

Cod proiect: **PN-III-P1-1.1-TE-2016-1352**

Director proiect: **Imola Wilhelm**

Instituție: **Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" Arad**

Titlu: **Interacțiunea pericitelor cu celulele de melanom și carcinom mamar în timpul formării metastazelor cerebrale**

Acronim: **PERI_mel_br-c**

Raport 3

Octombrie 2020

Scopul principal al acestui proiect a fost înțelegerea mecanismelor interacțiunii dintre pericitele cerebrale și celulele tumorale de melanom și de carcinom mamar triplu negativ în cadrul formării metastazelor cerebrale.

Etapa a 3-a a proiectului a fost axată pe determinarea contactelor dintre celulele tumorale cu pericitele cerebrale și membrana bazală.

Folosind modele experimentale *in vivo* am observat că celulele metastatice – după ce trec prin peretele endotelial al capilarelor – se acumulează și se înmulțesc în nișa perivasculară. Celulele tumorale traversează nu numai celulele endoteliale, dar și piciorușele astrocitare care formează așa numita *glia limitans*. În paralel cu înmulțirea celulelor de carcinom și creșterea tumorii, astrocitele își retrag piciorușele, care vor acoperi suprafața externă a tumorii. Între timp, capilarele sunt co-optate de celulele tumorale pentru a le asigura vascularizația. Aceste vase co-optate de tumoră păstrează pericitele atașate de peretele vascular, iar aceste pericite asigură sursa de proteine de adeziune și factori de creștere.

În aceste condiții când astrocitele – care au un rol important în secreția membranei bazale – sunt excluse din masa tumorală, pericitele vor deveni principalul tip celular responsabil pentru formarea matricei extracelulare, de care aderă celulele tumorale. Având în vedere faptul că atașarea celulelor metastatice de membrana bazală este esențială în supraviețuirea lor, pericitele au un rol decisiv în formarea metastazelor cerebrale prin secretarea colagenului de tip IV și a fibronectinei.

Nu am găsit contacte de tip N-caderină - N-caderină sau joncțiuni gap între pericitele cerebrale și celulele tumorale. La fel, nici eliberarea exosomilor de către pericite nu a avut efecte semnificative asupra celulelor tumorale. Rezultatele noastre arată că interacțiunile dintre cele două tipuri de celule (mai specific: efectele pericitelor

asupra celulelor tumorale) sunt mediate în primul rând de factorii secretați de pericite, cum ar fi factorul de creștere IGF-2 și proteinele membranei bazale.

Pericitele eliberează și factori chemoatractivi care încurajează celulele tumorale să migreze în direcția lor. Astfel, celulele de carcinom mamar sunt capabile să parcurgă un drum de mai mult de 1 cm *in vitro* ca să formeze colonii între pericite. Tot cu ajutorul modelelor *in vitro* am demonstrat că celulele de carcinom mamar (dar nu și cele de melanom) se atașează de preferință de pericite.

În ceea ce privește diseminarea rezultatelor, în perioada raportată am publicat cinci articole ISI având factorul de impact cumulativ 24,407. Dintre acestea aș sublinia articolul Molnár *et al.* Mol Oncol 2020 (doi: 10.1002/1878-0261.12752), în care am descris rolul pro-metastatic al pericitelor cerebrale, în principal importanța factorului de creștere IGF-2 secretat de pericite.

În ansamblu, în perioada octombrie 2018-octombrie 2020 am realizat în totalitate planul experimental al proiectului așa cum ne-am propus. Rezultatele cele mai importante sunt următoarele:

1. Transmigrarea celulelor tumorale prin bariera hemato-encefalică se poate realiza atât prin calea paracelulară (în cazul celulelor de melanom, și mai puțin în cazul celulelor de carcinom mamar), cât și prin calea transcelulară (în cazul celulelor de carcinom mamar). Celulele tumorale traversează nu numai celulele endoteliale, dar și piciorușele astrocitare, care ulterior vor fi retrase la limita dintre masa tumorală și parenchimul cerebral. Pericitele sunt co-optate împreună cu endoteliul microvascular cerebral (Fig. 1).
2. Pericitele au un efect chemoatractiv asupra celulelor de carcinom mamar, facilitând migrarea lor spre pericite, aderarea lor la pericite și formarea de colonii între pericite (Fig. 2).
3. Pericitele promovează adeziunea celulelor de melanom și de carcinom mamar la membrana bazală (sau la suprafața de cultură *in vitro*; Fig. 3), asigurând supraviețuirea lor în mediul cerebral. În paralel, se produce fosforilarea proteinelor Src și FAK în celulele tumorale.
4. Pericitele intensifică foarte semnificativ rata de proliferare a celulelor de carcinom mamar (dar nu și a celulelor de melanom) (Fig. 4) prin activarea căilor de reglare IGF în celulele carcinoame mamare (Fig. 5 și Fig. 6).

Astfel, am demonstrat pentru prima dată impactul clar pro-metastatic al pericitelor cerebrale, prin încurajarea adeziunii și/sau proliferării celulelor tumorale la nivel

cerebral. Aceste rezultate au o importanță deosebită, deoarece oferă noi ținte posibile care vor putea fi exploatare în viitor în tratamentul acestei boli devastatoare. În acest sens, inhibarea axei IGF2-IGF1R reprezintă o posibilitate reală în tratamentul metastazelor cerebrale de carcinom mamar dat fiind faptul că inhibitorul PPP/AXL1717 scade efectiv numărul celulelor de carcinom în creier (cel puțin în modelul *in vivo*), nu este toxic și are capacitatea de a trece prin bariera hemato-encefalică.

Pe întreaga durată a proiectului am publicat opt articole ISI având factorul de impact cumulat 39,72.

FIGURI:

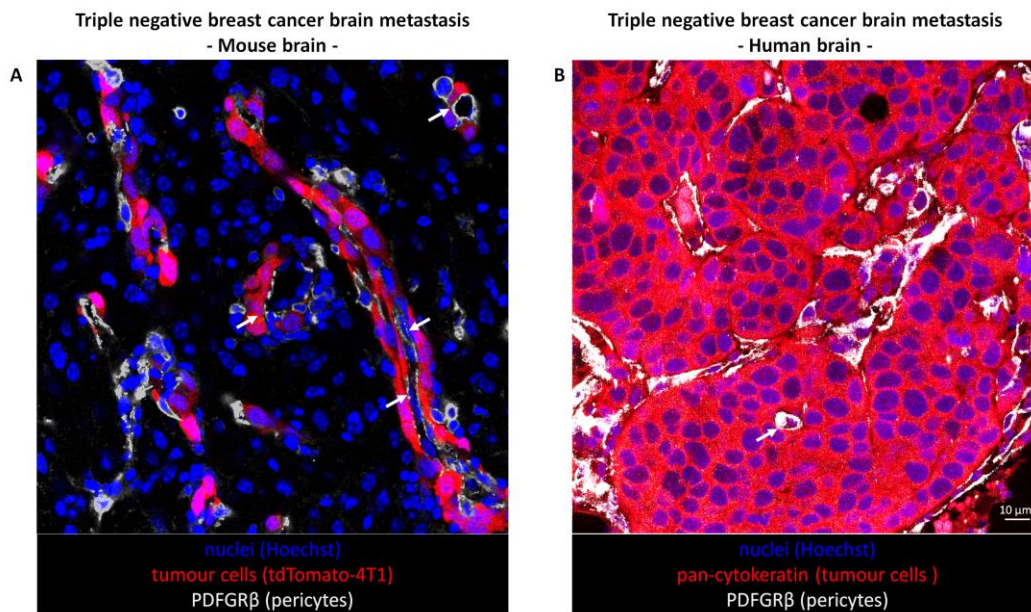


Fig. 1. Co-optarea pericitelor de către celulele de carcinom mamar la șoareci și în metastazele cerebrale umane.

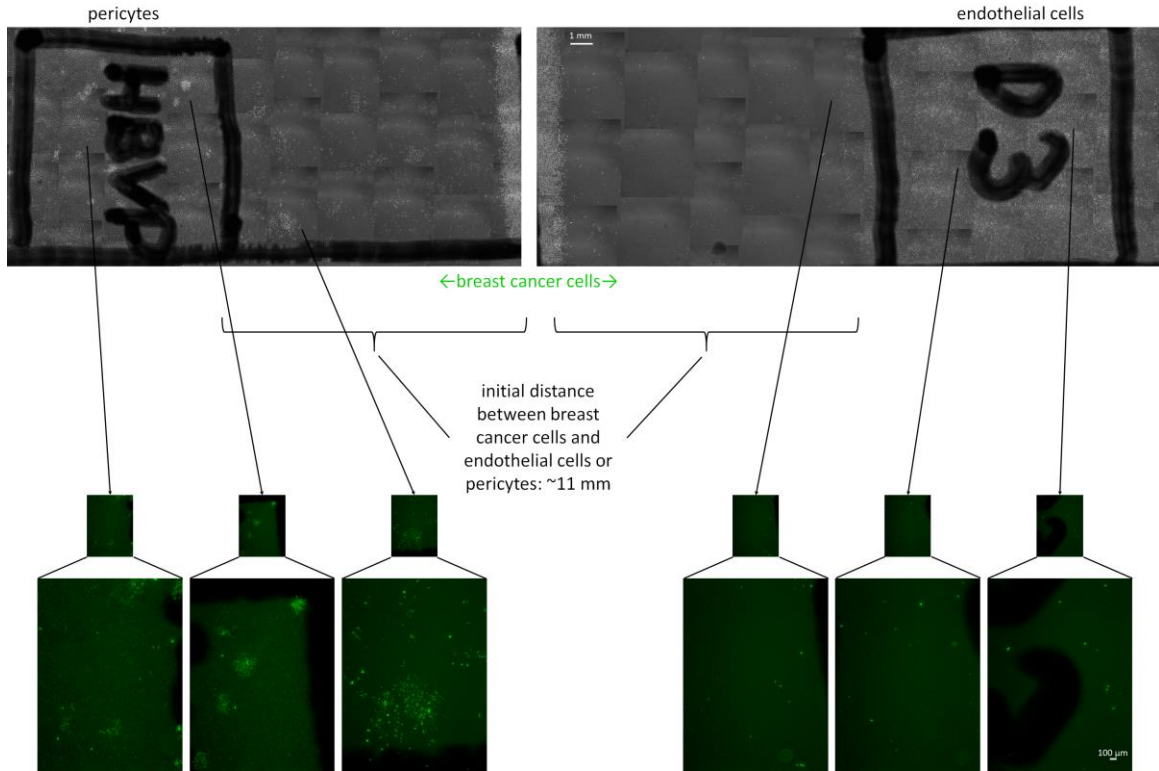


Fig. 2. Migrarea celulelor de carcinom mamar triplu negativ (EGFP-MDA) în direcția pericitelor (HBVP) și a celulelor endoteliale cerebrale (D3).

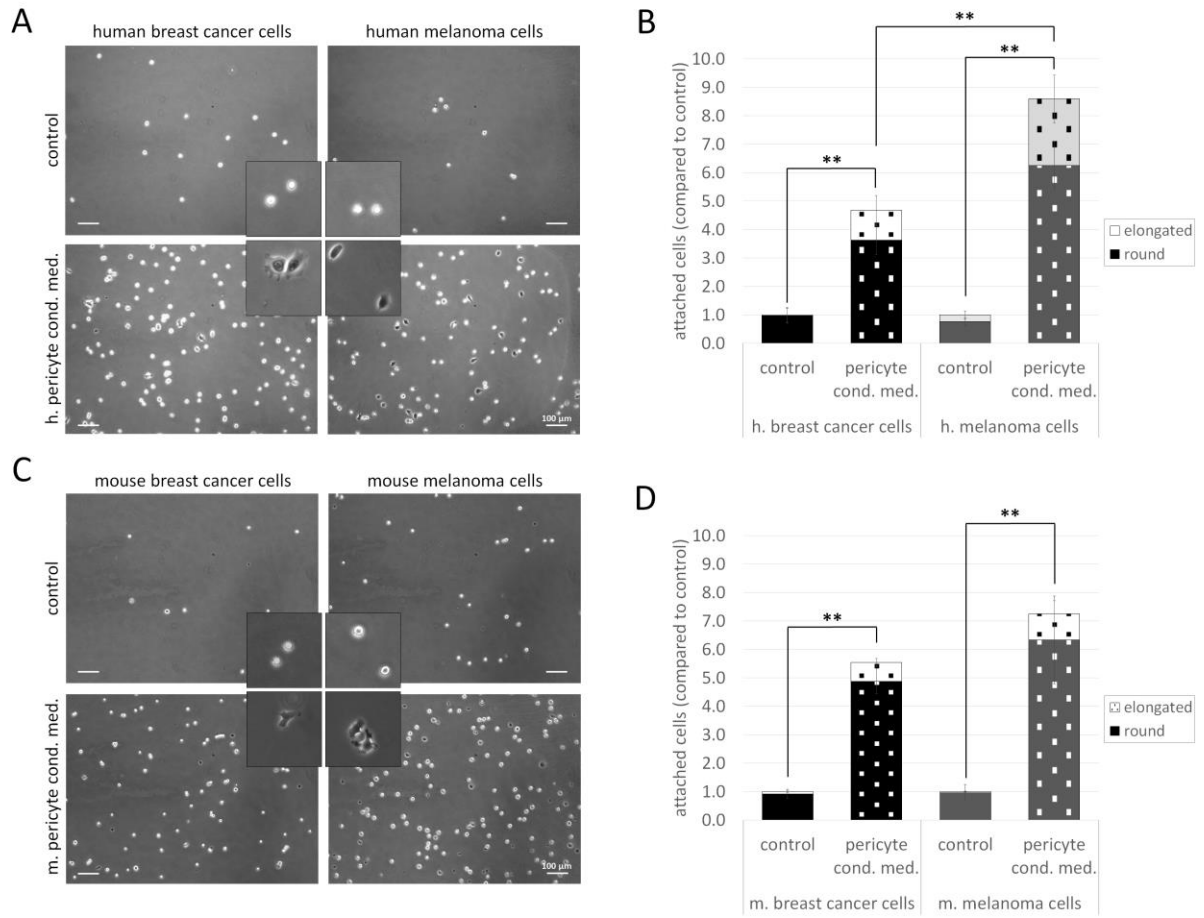


Fig. 3. Aderența celulelor de carcinom mamar și de melanom în absența sau prezența factorilor secretați de pericyte, în modelele umane și de șoareci *in vitro*.

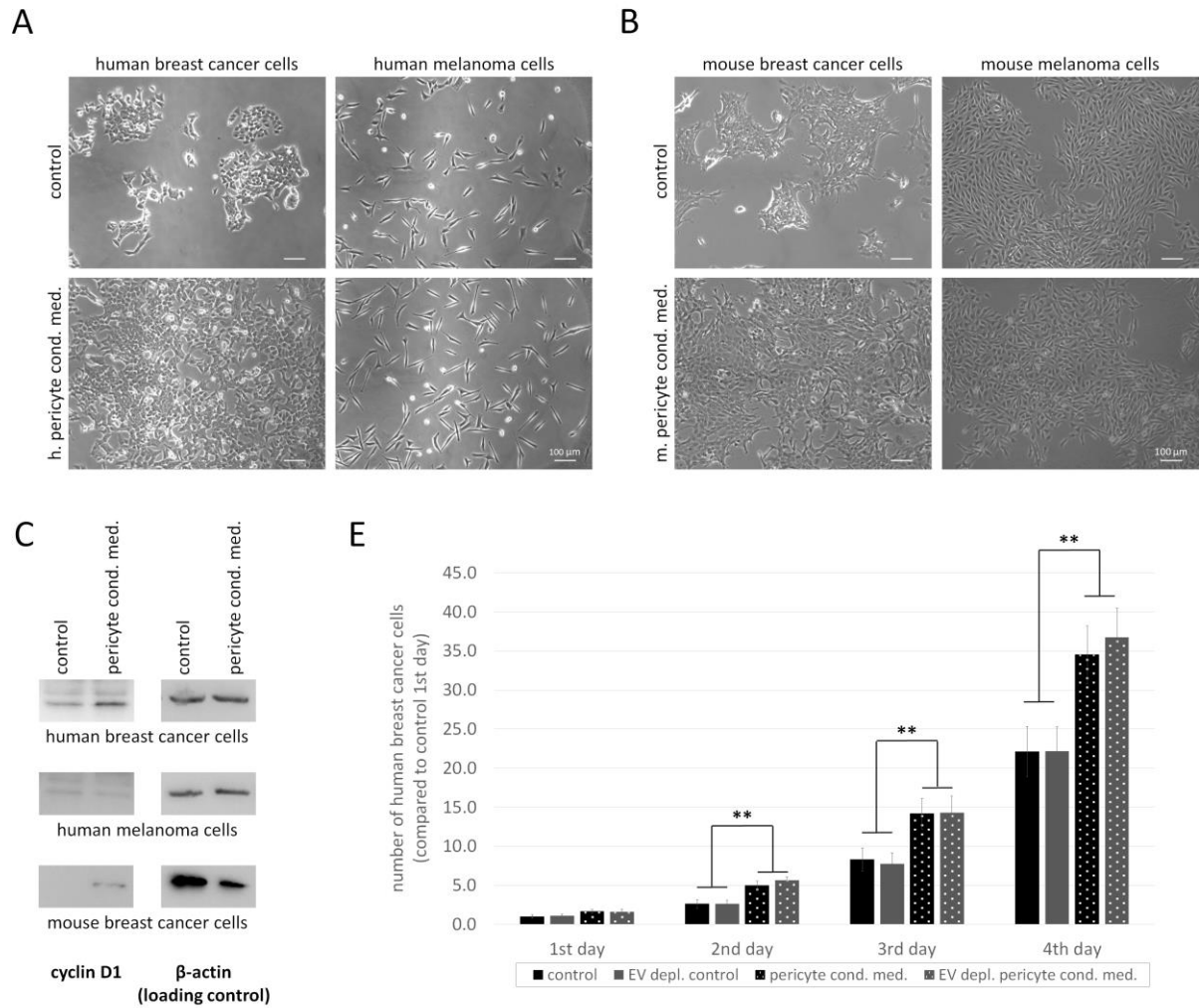


Fig. 4. Proliferarea celulelor de carcinom mamar și de melanom în absența sau prezența factorilor secretați de pericite, în modelele umane și de șoareci *in vitro*. Creșterea expresiei proteinei ciclina D1. EV = extracellular vesicles/exosomes (vezicule extracelulare/exosomi)

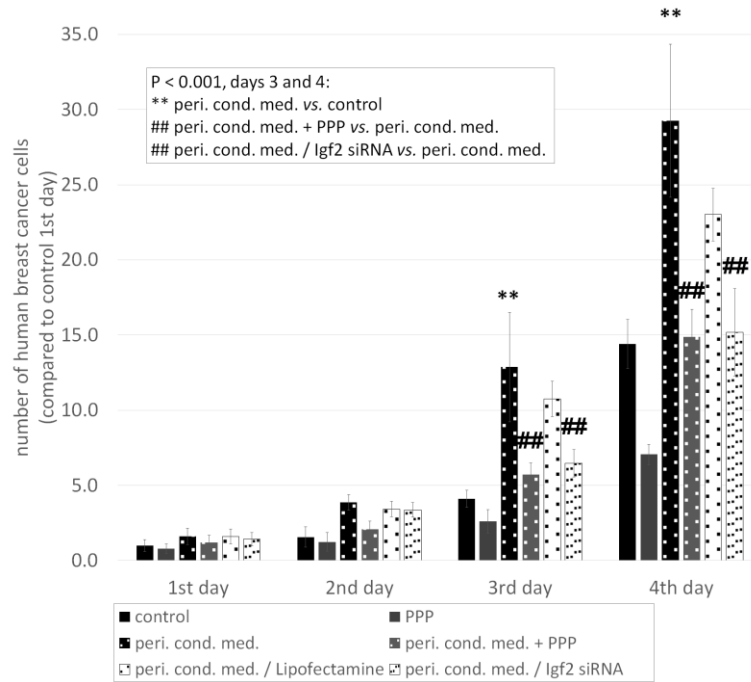
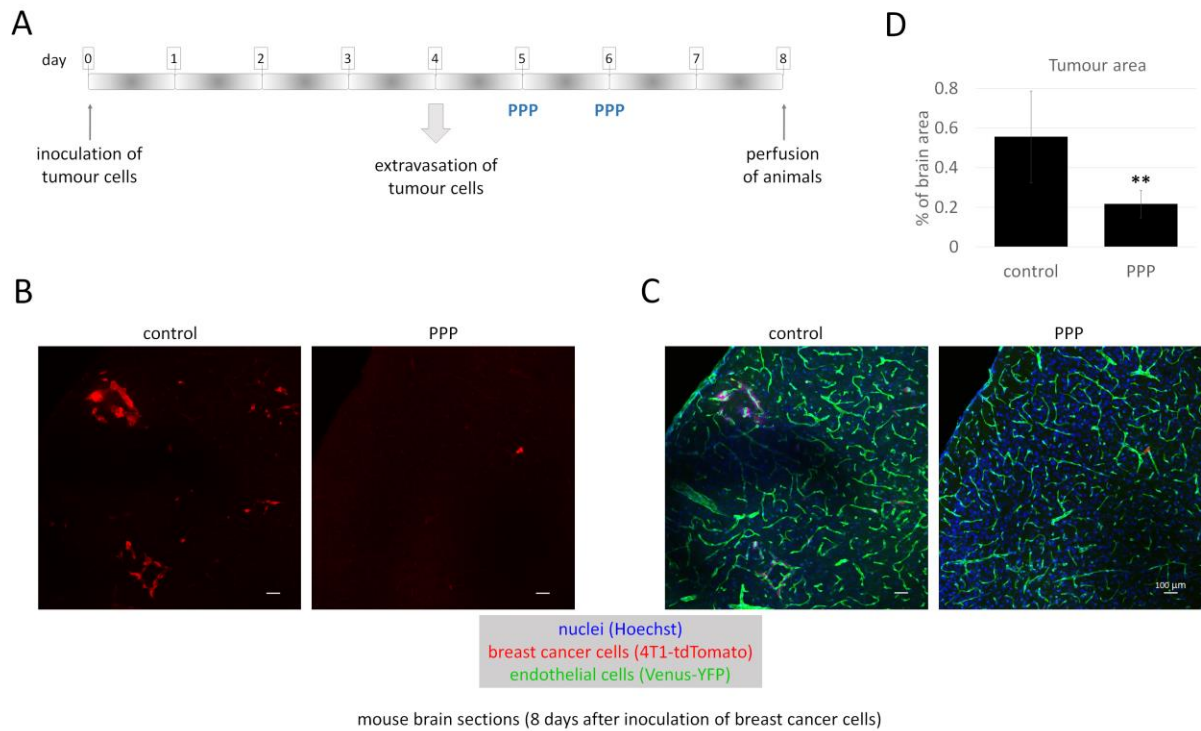


Fig. 5. Rolul proteinei IGF2 în proliferarea celulelor de carcinom mamar indusă de pericite.



mouse brain sections (8 days after inoculation of breast cancer cells)

Fig. 6. Rolul inhibării căilor de reglare IGF în proliferarea celulelor de carcinom mamar în parenchimul cerebral. PPP = picropodophyllin (inhibitor al receptorului IGF1R)