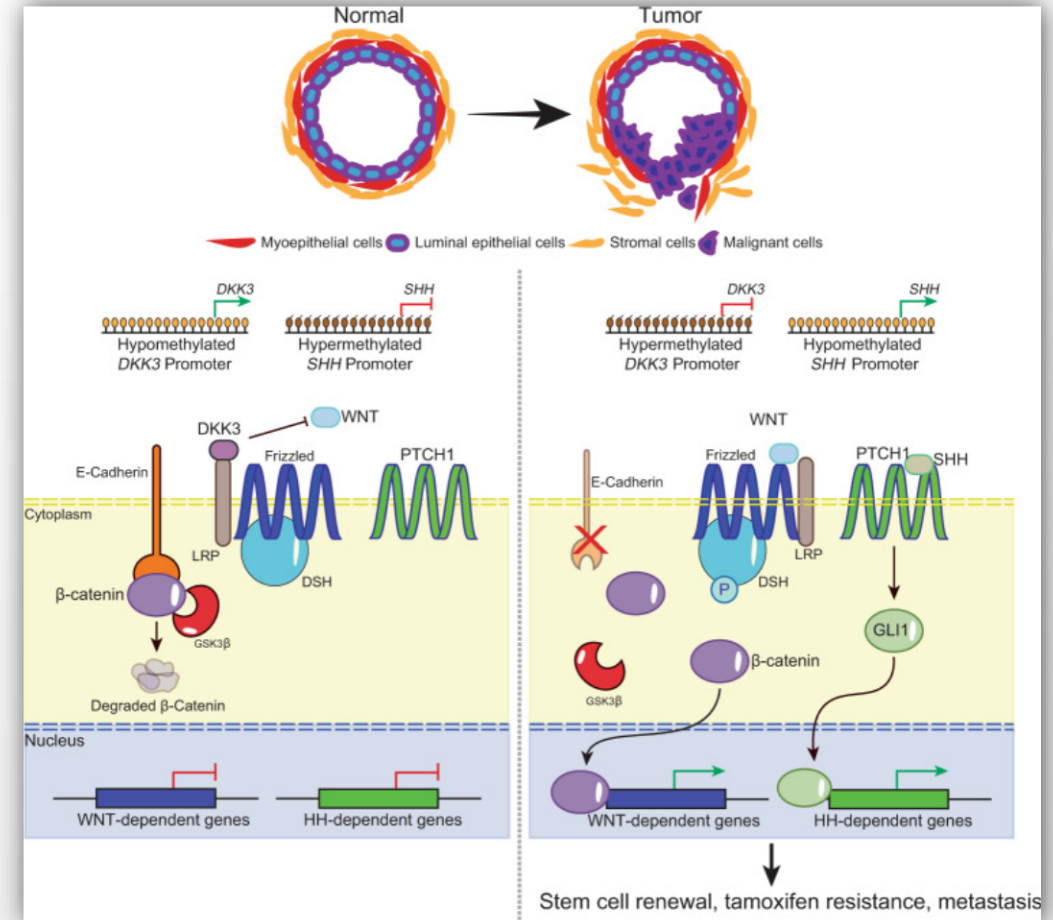


Figura 3: Confronto tra le principali vie di differenziamento tra una cellula normale e una tumorale

Fonte: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>

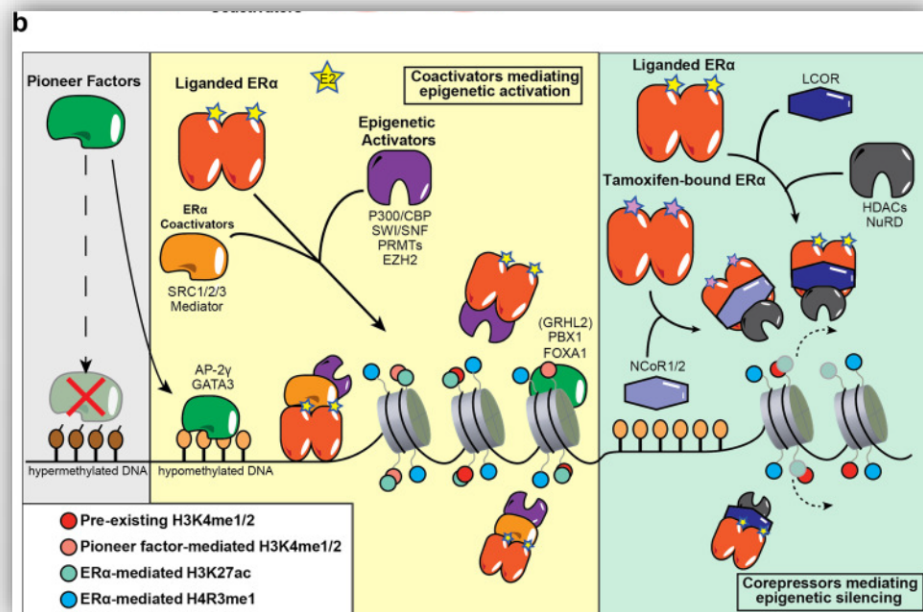
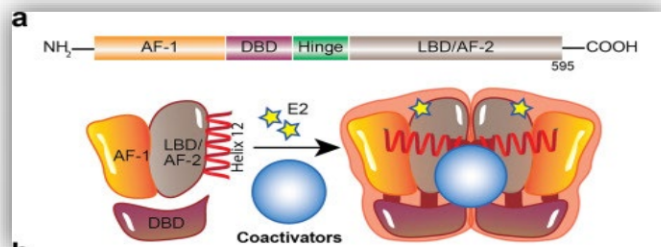


Figura 4:
 (a) Domini e attivazione di $ER\alpha$;
 (b) Attività trascrizionale dei fattori pionieri

Fonte: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>

→ Gli **estrogeni** coordinano meccanismi mitogenici ed epigenetici regolando lo sviluppo della ghiandola mammaria.

→ Circa il **70% dei carcinomi mammari è sensibile al $ER\alpha$** .

→ $ER\alpha$ è un recettore **nucleare**, in grado di rispondere alla segnalazione del **17- β estradiolo (E2)**.

→ Presenta diversi domini funzionali:

- **AF1 (N-terminale);**
- **LBD (C-terminale);**
- **DBD;**
- **Cerniera inter-dominio**

→ La segnalazione stimolata da E2 avviene attraverso:

- **Percorsi genomici;**
- **Percorsi non genomici**

→ L'attivazione avviene per **omodimerizzazione**.

→ Mutazioni a livello di **BRCA1**, principale co-repressore, comportano un aumento dell'attività trascrizionale dell' $ER\alpha$.

→ Le terapie endocrine mirano all'asse **oncogenico E2-ER α** .

→ Si servono di tre classi principali di farmaci:

- **SERM (Modulatori Selettivi Dei Recettori Degli Estrogeni);**
- **SERD (Degradatori Selettivi dei Recettori degli Estrogeni);**
- **IA (Inibitori delle Aromatasi)**

→ L'esposizione prolungata agli estrogeni provoca alterazioni genetiche che interrompono l'equilibrio tra **co-attivatori** e **co-repressori** dell'ER α e sono associate a prognosi sfavorevole e resistenza alla terapia endocrina.

Attualmente sono in via di sviluppo farmaci che leghino ER α e in grado di combinare la funzionalità dei farmaci SERM e SERD.

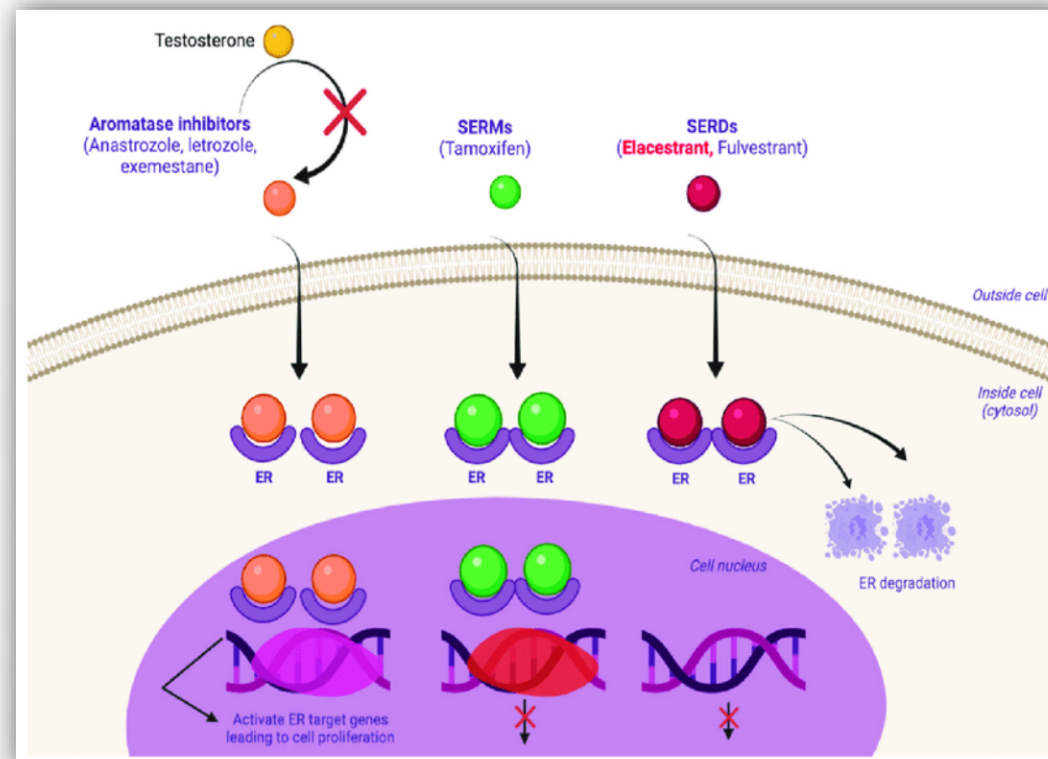
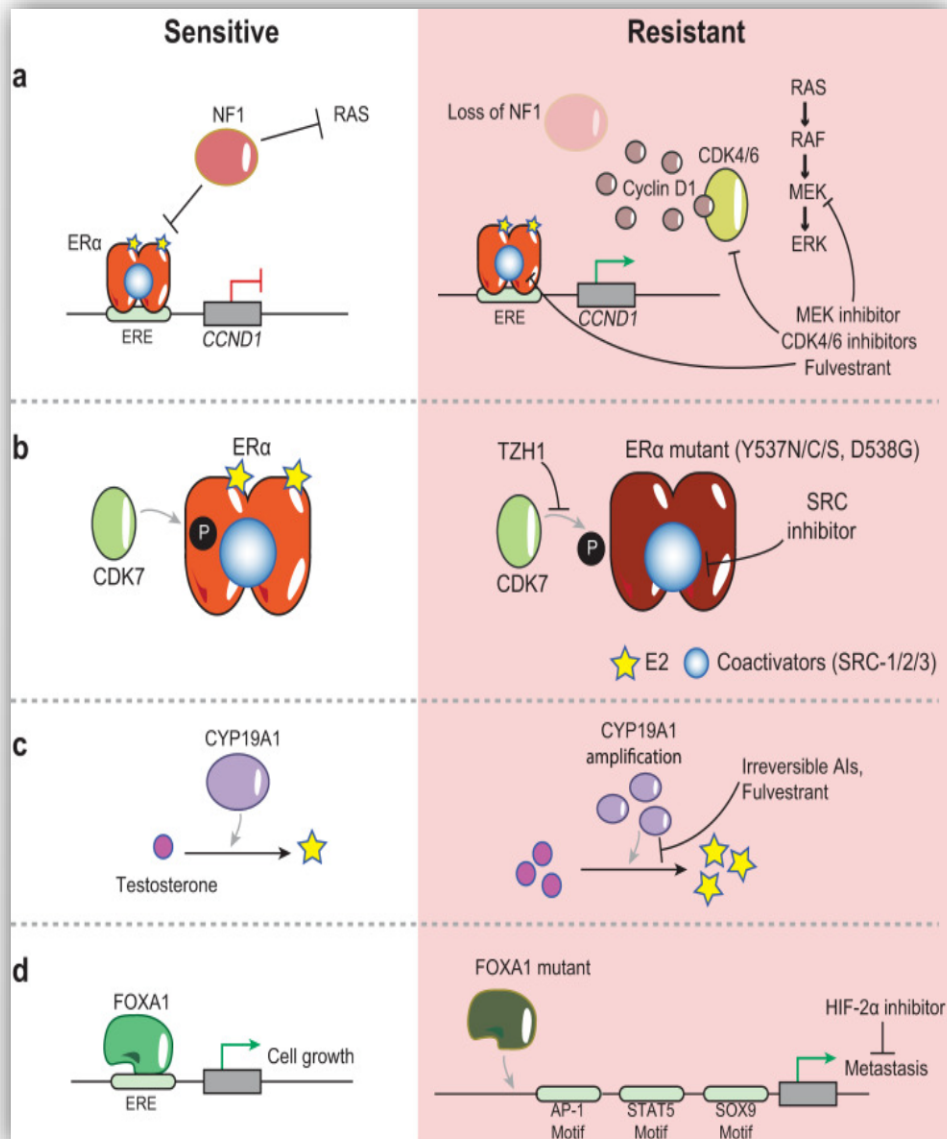


Figura 5: Meccanismo di azione dei diversi ET. *Gli AI bloccano la produzione di estrogeni inibendo l'aromatizzazione degli androgeni. I SERM inibiscono competitivamente il legame degli estrogeni all'ER. I SERD riducono la capacità di ER di traslocare nel nucleo, inibendo la trascrizione dei geni regolati da ER.*



→ Nonostante l'efficacia della terapia endocrina, nel 25% dei casi si manifesta **resistenza**.

→ Tra le mutazioni che comportano resistenza:

- **Perdita o alterazione di co-repressori di E α**
- **La riattivazione ligando-indipendente dell'E α ;**
- **Alterazioni genetiche nel CYP19A1;**
- **Amplificazione genica e mutazioni missenso del gene FOXA1;**
- **Mutazioni con perdita di funzione del gene ARID1A;**

→ Collegati alla resistenza ai farmaci sono i cambiamenti nel controllo del ciclo cellulare.

→ La deregolazione epigenetica è un importante fattore che contribuisce alla tumoregenesi e alla resistenza ai farmaci.

Figura 6: Alterazioni genomiche che mediano la resistenza terapeutica nel cancro al seno ER+.

Fonte: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>

Premessa:

La frequenza con la quale si presenta resistenza terapeutica, dopo un prolungato trattamento con farmaci endocrini, rimane il problema clinico principale per la gestione di tali malattie.

Ipotesi:

È possibile utilizzare terapie epigenetiche in grado di ripristinare la sensibilità endocrina e di evitare la selezione di un fenotipo resistente?

Obiettivo:

Identificare epifarmaci che associati a farmaci endocrini siano in grado di modulare la differenziazione delle cellule del cancro.

Primo studio sull'utilizzo combinato dell'inibitore delle deacetilasi istoniche (HDACi) e un farmaco endocrino appartenente ai SERM per ripristinare sensibilità nelle cellule del carcinoma mammario ER+.

- L'utilizzo di agenti epigenetici combinato con terapia ormonale o chemioterapia, è l'approccio più significativo che si possa avere nel contribuire alla progressione del cancro e alla resistenza alle attuali terapie.
- Le deacetilasi istoniche e le acetil-transferasi istoniche svolgono un ruolo importante nel mantenimento e nella funzione della cromatina: regolano l'acetilazione degli istoni e regolano molti bersagli non istonici permettendo modifiche post-traduzionali oltre ai loro ruoli durante la regolazione trascrizionale.
- La logica utilizzata per tale studio, deriva di diversi studi pre-clinici che suggeriscono come la modulazione epigenetica e la modifica post-traduzionale dell'ER da parte degli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) migliora gli effetti antitumorali del tamoxifene.
- Gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) inducono l'arresto della crescita, la differenziazione e l'apoptosi nelle cellule del cancro al seno ER+.
- **Lo studio prevede l'utilizzo del Vorinostat, un inibitore delle deacetilasi istoniche (HDACi), in combinazione con il tamoxifene.**

→ Gruppo di 43 pazienti, in età pre/post- menopausa, con età media di 56 anni. Tutte le pazienti avevano precedentemente adottato terapie endocrine o chemioterapia, mostrando progressione della malattia. Nella scelta del gruppo sono stati tenuti in considerazione diversi parametri.

→ Si è cercato dunque di valutare la tossicità dell'inibitore delle deacetilasi istoniche (HDACi), il Vorinostat, e tamoxifene, farmaco endocrini, somministrandoli in pazienti con carcinoma mammario ER+ che mostravano progressione della malattia dopo terapia ormonale, e stimarne l'attività antitumorale.

→ I pazienti hanno ricevuto 400 mg di **Vorinostat** (HDACi) una volta al giorno per 21 giorni su 28 e 20 mg di tamoxifene al giorno senza interruzione. Entrambi i farmaci sono stati somministrati in formulazione orale.

→ Per valutare la risposta, sono stati effettuati dei test per i marcatori tumorali e la documentazione della malattia misurata mediante tomografia computerizzata (CT), dopo ogni due cicli.

→ Mentre per un numero significativo di pazienti è stato necessario aggiustare la dose, un altro sottogruppo ha tollerato la somministrazione a lungo termine della combinazione dei due farmaci per 2 anni o più.

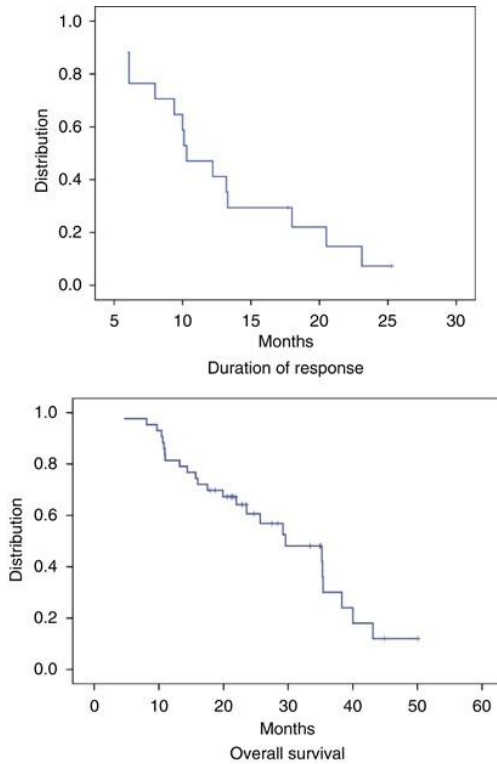


Figura 7: Durata media della risposta e sopravvivenza globale

Fonte :<https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>

→ Gli effetti farmacologici di Vorinostat (HDACi) sono stati valutati nelle cellule mononucleate periferiche (PBMC).

→ I cambiamenti indotti da Vorinostat (HDACi) nell'acetilazione degli istoni nelle cellule mononucleate periferiche (PBMC) è paragonabile all'acetilazione dell'istone nelle cellule tumorali trattate con Vorinostat (HDACi).

→ È stata osservata un'acetilazione di H4 maggiore nei pazienti che hanno risposto alla terapia piuttosto che nei pazienti non responsivi alla terapia. L'iperacetilazione degli istoni H4 e un aumento del livello basale dell'istone deacetilasi 2 (HDAC2) sono correlati alla risposta.

→ È stato possibile dimostrare come l'espressione basale di HDAC2 sia più alta nei pazienti che mostrano una risposta alla terapia, rispetto ai pazienti non responsivi e che questo possa suggerire la risposta molecolare di un paziente a tale terapia.

Il trattamento, dunque, determina una regressione del tumore o una stabilizzazione prolungata dopo precedente terapia ormonale o chemioterapia. Il trattamento porta ad una down-regulation di ESR1 (recettore agli estrogeni 1) e all'inversione della stabilizzazione dell'ER indotta dal tamoxifene. In presenza, di tali inibitori, il tamoxifene induce apoptosi, mediante anche inibizione dell'HDAC2.

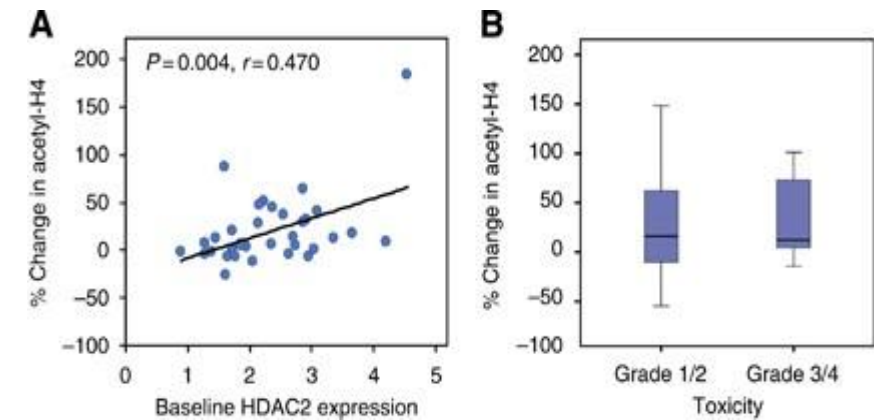


Figura 8: (A) Grafico a dispersione dell'espressione di HDAC2 basale in rapporto alla % dei cambiamenti dell'H4 dopo 8 giorni di trattamento nelle cellule PBMC. (B) Variazione percentuale dell'H4 nei pazienti con tossicità ematologiche o non ematologiche più o meno gravi.

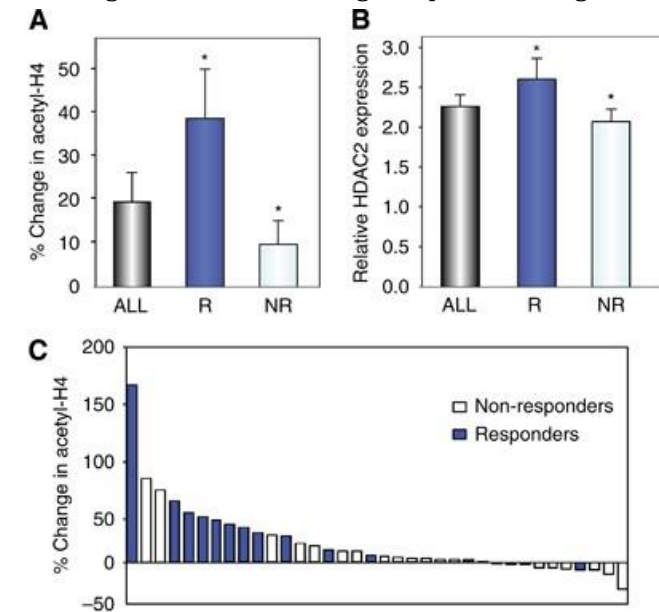


Figura 9: (A) Variazione della % di acetilazione di H4 nelle cellule PBMC. (B) Espressione di HDAC2 in tutta la popolazione esaminata, solo nei pazienti con risposta e in quelli NR. (C) Grafico a cascata della % di acetilazione H4 nei pazienti NR e R.

Conclusioni:

- **La terapia endocrina risulta efficace verso i tumori al seno di grandi volumi, tuttavia fallisce nel colpire piccole popolazioni cellulari che potrebbero indurre a fenotipi resistenti.**
- **La deregolazione epigenetica è la causa principale di oncogenesi e resistenza terapeutica.**
- **L'approccio epigenetico, se perfezionato, rimane un'ottima strategia per salvare e migliorare la vita di molte donne con carcinoma mammario metastatico ER+.**
- **Gli epidrugs offrono l'opportunità di risensibilizzare le cellule endocrino-resistenti. Questi epifarmaci funzionano colpendo i regolatori della cromatina:**
 - **HDACi (Vorinostat)**, tale epifarmaco è in grado di bloccare l'attività delle deacetilasi istoniche impedendo l'acetilazione della lisina 27.
- **Si tratta di uno studio in continua evoluzione. Sono nuove scoperte, che, come in tutti gli aspetti di ricerca, sollevano nuovi interrogativi, che se risolti potrebbero ampliare notevolmente il panorama di cura.**

Riassunto:

Circa il 70% delle donne affette da carcinoma mammario, sono sensibili agli estrogeni. Questo è dovuto dall'alto livello dell'ER α attivo. Viene utilizzata principalmente la terapia endocrina, tuttavia si osserva resistenza e progressione della malattia dopo circa 10 anni dal trattamento. La ricerca sta tentando di identificare delle possibili vie mirate all'alterazione dei pathway responsabili dei fenotipi resistenti e che potrebbero causare ricaduta. Inoltre, in fase di studio, sono i meccanismi responsabili del cambiamento della struttura della cromatina, in modo da andare a «creare» nuovi farmaci in grado non solo di ri-sensibilizzare le cellule resistenti ma ridurre anche la mortalità.

L'utilizzo combinati di epifarmaci con farmaci endocrini ha mostrato un'attività incoraggiante nell'invertire la resistenza ormonale. Il primo approccio all'utilizzo clinico di epifarmaci in combinazione con farmaci endocrini è stato promosso dall'Università della California a San Francisco. Durante questo studio combinato, è stato possibile valutare la tossicità delle due diverse classi di farmaci somministrate a donne con carcinoma mammario ER+ dopo progressione rispetto ad una precedente terapia ormonale; inoltre, è stato possibile valutare l'attività antitumorale. Sono state selezionate 43 donne, con carcinoma mammario ER+, in pre- e post- menopausa. La terapia, di durata di 28 giorni, prevedeva l'assunzione una volta al giorno per via orale di 400 mg di HDACi per 21 giorni e di 20 mg di tamoxifene assunto in maniera continuativa. I test per valutare la risposta venivano eseguiti ogni due cicli. È stato sviluppato un test farmacodinamico per misurare l'acetilazione dell'istoni sulle cellule mononucleari periferiche (PBMC) in maniera tale da avere a disposizione un mezzo affidabile per misurare l'attività target degli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi). È stato osservato come i livelli basali delle deacetilasi istoniche 2 (HDAC2) sia più elevato nei pazienti che hanno mostrato beneficio clinico durante il trattamento. In particolare gli inibitori delle deacetilasi istoniche sono in grado di risensibilizzare le cellule resistenti alla terapia ormonale e si pensa possano prevenire l'insorgenza di resistenze.

Si ritiene, inoltre, che la valutazione dell'espressione basale delle deacetilasi istoniche possa predire la risposta molecolare di un paziente.

Nonostante, il grande entusiasmo intorno all'uso di questi agenti, ci sono ancora diversi ostacoli. I risultati clinici non soddisfano le aspettative generate nello scenario preclinico in termini di efficacia e tossicità.

Bibliografia

<https://cordis.europa.eu/article/id/386912-epigenetics-explains-how-breast-tumour-cells-escape-hormonal-treatment/it>

<https://www.nature.com/articles/s41467-021-22024-3>

<https://www.nature.com/articles/bjc2011156>

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/ricerca-di-base/epigenetica#:~:text=Epigenoma%2C%20un%20compagno%20di%20vita,cambiamenti%20epigenetici%20presenti%20nell'organismo.>

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/cose-il-cancro/geni-familiarita-cancro>

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-seno>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3477864/>