

Titolo: "Effetti della vitamina D sulla differenziazione cellulare e staminalità nel cancro - Vitamin D Effects on Cell Differentiation and Stemness in Cancer"

Codice: VID004

Autore: Fernández-Barral et al.

Data: 2020

Rivista: Cancer (Basel) 25;12(9):2413

Argomento: vitamina D

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12092413>

URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/9/2413>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2025/03/11/vid004-fernandez-barral-et-al-2020/>

Parole chiave: vitamina D; differenziazione cellulare, staminalità, cancro, carcinoma, fibroblasti associati al cancro, cellule staminali del cancro, transizione epitelio-mesenchimale, Wnt/ β -catenina

Tumore: carcinoma, cancro al seno, cancro al colon

Traduzione: l'articolo è stato tradotto tutto, ma con semplificazioni.

Punti di interesse: La vitamina D₃ è un ormone pleiotropico e importante regolatore del genoma umano. Modula il fenotipo e la fisiologia di molti tipi di cellule controllando l'espressione di centinaia di geni in modo specifico per tessuto e cellula. La carenza di vitamina D è comune tra i pazienti oncologici e numerosi studi hanno riportato che la forma attiva della D₃ promuove la differenziazione di un ampio spettro di cellule di carcinoma, l'inibizione della transizione epitelio-mesenchimale, con conseguente riduzione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. Controlla inoltre l'espressione genica e il fenotipo dei fibroblasti associati al cancro (CAF) e ha un ruolo regolatore delle cellule staminali normali e cancerose (CSC).

Gli autori spagnoli di questo articolo ritengono la vitamina D₃ un ormone regolatore cruciale dell'omeostasi nell'organismo e un ottimo candidato per terapie antitumorali non citotossiche basate sulla regolazione della differenziazione e della staminalità delle cellule tumorali.

A sostegno di ciò propongono sia risultati di studi propri e sia risultati di studi prelevati dalla letteratura scientifica, principalmente sui carcinomi di colon e seno, ma anche di altri tumori solidi ed ematologici. L'articolo è molto corposo e ricco di informazioni, comunque ben organizzato nella sua complessità. È diviso in tre parti in cui si esaminano 1) gli effetti della vitamina D₃ sulla differenziazione delle cellule tumorali, nel carcinoma del colon, del seno e brevemente anche in altri tumori solidi ed ematologici, 2) gli effetti della vitamina D₃ sulla differenziazione dei fibroblasti stromali tumorali 3) gli effetti della vitamina D₃ sulle cellule staminali cancerose.

I carcinomi e la perdita di differenziazione cellulare epiteliale. I carcinomi sono il tipo di cancro solido più frequente (circa il 90%). Derivano da cellule epiteliali che perdono le loro caratteristiche di cellule differenziate (principalmente polarità apicale-basale e adesività) e il controllo della loro proliferazione. La perdita di differenziazione epiteliale deriva dall'acquisizione di un programma cellulare chiamato transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Questa transizione comporta drastici cambiamenti nel modello di espressione genica, innescati da un gruppo di fattori di trascrizione, i fattori di trascrizione attivanti la EMT e indicati con la sigla EMT-TF, che causano la repressione

del fenotipo epiteliale e l'induzione di uno stato cellulare mesenchimale. Una cellula mesenchimale, rispetto ad una cellula epiteliale, ha la funzionalità di una cellula connettivale embrionale, acquisisce morfologia fibroblastica con elevata capacità riproduttiva e mobilità, e può differenziarsi in diversi tessuti. I regolatori di polarità cellulare, le diverse proteine di superficie delle cellule epiteliali responsabili dell'adesività cellula-cellula e cellula-substrato, inclusi i componenti delle giunzioni aderenti come l'E-caderina, ed altre, così come i componenti del citoscheletro e altri che legano la cellula alla matrice extracellulare (ECM), vengono sostituite da altre tipiche delle cellule fibroblastiche mobili capaci di invasione della membrana basale. L'EMT fornisce alle cellule tumorali altre caratteristiche di malignità, come staminalità e apoptosi ridotta.

Il processo EMT è attivato da una varietà di agenti e segnali che inducono o attivano fattori di trascrizione tipici legati all'attivazione della EMT (EMT-TF) come il fattore di crescita trasformante (TGF)- β , le proteine Wnt, e altri. Questi segnali di solito agiscono in modo cooperativo e in molti casi sono prodotti dalle cellule stromali del microambiente tumorale. L'EMT è un fenomeno reversibile e solitamente parziale. Non colpisce tutte le cellule di un tumore, genera eterogeneità fenotipica intratumorale. Successivamente, durante la tumorigenesi, l'EMT viene invertito dal processo opposto della transizione mesenchimale-epiteliale (MET). Ripristinando l'aggregazione cellulare e i legami con la matrice extracellulare, MET probabilmente facilita la sopravvivenza delle cellule tumorali durante la circolazione nel flusso sanguigno e la colonizzazione iniziale delle nicchie metastatiche.

Vitamina D3 e differenziazione cellulare nei carcinomi

Morfologia, adesione, blocco della EMT nel cancro al colon. Molti studi sugli effetti di 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule del carcinoma sono stati condotti nel cancro del colon e della mammella a causa della loro elevata incidenza e mortalità. Queste due neoplasie sono quelle più comunemente associate alla carenza di vitamina D. Come nella maggior parte dei tipi di cellule tumorali, 1,25(OH)₂D₃ riduce la proliferazione cellulare, la sopravvivenza cellulare per aumento della sensibilità agli stimoli apoptotici, induce la differenziazione cellulare.

L'induzione della differenziazione cellulare consiste nella determinazione di un cambiamento morfologico e aumento dell'adesione cellula-cellula e cellula substrato, e questo effetto è direttamente correlato al livello di espressione del recettore VDR. I dati mostrano che la D₃ sovraregola una serie di molecole di adesione intercellulare, tra cui E-caderina, induce e/o ridistribuisce diverse citocheratine che modulano il citoscheletro di actina e la rete di filamenti intermedi e le strutture di legame dell'ECM. Nelle cellule epiteliali normali la D₃ inibisce l'induzione di EMT da parte del fattore di crescita trasformante β (TGF- β) e da parte dell'interleuchina-1 β .

Blocco segnalazione Wnt/ β -catenina nel cancro al colon. La dedifferenziazione epiteliale, l'induzione di EMT e l'acquisizione di staminalità è legata all'attivazione di diversi percorsi di segnalazione tra cui il percorso Wnt/ β -catenina. Quando questo percorso si attiva, sia per mutazioni (tipiche di molti tumori al colon primari e nelle metastasi) che per stimolazione da parte dei fattori proteici Wnt, la β -catenina, non viene più degradata ma si accumula nel nucleo cellulare delle cellule epiteliali del colon e agisce come regolatore trascrizionale, attivando uno specifico programma di espressione genica che coincide in gran parte con quello delle normali cellule staminali intestinali. Ciò porta alla dedifferenziazione epiteliale, all'induzione di EMT e all'acquisizione di staminalità. Pertanto, l'attivazione anomala del percorso Wnt/ β -catenina è responsabile dell'inizio e probabilmente anche della progressione del cancro del colon attraverso l'aumento della sopravvivenza e della proliferazione delle cellule epiteliali del colon e la perdita del fenotipo differenziato. È stato dimostrato che la vitamina D antagonizza questo percorso di attivazione, ovvero lo blocca, a diversi livelli sia nelle cellule del cancro al colon ma anche in altri tipi di tumore. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi di disattivazione, uno di questi è dovuto all'aumento di E-caderina causato dalla D₃, la quale, grazie alla sua elevata affinità, lega nelle

giunzioni di superficie, e così sequestra, la proteina β -catenina citosolica di nuova sintesi.

Ulteriori molecole prodifferenzianti nel cancro al colon. Il lavoro degli autori di questo articolo ha portato all'identificazione di altri mediatori dell'azione di prodifferenziazione della D_3 nelle cellule del carcinoma del colon. Questi mediatori includono cistatina D, miR-22, KDM6B e Sprouty-2 (SPRY2).

La cistatina D è una proteina fortemente indotta dalla D_3 , che a sua volta induce l'espressione di E-caderina, reprime geni per i fattori che attivano la EMT, blocca il percorso Wnt/ β -catenina.

Il microRNA miR-22, indotto da $1,25(OH)_2D_3$ è coinvolto nella regolazione sull'espressione genica da parte della D_3 , inibisce la EMT, l'invasività e crescita tumorale nel cancro del colon e in alcuni altri sistemi tumorali.

KDM6B è un enzima demetilante l'istone H3 ($H3K27me2/3$), un regolatore epigenetico. I dati indicano che la D_3 sovraregola l'espressione di questo gene KDM6B. KDM6B aumenta la produzione di proteine di adesione cellulare, aumenta l'induzione di E-caderina e la differenziazione cellulare e l'inibizione dell'attività trascrizionale della β -catenina.

SPRY2 è stato scoperto essere un gene fortemente represso da $1,25(OH)_2D_3$ e i dati indicano che la sua repressione apporta un contributo importante all'azione di prodifferenziazione di della vitamina D_3 .

Effetto differenziante della vitamina D nel cancro al seno. Il cancro al seno è una malattia altamente eterogenea. I tumori al seno tripli negativi o TNBC che mancano o esprimono livelli molto bassi di proteine ER (recettore estrogeni), PR (recettore progesterone) e HER2 (recettore fattore di crescita epidermico) hanno la prognosi più sfavorevole. Le cellule ER-PR-HER2- sono altamente dedifferenziate, cioè anaplastiche. I pazienti con TNBC hanno livelli ematici di $25(OH)D$ molto bassi e alcuni studi in vitro e clinici suggeriscono la possibilità di un effetto protettivo di $1,25(OH)_2D_3$ contro il TNBC.

In linee cellulari di carcinoma mammario umano è stato dimostrato che la vitamina D_3 induce un cambiamento specifico nella morfologia delle cellule e nell'espressione genica. Alterare la citoarchitettura dei filamenti di actina e dei microtubuli, induce estensioni citoplasmatiche (filopodi e lamellipodi), aumenta l'adesione cellulare al substrato. L'inibizione da parte di D_3 della migrazione delle cellule del carcinoma mammario, dell'invasione e delle capacità metastatiche secondo alcuni dati avverrebbe tramite una riduzione dell'espressione e/o dell'attività della N-caderina, dei componenti dell'ECM, e delle metalloproteasi (MMP-1, MMP-9). La sovraregolazione della proteina adattatrice del citoscheletro di actina da parte della D_3 è fondamentale per le azioni pro-adesive, antimigratorie e anti-invasive di questa vitamina nel carcinoma mammario.

Effetto differenziante della vitamina D in altri tumori solidi. Come nei tumori del colon e del seno, $1,25(OH)_2D_3$ induce la differenziazione cellulare, sensibilizza all'apoptosi e inibisce la proliferazione, la migrazione e l'invasione in una serie di altre neoplasie solide. Ancora una volta, i suoi effetti sulla differenziazione sono in gran parte dovuti all'inibizione dell'EMT e all'antagonismo del percorso di segnalazione Wnt/ β -catenina, all'inibizione del fattore di crescita trasformante β (TGF- β) e il fattore di crescita dell'epidermide (EGF).

Nelle cellule del carcinoma tiroideo anaplastico, del carcinoma ovarico, dell'adenocarcinoma polmonare e del carcinoma renale è stato descritto l'inibizione del percorso TGF- β , con repressione dei fattori stimolanti la EMT e la sovraregolazione dei marcatori epiteliali da parte della vitamina D_3 . Nel complesso, i dati indicano che la $1,25(OH)_2D_3$ è un forte promotore multiforme della differenziazione delle cellule del carcinoma umano con associata diminuzione della proliferazione delle cellule del carcinoma, sopravvivenza, capacità migratorie, invasive e metastatiche.

Effetto differenziante della vitamina D nei tumori ematologici. Come nei tumori solidi, la carenza di vitamina D è comune tra i pazienti con neoplasie ematologiche. La D_3 e analoghi sintetici inibiscono la proliferazione delle cellule di leucemia, linfoma e mieloma, oltre a favorire la loro apoptosi. Un effetto ampiamente riportato di D_3 in queste cellule è l'inibizione della

segnalazione STAT-1 e STAT-3 e successiva repressione di un gran numero di citochine. 1,25(OH)₂D₃ induce la differenziazione delle cellule della leucemia mieloide e sono stati riportati effetti di prodifferenziazione anche in colture di cellule del linfoma non-Hodgkin follicolare.

Vitamina D3 e differenziazione nei fibroblasti stromali tumorali. Oggi ampiamente accettata l'importanza cruciale del microambiente tumorale in tutte le fasi della carcinogenesi ma sono scarsi gli studi sull'azione di 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule stromali tumorali. I fibroblasti associati al cancro (CAF) sono il tipo di cellula più abbondante nel microambiente tumorale. I CAF sono una popolazione eterogenea di cellule generate da origini diverse in risposta a segnali secreti dalle cellule tumorali o da altre cellule dello stroma tumorale. Di solito, ma non sempre, i CAF hanno effetti promotori del tumore che favoriscono la malignità, alterano la matrice extracellulare, secernono fattori protumorigenici e di resistenza ai farmaci. Studi sull'espressione genica di fibroblasti associati al cancro umani isolati da biopsie e in fibroblasti sani mostrano una firma genetica della D3 che riflette un effetto antiproliferativo e antinfiammatorio. La 1,25(OH)₂D₃ promuove una profonda riprogrammazione del profilo di espressione genica dei CAF, che porta all'inibizione del loro fenotipo protumorale. L'analisi delle biopsie tumorali ha mostrato che un'elevata espressione di VDR nei CAF è associata a una migliore sopravvivenza complessiva e libera da progressione del paziente, indipendentemente dal livello di espressione di VDR nelle cellule del carcinoma.

La regolazione da parte di 1,25(OH)₂D₃ delle molecole di segnalazione (citochine, fattori di crescita) secrete dai CAF suggerisce che la D₃ potrebbe anche influenzare in modo paracrino la biologia delle cellule del carcinoma e delle cellule nel microambiente tumorale (cellule immunitarie ed endoteliali). In linea con questa ipotesi è stato trovato che la D₃ diminuisce la quantità di microRNA trovata negli esosomi secreti dai CAF pancreatici umani, il che attenua gli effetti promigratori e pro-invasivi che questi CAF esercitano sulle cellule del carcinoma pancreatico. Questi risultati mostrano che l'azione di 1,25(OH)₂D₃ si estende ai fibroblasti stromali tumorali e che 1,25(OH)₂D₃ è un importante regolatore della differenziazione CAF. I risultati degli studi disponibili quindi suggeriscono effetti anti-infiammatori e anti-angiogenici di 1,25(OH)₂D₃ a livello di cellule immunitarie ed endoteliali nel microambiente tumorale, e ampliano l'azione di prodifferenziazione di 1,25(OH)₂D₃ alle cellule del microambiente tumorale, il che può avere importanti conseguenze sullo sviluppo del cancro.

Effetti di 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule staminali cancerose. Secondo il concetto di cellule staminali cancerose i tumori vengono avviati, progrediscono a causa dell'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche nelle cellule staminali tissutali che diventano cellule staminali cancerose (CSC). Ciò ha portato a indagini focalizzate sull'identificazione di marcatori di cellule staminali indifferenziate per isolare e colpire specificamente le CSC con farmaci o anticorpi appropriati. Tuttavia, i ricercatori si sono scontrati con la scoperta della plasticità delle cellule staminali. La staminalità è oggi considerata uno stato cellulare solitamente transitorio che si perde nel processo di differenziazione ma si riacquista quando il serbatoio delle cellule staminali deve essere rigenerato. Di conseguenza, non sembrano esistere CSC stabili all'interno dei tumori che possano essere isolate e studiate come target ottimali per le terapie antitumorali. Diversi studi hanno riportato che gli analoghi sintetici della D3 la formazione di sferoidi, o mammosfere (una caratteristica attribuita alle CSC) nelle cellule staminali del cancro al seno ottenute da linee cellulari stabilite, riduce l'espressione dei marcatori di staminalità, ha impoverito la sottopopolazione di cellule staminali cancerose presenti in una linea cellulare di cancro ovarico umano. Studi su organoidi, strutture tridimensionali generate da biopsie di tessuto sano e tumorale ottenute da pazienti con cancro del colon mostrano che 1,25(OH)₂D₃ induce la differenziazione cellulare negli organoidi tumorali, modificando il loro tipico aspetto di cellule blastiche in un fenotipo differenziato epiteliale. L'analisi globale dell'RNA trascrittomico ha rivelato che la D₃ promuove negli organoidi tumorali del colon e del retto la repressione dei geni coinvolti nella proliferazione e nella tumorigenesi. Negli organoidi

normali del colon e del retto, derivati da tessuto sano, la D_3 sovraregola diversi geni chiave di staminalità e non influenza il fenotipo cellulare indifferenziato, regola negativamente i geni di differenziazione. Questo indica un'azione omeostatica di $1,25(OH)_2D_3$ sulla popolazione di cellule staminali normali in entrambe le aree intestinali (colon e retto). Altri studi concordano con questi risultati, indicano cioè un'attività differenziale su cellule sane e su cellule tumorali: la D_3 esercita un'azione omeostatica nelle cellule staminali normali del colon ma un effetto prodifferenziante sulle CSC del colon.

Conclusioni. Il metabolita attivo della vitamina D, il $1,25(OH)_2D_3$ e altri analoghi sintetici sono agenti di differenziazione che impongono uno stato epiteliale nelle cellule del carcinoma, in gran parte attraverso l'induzione di proteine epiteliali chiave e l'inibizione dell'EMT. Il lavoro svolto prevalentemente sul cancro del colon e del seno mostra che l'inibizione dell'EMT è principalmente una conseguenza dell'antagonismo che queste molecole esercitano sulle vie di segnalazione Wnt/ β -catenina, TGF- β ed EGF. Inoltre, $1,25(OH)_2D_3$ modifica profondamente il profilo di espressione genica dei fibroblasti stromali tumorali. Attenua il loro fenotipo attivato e diminuisce i loro effetti protumorali. Esercita anche azioni di prodifferenziazione sulle cellule staminali del cancro. Nel complesso, questi dati indicano che $1,25(OH)_2D_3$, o gli analoghi, sono candidati per strategie di differenziazione del cancro.

Traduzione articolo

Riassunto

La vitamina D_3 è il precursore della $1\alpha,25$ -diidrossivitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), un ormone pleiotropico che è un importante regolatore del genoma umano. La $1,25(OH)_2D_3$ modula il fenotipo e la fisiologia di molti tipi di cellule controllando l'espressione di centinaia di geni in modo specifico per tessuto e cellula. La carenza di vitamina D è comune tra i pazienti oncologici e numerosi studi hanno riportato che la $1,25(OH)_2D_3$ promuove la differenziazione di un ampio pannello di cellule di carcinoma coltivate, frequentemente associata a una riduzione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. Un meccanismo importante di questa azione è l'inibizione della transizione epitelio-mesenchimale, che a sua volta è in gran parte basata sull'antagonismo delle vie di segnalazione Wnt/ β -catenina, TGF- β ed EGF. Inoltre, $1,25(OH)_2D_3$ controlla il profilo di espressione genica e il fenotipo dei fibroblasti associati al cancro (CAF), che sono attori importanti nel processo tumorigenico. Inoltre, dati recenti suggeriscono un ruolo regolatore di $1,25(OH)_2D_3$ nella biologia delle cellule staminali normali e cancerose (CSC). Qui, rivediamo le attuali conoscenze delle basi molecolari e genetiche della regolazione da parte di $1,25(OH)_2D_3$ della differenziazione e staminalità delle cellule di carcinoma umano, CAF e CSC. Questi effetti supportano un'azione anticancro omeostatica non citotossica di $1,25(OH)_2D_3$ basata sulla riprogrammazione del fenotipo di diversi tipi di cellule.

1. Introduzione

La vitamina D₃, o colecalciferolo, è una molecola secosteroide sintetizzata nella pelle umana dall'azione della luce solare UV-B sul 7-deidrocolesterolo. Una seconda fonte limitata (circa il 10%) di vitamina D₃ nell'organismo umano è la dieta, in particolare pesci grassi come salmone, aringhe e sardine. Il colecalciferolo è biologicamente inerte. Entra nel flusso sanguigno e viene idrossilato nel fegato per produrre la 25-idrossivitamina D₃ (25(OH)D₃ (calcidiolo o calcifediolo). Il 25(OH)D₃ viene quindi sottoposto a un'altra idrossilazione, principalmente dalle cellule tubulari renali e anche da diversi tipi di cellule epiteliali e immunitarie, per formare 1 α ,25-diidrossivitamina D₃ (1,2(OH)₂D₃,5 - calcitriolo) [1,2,3]. Sia 25(OH)D₃ che 1,25(OH)₂D₃ si legano alla proteina recettore della vitamina D (VDR), uno dei 48 membri della superfamiglia dei fattori di trascrizione attivati dal ligando dei recettori ormonali nucleari. Sebbene esista una certa controversia, 1,25(OH)₂D₃ sembra legare VDR con maggiore affinità ed efficacia in termini di regolazione genica rispetto a 25(OH)D₃. Il legame del ligando promuove la formazione di eterodimeri tra VDR e RXR, il recettore per l'acido 9-cis-retinoico, e il legame di questi eterodimeri VDR-RXR al DNA [1,2,3]. I test di sequenziamento dell'immunoprecipitazione della cromatina hanno rivelato la presenza di circa diecimila siti di legame di VDR nel DNA del genoma umano [4]. Sono distribuiti in tutto il genoma. Un sottoinsieme si trova vicino al sito di inizio della trascrizione dei geni che sono direttamente regolati da 1,25(OH)₂D₃, ma in molti casi si trovano a monte del sito di inizio della trascrizione o negli introni, nella sequenza codificante o nei geni bersaglio a valle. In linea con l'elevato numero di siti di legame nel DNA, 1,25(OH)₂D₃ regola l'espressione di centinaia di geni che variano tra tessuti, tipi di cellule e contesto [5,6]. Di conseguenza, 1,25(OH)₂D₃ mostra un intero set di funzioni nell'organismo. La conoscenza a lungo termine dell'associazione della carenza di vitamina D con il rachitismo nei bambini e l'osteomalacia negli adulti ha portato a considerare il metabolismo del calcio e del fosfato e la biologia ossea come i ruoli principali della vitamina D negli esseri umani. Tuttavia, durante l'evoluzione, VDR è stato prima probabilmente coinvolto nel metabolismo energetico e nella difesa contro le infezioni, e 1,25(OH)₂D₃ è oggi considerato un importante regolatore multiforme del sistema immunitario [7]. 1,25(OH)₂D₃ è stato inizialmente collegato al cancro nel 1981, quando i gruppi di D. Feldman e T. Suda hanno segnalato il suo effetto di inibizione della proliferazione di cellule di melanoma umano coltivate e di induzione della differenziazione delle cellule leucemiche mieloidi del topo, rispettivamente [8,9]. Negli ultimi quattro decenni, molti studi hanno confermato che 1,25(OH)₂D₃ attenua il tasso di proliferazione di molti tipi di cellule tumorali, solitamente in associazione a un effetto di induzione della differenziazione. Negli ultimi anni, è stato dimostrato che 1,25(OH)₂D₃ regola il profilo di

espressione genica e il fenotipo dei fibroblasti stromali presenti nel microambiente tumorale. Inoltre, diversi studi hanno indicato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, modula la staminalità cellulare in alcuni sistemi tumorali. Qui, esaminiamo questo insieme di azioni, proponendo il $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, come un regolatore cruciale dell'omeostasi nell'organismo e come candidato per terapie antitumorali non citotossiche basate sulla regolazione della differenziazione e della staminalità delle cellule tumorali.

2. Effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla differenziazione delle cellule tumorali

2.1. Carcinomi: la transizione epiteliale-mesenchimale

I carcinomi sono il tipo di cancro solido più frequente (circa il 90%). Derivano da cellule epiteliali che, nelle prime fasi del processo tumorigenico, perdono il controllo della loro proliferazione e due caratteristiche del loro fenotipo differenziato: (i) polarità apicale-basale, che è la distribuzione differenziale di proteine e lipidi in distinte aree di superficie cellulare che in questo modo sono funzionalmente diverse, e (ii) adesività, che è la capacità di legarsi fortemente alle cellule epiteliali vicine e alla matrice extracellulare (ECM) per mezzo di una serie di strutture di adesione cellulare specializzate. La perdita di differenziazione epiteliale deriva dall'acquisizione di un programma cellulare chiamato transizione epitelio-mesenchimale (EMT). L'EMT comporta drastici cambiamenti nel modello di espressione genica, innescati da un gruppo di fattori di trascrizione indicati con la sigla EMT-TF (principalmente SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB2 e TWIST1) che causano la repressione del fenotipo epiteliale e l'induzione di uno stato mesenchimale [10,11]. Pertanto, diverse proteine di superficie delle cellule epiteliali responsabili dell'adesività, inclusi i componenti delle giunzioni aderenti come l'E-caderina (considerata un segno distintivo del fenotipo epiteliale differenziato adesivo), le giunzioni strette come le claudine e l'occludina e i desmosomi, così come i componenti del citoscheletro (citocheratine), alcune integrine leganti l'ECM e regolatori di polarità (come i complessi Crumbs, Par e Scribble), vengono sostituite da altre tipiche delle cellule fibroblastiche mobili. Queste includono l'N-caderina, un pannello distinto di integrine, la vimentina e le metalloproteasi degradanti l'ECM (MMP). Di conseguenza, le cellule epiteliali rimodellano i loro citoscheletri, perdono l'adesione cellula-cellula e cellula-ECM, cambiano in una polarità anteriore-posteriore e acquisiscono un fenotipo simile a quello fibroblastico con motilità e capacità di invasione della membrana basale [11,12]. L'EMT fornisce alle cellule tumorali altre caratteristiche di malignità, come staminalità e apoptosi ridotta, che causa resistenza alle chemioterapie e alle radioterapie citotossiche e all'immunoterapia [11]. Quindi, la comparsa di un carcinoma comporta un'iniziale aumentata capacità di proliferazione e anche la perdita del fenotipo

differenziato da parte delle cellule epiteliali che è per lo più associata al programma EMT. L'aumentata capacità di proliferazione dà origine a una massa di cellule tumorali inizialmente benigne che crescono nella loro posizione tissutale originale, mentre la perdita del fenotipo differenziato conferisce a queste cellule la capacità di migrare (il primo requisito per la disseminazione del cancro e le metastasi) e una maggiore capacità di sopravvivenza. Il processo EMT è attivato da una varietà di agenti e segnali che inducono o attivano fattori di trascrizione tipici legati all'attivazione della EMT (EMT-TF) come il fattore di crescita trasformante (TGF)- β , Wnt, Notch e ligandi di diversi recettori con attività tirosin-chinasica e recettori delle citochine. Questi segnali di solito agiscono in modo cooperativo e in molti casi sono prodotti dalle cellule stromali del microambiente tumorale [11]. L'EMT è un fenomeno reversibile e solitamente parziale. Non colpisce tutte le cellule di un tumore e non abroga completamente la polarità e l'adesività cellulare; quindi, genera eterogeneità fenotipica intratumorale. Successivamente, durante la tumorigenesi, l'EMT viene invertito dal processo opposto della transizione mesenchimale-epiteliale (MET). Ripristinando l'aggregazione cellulare e legandosi all'ECM, MET probabilmente facilita la sopravvivenza delle cellule tumorali durante la circolazione nel flusso sanguigno e la colonizzazione iniziale delle nicchie metastatiche [10,11].

2.2. Effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla differenziazione delle cellule del carcinoma

è

2.2.1. Cancro del colon

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la differenziazione epiteliale e inibisce l'EMT

In linea con il suo ruolo fisiologico nell'intestino, promuovendo l'assorbimento di calcio e fosfato, la funzione di barriera dell'epitelio intestinale e il metabolismo xenobiotico, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la differenziazione delle normali cellule epiteliali del colon attraverso la regolazione positiva di molti enzimi e marcatori epiteliali e attraverso il mantenimento della morfologia tipica del fenotipo differenziato epiteliale [14,15]. Nelle cellule del carcinoma del colon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce un cambiamento nella morfologia che aumenta l'adesione cellula-cellula e l'appiattimento cellulare (Figura 1a), che è parallelo a una diminuzione della proliferazione. Questo effetto è variabilmente profondo e direttamente correlato al livello di espressione di VDR [16,17]. Le analisi dell'immunofluorescenza e dell'espressione genica globale hanno mostrato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

sovraregola una serie di molecole di adesione intercellulare, tra cui E-caderina, induce e/o ridistribuisce diverse citocheratine che modulano il citoscheletro di actina e la rete di filamenti intermedi, modificando le fibre di stress e le strutture di legame dell'ECM [16,17]. Pertanto, controllando un ampio set di geni e proteine, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta l'adesione cellula-cellula e cellula-ECM (Figura 2). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce anche l'espressione del recettore di rilevamento del calcio (CASR) che regola l'omeostasi del calcio e la differenziazione dell'epitelio normale del colon e delle cellule del carcinoma [19,20,21,22,23]. Curiosamente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha effetti distinti sugli inibitori della differenziazione (ID)-1 e -2, due membri della famiglia di proteine ID che controllano la differenziazione, la proliferazione, la migrazione e l'invasione di molteplici tipi di cellule. Pertanto, nelle cellule di carcinoma del colon umano SW480-ADH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce ID-1 ma diminuisce l'espressione di ID-2 [24].

Uno studio approfondito ha rivelato che l'induzione della proteina E-caderina da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dipende dall'attivazione di un percorso di segnalazione extranucleare che coinvolge l'ingresso di Ca^{2+} dal mezzo esterno nel citosol e l'attivazione a cascata di un percorso che potenzia la trascrizione del gene di E-caderina. La D_3 legandosi al VDR porta all'accumulo della proteina E-caderina nelle giunzioni aderenti, con il potenziamento dell'adesione cellula-cellula [17, 25]. Il TGF- β è un forte inibitore della proliferazione delle cellule epiteliali e un importante induttore di EMT-TF in molti sistemi cellulari. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce l'induzione di EMT da parte del TGF- β nelle cellule epiteliali normali, il che impedisce la sottoregolazione dell'E-caderina [26,27]. Allo stesso modo, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ riduce l'induzione di EMT da parte di interleuchina-1 β tramite la repressione del RNA lungo non codificante lncTCF7 [28].

Antagonismo del percorso di segnalazione Wnt/ β -catenina da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Il percorso di segnalazione Wnt/ β -catenina è attivato in modo anomalo da mutazioni in quasi tutti i tumori primari del colon umano e nelle loro metastasi [29,30]. Inoltre, la stimolazione autocrina o paracrina da parte dei fattori Wnt e la ridotta espressione degli inibitori di Wnt possono potenziare questo percorso [31]. Come risultato di queste alterazioni, la proteina β -catenina si accumula all'interno del nucleo cellulare delle cellule epiteliali del colon e agisce come regolatore trascrizionale, attivando uno specifico programma di espressione genica che coincide in gran parte con quello delle normali cellule staminali intestinali [32]. Ciò porta alla dedifferenziazione epiteliale, all'induzione di EMT e all'acquisizione di staminalità. Pertanto, l'attivazione anomala del percorso Wnt/ β -catenina è responsabile dell'inizio e probabilmente anche della progressione del

cancro del colon attraverso l'aumento della sopravvivenza e della proliferazione delle cellule epiteliali del colon e la perdita del fenotipo differenziato [31,32,33].

Inizialmente nelle cellule del carcinoma del colon e successivamente in altri tipi di cellule cancerose, è stato dimostrato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antagonizza l'attivazione del percorso Wnt/ β -catenina a diversi livelli [34,16,35,36]. Un altro meccanismo di inattivazione del pathway Wnt/ β -catenina da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ deriva dall'aumento dell'accumulo della proteina E-caderina che, grazie alla sua elevata affinità, sequestra la proteina β -catenina citosolica di nuova sintesi nelle giunzioni di superficie [16].

Sono stati proposti altri meccanismi di disattivazione del pathway Wnt/ β -catenina da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [38,39].

La rilevanza del sistema della vitamina D per l'attività Wnt/ β -catenina nel cancro del colon in vivo è stata studiata per la prima volta negli animali. Larriba et al. [40] e Zheng et al. [41] hanno riferito che l'assenza di VDR (topi Vdr-deficienti) aumenta il carico tumorale del colon e la quantità di proteina nucleare β -catenina nelle cellule del cancro del colon. Questi risultati supportano un ruolo di VDR/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nella repressione del pathway Wnt/ β -catenina e nella crescita dei tumori intestinali. Ancora più importante, in uno studio clinico randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, Bostick et al. hanno dimostrato che l'integrazione con vitamina D_3 aumenta l'espressione di E-caderina e CASR, così come altri marcatori di differenziazione e geni potenzialmente protettivi, nella mucosa del colon sana di pazienti con adenomi coloretali [42,43]. Questi autori hanno anche riscontrato nella mucosa del colon del gruppo integrato con vitamina D_3 un aumento di complessi proteici, compatibile con un effetto inibitorio della vitamina D_3 sul pathway Wnt/ β -catenina [44].

Altri geni bersaglio della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sono coinvolti nella differenziazione delle cellule del cancro del colon.

Il lavoro del nostro gruppo ha portato all'identificazione di diversi mediatori dell'azione di prodifferenziazione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle cellule del carcinoma del colon. Questi mediatori includono cistatina D, miR-22, KDM6B e Sprouty-2 (SPRY2).

La cistatina D è una proteina multifunzionale che è fortemente indotta da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle cellule del carcinoma del colon tramite il legame diretto di VDR alla sua regione promotore [46].

Sorprendentemente, la sovraespressione di cistatina D induce l'espressione di E-caderina e altre proteine di adesione e reprime quella di diversi geni che codificano EMT-TF. Inoltre, la cistatina D

antagonizza il pathway Wnt/ β -catenina e inibisce la proliferazione e la migrazione delle cellule del carcinoma del colon [46].

Diversi microRNA (miR) sono regolati da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle cellule del carcinoma del colon umano. Uno di questi è miR-22, che è indotto da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e contribuisce agli effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sull'espressione genica e sulla proliferazione e migrazione cellulare [47]. Altri gruppi hanno riferito che miR-22 inibisce EMT, invasività e crescita tumorale nel cancro del colon e in alcuni altri sistemi tumorali [48,49].

KDM6B è un enzima che demetila l'istone H3 (H3K27me2/3), un segno epigenetico che di solito è correlato alla repressione genica. Abbiamo scoperto che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sovraregola il gene KDM6B attivando il suo promotore. L'abbattimento di KDM6B sottoregola la produzione di proteine di adesione cellulare, riduce l'induzione di E-caderina e la differenziazione cellulare e l'inibizione dell'attività trascrizionale della β -catenina promossa da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle cellule del carcinoma del colon [50, 51].

SPRY2 è stato scoperto essere un gene fortemente represso da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [18]. La sua proteina codificata è un modulatore della segnalazione del recettore della tirosina chinasi, con effetti inibitori o potenzianti dipendenti dal recettore e dal tipo di cellula. In sintesi, i nostri dati indicano che la repressione di SPRY2 apporta un contributo importante all'azione di prodifferenziazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [52,53,54].

Interferenza tra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ed EMT.

I dati di cui sopra indicano chiaramente che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promuove la differenziazione epiteliale e inibisce EMT nelle cellule del carcinoma del colon. Al contrario, è stato dimostrato che SNAIL1 e SNAIL2 reprimono l'espressione di VDR e aboliscono la reattività di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [55,56,57].

Pertanto, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ed EMT sono reciprocamente sottoregolati e l'equilibrio tra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e segnali che inducono EMT determina il fenotipo cellulare. A supporto di ciò, l'espressione dell'RNA VDR è correlata direttamente con la differenziazione e inversamente con l'espressione dell'RNA SNAIL1 e SNAIL2 nei tumori del colon umano [55,57,58,59,60]. Oltre ai meccanismi descritti nelle sezioni precedenti, l'antagonismo reciproco tra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ed EMT è probabilmente anche una conseguenza dell'inibizione crociata multilivello di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dei percorsi di induzione di EMT Wnt/ β -catenina, TGF- β ed EGF [34,61,62, 63, 64, 65, 66] (Figura 2). Un crosstalk funzionale simile si applica anche a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e al fattore di crescita insulino-simile (IGF)-I [61].

2.2.2. Cancro al seno

Il cancro al seno è una malattia altamente eterogenea. Due studi chiave hanno rispettivamente proposto cinque o dieci sottotipi molecolari sulla base di uno studio di espressione genica globale [67] o di un'analisi genomica e trascrittomico più completa [68]. L'analisi dell'espressione del recettore degli estrogeni (ER), del recettore del progesterone (PR) e del recettore del fattore di crescita epidermico 2 (ERBB2, NEU o HER2) è ancora la base per la stratificazione del cancro al seno e un importante determinante del fenotipo cellulare del carcinoma mammario. I tumori che mancano o esprimono livelli molto bassi di proteine ER, PR e HER2 (tumori al seno tripli negativi o TNBC) hanno la prognosi più sfavorevole e, concordantemente, le cellule ER-PR-HER2- sono altamente dedifferenziate (anaplastiche). È interessante notare che i pazienti con TNBC hanno livelli ematici di 25(OH)D molto bassi e alcuni studi in vitro e clinici suggeriscono la possibilità di un effetto protettivo di 1,25(OH)₂D₃ contro il TNBC [69].

1,25(OH)₂D₃ contribuisce allo sviluppo e alla funzione normale della ghiandola mammaria [70]. Di conseguenza, VDR è espresso nel tessuto mammario normale e in molte, ma non tutte, le linee cellulari e i tumori del carcinoma mammario [71,72,73,74]. Diverse eccellenti revisioni hanno riassunto gli effetti di 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule del cancro al seno, sui modelli animali e sui pazienti [70,75,76,77]. Lo studio degli effetti di 1,25(OH)₂D₃ in linee cellulari di carcinoma mammario umano ha rivelato che la vitamina D₃ induce un cambiamento specifico nella morfologia delle cellule (Figura 1b) e nell'espressione genica. In alcuni casi, 1,25(OH)₂D₃ altera la citoarchitettura dei filamenti di actina e dei microtubuli e induce estensioni citoplasmatiche (filopodi e lamellipodi). Aumenta inoltre l'adesione cellulare al substrato [72,78]. Altri studi hanno descritto l'inibizione da parte di 1,25(OH)₂D₃ della migrazione delle cellule del carcinoma mammario, dell'invasione e delle capacità metastatiche attraverso una riduzione dell'espressione e/o dell'attività della N-caderina, dei componenti dell'ECM, di diverse metalloproteasi (MMP-1, MMP-9) [79,80,81,82,83,84]. Inoltre, la sovraespressione della proteina adattatrice del citoscheletro di actina, indicata con la sigla PDLIM2, è fondamentale per le azioni pro-adesive, antimigratorie e anti-invasive di 1,25(OH)₂D₃ nelle cellule del cancro al seno [85]. Contrariamente alla sua induzione nelle cellule del carcinoma del colon [24], 1,25(OH)₂D₃ sopprime l'espressione di ID-1 nelle cellule del carcinoma mammario umano, il che contribuisce presumibilmente a promuovere la differenziazione [86].

2.2.3. Altri tumori solidi

Come nei tumori del colon e del seno, 1,25(OH)₂D₃ induce la differenziazione cellulare, sensibilizza

all'apoptosi e inibisce la proliferazione, la migrazione e l'invasione in una serie di altre neoplasie solide. Ancora una volta, i suoi effetti sulla differenziazione sono in gran parte dovuti all'inibizione dell'EMT e all'antagonismo delle vie Wnt/ β -catenina, EGF e TGF- β .

L'antagonismo del percorso Wnt/ β -catenina da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stato descritto in diversi tumori solidi come conseguenza di una varietà di meccanismi [89,90,91]. Nelle cellule del carcinoma tiroideo anaplastico [92], nelle cellule del carcinoma ovarico [93], nelle cellule dell'adenocarcinoma polmonare [94] e nelle cellule del carcinoma renale [88] sono stati segnalati da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (o agonisti del VDR) l'inibizione del percorso TGF- β e la successiva repressione degli EMT-TF e la sovraregolazione dei marcatori epiteliali. Allo stesso modo, gli agonisti VDR reprimono la segnalazione EGF nelle cellule del carcinoma a cellule squamose [95], nelle cellule epidermoidi [96] e nei cheratinociti psoriasici [97]. Nel complesso, questi effetti mostrano che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è un forte promotore multiforme della differenziazione delle cellule del carcinoma umano. Come discusso da Gocek e Studzinski [75], l'effetto prodifferenziante di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle cellule del carcinoma non determina il ripristino di un fenotipo epiteliale normale completo, ma probabilmente ha un'azione antitumorale dovuta alla associata diminuzione della proliferazione delle cellule del carcinoma; sopravvivenza; e capacità migratorie, invasive e metastatiche.

2.3. Effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla differenziazione delle cellule tumorali ematologiche

Come nei tumori solidi, la carenza di vitamina D è comune tra i pazienti con neoplasie ematologiche e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e altri agonisti VDR inibiscono la proliferazione delle cellule di leucemia, linfoma e mieloma, oltre a favorire la loro apoptosi in seguito a trattamenti citotossici. Un effetto ampiamente riportato di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in queste cellule è l'inibizione della segnalazione STAT-1 e STAT-3 e la successiva repressione di un gran numero di citochine [75,98]. Tuttavia, l'induzione della differenziazione sembra essere un meccanismo protettivo meno importante di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle neoplasie ematologiche rispetto ai tumori solidi. Sebbene VDR sia espresso da tutti i tipi di cellule immunitarie, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce quasi esclusivamente la differenziazione delle cellule della leucemia mieloide [99,100]. La maggior parte dei risultati è stata ottenuta nelle linee cellulari della leucemia mieloide acuta (LMA) HL60, THP-1 e U937. Pertanto, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta l'espressione di marcatori del fenotipo monocita-macrofago, come CD14 e alcune proteine coinvolte nella fagocitosi e nell'aderenza al substrato, tra cui CD11b [75,98]. Sono stati proposti numerosi geni e proteine come mediatori di questa azione di prodifferenziazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

[101,102,103,104,105,106,107]. Sono stati riportati anche effetti di prodifferenziazione degli agonisti VDR in colture di cellule del linfoma non-Hodgkin follicolare, con aumentata espressione di marcatori delle cellule B mature [108].

3. Effetti di 1,25(OH)₂D₃ sulla differenziazione dei fibroblasti stromali tumorali

Sebbene l'importanza cruciale del microambiente tumorale durante tutte le fasi della carcinogenesi sia oggi ampiamente accettata, gli studi sull'azione di 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule stromali tumorali sono scarsi. I fibroblasti associati al cancro (CAF) sono il tipo di cellula più abbondante nel microambiente tumorale. Dati recenti indicano che i CAF sono una popolazione eterogenea di cellule generate da origini diverse in risposta a segnali secreti dalle cellule tumorali o da altre cellule dello stroma tumorale. Pertanto, possono avere origine dal cambiamento fenotipico (attivazione) dei fibroblasti residenti, dal reclutamento e dall'attivazione dei fibrociti derivati dal midollo osseo e delle cellule staminali mesenchimali, o dalla transdifferenziazione di altri tipi cellulari (cellule epiteliali, endoteliali o muscolari lisce, adipociti o periciti) [109,110]. Di solito, ma non sempre, i CAF hanno effetti promotori del tumore che favoriscono la malignità delle cellule tumorali alterando l'ECM e secernendo fattori protumorigenici e di resistenza ai farmaci [109,111]. Sono possibili diverse strategie per la terapia antitumorale diretta dai CAF [110]. Poiché l'eliminazione dei CAF ha inaspettatamente determinato un'accelerazione del cancro al pancreas [112,113], l'opzione della loro disattivazione o riprogrammazione a un fenotipo meno protumorigenico è diventata attraente. In questo contesto, è stato riportato che l'agonista VDR calcipotriolo inibisce l'attivazione delle cellule stellate pancreatiche e la differenziazione in miofibroblasti, e quindi riduce l'infiammazione e la fibrosi in un modello murino di pancreatite e aumenta l'efficacia della terapia antitumorale in un modello di cancro al pancreas [114]. Allo stesso modo, il calcipotriolo riduce l'infiammazione e la fibrosi del fegato attraverso l'inibizione dell'attivazione delle cellule stellate epatiche [115,116]. Di conseguenza, altri effetti protettivi dell'1,25(OH)₂D₃ contro la fibrosi sono stati descritti e riassunti altrove [62]. Uno studio globale sull'espressione genica, eseguito con CAF umani isolati da biopsie tumorali di cinque pazienti con cancro al seno, ha identificato 123 geni regolati dall'1,25(OH)₂D₃ [117]. Questa firma genetica riflette un effetto antiproliferativo e antinfiammatorio di 1,25(OH)₂D₃, poiché include la downregulation del fattore di crescita nervoso NRG1 e di altri geni con effetti di promozione della proliferazione. Recentemente, uno studio progettato per caratterizzare gli effetti di 1,25(OH)₂D₃ sui fibroblasti stromali del cancro del colon ha prodotto alcuni dati interessanti [118]. In primo luogo,

l'analisi delle biopsie tumorali di 658 pazienti ha mostrato che un'elevata espressione di VDR nei CAF è associata a una migliore sopravvivenza complessiva e libera da progressione del paziente, indipendentemente dal livello di espressione di VDR nelle cellule del carcinoma. In secondo luogo, un'analisi dell'espressione genica di sette colture primarie di CAF e fibroblasti normali derivate da biopsie di pazienti con cancro al colon ha rivelato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ impone nei CAF una firma di 48 geni che si correla a una maggiore sopravvivenza del paziente. Circa mille geni sono regolati da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nei CAF e nei fibroblasti normali, con una sovrapposizione del 21%. I geni target $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identificati sono coinvolti nell'adesione cellulare, nella differenziazione e nella migrazione; nel rimodellamento dei tessuti; nello sviluppo dei vasi sanguigni e nella risposta infiammatoria. Questi geni codificano principalmente per componenti ECM e citochine. In terzo luogo, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce due proprietà protumorali nei CAF e nei fibroblasti normali: l'azione promigratoria paracrina sulle cellule del carcinoma e la capacità di contrarre gel di collagene, che è considerata un segno distintivo dell'attivazione fibroblastica [118] (Figura 2). Questi risultati mostrano che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promuove una profonda riprogrammazione del profilo di espressione genica dei CAF, che porta all'inibizione del loro fenotipo protumorale e contribuisce alla protezione contro il cancro del colon. Inoltre, questo studio rivela che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ attenua il fenotipo maligno delle cellule del carcinoma del colon non solo tramite un effetto diretto su queste cellule, ma anche indirettamente attraverso la disattivazione dei CAF. Concordemente, l'analisi di un'ampia coorte di pazienti con cancro del colon ha indicato che l'espressione di VDR nei CAF e nelle cellule del carcinoma ha un effetto protettivo additivo, estendendo la sopravvivenza complessiva dei pazienti [118]. Questi risultati sono clinicamente rilevanti, in quanto indicano che i pazienti affetti da cancro del colon possono trarre beneficio da un adeguato livello di vitamina D o dal trattamento con agonisti del VDR, a condizione che i loro CAF esprimano il VDR, anche se le loro cellule tumorali possono essere carenti di VDR, ad esempio a causa della sovraregolazione delle proteine della famiglia SNAIL.

Sorprendentemente, la regolazione da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ delle molecole di segnalazione (citochine, fattori di crescita) secrete dai CAF suggerisce che potrebbe anche influenzare la biologia delle cellule del carcinoma e di altri tipi di cellule nel microambiente tumorale, come le cellule immunitarie ed endoteliali, in modo paracrina. In linea con questi dati, Kong et al. [119] hanno riferito che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminuisce la quantità di miR-10a-5p trovata negli esosomi secreti dai CAF pancreatici umani, il che attenua gli effetti promigratori e pro-invasivi che questi CAF esercitano sulle cellule del carcinoma pancreatico. In particolare, è stata anche segnalata la possibile interazione tra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e Wnt3A nei fibroblasti del colon. Entrambi gli agenti sono forti

regolatori del profilo di espressione genica e del fenotipo di queste cellule [120,121]. Questi risultati mostrano che l'azione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si estende ai fibroblasti stromali tumorali e che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è un importante regolatore della differenziazione CAF. Insieme ad altri risultati, che suggeriscono effetti anti-infiammatori e anti-angiogenici di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello di cellule immunitarie ed endoteliali [122], ampliano l'azione di pro-differenziazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alle cellule del microambiente tumorale, il che può avere importanti conseguenze sullo sviluppo del cancro.

4. Effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle cellule staminali cancerose

Il concetto di cellule staminali cancerose (CSC) afferma che i tumori vengono avviati, progrediscono e probabilmente diventano resistenti alle terapie a causa dell'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche nelle cellule staminali tissutali che diventano CSC. Ciò ha portato a indagini focalizzate sull'identificazione di marcatori di cellule staminali indifferenziate in ogni tessuto che potrebbero essere utilizzati per isolare e colpire specificamente le CSC con farmaci o anticorpi appropriati. Tuttavia, sebbene alcuni marcatori relativamente selettivi siano stati identificati in alcuni tipi di cancro, l'idea di coltivare o colpire le CSC specifiche del tumore si è scontrata con la scoperta della plasticità delle cellule staminali. Questo termine si riferisce alla dedifferenziazione delle cellule in stadi di differenziazione intermedi o addirittura terminali, al fine di ripristinare il compartimento delle cellule staminali a seguito di una lesione letale nei tessuti normali, o come conseguenza dell'acquisizione di alterazioni genetiche e/o in risposta a segnali dal microambiente tumorale nel cancro [123,124,125]. Pertanto, la staminalità è oggi considerata uno stato cellulare solitamente transitorio che si perde nel processo di differenziazione. Le cellule differenziate possono riacquistare le proprietà di staminalità quando il serbatoio delle cellule staminali deve essere rigenerato. Di conseguenza, non sembrano esistere CSC stabili all'interno dei tumori che possano essere isolate e studiate come target ottimali per le terapie antitumorali [126]. Diversi studi hanno riportato che gli agonisti VDR inibiscono la formazione di sferoidi galleggianti chiamati mammosfere (una caratteristica attribuita alle CSC) nelle cellule staminali del cancro al seno ottenute da linee cellulari stabilite. È interessante notare che questo effetto potrebbe essere superato dalla sovraespressione della β -catenina, il che suggerisce che l'inibizione del pathway Wnt/ β -catenina media questa azione degli agonisti VDR [127]. Allo stesso modo, nelle cellule umane del cancro al seno triple negative e basali, l'analogo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ BXL0124 riduce l'efficienza di formazione delle mammosfere e riduce l'espressione dei marcatori di staminalità

(OCT4, CD44) e dei geni del pathway Notch (NOTCH1, JAG1/2) [128,129,130]. Inoltre, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha impoverito la sottopopolazione di cellule staminali cancerose presenti in una linea cellulare di cancro ovarico umano [131,132].

Gli studi di cui sopra condividono la debolezza dell'analisi degli effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle popolazioni cellulari che sono arricchite nelle caratteristiche delle cellule staminali ma che sono isolate da linee cellulari immortalizzate che sono cresciute in coltura per lungo tempo. Gli organoidi assomigliano chiaramente di più alla situazione in vivo, poiché sono strutture tridimensionali generate da cellule staminali primarie normali o cancerose isolate da pazienti in coltura. Il nostro gruppo ha recentemente descritto gli effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sugli organoidi normali e tumorali del colon umano, generati da biopsie di tessuto sano e tumorale ottenute da pazienti con cancro del colon [134]. Sorprendentemente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la differenziazione cellulare negli organoidi tumorali del colon modificando il loro tipico aspetto di cellule blastiche in un fenotipo differenziato più epiteliale che include strutture di adesione cellula-cellula, eterocromatina, villi, abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, complessi del Golgi e vacuoli autofagici [134] (Figura 1c).

L'analisi globale dell'RNA trascrittomico ha rivelato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promuove negli organoidi tumorali del colon e del retto la repressione dei geni coinvolti nella proliferazione e nella tumorigenesi (Figura 2) [134,135]. Tuttavia, inaspettatamente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ non modula sostanzialmente l'espressione dei geni target di staminalità o Wnt/ β -catenina. Al contrario, negli organoidi normali del colon e del retto, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sovraregola diversi geni chiave di staminalità e non influenza il fenotipo cellulare indifferenziato, regola negativamente i geni di differenziazione [134, 135]. Questo indica un'azione omeostatica di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla popolazione di cellule staminali normali in entrambe le aree intestinali (colon e retto) [135]. Altri studi [136,137,138, 139] indicano che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita un'azione omeostatica nelle cellule staminali normali del colon e un effetto prodifferenziante sulle CSC del colon.

Recentemente, è stato scoperto che una ridotta espressione di VDR è associata a una differenziazione compromessa dei progenitori mieloidi e a un fattore prognostico negativo nella leucemia mieloide acuta (LMA). La repressione VDR osservata è dovuta principalmente alla metilazione del promotore genico, che blocca la differenziazione e promuove l'auto-rinnovamento e la proliferazione nelle cellule precursori mieloidi. Di conseguenza, gli agonisti VDR inibiscono la staminalità cellulare nel midollo osseo normale e nella LMA [140].

5. Conclusioni

Il metabolita attivo della vitamina D $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e altri agonisti VDR sintetici sono agenti di differenziazione che impongono uno stato epiteliale nelle cellule del carcinoma in gran parte attraverso l'induzione di proteine epiteliali chiave e l'inibizione dell'EMT. Il lavoro svolto prevalentemente sul cancro del colon e del seno mostra che l'inibizione dell'EMT è principalmente una conseguenza dell'antagonismo che queste molecole esercitano sulle vie di segnalazione Wnt/ β -catenina, TGF- β ed EGF. Inoltre, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modifica profondamente il profilo di espressione genica dei fibroblasti stromali tumorali. Attenua il loro fenotipo attivato e diminuisce i loro effetti protumorali. Esercita anche azioni di prodifferenziazione sulle CSC. Nel complesso, questi dati indicano che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o gli agonisti VDR in generale, sono candidati per strategie di differenziazione del cancro.