



DIREZIONE GENERALE

BILANCIO DI ESERCIZIO 2022

RELAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE

(ex art. 32, L.R. 38/1994 e art. 26. D. Lgs. 118/11)

PREMESSA

L'Ente Ospedaliero "Saverio de Bellis" di Castellana Grotte (BA) è un I.R.C.C.S. di diritto pubblico con specializzazione in gastroenterologia riconosciuto con D.M. del 31 marzo 1982 che opera in Puglia nell'ambito del servizio sanitario nazionale.

A marzo 2008 è stata inaugurata la nuova sede dell'Istituto che ha estensione di circa 19.200 mq e risponde meglio alle moderne esigenze assistenziali.

L'Istituto è in possesso della certificazione di qualità ISO 9001:2009 n°IQ-1208-14 a partire dal 24.12.2009 e della certificazione dei Bilanci di Esercizio 2019/2021.

Il Bilancio di Esercizio 2022 è stato redatto secondo i principi della Contabilità Economico-Patrimoniale in conformità agli artt. 2423 e seguenti del Codice Civile, tenuto conto del Decreto Interministeriale del 20.10.94 integrato dal D. Lg.vo n. 229 del 19.06.99, nonché del D. LGS. n. 118/2011 e ss. mm. e ii.

Il Presente Bilancio è predisposto e adottato vista la

L. 27/04/2020 n. 27 e ss. mm e ii;

Le note inviate dal Dipartimento Promozione della Salute, del Benessere Sociale e del Benessere Animale Sez. Amministrazione Finanza e Controllo in Sanità – Sport per Tutti:

AOO_168/n. 2674 del 03/03/2023;

AOO_168/n. 2760 del 04/04/2023;

AOO_168/n. 3018 del 18/04/2023;

AOO_168/n. 3066 del 20/04/2023, relativa alle assegnazioni provvisorie;

AOO_168/n. 3121 del 26/04/2023, relativa all'aggiornamento scadenze adozione Bilancio 2022;

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





AOO_168/n. 3601 del 26/05/2023, relativa alle assegnazioni definitive, nonché di autorizzazione alla perdita conseguita;

AO_168/n. 3653 del 30/05/2023, relativa al Contributo ripiano perdita.

Visti:

la **L.R. n. 36/94** “Norme e principi per il riordino del Servizio, sanitario regionale in attuazione del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502 «Riordino della disciplina in materia sanitaria, a norma dell'articolo 1 della legge 23 ottobre 1992, n. 421», così come modificato dal decreto legislativo 7 dicembre 1993, n. 517”;

la **L.R. n. 38/94** “Norme sull'assetto programmatico, contabile, gestionale e di controllo delle Unità sanitarie locali in attuazione del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502 «Riordino della disciplina in materia sanitaria, a norma dell'art. 1 della legge 23 ottobre 1992, n. 421», così come modificato dal decreto legislativo 7 dicembre 1993, n. 517”.

La relazione è predisposta al fine di porre in evidenza gli elementi principali che hanno caratterizzato la struttura dell'Ente, l'attività svolta e il Bilancio al 31 dicembre 2022.

Al fine di rendere agevole la lettura e l'analisi dei dati economici, la relazione include inoltre:

- l'analisi degli scostamenti dei dati economici al 31.12.2022, raffrontati con il Bilancio di Previsione adottato con Deliberazione del Direttore Generale n. 532/2021;
- l'analisi degli scostamenti dei dati economici al 31.12.2022, raffrontati con il conto economico consuntivo al 31.12.2021.

Tutto ciò premesso, si relaziona quanto segue.

Il Bilancio di Esercizio 2022 rileva una perdita pari a € 9.925.837.

Tale risultato di esercizio è da considerarsi conseguito nell'ottica di rivisitazione dei processi gestionali delle aziende del SSN, così come avviata dalla L. n. 208/2015, Leggi di Stabilità - commi 524 e 525 in materia di “Piano di Rientro Aziendale”, e rivisti dal c. 390 della L. n. 232/2016, ancora in corso di definizione e perfezionamento dell'iter attuativo, sia in quella introdotta dall'art. 53, L.R. n. 1/2016.

Nelle pagine che seguono sono fornite notizie generali sulle attività assistenziali e scientifiche dell'Istituto rendendo di agevole lettura l'analisi dei dati economici con i principali scostamenti rispetto al budget 2022 ed al conto economico consuntivo al 2021.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



I commenti e le analisi sulle variazioni economiche e finanziarie saranno supportati da schede di dettaglio incluse nella presente relazione.

Lo schema di conto economico e stato patrimoniale utilizzato è quello di cui al D. lgs.vo n. 118/2011 e ss. mm. e ii.

DATI DI STRUTTURA E DI ATTIVITA'

Con deliberazione G.R. n. 53 del 23.01.2018 sono stati attribuiti all'Istituto n. 124 posti letto come di seguito rappresentato:

STRUTTURE OPERATIVE	POSTI LETTO
CHIRURGIA GASTROENTEROLOGICA	60 (15 non attivi)
GASTROENTEROLOGIA	44
RIANIMAZIONE E TERAPIA INTENSIVA	12
ONCOLOGIA	14 (4 non attivi)
MALATTIE DEL METABOLISMO – NUTRIZIONE CLINICA – CENTRO DI RICERCA PER L'OBESITA'	6 (non attivi)
TOTALE	136 (di cui 25 non attivi ancora)

Questa Direzione ha avviato nell'Esercizio in esame una serie di attività e di investimenti utili a potenziare l'unità operativa semplice a valenza dipartimentale di Oncologia, ritenuta strategica per l'Ente. Tale unità altamente qualificante nonché funzionale alla domanda di assistenza riveniente dal territorio ha permesso di attivare finalmente i posti letto di ricovero ordinario ed espandere l'offerta assistenziale, precedentemente limitata alle prestazioni in DH e ambulatoriali. È stata inoltre avviata la riorganizzazione della Chirurgia, anche nella sua ulteriore specializzazione Bariatrica, che determinerà i primi risultati in termini di produzione e volume di attività già nei primi mesi del 2023.

Tali riorganizzazioni hanno richiesto una conseguente rivisitazione della dotazione organica dell'ente, viste le nuove assunzioni nelle diverse aree di attività dell'Ente

Di seguito si riporta la dotazione organica dell'IRCCS con i relativi scostamenti rispetto all'anno precedente.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Tempo Indeterminato	SITUAZIONE AL 31.12.2021	Assunti dal 1° gennaio al 31 dicembre 2022	Cessati dal 1° gennaio al 31 dicembre 2022	TOTALE PERSONALE A TEMPO INDETERMINATO 2022
RUOLO SANITARIO	223	42	13	252
Dirigenza	78	11	3	86
Comparto	145	31	10	166
RUOLO PROFESSIONALE	0	0	0	0
Dirigenza	0			0
Comparto	0			0
RUOLO TECNICO	76	6	5	77
Dirigenza	2			2
Comparto	74	6	5	75
RUOLO AMMINISTRATIVO	28	5	1	32
Dirigenza	2	2		4
Comparto	26	3	1	28
RUOLO RICERCA	20	16	6	30
Dirigenza (Tempo Determ.)	0			0
Comparto (Tempo Determ.)	20	16	6	30
Totali	347	69	25	391

Il totale dei dipendenti a Tempo Indeterminato dell'Istituto, nella presente esposizione, fa rilevare un incremento pari a 44 unità. L'andamento ha riguardato in termini di incremento il Ruolo Sanitario – per 29 unità - e il Ruolo Tecnico – per 3 unità - e in termini di decremento il Ruolo della Ricerca – per 1 unità. Si precisa che il personale afferente al Ruolo della Ricerca è finanziato per intero dal Ministero della Salute, vista la Legge 27/12/2017, Art. 1 c- 425. Su indicazioni del Ministero dell'Economia e Finanze le unità di che trattasi sono state inserite fra i dipendenti a Tempo Indeterminato.

Il numero dei dipendenti a Tempo Determinato dell'Istituto mostra un decremento di 10 unità rispetto all'esercizio precedente. Tale fotografia rispecchia le scelte compiute dall'Amministrazione nella direzione della stabilizzazione e dell'assunzione a T.I., come sopra commentato. Resta assunto il personale cosiddetto COVID, le cui attività sono strettamente legate alla emergenza pandemica, i cui costi sono finanziati da misure correlate.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Tempo Determinato	SITUAZIONE AL 31.12.2021	Assunti dal 1 gennaio al 31 dicembre 2022	Cessati dal 1 gennaio al 31 dicembre 2022	TOTALE PERSONALE A TEMPO DETERMINATO 2022
RUOLO SANITARIO	22	6	14	14
Dirigenza	3	1		4
Comparto	19	5	14	10
RUOLO PROFESSIONALE	0	0	0	0
Dirigenza	0			0
Comparto	0			0
RUOLO TECNICO	3	0	2	1
Dirigenza	0			0
Comparto	3		2	1
RUOLO AMMINISTRATIVO	2	2	2	2
Dirigenza	0			0
Comparto	2	2	2	2
Totali	27	8	18	17

ATTIVITA' ASSISTENZIALE

Nella tabella si riportano i principali dati indicatori delle attività dell'Istituto relativi agli anni 2022 - 2021:

Regime	REPARTI	Ricoveri_2022	Ricoveri_2021	Delta 2022/2021
RO	CHIRURGIA 1-2	938	913	25
RO	GASTROENTEROLOGIA 1	452	590	-138
RO	GASTROENTEROLOGIA 2	1240	1042	198
RO	RIANIMAZIONE E TERAPIA INTENSIVA	89	137	-48
RO	ONCOLOGIA MEDICA	199	173	26
DH	CHIRURGIA 1	4	7	-3
DH	GASTROENTEROLOGIA 1	1	0	1
DH	ONCOLOGIA MEDICA	255	293	-38
DH	GASTROENTEROLOGIA 2	6	0	6

Prestazioni specialistiche

Il dato 2022, nel complesso, conferma la ripresa rispetto agli anni precedenti dell'erogazione delle prestazioni sanitarie sia di ricovero, sia ambulatoriali specialistiche, con ricavi che si incrementano per €/000 764.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

UNITA' OPERATIVE E SERVIZI	Esercizio 2022 €	Esercizio 2021 € *
CHIRURGIA GASTROENTEROLOGICA	420.384	384.379
GASTROENTEROLOGIA 1	217.724	101.315
UOSD ONCOLOGICA	242.411	190.672
GASTROENTEROLOGIA 2	903.044	683.912
RIANIMAZIONE E TERAPIA INTENSIVA	73.677	73.567
ANATOMIA E ISTOLOGIA PATOLOGICA	192.761	184.055
CARDIOLOGIA	114.178	121.246
LABORATORIO DI GENETICA	427.264	524.785
LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA	1.797.246	1.419.321
DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	1.049.426	990.706
TOTALE	5.438.115	4.673.958

* Dato assestato

ANALISI ECONOMICA

Di seguito si riporta il “CONTO ECONOMICO” riclassificato relativo ai documenti già citati in premessa.

	VALORI IN BILANCIO			COMPOSIZIONE %		
	Bilancio al	Bilancio al	BUDGET	Bilancio al	Bilancio al	BUDGET
	31/12/2022	31/12/2021	2022	31/12/2022	31/12/2021	2022
VOCI DI BILANCIO						
VALORE DELLA PRODUZIONE	50.021.106	49.379.720	45.153.450	99,20	94,39	100,00
Contributi in c/esercizio	17.343.989	18.500.332	9.356.500	34,40	35,36	20,72
Proventi e ricavi diversi	27.535.733	27.197.718	30.669.250	54,61	51,99	67,92
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	1.253.639	108.368	64.900	2,49	0,21	0,14
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	807.254	684.353	700.000	1,60	1,31	1,55
Utilizzo fondi per quote inutilizzate contrib. Vincolati	392.947	442.447	1.912.800	0,78	0,85	4,24
Costi capitalizzati	2.687.545	2.446.502	2.450.000	5,33	4,68	5,43
ALTRI PROVENTI	401.368	2.935.473	0	0,80	5,61	0,00
Finanziari	42	402	0	0,00	0,00	0,00
Diversi	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Straordinari	401.326	2.935.071	0	0,80	5,61	0,00
TOTALE RICAVI	50.422.474	52.315.193	45.153.450	100,00	100,00	100,00
COSTI OPERATIVI	58.279.937	55.415.399	51.269.861	96,57	96,20	96,93
Personale	21.976.056	20.201.820	22.844.900	36,42	35,07	43,19
Materiali	13.340.206	13.120.452	10.963.769	22,11	22,78	20,73

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Servizi e costi diversi	17.793.681	17.058.164	14.252.119	29,48	29,61	26,94
Ammortamenti	2.729.695	2.611.554	2.492.637	4,52	4,53	4,71
Accantonamenti	2.440.299	2.423.408	716.436	4,04	4,21	1,35
ALTRI ONERI	2.068.375	2.190.361	1.623.600	3,43	3,80	3,07
Finanziari	1.028	2.801	0	0,00	0,00	0,00
Diversi	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Straordinari	418.605	616.395	0	0,69	1,07	0,00
Tributari	1.648.741	1.571.165	1.623.600	2,73	2,73	3,07
TOTALE COSTI	60.348.311	57.605.760	52.893.461	100,00	100,00	100,00
RISULTATO ECONOMICO	-9.925.837	-5.290.567	-7.740.011	0,00	0,00	0,00

Si riporta in seguito l'analisi dei dati economici elaborati.

VALORE DELLA PRODUZIONE

Il Valore della Produzione relativo all'esercizio 2022, pari a €/000 50.021, in termini complessivi, fa registrare un incremento pari a €/000 641 rispetto all'esercizio 2021. Nella seguente tabella si specificano gli scostamenti per settori di aggregazione.

	Bilancio 2022	Bilancio 2021
Voce	€/000	€/000
Contributi c/esercizio	18.059	18.500
Rettifica Contrib. In C/Esercizio	-715	-
Ricavi per prest. san. e sociosan. a rilevanza sanitaria	27.428	27.184
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	1254	108
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	806	684
Quota contributi in c/capitale imputata nell'esercizio	2.688	2.447
Utilizzo fondi per quote inutilizz. contributi vinc.ti di eserc. precedenti	393	442
Altri ricavi e proventi	108	14
Totale VALORE DELLA PRODUZIONE	50.021	49.379

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



I contributi in c/esercizio sommano €/000 18.059, da nettare della rettifica, e sono composti dalle seguenti voci:

	€/000
Ristori Costi Covid	557
Contributi per PAY BACK	1.276
Finanziamento indistinto finalizzato da Regione (Progetto SALUS)	258
Funzioni - Altro	10.600
Ristoro costi energetici	1.117
Contributi da Ministero della Salute per ricerca corrente - Contributo per Piramide dei Ricercatori	4.029
Contributi da privati per ricerca	222
Totale	18.059

Riguardo al contributo da Ministero per le attività di ricerca (complessivi €/000 4.029), nello specifico si notizia che il contributo assegnato all'Ente nell'anno 2022 per lo svolgimento di attività di ricerca corrente ammonta a €/000 1.810, giusta comunicazione del Ministero della Salute avvenuta mediante *Workflow* n. 2022013613 del 29.11.2022, che il contributo utile a sostenere i costi della "Piramide dei Ricercatori, è pari a €/000 1.921, giusta comunicazione del Ministero della Salute avvenuta mediante *Workflow* n. 2022012310 del 19/10/2022. I contributi invece afferenti al programma "Alleanza contro il Cancro" valgono €/000 11, al "5X1000" €/000 109 mentre ammontano a €/000 146 i contributi a valere del programma "Aging". Infine sommano €/000 32 i contributi per programmi di ricerca "Phonetic" e "PON BIO".

L'importo postato a bilancio risulta ininfluente ai fini del risultato di esercizio in quanto lo stesso corrisponde all'ammontare dei costi effettivamente sostenuti per l'attività di ricerca, in quanto i contributi in parola hanno natura vincolata.

In ordine ai finanziamenti erogati nel corso dell'esercizio 2022, quanto non utilizzato per l'ordinaria attività di ricerca è stato oggetto di accantonamento ad apposito fondo "per quote non utilizzate", ciò in ottemperanza al D. L.gs. n. 118, art. 29, c. e, per un totale complessivo pari a €/000 1.433, come di seguito si riporta.



Accantonamenti per quote inutilizzate per contributi vincolati

	€/000
Fondo " 5 x 1000 2020" DDG n. 419/2022	108
Progetti di Rete	11
Fondo progetto di rete "PROMISING" DCS n. 423/2021	146
Fondo " Progetto UVAR +" DDG n. 410 del 06/08/2020	27
Accantonamento quote inutilizzate Contributo Piramide Ricercatori 2021	1.141
Totale	1.433

I contributi postati a bilancio rivenienti da erogazioni da altri enti per attività di ricerca risultano pari a €/000 222 e sono così ripartiti:

	€/000
Fondazione AIRC	181
MICRO Italia – Prog. Ricerca Cl.	41
Totale	222

Per quanto attiene ai proventi e ricavi diversi, si riporta di seguito una tabella relativa alla mobilità attiva dell'Istituto per l'anno 2022 rapportata ai risultati rilevati nell'esercizio precedente e nel budget 2022 oltre che ai valori parametrati al redigendo DIEF, come da comunicazioni dei competenti uffici regionali.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Attività di ricovero

Importi in €/mgl	Produzione al 31/12/2022	Budget 2022	Assegnazioni	Produzione al 31/12/2021	Delta Produzione 2022- Bgt 2022	Delta Produzione 2022- Assegnazioni	Delta Produzione 2022-2021
Mobilità attiva infraregionale	19.256	23.000	19.256	18.882	- 3.744	-	374
Mobilità attiva extraregionale	768	714	768	609	54	-	159
Prestazioni di File F	5.849	-	5.849	5.713	5.849	-	136
TOTALE	25.873	23.714	25.873	25.205	2.159	-	669

In confronto all'esercizio 2021 si rileva un incremento riguardo ai ricavi rivenienti dalle attività di ricovero in Mobilità infraregionale pari a €/000 374, a conferma del trend positivo delle attività di produzione dell'Ente, a seguito del riallineamento post pandemia. Il dato "extraregionale" fa rilevare anch'esso un segno positivo rispetto all'esercizio precedente, vista la maggiore produzione pari a €/000 159, alla stessa stregua delle prestazioni da File F che crescono per €/000 136.

L'attività Libero Professionale fa rilevare un decremento nell'anno 2022, pari a €/000 473, invertendo il trend degli ultimi esercizi come esplicito in sintesi:

	2022	2021	Budget 2022
RICAVI per PREST.SAN. EROGATE IN REG. DI INTRAMOENIA	1.554	2.027	1.812

Tale attività, e relativa gestione economico finanziaria, è condotta in ottemperanza alle norme vigenti nonché al Regolamento ALPI adottato con Delibera del Direttore Generale n 302 del 27/04/2018.

Riguardo alle prestazioni sanitarie e socio sanitarie diverse non v'è nulla da rilevare per l'esercizio 2022. Tali attività riguardano studi e sperimentazioni di tipo clinico, come regolamentato con Delibere del Direttore Generale n. 266/2019 e 302/2018.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Dasa-Rägister
EN ISO 9001:2008
IQ-1208-14



REGIONE
PUGLIA



Le compartecipazioni, per l'esercizio in esame, fanno rilevare un ricavo pari a €/000 807, in incremento rispetto al 2021 per €/000 123.

Le entrate proprie ammontano a €/000 1.254 secondo seguenti aggregati parziali

	€/000
Conc. da parte del pers. nelle spese (vitto..)	5
Recup. per indenn. INAIL inabil. temporanea	9
Altri rimborsi e recuperi	107
Pay-back per superamento del tetto della spesa farmaceutica ospedaliera	80
Ulteriore Pay-back	28
Rimborso per Pay back sui dispositivi medici	1.025
Totale	1.254

I ricavi per utilizzo quote in C/Capitale ammontano a €/000 2.688, così ripartiti:

	€/000
Utilizzo quota contrib. in c/cap. ricevuti da Reg.	1.293
Utilizzo Quota imputata all'esercizio dei finanziamenti per investimenti dallo Stato	462
Utilizzo Quota imputata all'esercizio dei contributi in c/ esercizio FSR destinati ad investimenti	929
Utilizzo Quota imputata all'esercizio di altre poste del patrimonio netto	4
Totale	2.688

Nel corso del 2022, inoltre, sono stati utilizzati fondi per quote inutilizzate su contributi vincolati per un importo complessivo pari a €/000 393, secondo la seguente ripartizione in €/000:

Prog. Medicina genere Det. 311 del 24/11/2021	7	Regione Puglia
Progetto Ern Apulia 3 DCS n. 68_2021	1	Regione Puglia
contributo R.C. anno 2018 - Delibera 348 del 03/06/2019	3	Min. della Salute
Fondo " Progetti Rete Acc 2021" DCS n. 518 del 23/12/2021	11	Min. della Salute
Fondo " Progetto UVAR +" DDG n. 410 del 06/08/2020	27	Min. della Salute
Fondo " 5 x 1000 2013" DDG n. 45/2016	20	MEF
Fondo " 5 x 1000 2017" DDG n. 683/2019	63	MEF
Fondo " 5 x 1000 2019" DDG n. 389/2020	60	MEF
Fondo " 5 x 1000 2020" DDG n. 507/2021	39	MEF
Progetto SG-SMYD3 Delibera D.G. 473/2020	24	Min. della Salute
Progetto di rete Promising DCS n. 423 del 12/11/2021	138	Min. della Salute

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Gli “Altri Ricavi e Proventi”, per questo Esercizio valgono complessivamente €/000 108, così rappresentati:

	€/000
Diritti per rilascio di certif. e cartelle cliniche	8
Fitti Commerciali	10
Altri proventi di natura commerciale	8
Altri ricavi e proventi	82

In ordine ad alcune voci, di seguito si espone esemplificativamente un’analisi relativa ai maggiori e minori ricavi in comparazione rispetto all’esercizio 2021.

	Bilancio 2022	Bilancio 2021	Maggiori ricavi	Minori ricavi
Voce	€/000	€/000	€/000	€/000
Contributi c/esercizio	18.059	18.500	-	- 441
Rettifica Contrib. In C/Esercizio	- 715	-	-	- 715
Ricavi per prest. san. e sociosan. a rilevanza sanitaria	27.428	27.184	244	-
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	1.254	108	1.145	-
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	807	684	123	-
Quota contributi in c/capitale imputata nell'esercizio	2.688	2.447	241	-
Utilizzo fondi per quote inutilizz. contributi vinc.ti di eserc. precedenti	393	442	-	- 49
Altri ricavi e proventi	108	14	94	-
Totale VALORE DELLA PRODUZIONE	50.021	49.380		

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



COSTI DELLA PRODUZIONE

	Bilancio 2022	Bilancio 2021	Maggiori costi	Minori costi
Voce	€/000	€/000	€/000	€/000
Acquisti di beni	13.421	12.848	572	
Acquisti di servizi sanitari	2.680	3.821	-	- 1.141
Acquisti di servizi non sanitari	8.720	7.362	1.359	-
Manutenzione e riparazione	1.909	2.224	-	- 315
Godimento beni di terzi	3.191	2.275	917	-
Personale	21.976	20.202	1.774	-
Oneri diversi di gestione	1.293	1.376	-	- 84
Ammortamenti	2.730	2.612	118	-
Rimanenze	- 80	272		
Accantonamenti	2.440	2.423	-	17
COSTI DELLA PRODUZIONE	58.280	55.415		

ANALISI COSTI DELLA PRODUZIONE

ACQUISTI DI BENI

Dall'analisi dello schema sotto riportato, ulteriormente dettagliato, si evince come l'acquisto di beni (sanitari e non), nel complesso, fa registrare un parziale incremento rispetto al dato di bilancio 2021, per €/000 572. Nello specifico il Totale dei Beni Sanitari acquisiti ammonta a €/000 13.193, mentre i beni non Sanitari fanno rilevare un costo complessivo pari a €/000 147.

Va specificato che i "Dispositivi medici" nel loro costo complessivo pari a €/000 6.168, nel 2022, sostanzialmente pareggiano il dato 2021 (+ €/000 94) e anche per l'esercizio in esame, per una parte (€/000 125) sono da imputare a costi "COVID 19".

I Beni non Sanitari, nello specifico, fanno registrare invece un decremento pari a €/000 89, determinato riscontrabile in modo evidente nelle diverse categorie.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Nella sintesi seguente si riporta la situazione analitica relativa al consumo di materiali sanitari e non sanitari.

	Consuntivo 2022	Budget 2022	Consuntivo 2021	Differenze CNS 2022-BGT. 2022		Differenze CNS 2022- CNS 2021	
				Valori	%	Valori	%
CONSUMO MATERIALI SANITARI	13.193.252	10.818.769	12.884.669	2.374.484	21,95%	308.584	2,39%
• Acquisti materiali sanitari	13.269.630	10.818.769	12.618.367	2.450.862	22,65%	651.264	5,16%
- Farmaci ed emoderivati	6.890.148	5.414.827	6.289.290	1.475.321	27,25%	600.858	9,55%
- Presidi chirurgici e materiali sanitari	3.492.902	3.231.249	3.725.655	261.653	8,10%	(232.753)	-6,25%
- Materiale protesico	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- Altri materiali sanitari	158.500	13.000	209.709	145.500	1119,23%	(51.210)	-24,42%
- Materiale per radiologia	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- Materiali diagnostici di laboratorio	2.726.430	2.159.692	2.391.237	566.738	26,24%	335.193	14,02%
- Materiali per emodialisi	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- Sieri e vaccini	1.650	0	2.475	1.650	#DIV/0!	(825)	-33,33%
- Materiale protesico fornitura diretta (assistenza protesica)	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Variazione scorte mat. sanitari	(76.378)	0	266.302	(76.378)	#DIV/0!	(342.680)	-128,68%
CONSUMO MATERIALI NON SANITARI	146.954	145.000	235.783	1.954	1,35%	(88.829)	-37,67%
• Acquisti materiali non sanitari	151.055	145.000	229.901	6.055	4,18%	(78.846)	-34,30%
- Prodotti alimentari	141	0	135	141	#DIV/0!	6	4,33%
- materiali per guardaroba e pulizia	60.884	36.000	34.157	24.884	69,12%	26.727	78,25%
- Materiali per manutenzione	17.850	17.000	67.701	850	5,00%	(49.851)	-73,63%
- Combustibili, carburanti e lubrificanti	4.949	11.000	12.632	(6.051)	-55,01%	(7.683)	-60,82%
- Cancelleria	62.897	51.000	74.640	11.897	23,33%	(11.743)	-15,73%
- Materiali diversi	4.333	30.000	40.635	(25.667)	-85,56%	(36.302)	-89,34%
• Variazione scorte mat. non sanitari	(4.101)		5.883	(4.101)	#DIV/0!	(9.984)	-169,71%
TOTALE CONSUMI	13.340.206	10.963.769	13.120.452	2.376.438	21,68%	219.755	1,67%
• Totale acquisti	13.420.685	10.963.769	12.848.268	2.456.917	22,41%	572.418	4,46%
• Totale variazione scorte	(80.479)	0	272.184	(80.479)	#DIV/0!	(352.663)	-129,57%

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



ACQUISTI DI SERVIZI

	Consuntivo 2022	Budget 2022	Consuntivo 2021	Differenze CNS 2022-BGT. 2022		Differenze CNS 2022- CNS 2021	
				Valori	%	Valori	%
ACQUISTI DI SERVIZI	11.400.457	9.832.020	11.182.764	1.568.437	15,95%	217.693	1,95%
• Prestazioni sanitarie da pubblico	553.065	675.900	589.246	(122.835)	-18,17%	(36.180)	-6,14%
• Prestazioni sanitarie da privato	2.127.032	2.643.340	2.494.193	(516.308)	-19,53%	(367.162)	-14,72%
- Assistenza convenzionata	291.796	288.000	214.405	3.796	1,32%	77.391	36,10%
- ALPI e consulenze	961.305	1.300.000	1.144.540	(338.695)	-26,05%	(183.235)	-16,01%
- Consulenze sanitarie	210.504	266.800	456.304	(56.296)	-21,10%	(245.800)	-53,87%
- Altri servizi	663.427	788.540	678.944	(125.113)	-15,87%	(15.517)	-2,29%
• Prestazioni non sanitarie da pubblico (altri costi)	11.033	28.200	35.465	(17.167)	-60,88%	(24.432)	-68,89%
• Prestazioni non sanitarie da privato	8.709.327	6.484.580	8.063.860	2.224.747	34,31%	645.467	8,00%
- Consulenze tecniche	267.488	0	114.557	267.488	#DIV/0!	152.931	133,50%
- Consulenze amministrative	8.642	0	0	8.642	#DIV/0!	8.642	#DIV/0!
- Consulenze legali	8.762	5.000	1.563	3.762	75,25%	7.200	460,70%
- Assicurazioni	22.467	16.000	25.511	6.467	40,42%	(3.044)	-11,93%
- Servizi diversi	161.984	145.400	882.150	16.584	11,41%	(720.166)	-81,64%
- Servizi appaltati	5.849.987	4.546.175	4.834.164	1.303.812	28,68%	1.015.823	21,01%
Lavanderia	290.468	250.494	257.396	39.975	15,96%	33.072	12,85%
Pulizia	586.232	488.281	514.167	97.951	20,06%	72.065	14,02%
Mensa	542.232	463.862	489.497	78.370	16,90%	52.735	10,77%
Riscaldamento e appalto energia	952.707	0	0	952.707	#DIV/0!	952.707	#DIV/0!
Smaltimento rifiuti speciali	166.031	75.390	81.289	90.641	120,23%	84.742	104,25%
Altri servizi appaltati	3.312.318	3.268.148	3.491.815	44.169	1,35%	(179.497)	-5,14%
- Utenze	2.389.997	1.772.006	2.205.915	617.991	34,88%	184.082	8,34%
Energia elettrica	2.310.739	882.000	1.274.148	1.428.739	161,99%	1.036.591	81,36%
Acqua	50.071	60.000	78.290	(9.929)	-16,55%	(28.219)	-36,04%
Gas	0	746.023	796.787	(746.023)	100,00%	(796.787)	100,00%
Telefono	29.187	83.983	56.690	(54.796)	-65,25%	(27.503)	-48,52%
MANUTENZIONI E RIPARAZIONI	1.909.179	1.844.609	2.224.352	64.570	3,50%	(315.173)	-14,17%
• Manutenzione e riparazione immobili	46.988	20.741	16.507	26.248	126,55%	30.481	184,65%
• Manutenzione e riparazione mobili	18.469	567	16.894	17.902	3158,89%	1.575	9,32%
• Manutenzione e riparazione attrezzature sanitarie	1.289.390	1.314.455	1.336.713	(25.064)	-1,91%	(47.322)	-3,54%
• Manutenzione e riparazione mezzi di trasporto	4.190	3.935	3.017	255	6,47%	1.173	38,90%
• Manutenzione e riparazione impianti	550.142	504.912	851.222	45.230	8,96%	(301.080)	-35,37%
GODIMENTO BENI DI TERZI	3.191.410	1.515.489	2.274.826	1.675.920	110,59%	916.584	40,29%
• Affitti immobili	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Leasing e noleggio attrezzature sanitarie	601.468	466.192	530.110	135.276	29,02%	71.357	13,46%
• Canoni leasing e noleggio centri elettrocontabili	2.585.736	1.042.059	1.735.978	1.543.677	148,14%	849.758	48,95%
• Altri canoni di leasing e noleggio	4.206	7.239	8.738	(3.033)	-41,89%	(4.532)	-51,86%

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Dasa-Rägister
EN ISO 9001:2008
IQ-1208-14



REGIONE
PUGLIA



ONERI DIVERSI DI GESTIONE	1.292.635	1.060.000	1.376.222	232.635	21,95%	(83.588)	-6,07%
• Compensi agli organi istituzionali	773.477	848.300	779.512	(74.823)	-8,82%	(6.035)	-0,77%
• Spese postali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Spese legali	166.602	50.000	266.943	116.602	233,20%	(100.341)	-37,59%
• Pubblicità	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Spese di rappresentanza	95.611	20.000	64.341	75.611	378,06%	31.270	48,60%
• Oneri diversi di gestione	256.944	141.700	265.427	115.244	81,33%	(8.483)	-3,20%
Totale servizi e costi diversi	17.793.681	14.252.119	17.058.164	3.541.561	24,85%	735.516	4,31%

L'acquisto di servizi fa registrare un incremento complessivo pari a €/000 736.

I più significativi incrementi si sono concretizzati nelle seguenti categorie (€/000):

Assistenza convenzionata	77
Consulenze tecniche	153
Consulenze amministrative	9
Consulenze legali	7
Lavanderia	33
Pulizia	72
Mensa	53
Riscaldamento	953
Smaltimento rifiuti speciali	85
Energia elettrica	1.037
Manutenzione e riparazione immobili	30
Manutenzione e riparazione mobili	2
Manutenzione e riparazione mezzi di trasporto	1
Leasing e noleggio attrezzature sanitarie	71
Canoni leasing e noleggio centri elettrocontabili	850
Spese di rappresentanza	31

Nelle acquisizioni di servizi, di contro, si rilevano i seguenti principali decrementi (€/000):

Prestazioni sanitarie da pubblico	36
ALPI e consulenze	183
Consulenze sanitarie	246
Altri servizi	16
Prestazioni non sanitarie da pubblico -altri costi)	24
Assicurazioni	3
Servizi diversi	720
Altri servizi appaltati	179

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





Acqua	28
Telefono	28
Manutenzione e riparazione attrezzature sanitarie	47
Manutenzione e riparazione impianti	301
Altri canoni di leasing e noleggio	5
Compensi agli organi istituzionali	6
Spese legali	100
Oneri diversi di gestione	8

Nello specifico, si riportano i dettagli delle voci afferenti alla categoria “**Consulenze Sanitarie**”, pari a €/000 211

Consulenze sanitarie da privato - (prestazioni aggiuntive) Comparto L. 1/2002.	43
Oneri sociali su Consulenze sanitarie da privato - (prestazioni aggiuntive) Comparto L. 1/2002.	10
Altre consulenze sanitarie e sociosanitarie da privato	2
Co.Co.Co. sanitarie e socios. Dirigenza Sanitaria Non Medica. Competenze	83
Co.Co.Co. sanitarie e socios. Dirigenza Sanitaria Non Medica. Oneri	18
Indennità a personale universitario - area sanitaria	55

Quelli afferenti a prestazioni da Co.Co.Co., sono costi sostenuti a quasi totale carico dei finanziamenti ricevuti dall’Ente per lo svolgimento di attività di ricerca, siano essi da fonte pubblica (Finalizzata e Corrente) e “5 per mille”, sia da privati, pertanto a impatto sul risultato nullo.

Così come le seguenti categorie di costo afferente a “**Servizi diversi**”, per €/000 162

Costi di formazione da privato	63
Person. relig. convenz. (incluso oneri riflessi)	16
Co.Co.Co. comparto ruolo Amm.vo - Competenze	61
Co.Co.Co. comparto ruolo Amm.vo - Oneri sociali	4
Rimborso oneri stipendiali personale non sanitario in comando da Regione, soggetti pubblici e da Università	18

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Altri servizi appaltati, per €/000 3.312:

Elaborazione dati	24
Assistenza hardware e software	333
Servizi trasporti (non sanitari)	4
Servizi di Logistica	708
Vigilanza	402
Gestione Archivi	55
Servizio di Portierato e Ausiliario	509
Altri Servizi	977
Manutenzione del verde	39
Servizi di radioprotezione	6
Libri, Riviste ed Abbonamenti vari	104
Altre spese bancarie e postali	23
Spese di pubblicita, pubblicaz. e bandi di gare	116
Spese postali	4
Altri servizi non Sanitari da pubblico (Aziende sanitarie pubbliche della Regione)	7

I maggiori costi delle forniture di servizi sopra riportate, come già relazionato, sono da addebitare anche alla necessità di far fronte alle urgenze rivenienti dall'emergenza pandemica come, nello specifico, rappresentato dalle voci "Vigilanza", Servizi di logistica" e "Altri Servizi", "Pulizia" e sommano un importo pari a €/000 2.673, di cui €/000 555 a carico delle attività "Covid".

Incrementi fanno rilevare l'assistenza convenzionata, per €/000 77, a causa di attività consulenziali e di supporto da privati. L'attività ALPI fa registrare una lieve inflessione, per €/000 183, ciò a causa di una momentanea riduzione delle prestazioni libero professionali.

Le prestazioni non sanitarie da pubblico pari a €/000 11 riguardano le attività in regime di convenzione svolte da personale delle aziende sanitarie regionali per supporto tecnico ingegneristico.

Le *Utenze* fanno rilevare un significativo incremento nella voce afferente alla fornitura di energia elettrica, per ragioni collegate ai forti aumenti di costi collegati. Tal costo risulta essere pari a €/000 2.311, di contro ristorato dalla Regione Puglia per €/000 1.117.

I costi di manutenzione decrementano il dato dell'esercizio precedente per €/000 315, a causa di rivisitazioni contrattuali che troveranno assestamento nell'esercizio successivo. Tali costi rappresentano attività manutentive necessarie alla buona gestione del parco macchine, attrezzature e ambiente incidendo soprattutto nell'area dell'impiantistica.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



L'area che afferisce all'aggregato Godimento *Beni di Terzi* si incrementa, per €/000 916 e rappresenta i contratti stipulati per utilizzo attrezzature in regime di noleggio, di cui per una parte finanziati da contributi per attività di ricerca, corrente o vincolata. L'incremento significativo riguarda l'area dei "centri elettrocontabili" su cui si sta avviando un'importante attività di implementazione e innovazione del sistema. Nello specifico:

- è stato implementato e innovato il sistema cosiddetto "CORO";
- è stata avviata la costruzione di un Registro utile a raccordare informazioni cosiddette classificate afferenti alle malattie "IBD";
- è stato implementato il sistema del governo delle informazioni in materia di *Privacy*;
- è stato portato a termine il processo di implementazione del sistema a garanzia della sicurezza informatica.

Gli *Oneri Diversi di Gestione* fanno rilevare minori costi per €/000 84.

In tabella si esplodono le singole voci, per complessivi €/000 1.293:

Compensi per Direttore Generale	169
Oneri sociali per Direttore Generale	31
Compensi per Direttore Amm.vo	126
Rimborso spese per Direttore Amm.vo	2
Oneri di gestione relativi al Direttore Amministrativo dipendente di aziende del sistema sanitario regionale in aspettativa	32
Compensi per Direttore Sanitario	135
Oneri di gestione relativi al Direttore Sanitario dipendente di aziende del sistema sanitario regionale in aspettativa	36
Compensi per Direttore Scientifico	142
Oneri sociali per Direttore Scientifico	41
Compensi per Collegio Sindacale	51
Rimborso spese per Collegio Sindacale	6
Oneri sociali per Collegio Sindacale	3
Indenn. e rimb. spese membri di comm. e altri org.	79
Spese di promozione	96
Oneri e spese legali per resistenza in giudizio	167
Premi di assicuraz. per furto, incendio ed RC auto	20
Premi di assicuraz. respons. civile profess.	2
Altri oneri di gestione	85
Imposte, tasse e tributi	93

Si precisa che gli oneri assicurativi sono contemplati nell'aggregato "Assicurazioni", e valgono €/000 23.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

Risulta incrementato il costo relativo agli *Ammortamenti* in confronto all'esercizio precedente, per un totale di €/000 118.

L'esercizio in esame fa rilevare ammortamenti complessivi per €/000 2.730

Amm.to Altre Immobilizzazioni Immateriali	96
Amm.to Fabbric. indisp. (gravati da vincolo di destinaz.)	769
Amm.to Costruzioni leggere	5
Amm.to Impianti e macchinari	270
Amm.to Attrezzature sanitarie	1.085
Amm.to Attrezz. sanit. destinate alla ricerca	282
Amm.to Attrezz. non sanitarie	36
Amm.to Mobili e arredi d'ufficio	32
Amm.to Autov., motov. e simili (comrese ambul.)	17
Amm.to Macchine elettroniche	133
Amm.to Telefoni cellulari	1
Amm.to Altri beni materiali	4

E' perseguito l'obiettivo del contenimento dei costi del personale ex art. 1 c. 71 L.23 dicembre 2009 e ss. mm. e ii..

Nello specifico il consuntivo del "Personale", che ammonta complessivamente a €/000 21.976.

	Consuntivo 2022	Budget 2022	Consuntivo 2021	Differenze CNS 2022-BGT. 2022		Differenze CNS 2022 - CNS 2021	
				Valori	%	Valori	%
RUOLO SANITARIO	17.829.130	18.422.100	16.300.353	(592.970)	-3,22%	1.528.777	9,38%
• Competenze fisse	9.679.573	10.497.100	8.978.214	(817.527)	-7,79%	701.359	7,81%
• Competenze accessorie	4.169.361	3.913.100	3.812.116	256.261	6,55%	357.245	9,37%
• Altre indennità	168.614	46.200	50.356	122.414	264,96%	118.258	234,84%
• Oneri sociali	3.811.583	3.965.700	3.459.667	(154.117)	-3,89%	351.916	10,17%

RUOLO PROFESSIONALE	0	50.300	36.296	(50.300)	100,00%	(36.296)	100,00%
• Competenze fisse	0	22.800	15.013	(22.800)	100,00%	(15.013)	100,00%
• Competenze accessorie	0	16.200	10.526	(16.200)	100,00%	(10.526)	100,00%
• Altre indennità	0	0	3.549	0	0,00%	(3.549)	100,00%
• Oneri sociali	0	11.300	7.208	(11.300)	100,00%	(7.208)	100,00%

RUOLO TECNICO	2.641.157	2.673.000	2.558.815	(31.843)	-1,19%	82.342	3,22%
• Competenze fisse	1.594.265	1.494.300	1.540.590	99.965	6,69%	53.676	3,48%
• Competenze accessorie	453.805	581.400	431.789	(127.595)	-21,95%	22.017	5,10%

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



• Altre indennità	29.626	41.600	43.848	(11.974)	-28,78%	(14.221)	-32,43%
• Oneri sociali	563.459	555.700	542.588	7.759	1,40%	20.871	3,85%

RUOLO AMMINISTRATIVO	1.505.770	1.699.500	1.306.356	(193.730)	-11,40%	199.413	15,26%
• Competenze fisse	847.798	967.300	752.780	(119.502)	-12,35%	95.017	12,62%
• Competenze accessorie	334.622	360.800	259.193	(26.178)	-7,26%	75.429	29,10%
• Altre indennità	4.851	9.700	13.900	(4.849)	-49,99%	(9.050)	-65,10%
• Oneri sociali	318.499	361.700	280.483	(43.201)	-11,94%	38.016	13,55%

COSTO DEL PERSONALE DIPENDENTE	21.976.057	22.844.900	20.201.820	(868.843)	-3,80%	1.774.237	8,78%
• Competenze fisse	12.121.636	12.981.500	11.286.597	(859.864)	-6,62%	835.039	7,40%
• Competenze accessorie	4.957.788	4.871.500	4.513.624	86.288	1,77%	444.164	9,84%
• Altre indennità	203.091	97.500	111.653	105.591	108,30%	91.438	81,89%
• Oneri sociali	4.693.542	4.894.400	4.289.946	(200.858)	-4,10%	403.596	9,41%

Il Costo del Personale, pari a €/000 21.976, comprende anche quello afferente alla cosiddetta Piramide dei Ricercatori, per un importo complessivo pari a €/000 910 (a totale carico dei Contributi Ministeriali per la Ricerca Corrente) e quello invece relativo alle assunzioni di personale “COVID”, arruolato per far fronte alle esigenze sanitarie e logistiche rivenenti dalla emergenza pandemica. Tali costi ammontano a €/000 835.

Si espone specifica relativa alla “Piramide dei Ricercatori”.

Personale afferente alla "Piramide dei Ricercatori" €/000	€/000
PERSONALE DEL RUOLO SANITARIO ALTRO RAPPORTO	764
Competenze fisse Comparto Ricercatore Sanitario Tempo DETERMINATO	486
Competenze da fondo condizioni di lavoro e incarichi Comparto Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	18
Competenze da fondo premialità e fasce Comparto Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	88
Altre competenze extra fondi Comparto Ricercatore Sanitario Tempo DETERMINATO	0
Oneri sociali su restanti retribuzioni Comparto Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	172
PERSONALE DEL RUOLO AMMINISTRATIVO ALTRO RAPPORTO	90
Competenze fisse Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	59
Competenze da fondo condizioni di lavoro e incarichi Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	2
Competenze da fondo premialità e fasce Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	8
Oneri sociali su restanti retribuzioni Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	20
Totale costi Personale "Piramide dei Ricercatori"	854
IRAP Personale "Piramide dei Ricercatori"	56
Totale Complessivo costi Personale "Piramide dei Ricercatori"	910

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Vincolo previsto in materia di contenimento della spesa di personale (riduzione 1,4 %).

Con riferimento al consuntivo 2022 si riporta schema relativo ai dati calcolati ai fini del rispetto del vincolo ex art. 1 c. 71 e 72 L.23 dicembre 2009, computati al netto degli aumenti contrattuali, dei costi in deroga ex art. 12 bis D. Lgs. n. 502/92 e dei costi afferenti alle categorie protette. Lo stesso vincolo risulta calcolato secondo i parametri comunicati dalla Regione Puglia giusta D.G.R. n. 2293/2018.

Per quanto in ordine all'osservanza del vincolo di spesa predetto, alla data del 31/12/2022 si prospetta il seguente quadro di sintesi:

	€/000
Limite spesa Art. 2 c. 71 L. 191/09 (- 1,4 % Spesa 2004)	22.269
Costo del personale al netto dei rinnovi contrattuali	18.344
Minore spesa rispetto al vincolo	3.925

E' rispettato anche il limite di spesa di cui al c. 28 art. 9 del D.L. n. 78/2010. Di seguito schema riassuntivo come adottato in Delibera del Direttore Generale dell'Ente n. 268/2023.

SPESA SOSTENUTA PER IL PERSONALE A TEMPO DETERMINATO NELL'ANNO 2022 AI FINI DEL RISPETTO DEI VINCOLI DI CUI ALL'ART.9, COMME 28, DEL D.L. n.78/2010 CONVERTITO CON MODIFICHE NELLA LEGGE n.122/2010	
Totale della spesa sostenuta per l'assunzione di personale con contratto di lavoro Flessibile nell'Anno 2009	1.361.014,27
Totale spesa sostenuta per Convenzioni con altre Aziende/ Enti del Servizio Sanitario Regionale - Anno 2009	24.050,42
IN DEDUZIONE: Spesa sostenuta per personale assunto nel 2009 in sostituzione di personale assente dal servizio	0,00
Totale spesa per personale a Tempo Determinato - Anno 2009	1.385.064,69
Limite di Spesa pari al 50% dell'Anno 2009 (art.9, comma 28, D.L. n.78/2010)	692.532,35
Totale spesa sostenuta per assunzioni a Tempo Determinato (Compreso personale in sostituzione, personale in comando e personale COVID) - Periodo: Gennaio - Dicembre 2022	1.293.705,32

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Totale spesa sostenuta per Convenzioni con Aziende/Enti del SSR e Contratti di lavoro autonomo ex art.7 c.6 Dlgs.n.165/2001 - Periodo: Gennaio - Dicembre 2022	143.767,13
Totale spesa sostenuta per assunzioni di personale con rapporto di lavoro flessibile - ANNO 2022	1.437.472,45
SPESE NON COMPUTABILI AI FINI DELLA VERIFICA DEL LIMITE 2009 (PORTATE IN DEDUZIONE):	0
Spesa sostenuta per assunzioni di personale a Tempo Determinato per sostituzione personale assente dal servizio per lunghi periodi (Maternità, Aspettative, Congedi) - Periodo: Gennaio - Dicembre 2022	-111.892,19
Spesa sostenuta per personale comandato proveniente da altre Aziende/Enti del SSR - Periodo: Gennaio - Dicembre 2022	-36.264,32
Spesa sostenuta per assunzioni di personale a Tempo Determinato per emergenza sanitaria COVID-19 - Periodo: Gennaio - Dicembre 2022	-886.436,53
TOTALE SPESA 2022 NON COMPUTABILE AI FINI DELLA VERIFICA DEL LIMITE 2009	-1.034.593,04
Totale spesa sostenuta per assunzioni di personale con rapporto di lavoro flessibile (al netto delle spese non computabili) - ANNO 2022	402.879,41
Disponibilità Residua 2022 rispetto al Limite del 50% dell'anno 2009	289.652,94

Nella sintesi sopra riportata, oltre al personale a T.D. assunto dall'IRCCS è specificato quello arruolato per far fronte all'emergenza pandemica da COVID 19, oltre al personale consulente su base convenzionale con altre AA SS del SSR.

ALTRI PROVENTI E ONERI

	Consuntivo 2022	Budget 2022	Consuntivo 2021	Differenze CNS 2022-BGT. 2022		Differenze CNS 2022- CNS 2021	
				Valori	%	Valori	%
PROVENTI E ONERI FINANZIARI	-986	0	-2.399	(986)	#DIV/0!	1.413	-58,91%
• Interessi attivi	17	0	0	17	#DIV/0!	17	18744,44%
• Altri proventi	25	0	402	25	#DIV/0!	(377)	-93,71%
• Interessi passivi	1.028	0	2.801	1.028	#DIV/0!	(1.773)	-63,30%
- su debiti	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- su anticipazioni	1.028	0	3	1.028	#DIV/0!	1.025	34627,36%
- interessi moratori	0	0	2.798	0	0,00%	(2.798)	100,00%
• Altri oneri	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

PROVENTI E ONERI STRAORDINARI	(17.280)	0	2.318.676	17.280	//	- 2.335.956	-100,75%
• Proventi straordinari	401.326	0	2.935.071	401.326	//	(2.533.745)	-86,33%
- plusvalenze patrimoniali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- sopravvenienze attive e insussistenze del passivo	401.326	0	2.935.071	401.326	//	(2.533.745)	-86,33%
- concorsi, recuperi, rimborsi attività non tipiche	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Oneri straordinari	418.605	0	616.395	418.605	#DIV/0!	(197.790)	-32,09%
- minusvalenze patrimoniali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- sopravvenienze passive e insussistenze dell'attivo	418.605	0	616.395	418.605	#DIV/0!	(197.790)	-32,09%
- accantonamenti non tipici dell'esercizio	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%

IMPOSTE E TASSE	1.648.741	1.623.600	1.571.165	25.141	1,55%	77.576	4,94%
• Imposte, tasse e tributi	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• IRAP	1.648.741	1.623.600	1.571.165	25.141	1,55%	77.576	4,94%

Gli oneri finanziari rilevati nel 2022 presentano un saldo pari a €/000 1 addebitabile a interessi passivi su Anticipazione di Cassa forniti dall'Ente Tesoriere dell'IRCCS "de Bellis", come richiesto con Provvedimento n. 586 del 21/11/2022.

PROVENTI E ONERI STRAORDINARI

I proventi e oneri straordinari per il 2022 presentano un saldo negativo pari a €/000 17.

Tale risultato riviene dalle seguenti principali voci.

Gli oneri straordinari sono rappresentati a CE da complessivi €/000 419 e specificatamente:

SOPRAVVENIENZE PASSIVE E INSUSSIST. DELL'ATIVO	
Sopravv.ze pass. riguard. altre imposte e tasse	3
Sopravv.ze pass. relative al pers. del comparto	5
Sopravv.ze pass. rel. ad acquisto di beni e servizi	314
Altre sopravvenienze passive	77
Insuss. pass. relative ad acquisto di beni e ser.	2
Altre insussistenze passive	17
Arrotondamenti e abbuoni passivi	1

I proventi straordinari sono rappresentati a CE da complessivi €/000 401 e specificatamente:

SOPRAVVENIENZE ATTIVE E INSUSSIST. DEL PASSIVO	
Sopravvenienze attive diverse	51
Sopravvenienze att relative ad acq. di beni e serv	305
Insussistenze attive v/Aziende sanitarie pubbliche della Regione	44
Insuss. att. rel. ad acq. di beni e servizi	1

In ordine ai proventi straordinari va evidenziato il gap rilevato nell'esercizio 2023 rispetto al precedente stante il maggiore ricavo per insussistenze del passivo contabilizzato nel 2022. Tale minore ricavo straordinario, pari a €/000 2.534, ha fortemente contribuito sfavorevolmente riguardo alla determinazione del risultato di esercizio 2022.

Gli "Accantonamenti Tipici dell'Esercizio" impattano sul bilancio secondo le seguenti voci di costo, per un totale di €/000 2.440:

Accant. fondi altri oneri diversi - Applicaz. L. "Balduzzi"	38
Accant. fondo oneri rinnovi contrat. Dirigenza medica	241
Accant. fondo oneri rinnovi contrat. Dirigenza NON medica	47
Accant. fondo oneri rinnovi contrat. comparto	76
Accant. per vertenze giudiziarie e contenz.	22
Accant. per copertura diretta dei rischi (autoassicurazione)	584
Accant. per quote inutilizzate contributi da soggetti pubblici per ricerca	1.432

La voce *Imposte e tasse* per l'anno 2022 incrementa il valore rispetto all'Esercizio precedente, per €/000 78 e si attesta su €/000 1.649. Tale voce è alimentata quasi esclusivamente dall'Imposta Regionale sulle Attività Produttive.

Di seguito l'analisi puntuale dell'aggregato:

IRAP su pers. dip. (Base imp.le Redditi da Lavoro)	1.383
IRAP su pers. dip. (Base imp.le Redditi da Lavoro)-Ricercatori	56
IRAP su altre categ. (Base Imp.le Redditi)	124
IRAP su attività libero professionale	78
IRAP su consulenze art. 55 co.2 e L. 1/2002 (c.d. prestazioni aggiuntive)	8

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



ESAME INCREMENTO 2% DEI COSTI AL 31/12/2022 E BILANCIO 2004

Vincolo incremento del 2% sui costi per acquisto di beni e servizi rilevati nel 2004

Non è stato rispettato il vincolo del 2% ex L.R. n. 40/2007 nonché DGR n. 1442/2009 (DIEF 2009), tenuto conto che dal valore dei costi di produzione, al netto dei costi del personale, sono state detratte le voci di ricavo iscritte nel valore della produzione, che sono direttamente correlate alle voci di spesa incluse nei Costi della Produzione.

Tra esse si evidenziano:

- Il finanziamento per somministrazione diretta dei farmaci;
- La sterilizzazione degli ammortamenti relativi ai beni acquistati con contributi finalizzati.

Sintesi in €/000

Tot. Costi Governabili Bilancio 2004	Incremento del annuo 2 %	Totale tetto	Tot. Costi Governabili Bilancio Eserc. 2022	Incremento percentuale
5.694	1.139	6.833	24.534	217%

L'incremento del vincolo del 2% dei costi governabili della produzione è stato superato in quanto i costi del 2004 sono rapportati al funzionamento di un piccolo ospedale con dimensioni strutturali di gran lunga inferiori rispetto al nuovo, infatti la dimensione a tale epoca era circa di 7.000 mq., dotato di tecnologie ed impianti semplici, ambienti non climatizzati, spesso non a norma e sui quali gli interventi manutentivi non rappresentavano importi rilevanti.

In tale contesto va ribadito che i costi evidenziati in consuntivo sono riferiti all'attivazione del nuovo ospedale, il quale è dotato di una struttura con superficie di circa 20.000 mq., adeguata a norma, di attrezzature tecnologiche complesse (grandi macchine) e di ultima generazione.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



SINTESI DATI DI BILANCIO

Al fine di consentire una più agevole lettura dei dati di bilancio, di seguito si riportano le tabelle di sintesi dello Stato Patrimoniale.

ESAME DELLA SITUAZIONE PATRIMONIALE

VOCI DI BILANCIO	VALORI IN BILANCIO		COMPOSIZIONE %	
	31/12/2022	31/12/2021	31/12/2022	31/12/2021
DISPONIBILITA' LIQUIDE	390	7.245	-2	-61
CREDITI OPERATIVI, RATEI E RISCONTI ATTIVI	29.886	20.116	-182	-171
DEBITI OPERATIVI, RATEI E RISCONTI PASSIVI	-13.897	-15.573	85	132
ATTIVO REALIZZABILE NETTO	16.379	11.788	-100	-100
MAGAZZINO	827	747	2	2
IMMOBILIZZAZIONI MATERIALI - IMMATERIALI	23.944	23.125	58	65
IMMOBILIZZAZIONI FINANZIARIE	15	15	-	-
CAPITALE INVESTITO	41.165	35.675	-40	-33
FONDI ACCANTONAMENTO	10.599	9.178	26	26
PATRIMONIO NETTO	30.566	26.497	74	74
COPERTURE FINANZIARIE	41.165	35.675	100	100

Dai dati in tabella si può evincere un sostanziale incremento dei crediti operativi dell'Ente rivenienti dai rapporti con il Ministero della Salute, per €/000 1.026, in gran misura da quelli con la Regione Puglia per €/000 28.121, siano essi afferenti alle attività correnti e a finanziamenti vincolati (in C.Capitale o per Ricerca) .

Oltre i Risconti Attivi, par a €/000 17, di seguito si espone il dettaglio della situazione creditoria dell'Ente.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Crediti	29.758
Crediti v/Stato	1.026
a) Crediti v/Ministero - investimenti	556
b) Crediti v/Ministero - per ricerca	470
Crediti v/Regione o Provincia Autonoma	28.121
a) Crediti v/Regione o Provincia Autonoma - parte corrente	5.084
b) Crediti v/Regione o Provincia Autonoma - patrimonio netto	23.037
Crediti v/aziende sanitarie pubbliche della Regione	71
Crediti v/Erario	10
Crediti v/altri	528

I debiti operativi si decrementano rispetto all'esercizio precedente per €/000 174. Un attore di questo aggregato è la Regione Puglia che, per maggiori anticipazioni rispetto alle assegnazioni definitive, vanta un credito pari a €/000 1.463, comunque inferiore al 2020.

Si incrementa il debito vs/fornitori per €/000 197 rispetto all'esercizio precedente, attestandosi così su €/000 5.979.

Il debito verso l'Istituto Tesoriere si attesta su €/000 546, e rappresenta quanto da versare in ottemperanza agli obblighi contributivi e V/Erari di fine esercizio.

Di seguito la composizione del debito.

DEBITI	13.483
Debiti v/Regione o Provincia Autonoma	1.463
Debiti v/aziende sanitarie pubbliche	249
Debiti v/fornitori	5.979
Debiti v/Istituto Tesoriere	546
Debiti tributari	1.950
Debiti v/istituti previdenziali, assistenziali e sicurezza sociale	1.323
Debiti v/altri	1.973

Nella seguente tabella, invece, si esplica la situazione relativa alla consistenza dei Fondi Rischi ed Oneri che vedono un saldo complessivo pari a €/000 10.600, così ripartito, rispetto al 2021.

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



I Fondi “Rischi”, invece, così vengono rappresentati:

	2022	2021	Delta 2021/2020
FONDI PER RISCHI	4.336	3.735	+ 606
Fondo rischi per cause civili ed oneri processuali	277	255	+ 22
Fondo rischi per copertura diretta dei rischi (autoassicurazione)	3.917	3.333	+ 584
Altri fondi rischi (Fondi a copertura Interessi di mora)	143	147	-

I Fondi per quota inutilizzata contributi di parte corr. inutilizzata in applicaz. dell’Art. 29 c. e, D. Lgs.vo 118/11 presentano la seguente consistenza.

Descrizione	Consistenza fondo (€/000)
Fondo quote inutilizzate contributi da Regione Medicina di Genere	37
Fondo quote inutilizzate contributi per ricerca Misura 5X1000	264
Fondo per la Piramide dei Ricercatori	4.868
Fondo "Progetti di Rete"	8
Fondo Prgetto SG-SMYD3	83
Fondo Progetto UVAR	5
ERN Apulia	1
Totale	5.266

Altri Fondi e Oneri, per €/000 998

	2022	2021
Altri fondi	205	208
F.do rinnovo contratt. person. Dirigenza Medica	621	380
F.do rinnovo contratt. person. Dirigenza Sanitaria Non Medica	120	72
F.do rinnovo contratt. person. Comparto Ruolo Sanitario	32	537
F.do rinnovo contratt. person. Dirigenza Professionale	5	5
F.do rinnovo contratt. person. Dirigenza Amministrativa	15	15

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Di seguito invece lo specifico di “Altri Fondi” (€/000).

F.do Formazione area SPTA	4
F.do ex art. 2 D.L. 158/2012 – “L. Balduzzi”	87
F.do Reolamento Sperime. Clin. Art. 12 _D. Sc.	96
F.do Regolamento Sperime. Clin. Art. 12 _D. San.	18
Totale	205

Fondo Svalutazione Crediti

	2022	2021
FONDI SVALUTAZIONE CREDITI	84	84
Fondo Svalut. Crediti da Clienti	84	84

ANALISI PATRIMONIO NETTO

	2022	2021	Delta 2022/2021
Fondo di dotazione	1.205	1.205	-
Finanziamenti per investimenti	39.148	30.439	8.709
1) Finanziamenti per beni di prima dotazione	-	-	
2) Finanziamenti da Stato per investimenti	14.703	14.382	321
a) Finanziamenti da Stato ex art. 20 Legge 67/88	4.921	888	4.033
b) Finanziamenti da Stato per ricerca	76	0	76
c) Finanziamenti da Stato - altro	9.705	13.494	- 3.789
3) Finanziamenti da Regione per investimenti	10.632	14.391	-3.759
4) Finanziamenti da altri soggetti pubbl, per investimenti	12.308	-	
4) Finanziamenti per investimenti da rettifica contributi in conto esercizio	1.505	1.666	-161
Riserve da donazioni e lasciti vincolati ad investimenti	16	20	-4
Altre riserve	-	-	-
Utili (perdite) portati a nuovo	123	123	-
Utile (perdita) dell'esercizio	- 9.926	-5.291	- 4.635
Totale Patrimonio Netto	30.566	26.497	4.069

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Saverio de Bellis”

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

Il Bilancio di Esercizio 2022 presenta un valore a **PATRIMONIO NETTO** pari a €/000 30.566, in incremento rispetto al 2021 per €/000 4.069.

In merito all'applicazione delle disposizioni ex Art. 41 DL 66/2014 in ordine ai termini di pagamento dei fornitori previsti dal D. Lgs.vo 231/2002 e ss. mm. e ii. si riporta il

Prospetto pagamento fornitori al 31.12.2022

Importo dei pagamenti effettuati dopo la scadenza	€/000 1.054
Indice di tempestività dei pagamenti	- 21

Indice di tempestività calcolato secondo quanto stabilito dall'art. 9 DPCM del 22.09.2014, entrato in vigore dal 01.01.2015.



CONCLUSIONI

Il Bilancio di Esercizio 2022 presenta una perdita pari a €/000 9.926, incrementata rispetto al 2021 per €/000 4.635.

Tale perdita è stata autorizzata dalla Regione Puglia e pertanto oggetto di copertura, giusta nota del Dipartimento Promozione della Salute del Benessere Animale – Sez. Amministrativa, Finanza e Controllo in Sanità – Sport per Tutti n. AOO/168/Prot. 3653 del 30/05/2023.

La gestione dell'intero Presidio, nel 2022, è ancora stata caratterizzata da una forte influenza emergenziale dovuta alla crisi pandemica da Covid19. Tale emergenza ha rappresentato maggiori costi per l'Ente pari a €/000 1.810 che, nello specifico sono da addebitare alle acquisizioni di beni, per €/000 126 e servizi, per €/000 786, oltre che per spese del Personale per €/000 898. Tali costi, oggetto di puntuale e documentata rendicontazione, sono stati comunque oggetto di ristoro da parte della Regione Puglia per €/000 556, giusta propria nota relativa alle finali Assegnazioni.

Nonostante il particolare momento storico, però, l'IRCCS ha ben reagito alla crisi introducendo capacità e organizzazione che si sono tradotte in un aumento della produzione per servizi erogati (in regime di ricovero e specialistica) e che hanno ben attutito il colpo inferto dall'emergenza pandemica. Tale incremento è quantificato in €/000 669 di maggiori ricavi. L'aumento delle attività, è evidente, ha determinato un incremento dei costi operativi, comunque ben compensati dal maggiore riconoscimento del contributo regionale per "Funzioni" (+ €/000 800) – che si auspica diventi entità strutturata del bilancio dell'Ente.

Le attività cantierizzate nel 2022, documentate nei processi, e ormai in piena operatività già nei primi mesi del 2023, rappresentano ulteriori e potenziali elementi di crescita delle prestazioni da erogare traducibili, fra l'altro, in una maggiore presenza sul territorio dell'Ente ed in una maggiore attrattività, con possibile incremento della mobilità attiva extraregionale.

Significativo, in tal senso, il percorso del paziente obeso comprensivo della Chirurgia, compresa quella Bariatrica, per la quale si sta già configurando nel 2023 un'ulteriore crescita delle prestazioni erogate. Allo stesso modo la performance chirurgica, stante il nuovo assetto direzionale e organizzativo della Unità, fa segnalare un notevole incremento di produzione quantificato in un plus pari a circa €/000 500/mese. La proiezione di tali risultati, ormai certificati, fa prevedere risultati eccellenti.

In ultimo, effetti positivi sulla produzione saranno garantiti dall'incremento previsto dei posti letto di ricovero ordinario per la UOC Rianimazione (n. 4 pl) e per la UOSD Oncologia (n. 4 pl).



In allegato alla presente relazione si compie quella afferente alle attività di Ricerca. Sarà facile evincere come il carattere traslazionale delle attività è sempre interprete principale di un'azione ormai tesa alla crescita, senza soluzione di continuità.

Castellana Grotte (BA), 31/05/2023

F.to

II DIRETTORE GENERALE

Dr. Tommaso A. Stallone

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Saverio de Bellis"

Ente di Diritto Pubblico D.M. del 31/03/1982

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE
ANNO 2022

Direzione Scientifica

LINEA 1

MEDICINA DI PRECISIONE IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 1 - “*Medicina di precisione in Gastroenterologia*”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell’anno 2022 sono i seguenti:

Progetto 01/2020: Il ruolo di esosomi per il cross-talk tra cellule tumorale e il microambiente in hepatocarcinoma

Responsabile: dott.ssa Silke Krol

Partecipanti: Francesco Dituri, Matteo Centonze, Nunzio Denora

Gli esosomi sono vescicole di membrana le cui dimensioni di diametro sono comprese tra i 30 nm e i 130 nm. Sono prodotte nel compartimento endosomiale dai corpi multivescicolari (MVB). Vengono rilasciati nel milieu extracellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Gli esosomi contengono mRNA, RNA lungo non codificante, proteine, DNA e miRNA in una composizione ben definita. Prove sperimentali indicano il ruolo fondamentale degli esosomi nell'insorgenza di patologie ed in particolare nella crescita di tumori. Ciò accade poichè influenzano il microambiente tumorale e preparano le cavità per le metastasi. Nel carcinoma epatocellulare (HCC), il tumore è composto da: epatociti maligni, cellule stromali tumorali attivate dalle cellule epatiche stellate, fibroblasti associati a tumori, miofibroblasti, cellule immuni e matrice extracellulare (ECM) dove avviene principalmente lo sviluppo della fibrosi [1].

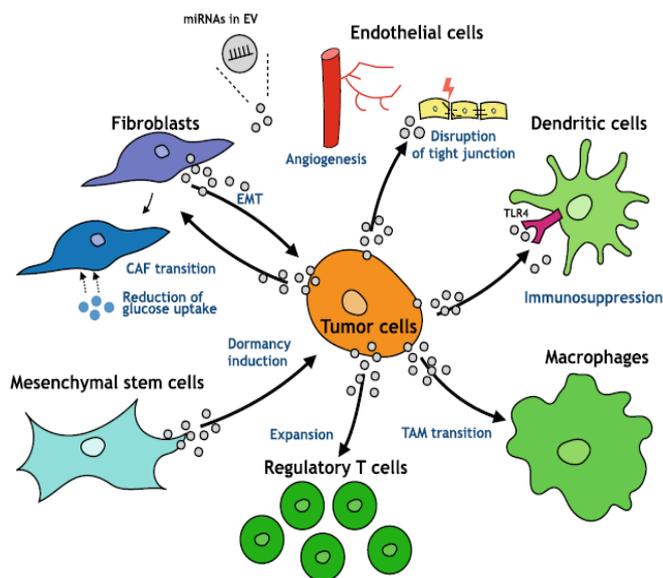


Figura. miRNA esosomiale e crosstalk nel microambiente tumorale.[2].

Goulet et al. hanno mostrato che gli esosomi derivanti da cellule del tumore alla vescica contengono un alto tasso di TGF-beta. In alcune linee cellulari il contenuto di TGF-beta rilasciato negli esosomi è maggiore di quello libero. [3]. Il TGF-beta esosomiale è coinvolto nella transizione fenotipica dei fibroblasti in CAFs come il TGF-beta libero ma non è soggetto alle proprietà che ha il TGF-beta libero in relazione alla produzione di ECM.

Si può concludere, in sintesi, che il ruolo degli esosomi nel crosstalk tra cellule tumorali, il loro microambiente e siti metastatici distanti è meritorio di interesse, specialmente alla luce dei fallimenti delle strategie terapeutiche che hanno come target il pathway del TGF-beta. Ad esempio, il TGF-beta racchiuso negli esosomi potrebbe bypassare il controllo degli inibitori e favorire lo sviluppo di tumori. Nel progetto ci concentreremo sulla presenza del TGF-beta negli esosomi derivanti da linee cellulari di epatocarcinoma con e senza cellule CAF che possano avere la funzione di trigger.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Sviluppo di Organoidi (3D) dalla linea cellulare dell'epatocarcinoma e fibroblasti associati al cancro

Obiettivo specifico 2: Identificazione di TGF-beta in esosomi rilasciati da CAF o da cellule tumorali

Obiettivo specifico 3: Pathway degli esosomi contenenti TGF-beta nelle cellule recipienti

Obiettivo 1: Sviluppo di Organoidi (3D) dalla linea cellulare dell'epatocarcinoma e fibroblasti associati al cancro

Svilupperemo modelli cellulari 3D contenenti HCC di linee cellulari quali HepG2 dei primi stadi tumorali ed HLF degli ultimi stadi tumorali. Gli organoidi saranno messi in coltura secondo il modello delle gocce appese o superfici coperte di PEG6000 in presenza o assenza di cellule CAF isolate dai tumori dei pazienti.

Alternativamente, i CAF saranno fatti crescere in coltura su superfici decorate "a frattali" che promuovono la crescita di queste cellule in strutture 3D simili a tumoroidi. Le colture cellulari saranno realizzate in terreno privo di esosomi. Gli esosomi rilasciati saranno raccolti e caratterizzati.

Obiettivo 2: Identificazione di TGF-Beta in esosomi rilasciati da CAF o da cellule tumorali

Gli esosomi isolati da monoculture di cellule CAF o HCC, così come da cellule di coculture CAF/HCC in condizione di simulare diversi fenotipi (più o meno aggressivo) o diversi stadi di sviluppo dei tumori saranno sottoposte ad analisi tramite immunoassays che quantifichino la quantità di TGF-beta prodotto. Qualora siano rilevate frazioni di esosomi contenenti TGF-beta queste saranno caratterizzate più nel dettaglio al fine di stabilire la composizione lipidica e/o la presenza di glicocalice.

Obiettivo 3: Pathway degli esosomi contenenti TGF-Beta nelle cellule recipienti

Per tracciare gli esosomi durante le interazioni o durante l'uptake in cellule recipienti, gli esosomi saranno marcati con lectine fluorescenti (tramite legame delle stesse al glicocalice), o per inclusione di nanoparticelle d'oro. L'inclusione di nanoparticelle d'oro negli esosomi si otterrà a seguito della fagocitosi di questi da parte di cellule produttrici di TGF-beta (HCC/CAF) e della successiva raccolta dei relativi esosomi rilasciati nel mezzo.

La dimensione delle nanoparticelle varierà tra i 2 nm ed i 15 nm. Gli esosomi contenenti nanoparticelle d'oro verranno identificati tramite microscopia elettronica

Dati preliminari:

Cultura cellulare 3D di cellule HepG2 su superfici coperte di PEG6000

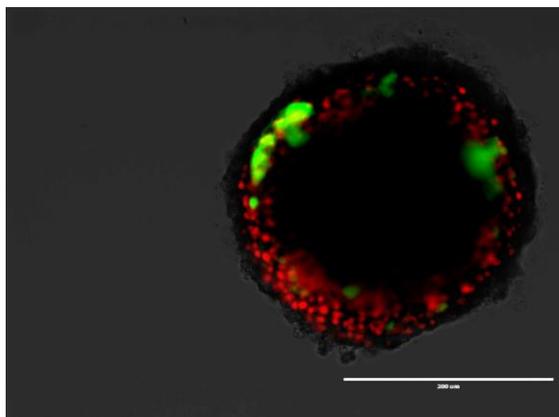


Figura: Immagine fluorescente di uno sferoide formato da cellule HepG2 dopo 5 giorni in coltura a goccia. Fluorescenza rossa: propidio ioduro; Fluorescenza verde: fluorescein acetato

Colture cellulari 3D di cellule CAF su superfici frattali

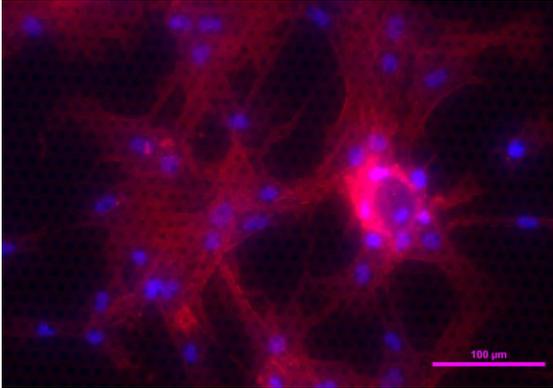


Figura: Immagini fluorescenti di CAFs che formano sferoidi multicellulari (destra) su superfici ricoperte di frattali. Fluorescenza blu: DAPI, la fluorescenza rossa è causata da filamenti di actina

Isolazione degli esosomi su TLC (thin layer chromatography)



Figura: lastre di TLC dopo esposizione 2D a miscele di acqua e solventi organici. Corsia superiore: esosomi; Corsia inferiore: lipidi dopo il trattamento con Triton

Metodologie e analisi statistiche:

1. CAF isolation

I CAF saranno isolati da tessuti di HCC umani espianati in fase di resezione chirurgica. La procedura prevede la disgregazione dei tessuti con collagenasi e la purificazione delle cellule con un kit commerciale per arricchimento di fibroblasti. La purezza della preparazione cellulare sarà valutata mediante analisi tramite citofluorimetro e microscopia a fluorescenza per evidenziare la presenza di marker mesenchimali (inclusi vimentina, alfa-SMA e N-caderina) ed escludere la presenza di marker ematopoietici/ immunologici/ epatocellulari (come CD45, alfa-fetoproteina, EpCAM e E-caderina).

Colture cellulari 3D

Metodo Goccia Sospesa

40 microlitri di sospensione cellulare tripsinizzata in terreno cellulare sono depositati sul coperchio di una petri dish che è riempita d'acqua per prevenire l'evaporazione. Il coperchio verrà piazzato sulla petri dish e dopo 24 ore i microtumori inizieranno a formarsi. Microtumori densi possono essere osservati dopo 2-7 giorni a seconda del tipo di cellula. I microtumori cresceranno in ogni goccia.

Piastre multi-wells coperte da PEG6000

Le multi wells sono riempite di una soluzione al 3% di PEG6000 e incubate 1 ora a 35°C. La soluzione in seguito è rimossa e la sospensione cellulare delle cellule tripsinizzate aggiunta. Sferoidi 3D si formano dopo 1-2 giorni.

Coltura di cellule CAF su frattali

Si è scoperto che le CAF isolate crescono su specifiche strutture frattali comparabilmente a strutture microtumoriali composte di CAFs e attaccate a strutture 3D multicellulari.

Isolamento degli esosomi

Gli esosomi sono isolati tramite il metodo del salting out descritto da Brownlee et al. [4] dal mezzo raccolto da cellule cresciute in assenza di esosomi (Terrenoserum free o con siero fetale bovino privo di esosomi).

2. Caratterizzazione degli esosomi su TLC

Gli esosomi sono dissolti in un volume compreso tra i 100 e i 30 microlitri di una soluzione di HBS. Vengono poi caricati sottoforma di "spot" su TLC in triplicato, 6 microlitri per spot. È stato notato che gli esosomi corrono meglio nei solventi polari, l'acqua più di ogni altro. Inoltre sembrano separarsi meglio quando le TLC sono poste orizzontalmente e non verticalmente. Successivamente le TLC sono analizzate al chemidoc e poi sottoposte a colorazione tramite immersione in permanganato di potassio. Attualmente è in corso una ottimizzazione della metodica al fine di ottenere una separazione migliore degli esosomi.

Risultati attesi:

- 1) **Ruolo di esosomial TGF-beta in cross-talk tra cellule tumorale e microambiente**
- 2) **Nuove tecnologie per seguire esosomi in cellule ed analisi (TLC)**
- 3) **Identificazione di nuovi bersagli per erapia di cancro**

Innovazioni:

- 1) **Esosomi marcati di oro:** il rilascio di esosomi contenuti oro non è ancora stato descritto in letteratura. Solo di recente una pubblicazione ha introdotto il concetto di esosomi contrassegnati da farmaci-nanoparticelle di silice porosa riscaldate come sistema target di consegna del farmaco. [5].
- 2) **TLC per caratterizzazione facile e veloce di esosomi:** la tecnologia è semplice ed usa solo una piccola quantità di esosomi

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il PI vanta una esperienza sull'uso di nanomateriali in particolare nanoparticelle d'oro come veicolo per il farmaci tramite barriere e sulla caratterizzazione dei singoli esosomi. Ha sviluppato in progetti precedenti sferoidi 3D di cellule da utilizzare per test con farmaci. Matteo Centonze è un esperto per la coltura cellulare e la biologia molecolare. Francesco Dituri è un esperto per il pathway di TGF-beta e CAF. Vito De Beneditis ha sviluppato in collaborazione con il PI l'isolamento degli esosomi con il metodo "salting out", e la successiva caratterizzazione degli stessi tramite TLC e. Le competenze dei 4 ricercatori convergono in tutti gli aspetti di questo progetto complesso.

Bibliografia:

1. Carloni V, Luong TV, Rombouts K. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: More complicated than ever. *Liver Int.* 2014;34: 834–843. doi:10.1111/liv.12465
2. Kogure A, Kosaka N, Ochiya T. Cross-talk between cancer cells and their neighbors via miRNA in extracellular vesicles: An emerging player in cancer metastasis. *J Biomed Sci.* 2019;26: 1–8. doi:10.1186/s12929-019-0500-6
3. Fricke F, Lee J, Michalak M, Warnken U, Hausser I, Suarez-Carmona M, et al. TGFBR2-dependent alterations of exosomal cargo and functions in DNA mismatch repair-deficient HCT116 colorectal cancer cells. *Cell Commun Signal.* 2017;15: 14. doi:10.1186/s12964-017-0169-y
4. Brownlee Z, Lynn KD, Thorpe PE, Schroit AJ. A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J Immunol Methods.* 2014;407: 120–126. doi:10.1016/j.jim.2014.04.003
5. Yong T, Zhang X, Bie N, Zhang H, Zhang X, Li F, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nat Commun.* 2019;10: 3838. doi:10.1038/s41467-019-11718-4

Timeline (Gantt chart)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Obiettivo 1: organoid HCC e/o CAF				D1								
Obiettivo 2: TGF-beta in esosomi da CAF o da cellule tumorale							M1					
Obiettivo 3: Pathway degli esosomi con TGF- beta in cellule ricipienti									M2			M3

D1. Sferoidi di cellule HCC e CAF in 3D

M1. Presenza di esosomi con TGF-beta

M2. Esosomi che contengono nanoparticelle d'oro

M3. Pathway dagli esosomi con TGF-beta

Progetto 02/2019: Efficacia del trattamento combinato Paclitaxel e Ramucirumab in modelli di carcinoma gastrico avanzato con resistenza indotta dai taxani: studio *in vitro* e *in vivo*

Principal Investigator: dott.ssa Catia Messa

Partecipanti: Ivan Lolli, Claudio Lotesoriere, Maria Notarnicola, Rosalba D'Alessandro, M.Grazia Refolo, Isabella Gigante, Annalisa Schirizzi

Background

Le maggiori conoscenze sulla biologia del carcinoma gastrico (GC) hanno aumentato le possibilità di trattamento di questa neoplasia. Pur tuttavia, ad oggi la chemioterapia combinata e la terapia molecolare costituiscono le uniche opzioni di trattamento per i pazienti con GC avanzato o metastatico. La sopravvivenza media dei pazienti con malattia in fase metastatica, trattati con la sola chemioterapia, raramente supera i 10 mesi. I protocolli chemioterapici di prima linea si basano principalmente sull'impiego di combinazioni di fluoropirimidine (5FU o capecitabina) e derivati del platino (cisplatino o oxaliplatino) cui è possibile associare epirubicina o docetaxel [1, 2].

Circa il 20% dei pazienti presenta una maggiore espressione del recettore HER2. In questi casi, il trattamento con Trastuzumab, anticorpo monoclonale anti-HER2, in associazione a cisplatino e fluorouracile, aumenta significativamente gli indici di sopravvivenza. Attualmente, la via molecolare attivata da HER-2 è l'unica che dispone di un farmaco target [2-4]. Nei casi in cui si manifesta progressione dopo una terapia di prima linea viene valutata la possibilità di una terapia di seconda linea. È di recente acquisizione una classificazione molecolare delle neoplasie gastriche in tumori positivi per EBV (Epstein-Barr Virus), tumori con instabilità dei microsattelliti (hypermuted), tumori genomicamente stabili (GS, Genomically Stable) e tumori con instabilità cromosomica (CIN, Chromosomal Instability) [5]. Questi sottogruppi, che differiscono non solo per l'assetto biomolecolare ma anche per numerose varianti clinico-patologiche (sede, età di insorgenza, istotipo predominante), potrebbero suggerire un nuovo approccio terapeutico che riconosca specifici target su cui agire.

Numerosi studi sono focalizzati sull'impiego di terapie combinate in cui viene sfruttata l'azione sinergica di chemioterapia sistemica e terapia a bersaglio molecolare. L'applicazione di tali protocolli ha come obiettivo primario allungare la sopravvivenza del paziente (OS), e garantire una migliore qualità di vita e questo rappresenta il presupposto per l'impiego di terapie di terza linea, strategia impensabile fino a non molto tempo fa.

L'angiogenesi svolge un ruolo cruciale nella patogenesi e nella progressione del cancro gastrico e il VEGFR-2 rappresenta uno dei recettori più importanti nella mediazione del segnale che porta alla formazione di nuovi vasi. Il Ramucirumab, un anticorpo monoclonale contro il VEGFR-2, è stato il primo agente anti-angiogenico a dimostrarsi efficace verso il carcinoma gastrico avanzato. Sulla base dei risultati ottenuti da due diversi studi di fase III, il Ramucirumab è stato approvato sia come mono-terapia sia in combinazione con Paclitaxel (PTX) per i pazienti con malattia in progressione dopo una precedente terapia a base di platino e fluoropirimidina [6, 7]. Le azioni pro-angiogeniche dei VEGF nelle cellule endoteliali sono mediate principalmente attraverso il legame e l'attivazione di VEGFR-2. La recente scoperta di diversi ligandi VEGF e dell'espressione di VEGFR-1 e VEGFR-3 nelle cellule tumorali epiteliali suggerisce un ruolo diretto di questi fattori e dei loro recettori nel controllo autocrino di alcuni processi biologici nelle cellule tumorali [8-11]. Nel nostro laboratorio si sta conducendo uno studio prospettico su pazienti con carcinoma gastrico in cui vengono valutati i livelli sierici di VEGF e dei suoi recettori nel corso della terapia combinata Ramucirumab e PTX al fine di stabilire se gli stessi possano essere considerati come possibili marcatori predittivi e prognostici. Studi precedenti basati su analisi retrospettive hanno rilevato l'importanza di questi fattori non solo nel processo di angiogenesi ma anche sulla crescita del tumore evidenziando la necessità di superare alcune criticità [12]. La sfida è conoscere i fattori di resistenza alla malattia, che possono essere generati da una resistenza primaria alla terapia in atto, oppure essere conseguenza di una resistenza acquisita durante la terapia stessa. La terapia anti-angiogenica potrebbe, in monoterapia, innescare una serie di meccanismi compensatori volti ad aggirare l'inibizione esercitata dai farmaci somministrati [13-18]. Per questo è in corso, nel nostro laboratorio, l'analisi sierologica dei fattori di crescita e pro-angiogenetici in corso di terapia al fine di rilevarne possibili variazioni e stabilire associazioni tra i loro livelli e lo stato di malattia inteso come controllo o progressione di malattia. Le terapie combinate, potrebbero dimostrarsi efficaci nel compensare possibili meccanismi di resistenza sviluppate verso un farmaco in monoterapia. Infatti, l'effetto derivante dal trattamento combinato con Ramucirumab e PTX è legato ai loro meccanismi d'azione che si intersecano e la via del segnale VEGFR2 è coinvolta in diverse funzioni delle cellule endoteliali, compresi i cambiamenti dinamici nella morfologia cellulare. Le interazioni tra VEGFR2 e proteine strutturali della cellula possono svolgere un ruolo cardine sia nel regolare la struttura cellulare che le cascate molecolari attivate dal recettore. A tale riguardo, è noto che

l'inibizione dei recettori VEGFR porta ad una diminuzione nei livelli della β -tubulina III (TUBB3) [19]. Pertanto, i segnali molecolari modulati dal Ramucirumab si intersecano con quelli modulati dal PTX. Il PTX esplica infatti la propria azione legandosi alla β -tubulina ed interferendo così con l'architettura dei microtubuli. Ciò determina un blocco nella fase G2/M e l'induzione del processo apoptotico, attraverso l'attivazione delle caspasi. Questo meccanismo d'azione è stato studiato in diversi tipi di cellule tumorali ed è alla base dell'attività antitumorale del PTX [20-22]. La resistenza acquisita al PTX nel GC può essere evidenziata attraverso alterazioni nei microtubuli, da ridotte risposte ai farmaci antimitotici e dalla resistenza apoptotica nonché da un'aumentata transizione epitelio-mesenchimale [EMT]. Chen e collaboratori hanno dimostrato che in cellule di GC resistenti erano rilevabili maggiori livelli di TUBB3, alterazioni nel ciclo cellulare, un'attenuata risposta ad agenti antimitotici e una maggiore capacità anti-apoptotica [23]. Si è dimostrato inoltre, che tale meccanismo d'azione è comune anche ad altri tumori resistenti alla terapia con PTX, come cancro ai polmoni, alle ovaie e alla prostata [24-27]. Tuttavia, questi studi suggeriscono che altre molecole potrebbero essere considerate come bio-marcatore nel processo di resistenza al PTX, nel carcinoma gastrico. Tra queste le proteine associate al citoscheletro o alcuni dei regolatori della transizione nella fase G2/M, come la Ciclina B1 la cui maggiore espressione viene identificata come marcatore di resistenza al PTX in alcuni tipi di tumore [28]. Inoltre, diversi studi hanno rivelato che le vie del segnale PI3K/Akt/mTOR e MAPK risultano attivate in caso di resistenza PTX [29, 30]. Alla luce di queste evidenze sperimentali e sulla base di uno studio che ha dimostrato che il blocco dei recettori VEGFR1/2 può portare a una diminuzione dei livelli di TUBB3 [19], abbiamo formulato la nostra ipotesi che vede nella combinazione di Ramucirumab e PTX la possibilità di superare possibili resistenze indotte dai due farmaci somministrati singolarmente. In particolare, la combinazione PTX e Ramucirumab potrebbe essere efficace anche in quei pazienti che hanno sviluppato insensibilità a una precedente terapia con taxani (schema FLOT). Se ciò si dimostrasse vero sarebbe di grande utilità per stabilire i criteri di eleggibilità per la terapia di seconda linea con PTX e Ramucirumab. Recentemente si è dimostrato che un altro componente della famiglia dei taxani, il Cabazitaxel, può essere impiegato nella terapia di seconda linea nei casi in cui si sviluppano resistenze alla terapia di prima linea con il Taxotere [26]. Si è dimostrato, *in vitro*, che il Cabazitaxel pur essendo in grado di stabilizzare i microtubuli con la stessa efficacia del Taxotere, risulta 10 volte più potente del Taxotere riuscendo così ad esplicitare la propria azione antitumorale anche sulle cellule tumorali resistenti.

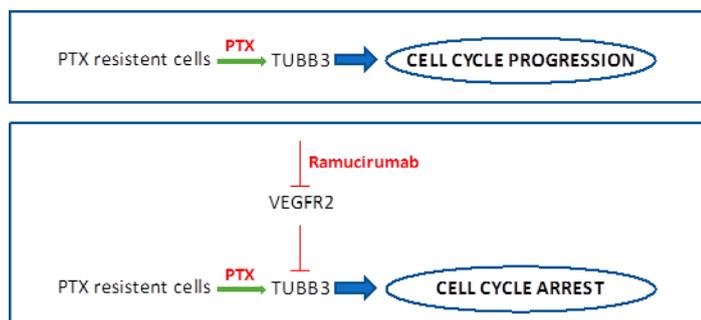
Obiettivi specifici dello studio

- Attraverso l'analisi dei principali fattori bersaglio dell'azione di Ramucirumab e PTX ci proponiamo di comprendere i possibili meccanismi di resistenza che si sviluppano in corso di trattamento antitumorale. In particolare, verranno condotti esperimenti *in vitro* e *in vivo* atti a verificare la nostra ipotesi, secondo cui la terapia combinata con Ramucirumab possa superare possibili resistenze indotte dalla mono terapia con PTX, tanto da essere efficace anche in quei pazienti che hanno sviluppato insensibilità a una precedente terapia con taxani (schema FLOT).
- I risultati ottenuti dagli studi sulla combinazione Ramucirumab e PTX verranno comparati con quelli ottenuti combinando il Ramucirumab con Cabazitaxel. I taxani sono importanti agenti chemioterapici con comprovata efficacia antitumorale, pur essendo il loro uso limitato a causa dallo sviluppo di meccanismi di resistenza. In questo studio intendiamo indagare i meccanismi d'azione del Cabazitaxel, un taxano semisintetico creato per superare la resistenza indotta dai taxani, con comprovata efficacia nel tumore prostatico. Non ci sono dati a riguardo nel trattamento del GC.

Obiettivo 1

Verranno studiati i meccanismi molecolari coinvolti nel processo di angiogenesi, la cui attivazione porta alla secrezione da parte delle cellule tumorali di quei fattori che, interagendo con il microambiente, rendono possibile la formazione di nuovi vasi. In particolare, saranno valutati gli effetti singoli e combinati di Ramucirumab e agenti chemioterapici sull'espressione delle forme del recettore VEGFR-1/3 che sembrano essere coinvolti nel controllo autocrino di alcuni processi biologici nelle cellule tumorali. Saranno altresì indagate vie angiogenetiche alternative a quella del VEGFR2 che potrebbero essere attivate dalla terapia con Ramucirumab, come ad esempio quelle del PDGF, FGF e TIE-2. Inoltre, considerando i possibili meccanismi di resistenza alla terapia con PTX verranno analizzati meccanismi quali l'organizzazione dei microtubuli, la transizione epitelio-mesenchimale, la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi cellulare. Considerando l'ipotesi alla base del nostro studio, l'organizzazione dei microtubuli e in particolare l'espressione della TUBB3 potrebbe costituire un fattore importante nello stabilire l'efficacia della terapia combinata Ramucirumab e PTX. Nel modello da noi proposto, ad un possibile aumento dei livelli di questa proteina, dovuti a meccanismi di resistenza al PTX, si contrappone un'azione opposta del

Ramucirumab che inibendo il recettore VEGFR2 andrebbe a diminuirne i livelli, rendendo possibile il superamento della resistenza indotta dal solo PTX.



Obiettivo 2

I taxani sono importanti agenti chemioterapici con comprovata efficacia antitumorale, pur essendo il loro uso limitato a causa dallo sviluppo di meccanismi di resistenza. In questo studio intendiamo indagare i meccanismi d'azione del Cabazitaxel (XRP6258), un taxano semisintetico creato per superare la resistenza indotta dai taxani. Tale farmaco viene impiegato con buoni risultati nella terapia di seconda linea in quei casi di carcinoma prostatico che hanno sviluppato resistenza alla terapia di prima linea con il Taxotere. Pertanto, sarebbe interessante indagarne l'efficacia anche nelle linee tumorali gastriche rese resistenti al PTX sperimentalmente nel nostro laboratorio. Saranno inoltre valutati gli effetti del trattamento combinato Ramucirumab e Cabazitaxel sulla crescita e motilità cellulare nelle linee di GC. Tali risultati verranno confrontati con quelli ottenuti a seguito del trattamento combinato Ramucirumab e PTX al fine di individuare i meccanismi molecolari principalmente coinvolti in tale resistenza.

Metodologie

Studio *in vitro*

Differenti linee cellulari di carcinoma gastrico umano, KATO III, NCI-N87, SNU-16, SNU-5, AGS e SNU-1, saranno sottoposte a trattamenti con diverse concentrazioni dei farmaci presi in esame e somministrati singolarmente o in combinazione a diversi intervalli di tempo. Per quanto attiene all'obiettivo 1, sarà inoltre generata una linea cellulare resistente al PTX grazie al trattamento prolungato con dosi scalari di PTX secondo il protocollo descritto da Chen D. e collaboratori [23]. Le caratteristiche morfologiche e molecolari di questa linea resistente saranno confrontate con quelle delle corrispondenti cellule sensibili dopo i trattamenti singoli e combinati con PTX o Cabazitaxel e Ramucirumab. Per comprendere i meccanismi molecolari che regolano questi fenomeni di resistenza GC, saranno analizzate le principali vie del segnale modulate dai due farmaci al fine di individuare dosi e tempi efficaci a produrre un effetto di potenziamento nella inibizione della proliferazione cellulare. I risultati ottenuti saranno inseriti in un modello computazionale che permette di calcolare un parametro indice del tipo di interazione tra i due farmaci. Si tratta del modello descritto da Chou, Chou e Talalay, implementato dal software CompuSyn (Biosoft, UK). Tale modello infatti, permette di ricavare un indice di combinazione (CI) e valori di $CI < 1$, $CI \pm 1$, e $CI > 1$ implicano rispettivamente sinergismo, additività e antagonismo. Verranno, così, ricavati per i farmaci in esame le concentrazioni e i tempi che danno un'azione inibitoria sinergica.

Per la proliferazione saranno utilizzati i seguenti metodi:

Saggio MTT

Dosaggio colorimetrico.

Ciclo cellulare

Tale studio sarà condotto sia mediante l'analisi di espressione molecolare dei principali fattori proteici coinvolti quali pCdk, pRb, ciclina B1, sia mediante citofluorimetria con l'utilizzo del Muse™ Cell Analyzer (Millipore), che permette di effettuare una misura quantitativa della percentuale di cellule presenti nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. Il principio si basa sull'uso di una Mix di reagenti (Muse™ Cell CycleReagent) che include DNA nucleare, fluorocromo Ioduro di propidio (PI) e RNasi A. L'analisi della progressione nel ciclo cellulare verrà valutata in seguito a specifici trattamenti e confrontata con quella rilevabile in seguito a trattamenti con agenti che bloccano il ciclo cellulare in fasi specifiche, come la timidina che blocca in G1/S o il nocodazolo che blocca in G2/M.

Determinazione del Ki67

L'antigene Ki-67 è una proteina del nucleo strettamente associata alla proliferazione cellulare. Tale antigene può essere determinato, mediante l'utilizzo di uno specifico anticorpo, in estratti proteici mediante Western Blotting o direttamente *in situ* mediante immunofluorescenza o citofluorimetria attraverso il kit di proliferazione Ki67 e l'utilizzo del Muse Cell Analyzer (Millipore).

Le combinazioni dei farmaci presi in esame verranno anche saggiate per studiare l'apoptosi, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali gastriche.

Apoptosi

Il processo apoptotico sarà studiato sia attraverso l'espressione di specifiche proteine coinvolte nelle vie del segnale estrinseco ed intrinseco con tecniche di WB, che con la citofluorimetria attraverso l'uso di Annexina V per l'analisi quantitativa delle cellule vive, in apoptosi precoce e tardiva, con il Muse Cell Analyzer; un secondo marcatore, il 7-AAD (7-ammino-actinomicina D), sarà usato per l'identificazione delle cellule necrotiche. Il Muse Cell Analyzer ci permetterà di valutare lo stato apoptotico delle cellule considerando l'attivazione delle Caspasi 3/7 e la permeabilizzazione della membrana plasmatica.

Organizzazione del citoscheletro e Migrazione cellulare

Per gli studi di migrazione cellulare si valuterà l'organizzazione del citoscheletro delle cellule tumorali gastriche in seguito ai diversi trattamenti farmacologici. A tale scopo, tecniche di immunocitochimica ci permetteranno di visualizzare, grazie al microscopio a fluorescenza, l'organizzazione dei filamenti d'actina, la localizzazione di proteine come la TUBB3 e la paxillina, e gli eventuali cambiamenti morfologici indotti. La capacità di migrazione delle cellule si valuterà usando lo "scratch wound test" che consiste nel determinare una incisione sul monostrato di cellule confluenti in piastre di coltura e di valutare, a tempi diversi, la capacità delle cellule di rimarginare il solco, cioè la loro capacità di migrare in presenza di specifici fattori. Le immagini vengono rilevate a tempi diversi, attraverso una camera digitale (Leica DMRXA) associata al microscopio ad inversione e analizzate con il Software ImageJ. La capacità di migrare da parte delle cellule è determinata dalla differenza tra l'ampiezza del solco al tempo zero e l'ampiezza a tempi successivi.

Invasione cellulare

La capacità di invasione cellulare (chemiotassi) sarà studiata usando il sistema "Matrigel-coated transwells" che impiega supporti porosi (8µm) trattati con una matrice extracellulare. Si valuta la capacità delle cellule, seminate nella parte superiore del filtro, di attraversare la membrana porosa quando nel compartimento inferiore sono presenti agenti chemioattrattori. Le cellule migrate attraverso il sistema poroso sono individuate e contate dopo colorazione con crystal violet.

Estrazione e quantificazione di RNA

L'RNA totale sarà estratto dai campioni di siero mediante kit commerciali e misurato mediante spettrofotometria. Aliquote di RNA totale (500 ng) saranno utilizzate per la retro trascrizione di cDNA successivamente amplificati mediante specifici primers. Saranno calcolati i livelli e la quantificazione relativa sarà effettuata considerando la β-actina, come standard interno. I livelli di RNA saranno espressi utilizzando la formula $2^{-\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct$ di RNA incognito – Ct dello standard interno. Il Ct è il numero di cicli di amplificazione con cui il termociclatore riesce a rivelare la minima quantità di prodotto di amplificazione.

Western-blotting (WB)

Tecniche di WB verranno impiegate al fine di valutare la transizione epitelio-mesenchimale pertanto, saranno valutati i livelli di espressione di proteine epiteliali come la E-caderina, la citocheratina e la claudina, così come i livelli di proteine mesenchimali quali la vimentina e la N-caderina.

Verranno, inoltre, esplorate le cascate fosforilative di alcune vie del segnale implicate nei processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione cellulare. Saranno studiate, in particolare, le vie delle MAPK e di PI3K/Akt, bersaglio diretto dell'azione di molti dei farmaci. In particolare sarà analizzata l'espressione dei principali marcatori a valle del complesso mTORC1 come S6, p70S6, 4EBP1, nella loro forma fosforilata e non, nonché delle proteine responsabili della sua regolazione come PI3K/Akt/TSC2. Analogamente, saranno poi analizzati i principali bersagli di mTORC2 come Akt, GSK3b, PKC. Questi studi saranno condotti anche in seguito a trattamento con inibitori dei componenti al crocevia delle diverse vie del segnale o over-esprimendo gli stessi in seguito alla trasfezione di plasmidi ricombinanti recanti la proteina in esame.

Studi *in vivo*

Negli studi *in vivo* verrà utilizzato il modello ortotopico proposto da Busuttill e colleghi [32]. Giunti alle 10-12 settimane i topi caratterizzati da doppio knockout per RecombinaseActivatingGene-2 (RAG2) e CytokineReceptorGamma-chain (GammaC) saranno sottoposti ad iniezione intragastrica, per la precisione la sospensione cellulare di linee cellulari di cancro gastrico in matrigel sarà iniettata a livello dello strato subsierosale della regione antrale dello stomaco. Il periodo necessario per la formazione del tumore e lo sviluppo di metastasi dipenderà dal citotipo iniettato. Dati in letteratura ci suggeriscono che le AGS nell'arco di 9 settimane portano allo sviluppo di metastasi nella regione addominale, le MKN45 sono cellule moderatamente metastatiche responsabili della formazione di metastasi epatiche dopo 4 settimane dall'iniezione e addominali e toraciche dopo 6 settimane, le cellule MKN28 sono altamente metastatiche tanto che già dalla prima settimana dopo l'iniezione portano allo sviluppo di metastasi a livello del fegato che alla sesta settimana coinvolgono molteplici tessuti e organi. A questo punto i topi saranno divisi in quattro gruppi ciascuno con 5 componenti e trattati per 3 settimane secondo lo schema seguente:

- 1) gruppo di controllo che riceverà 100 µL di PBS al giorno per via intra-peritoneale,
- 2) gruppo trattato settimanalmente con una dose intra-peritoneale di PTX corrispondente a 10 mg/kg,
- 3) gruppo trattato ogni 3 giorni con una dose intra-peritoneale di Ramucirumab pari a 27 mg/kg/dose [33],
- 4) gruppo che riceverà la combinazione di PTX e Ramucirumab secondo le dosi, i tempi e le modalità precedentemente indicati.

Dopo le somministrazioni finali dei farmaci, i topi verranno sacrificati, i tumori saranno prelevati e campionati in formalina per l'analisi immunohistochimica volta all'identificazione delle proteine di interesse, in particolar modo VEGFR2 e TUBBIII, o conservati a -80°C per le analisi di tipo molecolare (Western Blotting).

Inoltre, per analizzare i meccanismi molecolari coinvolti nel processo della resistenza acquisita da alcune forme di GC nei confronti della terapia con PTX, una sospensione cellulare di HGC-27 resistenti verrà iniettata per via sottocutanea nel lato dorsale destro dei topi nudi femmina Balb/c di 5 settimane. Quando il volume del tumore raggiungerà ~ 100 mm³, i topi saranno randomizzati in quattro gruppi seguendo lo schema precedentemente descritto [23]. Anche in questo caso, trascorse le 3 settimane di trattamento, i topi verranno sacrificati e si procederà col trattamento dei campioni per le indagini immunohistochimiche e molecolari.

Analisi statistica

I dati ottenuti dalla sperimentazione *in vitro* saranno analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e post-test appropriato (GraphPad 5.0 software).

Risultati attesi

Le sperimentazioni *in vitro* e *in vivo* saranno utili per comprendere i meccanismi molecolari alla base dei fenomeni di resistenza al farmaco andando a monitorare i processi proliferativi e la motilità cellulare in seguito alla somministrazione di Ramucirumab e PTX usati singolarmente e in combinazione a tempi e dosi diversi. In particolare, linee di GC resistenti all'azione del PTX saranno utili e per ottenere indicazioni circa il modello da noi proposto in cui la combinazione di PTX e Ramucirumab sarebbe efficace nel superare la resistenza. Verranno indagati in particolare quei processi che risultano alterati in caso di resistenza al PTX come la morfologia cellulare, con l'espressione di specifiche molecole come la TUBB3, la progressione nel ciclo cellulare con l'espressione di cycB1 e cdk1, la transizione epitelio mesenchimale con l'espressione di E-caderina e citocheratina da una parte e N-caderina e vimentina dall'altra, nonché il processo apoptotico con lo stato di attivazione delle principali caspasi coinvolte. Sarà inoltre verificata nelle stesse sperimentazioni *in vitro* e *in vivo* la capacità del Cabazitaxel di aggirare la resistenza indotta dal PTX, sia nei trattamenti singoli che in combinazione con il Ramucirumab.

Verranno studiate le vie del segnale implicate nel processo di angiogenesi la cui attivazione porta alla secrezione da parte della cellula tumorale di quei fattori che, interagendo con il microambiente, rendendo possibile la formazione di nuovi vasi. In particolare, valuteremo gli effetti singoli e combinati di Ramucirumab, PTX e Cabazitaxel sulla espressione delle forme del recettore VEGFR-1/3 le quali sembrano essere coinvolte nel controllo autocrino di alcuni processi biologici nelle cellule tumorali. Nel caso di trattamento farmacologico singolo o combinato sono attese variazioni nell'attivazione di componenti specifici delle vie Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt, bersaglio diretto dell'azione del Ramucirumab, del PTX e del Cabazitaxel, rispetto a cellule controllo non trattate.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Lo studio proposto prevede la messa in atto di procedure sperimentali già standardizzate e i ricercatori partecipanti possiedono conoscenze e competenze tali da trovare le soluzioni migliori ai problemi che potrebbero verificarsi in corso d'opera.

Innovazioni

Se, come ipotizzato nel presente studio, il Ramucirumab fosse in grado di bypassare la resistenza indotta dal PTX, la combinazione PTX e Ramucirumab potrebbe essere efficace anche in quei pazienti che hanno sviluppato insensibilità a una precedente terapia con taxani (schema FLOT). Se ciò si dimostrasse vero sarebbe di grande interesse per stabilire i criteri di eleggibilità per la terapia di seconda linea con PTX e Ramucirumab.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca

Tutte le competenze scientifiche e le competenze necessarie per raggiungere gli obiettivi del progetto sono presenti e ben integrate nelle unità partecipanti. Il progetto intende valorizzare la collaborazione tra Ricerca e Clinica. Attraverso questo progetto il Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare, l'UO di Oncologia e l'Animal Facility intendono creare un gruppo operativo focalizzato sull'oncologia molecolare base per l'approccio alla medicina personalizzata, nel caso specifico, dei tumori gastrici. Il disegno dello studio è stato ampiamente condiviso e discusso tra i componenti delle unità coinvolte. L'unità di Oncologia collaborerà con le altre unità a definire le condizioni sperimentali più corrette in base alle caratteristiche dei farmaci che verranno forniti e ad interpretare i risultati ottenuti. L'Animal Facility collaborerà attraverso gli esperimenti *in vivo* descritti, grazie al consolidato background nelle procedure relative all'utilizzo degli animali. Il laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare, in qualità di unità proponente, parteciperà e supervisionerà a tutte le fasi che porteranno al raggiungimento degli obiettivi dello studio. Tutti i risultati ottenuti verranno periodicamente analizzati e discussi, nonché conservati in cartelle condivise.

Bibliografia

- 1-Cunningham D, Starling N, Rao S et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 36-46.
- 2-Scartozzi M, Bittoni A, Pistelli M et al. Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: state of the art and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 451-462.
- 3- Deng N, Goh LK, Wang H et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* 2012; 61: 673-684.
- 4- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2- positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697.
- 5- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014 Sep 11;513(7517):202-9.
- 6- Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, Safran H, Dos Santos LV, Aprile G, Ferry DR, Melichar B, Tehfe M, Topuzov E, Zalberg JR, Chau I, Campbell W, Sivanandan C, Pikiel J, Koshiji M, Hsu Y, Liepa AM, Gao L, Schwartz JD, Taberner J; REGARD Trial Investigators. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2014 Jan 4;383(9911):31-39.
- 7- Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, Hironaka S, Sugimoto N, Lipatov O, Kim TY, Cunningham D, Rougier P, Komatsu Y, Ajani J, Emig M, Carlesi R, Ferry D, Chandrawansa K, Schwartz JD, Ohtsu A; RAINBOW Study Group. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Oct;15(11):1224-35.
- 8- Fan F, Wey JS, McCarty MF. Expression and function of vascularendothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005;24:2647-53.
- 9-Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br J Cancer* 2006;94:1710-7.
- 10- Su JL, Yang PC, Shih JY. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9:209-23.
- 11- Morelli MP, Brown AM, Pitts TM. Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2546-58.

- 12-** Fuchs CS, Tabernero J, Tomášek J, Chau I, Melichar B, Safran H, Tehfe MA, Filip D, Topuzov E, Schlittler L, Udrea AA, Campbell W, Brincat S, Emig M, Melemed SA, Hozak RR, Ferry D, Caldwell CW, Ajani JA. Biomarker analyses in REGARD gastric/GEJ carcinoma patients treated with VEGFR2-targeted antibody ramucirumab. *Br J Cancer*. 2016 Oct 11;115(8):974-982.
- 13-** Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE (2013) Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer-Res* 73(6): 1649–1657.
- 14-** Rigamonti N, Kadioglu E, Keklikoglou I, WyserRmili C, Leow CC, De Palma M (2014) Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. *Cell Rep* 8(3): 696–706.
- 15-** Llovet JM, Pena CE, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J. Group SIS (2012) Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 18(8): 2290–2300.
- 16-** Jo MJ, Lee JH, Nam BH, Kook MC, Ryu KW, Choi IJ, Kim YW, Bae JM (2009) Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 16(7): 2052–2057.
- 17-** U. T Hacker, L. Escalona-Espinosa, N. Consalvo, V. Goede, L. Schiffmann, S.J Scherer, P. Hedge, E. Van Cutsem, O. Coutelle and H. Buñing. Evaluation of Angiopoietin-2 as a biomarker in gastric cancer: results from the randomised phase III AVAGAST trial *British Journal of Cancer* (2016) 114, 855–862.
- 18-** Ock CY, Nam AR, Lee J, Bang JH, Lee KH, Han SW, Kim TY, Im SA, Kim TY, Bang YJ, Oh DY. Prognostic implication of antitumor immunity measured by the neutrophil-lymphocyte ratio and serum cytokines and angiogenic factors in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017 Mar;20(2):254-262.
- 19-** J Hwang, J Lee, M Park, D Kim, W Bae, H Shim, S Cho and I Chung. Blockade of VEGFR-1 and VEGFR-2 Enhances Paclitaxel Sensitivity in Gastric Cancer Cells. *Yonsei Med J* 54(2):374-380, 2013.
- 20-** Yu J, Gao J, Lu Z, Li Y, Shen L. Serum levels of TUBB3 correlate with clinical outcome in Chinese patients with advanced gastric cancer receiving first-line paclitaxel plus capecitabine. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3029-34.
- 21-** He W, Zhang D, Jiang J, Liu P, Wu C. The relationships between the chemosensitivity of human gastric cancer to paclitaxel and the expressions of class III β -tubulin, MAPT, and survivin. *Med Oncol*. 2014 May;31(5):950.
- 22-** Hwang JE, Hong JY, Kim K, Kim SH, Choi WY, Kim MJ, Jung SH, Shim HJ, Bae WK, Hwang EC, Lee KH, Lee JH, Cho SH, Chung IJ. Class III β -tubulin is a predictive marker for taxane-based chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer. *BMC Cancer*. 2013 Sep 23;13:431.
- 23-** D Chen, X Lin, C Zhang, Z Liu, Z Chen, Z Li, J Wang, B Li, Y Hu, B Dong, L Shen, J Ji, J Gao and X Zhang. Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cell Death and Disease*. 2018 9:123.
- 24-** Kavallaris, M. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J. Clin. Invest.* 100, 1282–1293 (1997).
- 25-** Duran, G. E., Wang, Y. C., Moisan, F., Francisco, E. B. & Sikic, B. I. Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition. *Br. J. Cancer* 116, 1318–1328 (2017).
- 26-** Sobue, S. et al. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 808–813 (2016).
- 27-** Gan, P. P. et al. Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1339–1348 (2010).
- 28-** Ou, Y. et al. Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 14, 45–55 (2013).
- 29-** Liu, Z., Zhu, G., Getzenberg, R. H. & Veltri, R. W. The upregulation of PI3K/Akt and MAP kinase pathways is associated with resistance of microtubule targeting drugs in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 116, 1341–1349 (2015).
- 30-** Zhang, W. et al. SET protein overexpression contributes to paclitaxel resistance in MCF-7/S cells through PI3K/Akt pathway. *J. Drug. Target.* 25, 255–263 (2017).
- 31-** Vrignaud, P., Semiond, S., Lejeune, P., Bouchard, H., Calvet, L., Combeau, L., Riou, GF., Commerc, A., Lavelle, F. and Bissery, MC. Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors. *Clin Cancer Res*; 19(11) June 1, 2973-2983(2013).
- 32-** Busuttill RA, Liu DS, Di Costanzo N, Schröder J, Mitchell C, Boussioutas A. An orthotopic mouse model of gastric cancer invasion and metastasis. *Sci Rep*. 2018 Jan 16;8(1):825.
- 33-** Prewett M1, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res*. 1999 Oct 15;59(20):5209-18.

Timeline / Prodotti finali:**Nel primo anno ci prefiggiamo:**

1. di indagare i meccanismi molecolari alla base degli effetti combinati di Ramucirumab e PTX nelle linee cellulari di GC
2. ottenere linee resistenti di HGC27
3. saranno messe in atto le procedure per ottenere i topi con GC metastatico

Secondo anno:

- 1- Le cellule HGC27 resistenti verranno trattate con le combinazioni Ramucirumab/PTX e Ramucirumab/Cabazitaxel. Verranno studiati in particolare l'organizzazione dei microtubuli, la progressione nel ciclo cellulare, la transizione epitelio-mesenchimale, l'apoptosi.
- 2- Verranno completate le indagini molecolari sui diversi gruppi di topi con GC metastatico dopo trattamenti con Ramucirumab e PTX singoli o combinati.
- 3- I risultati ottenuti saranno presentati in pubblicazioni scientifiche

Terzo anno:

- 1- Le cellule HGC27 resistenti verranno iniettate nei topi che verranno poi sottoposti ai trattamenti Ramucirumab/PTX e Ramucirumab/Cabazitaxel. Seguiranno le indagini di immuno-istochimica e molecolari sui tumori sviluppati.
- 2- Stesura di lavori scientifici

Prima metà del progetto:

Nella prima metà del progetto verranno studiati i processi di crescita e motilità cellulare in seguito ai trattamenti singoli o combinati con Ramucirumab e PTX o Cabazitaxel e saranno indagate le principali vie del segnale coinvolte. Si procederà ad allestire le linee cellulari di GC resistenti al PTX. Verranno eseguiti gli esperimenti *in vivo* volti all'ottenimento di differenti tipi di topi con GC metastatico.

Seconda metà del progetto:

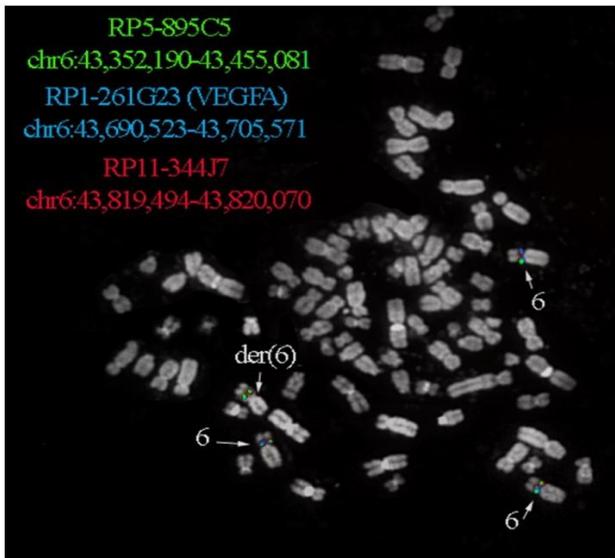
Nella seconda metà del progetto si completeranno gli esperimenti *in vitro* e *in vivo* utilizzando la linea cellulare al PTX, ed i risultati ottenuti verranno confrontati con quelli ottenuti con le linee sensibili, al fine di individuare i fattori più importanti nel meccanismo di resistenza indotta dai farmaci in esame.

Proroga:

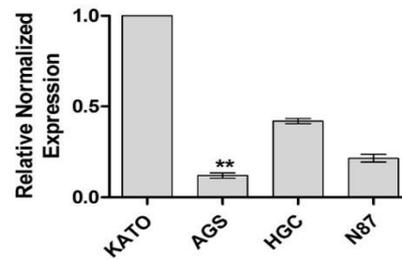
Al fine di comprendere i meccanismi di resistenza indotta dai taxani sono state isolate linee di GC resistenti ai taxani a partire dalla loro controparte sensibile. Abbiamo innanzitutto caratterizzato le nostre linee di GC umane per quanto riguarda possibili alterazioni cromosomiche che riguardassero la porzione del braccio corto del cromosoma 6 dove mappa il gene VEGFA. Tali alterazioni possono essere responsabili di una maggiore espressione di VEGFA e quindi di una migliore risposta al trattamento con ramucirumab. Attraverso esperimenti di FISH (Ibridazione fluorescente in situ) eseguiti sulle differenti linee cellulari di GC umano (HGC-27, N87, AGS, KATO III), abbiamo dimostrato che nelle cellule della linea KATO III sono presenti quattro copie del gene VEGFA. A livello di queste cellule infatti, è stata rilevata una trisomia del cromosoma 6, su cui questo gene mappa, e una traslocazione a livello del centromero di una parte del cromosoma che contiene un'ulteriore copia del gene (Fig.1). Inoltre abbiamo analizzato con esperimenti di Real Time PCR (RT-PCR), l'espressione a livello di mRNA sia di VEGFA che di VEGFR2 su tutte le linee cellulari e come si può notare dagli istogrammi in figura 1, è stato confermato che le KATOIII rispetto alle altre linee cellulari, sono caratterizzate da una maggiore espressione del VEGFA mentre il VEGFR2 è maggiormente espresso dalle HGC-27.

Fig. 1

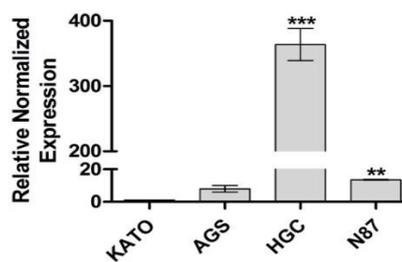
FISH KATO III cells



VEGFA expression



mRNA expression of VEGFR2

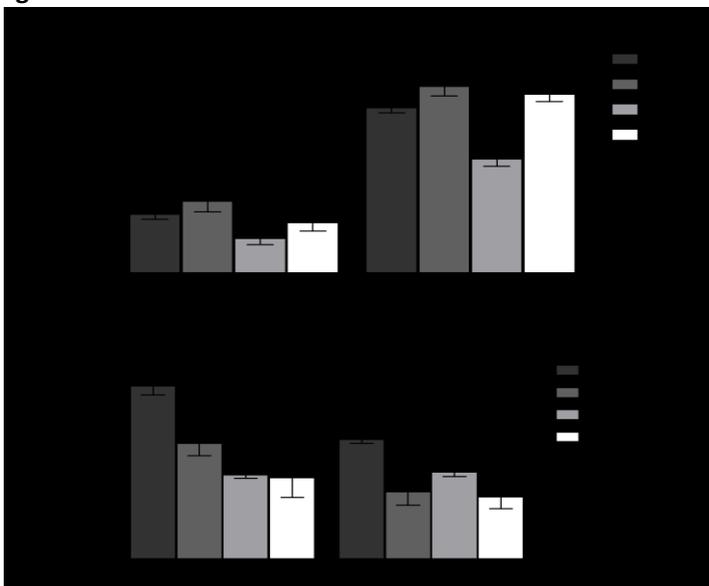


Questi risultati spiegano la maggiore sensibilità delle cellule KATOIII all'azione del ramucirumab come da noi evidenziato in studi precedenti. Pertanto, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'isolamento e la caratterizzazione di linee resistenti al paclitaxel(PTX) derivanti dalle HGC27 e dalle KATOIII. In particolare la caratterizzazione delle HGC27-R ha rivelato alcuni elementi interessanti.

Attraverso esperimenti di RT-PCR abbiamo confrontato il livello di espressione di VEGFA nelle due linee a seguito del trattamento con PTX eRamucirumab somministrati singolarmente e in combinazione. Risulta evidente dal primo grafico della figura 2, che la linea resistente presenta maggiori livelli di espressione di VEGFA rispetto alla controparte sensibile; è emerso inoltre che il trattamento con il Ramucirumab ne riduce l'espressione in entrambe le linee cellulari.

La stessa analisi è stata effettuata per il recettore VEGFR2, che risulta invece maggiormente espresso nelle sensibili rispetto alle resistenti. Come si può notare dal secondo istogramma della figura 2, sia il PTX che il Ramucirumab riducono l'espressione di questo recettore in entrambe le linee cellulari e i due farmaci hanno azione sinergica.

Fig. 2



Per meglio indagare le differenze fra le HGC-27 resistenti e le sensibili, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica dopo aver sincronizzato le cellule in fase G2 con il nocodazolo. Si può notare dai grafici in figura 3, come le cellule resistenti rispetto alle sensibili, oltre a presentare resistenza all'azione del PTX, presentano minore sensibilità ad altri inibitori mitotici come il nocodazolo in quanto un minor numero di cellule viene bloccato da questo farmaco in fase G2.

In aggiunta, è stata effettuata l'analisi dell'espressione delle proteine coinvolte nella tumorigenesi (β -catenina) e nella proliferazione cellulare (c-myc), attraverso esperimenti di Western Blotting. Nella figura 4 si può notare che le cellule HGC-27 resistenti presentano maggiori livelli di espressione nucleare di β -catenina e ridotti livelli di fosforilazione di quest'ultima da parte di GSK. Questo indica che le cellule resistenti hanno una β -catenina più stabile rispetto alla controparte sensibile, che si traduce in una maggiore tumorigenicità. Dal Western Blotting emerge inoltre che le HGC-27 resistenti presentano una più elevata espressione della forma di c-myc ad alto peso molecolare che è implicata nel ridurre il tasso proliferativo cellulare, questo spiega il motivo per il quale queste cellule hanno una minore sensibilità all'azione dei farmaci antimitotici.

Fig. 3

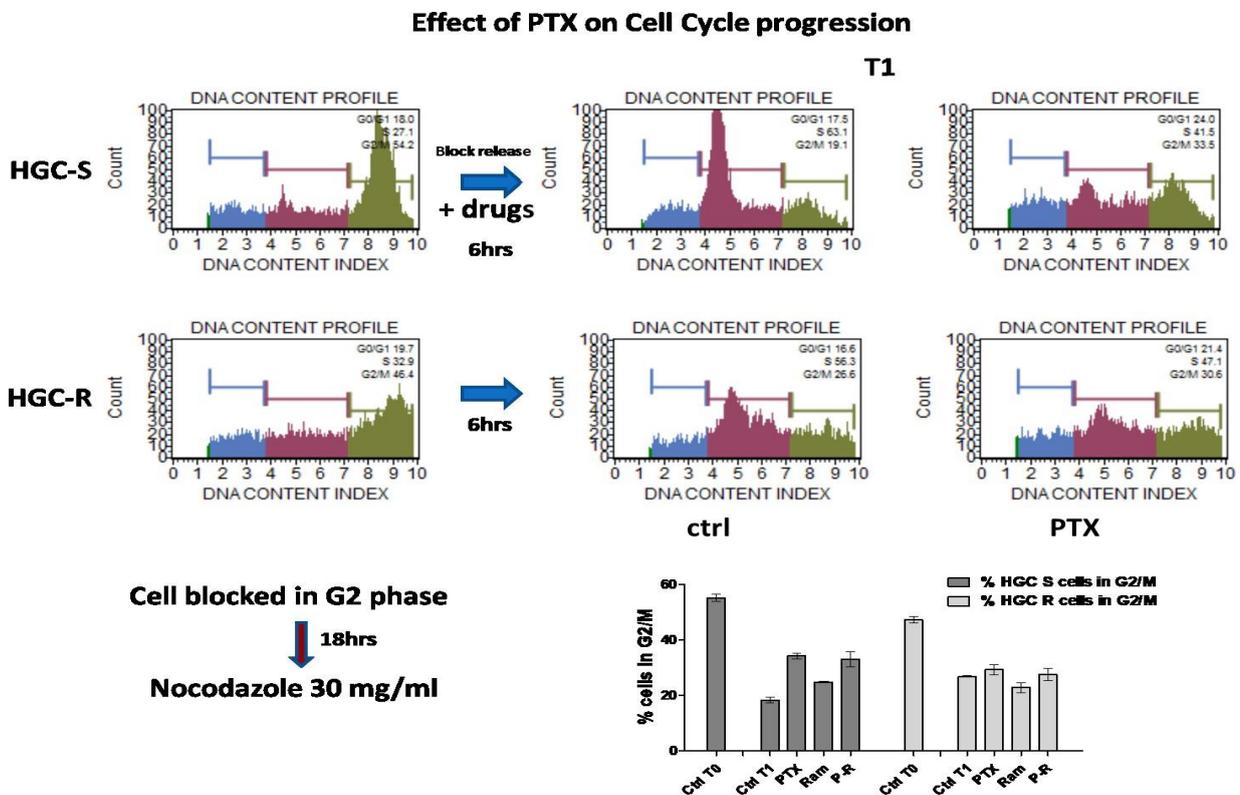


Fig. 4

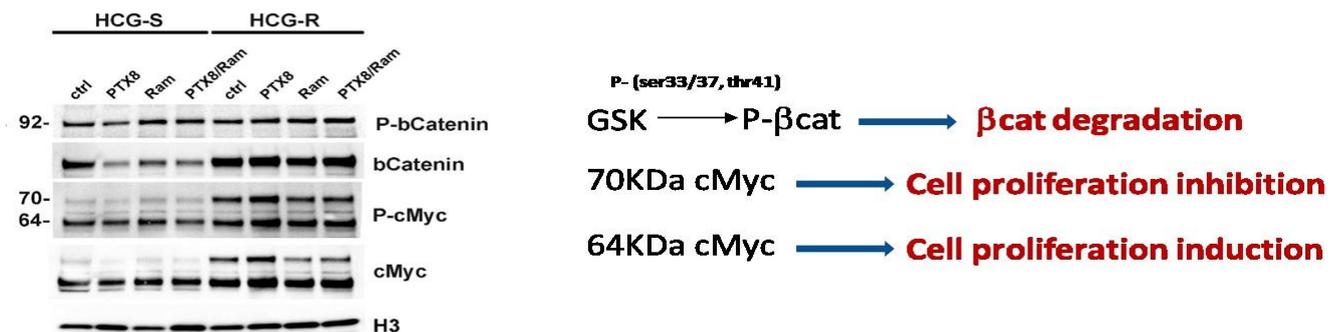
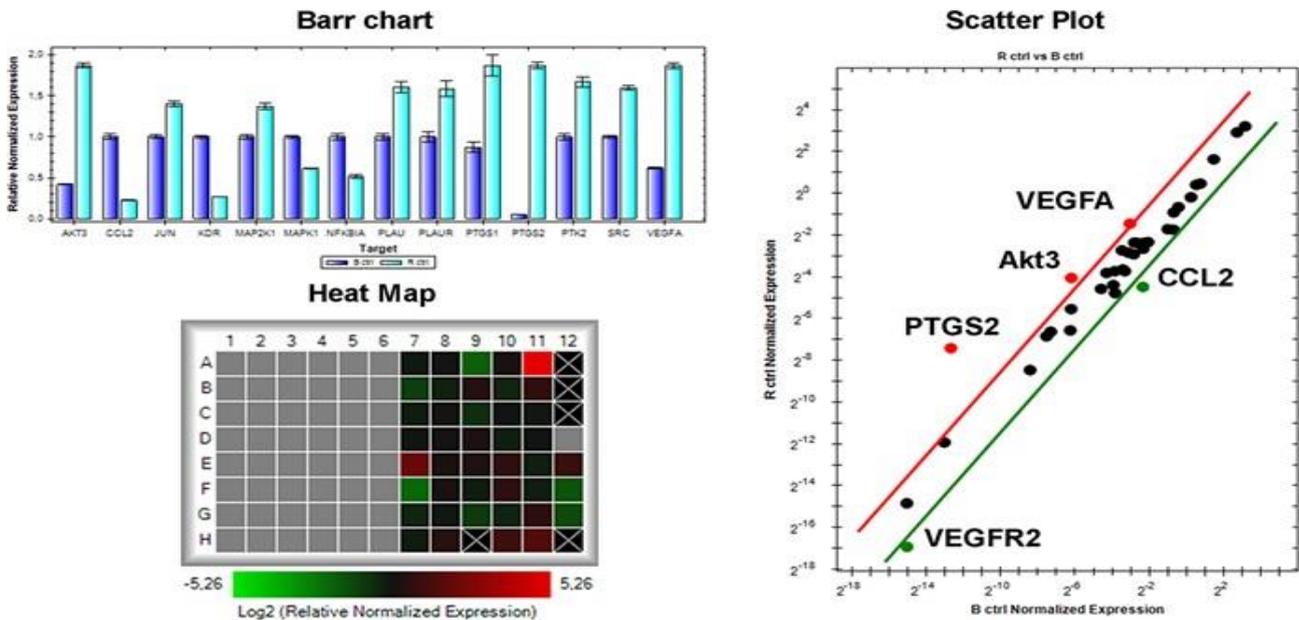


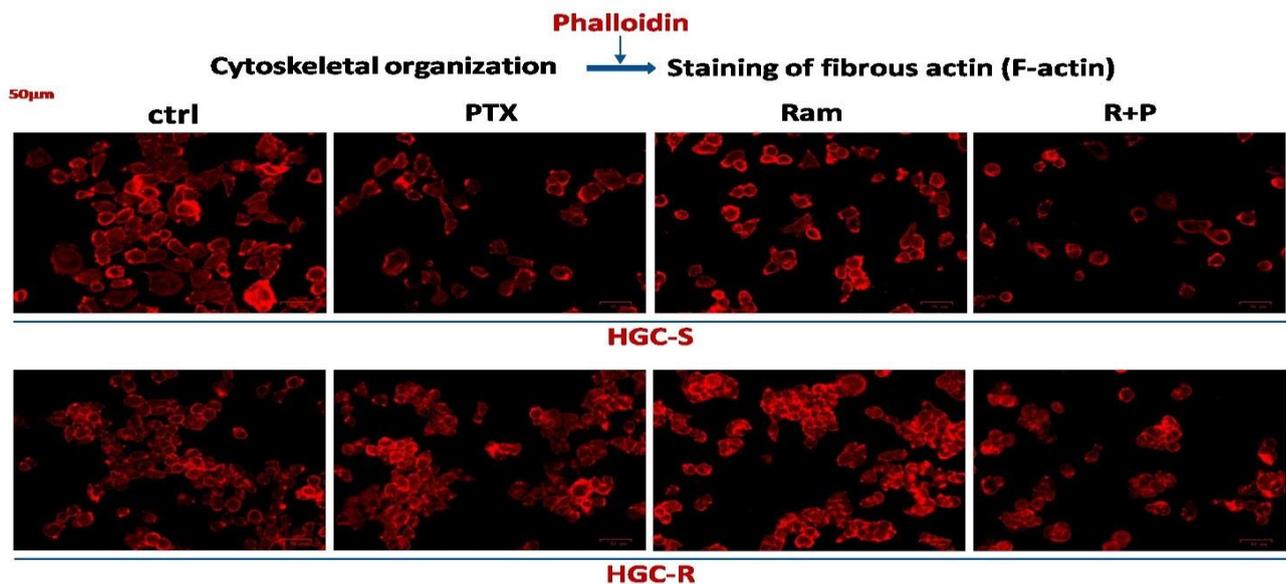
Fig. 5



Successivamente abbiamo eseguito sia sulle HGC-27 sensibili che sulle resistenti un miniarray in cui sono stati analizzati i trascritti dei principali geni che sono collegati al signaling del VEGFR2. Come si può notare dalle immagini in figura 5, a livello delle cellule resistenti rispetto alla controparte sensibile, si osserva una over espressione di VEGFA, Akt3, PTGS2 e una minore espressione di VEGFR2 e CCL2. Questi dati sono stati confermati con real time specifiche per i geni in questione.

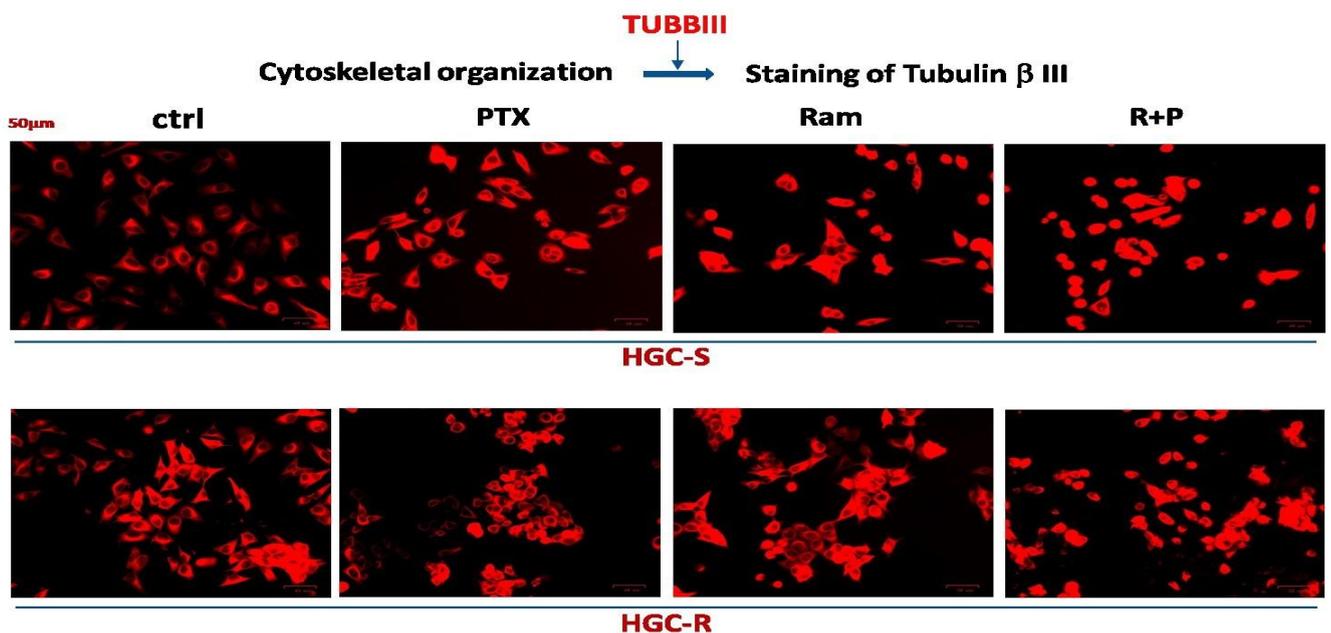
Abbiamo eseguito poi, su entrambe le linee cellulari, analisi di immunofluorescenza per indagare eventuali differenze fra le due linee a livello dell'organizzazione del citoscheletro. In prima analisi abbiamo immunocolorato le cellule con la falloidina, una sostanza che lega e stabilizza i polimeri di actina. Come si può notare nella figura 6, a livello delle HGC-27 sensibili vi è una maggiore organizzazione del citoscheletro rispetto alla controparte resistente. Nelle cellule sensibili infatti, l'actina è organizzata in fibre che formano un reticolo ben definito a differenza della controparte resistente in cui si vedono raggruppamenti di monomeri di actina disorganizzati. Nella figura 6 si può inoltre notare l'azione del Paclitaxel a livello del citoscheletro delle cellule sensibili, che risulta molto meno evidente nelle resistenti, dove invece ha maggiore effetto l'azione combinata dei due farmaci.

Fig. 6



In seconda istanza le cellule sono state immunocolorate con l'anticorpo anti-TUBBIII, questa proteina è espressa ad alti livelli nelle cellule tumorali. Nella figura 7 è ben evidente che le cellule resistenti hanno una maggiore espressione di questa proteina rispetto alla controparte sensibile. Inoltre si nota l'effetto del Paclitaxel, che nelle cellule sensibili agisce localizzando la TUBBIII nel nucleo. Nelle resistenti si nota unicamente l'effetto quando vengono trattate con entrambi i farmaci.

Fig. 7



Abbiamo eseguito le stesse indagini sperimentali anche nelle cellule KATOIII-R.

Grazie alla collaborazione con le Dr Alessandra Contino e Maria Grazia Perrone del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Bari che hanno sviluppato nel corso degli anni una consolidata esperienza nello sviluppo di ligandi attivi verso alcuni trasportatori definiti proteine Multi-Drug Resistance (MDR): P-gp, MRP1 e BCRP. Il chemio-terapico PTX è stato identificato come substrato della P-gp e la sua resistenza in alcuni tipi di cancro è stata attribuita all'efflusso della P-gp. Pertanto le linee cellulari GC, caratterizzate da diversa cancerogenicità e diversa sensibilità al PTX, ci consentiranno di studiare il potenziale legame esistente tra la resistenza al PTX e le proteine MDR e identificare possibili meccanismi di resistenza al PTX. Inoltre, verranno testati farmaci

appartenenti ad una libreria di inibitori MDR di cui disponiamo al fine di identificare potenziali molecole in grado di superare la resistenza al PTX in cellule di GC. I risultati ottenuti in vitro verranno validati in opportuni esperimenti in vivo.

Nel corso degli ultimi mesi inoltre abbiamo messo a punto la sperimentazione *in vivo* con il modello murino xenografo. 25 Topi nudi, BALB/c nu/nu femmine all'età di 6 settimane sono stati inoculati con una sospensione cellulare sarà iniettata sottocute sul fianco destro dei topi "nude" al fine di consentire lo sviluppo dei tumori solidi. Le cellule HGC27-R sono state tripsinizzate contate e sospese in 50% mix di Matrigel (BD biosciences) in PBS ad una concentrazione finale di 1×10^7 cellule in 0.2 ml di soluzione. Purtroppo, ci sono stati problemi nell'attecchimento delle cellule e abbiamo dovuto ripetere l'inoculo. Solo in un piccolo numero di topi si è sviluppato un tumore che l'analisi istologica ha confermato derivare dalle cellule HGC27. Abbiamo deciso di ripetere l'esperimento con 25 topi BALB/c nu/nu gamma irradiati con una dose di 4 gray.

Progetto 03/2021: "La metiltrasferasi SMYD3 come nuovo bersaglio molecolare nei tumori gastro/entero/pancreatici"

Responsabile: Prof. Cristiano Simone

Partecipanti: Valentina Grossi, Martina Lepore Signorile, Vittoria Disciglio, Giovanna Forte, Candida Fasano, Paola Sanese, Katia De Marco, Raffaele Armentano, Elisabetta Cavalcanti, Giulio Lantone, Giuseppe Lippolis, Leonardo Vincenti.

Introduzione

Le cure per il cancro sono in continua evoluzione. Attualmente, il principale trattamento terapeutico è la chemioterapia, capace di distruggere le cellule in attiva replicazione mediante il danneggiamento del DNA. Le rotture a doppio filamento (*Double strand breaks*, DSBs) sono le lesioni al DNA più efficaci nell'attivare la risposta al danno al DNA. Durante la fase S/G2, le DSBs vengono riparate per Ricombinazione Omologa (*Homologous Recombination*, HR). BRCA2, insieme a BRCA1 fosforilata da ATM, induce il riparo HR-DSB, che vede l'attivazione di RAD51, in grado di processare i filamenti del DNA a livello delle rotture [1]. Le mutazioni germinali che interessano i geni BRCA1/2 aggravano l'instabilità genetica ed aumentano il rischio di sviluppare neoplasie della mammella, ovariche ed altri tipi di cancro, come quello del colon-retto e pancreas [2]. La resistenza alle terapie convenzionali è frequentemente osservata in tumori in stadi avanzati, per i quali sono necessarie nuove strategie, come la terapia mirata, che vede l'uso di farmaci che interferiscono con specifiche molecole coinvolte nella crescita tumorale. Combinata alla chemioterapia, permette di ottenere migliori risultati e di ridurre gli effetti collaterali. In particolare, bersagliare i modificatori epigenetici può portare alla ri-sensibilizzazione dei tumori alla chemioterapia, data la reversibilità delle alterazioni epigenetiche. L'attivazione dei sistemi di riparo del DSB è uno dei principali meccanismi che promuovono la chemioresistenza, pertanto terapie mirate che agiscono su di essa risultano essere una potenziale strategia terapeutica, così come è stato già descritto per BRCA1, BRCA2 e RAD51 [3-5].

SMYD3 è una lisina metiltrasferasi altamente espressa in diversi tipi di tumori [6]. Dati genomici e trascrittomici ottenuti dal Cancer Genome Atlas (TCGA) per i tumori gastrointestinali rivela che SMYD3 è alterato nel 30% dei campioni di adenocarcinoma allo stomaco, adenocarcinomi coloretali, colangiocarcinomi e tumori pancreatici.

SMYD3 è stata dapprima caratterizzata come istone H3K4/H4K5 metiltrasferasi, coinvolta nell'attivazione trascrizionale quale membro del complesso dell'RNA polimerasi. I suoi geni bersaglio sono i regolatori chiave della proliferazione cellulare, del ciclo cellulare e della transizione epitelio- mesenchimale. Topi SMYD3-KO non hanno mostrato significative alterazioni dopo una completa fenotipizzazione [7]. In cellule normali, SMYD3 sembra non essere essenziale per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza. La sua elevata espressione è sufficiente per accelerare la crescita cellulare ed attiva geni coinvolti nella trasformazione tumorale e nella migrazione [8, 9].

Abbiamo dimostrato che, in un modello preclinico di CCR (APCMin/+ trattati con il carcinogeno azossimetano), risulta fortemente espresso durante la tumorigenesi, con un aumento dei livelli dell'mRNA e della proteina, seguito

da aumentata espressione dei suoi geni bersaglio. Inoltre, l'ablazione di SMYD3 comporta una riduzione della proliferazione di cellule di CCR, ciò quindi implica che sia coinvolta nella crescita delle cellule tumorali. Pertanto, abbiamo realizzato uno screening virtuale al fine di identificare nuovi inibitori di SMYD3 testando diversi composti formati da piccole molecole (*small-molecules*). Uno di questi (BCI-121) riduce l'attività di SMYD3 in maniera significativa sia in vitro che in cellule di CCR. Ulteriori analisi hanno dimostrato che SMYD3 è altamente espressa in molte linee cellulari derivanti da diversi tessuti, e che cellule cancerose con alti livelli di SMYD3 risultano essere molto sensibili all'inibizione farmacologica data da BCI-121. BCI-121 inibisce significativamente l'interazione tra SMYD3 ed il substrato istonico ed il suo reclutamento sulla cromatina, inoltre riduce la proliferazione promuovendo l'arresto del ciclo cellulare nella transizione tra le fasi S/G2, suggerendo il possibile coinvolgimento di SMYD3 nel checkpoint S/G2 [10].

Oltre alla regolazione dei processi relativi all'espressione genica, è stato recentemente scoperto che SMYD3 gioca un ruolo significativo nel cancro attraverso la modulazione di diverse cascate di segnalazione aventi un ruolo chiave. Esercita primariamente il suo ruolo oncogenico attraverso l'interazione con e la metilazione di proteine non istoniche, mediante cui transattiva specifiche vie di segnalazione cancro-specifiche [11-17]. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che il suo principale contributo nella regolazione della tumorigenesi sia ancora sconosciuto, in quanto non è basato sul sostegno della proliferazione autonoma delle cellule cancerose [18]. Inoltre, è stato proposto che il riparo via HR sia promosso dalla modulazione dell'espressione genica SMYD3-mediata [19]. Infatti, abbiamo recentemente pubblicato che SMYD3 è un interattore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA (DSBs). La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi dell'HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di DSB in risposta al danno endogeno o alla somministrazione di agenti danneggianti il DNA (come i chemioterapici) nel cancro del colon-retto e della mammella [20]. Interessante è proprio il fatto che il suo ruolo nel complesso dell'HR rende SMYD3 un valido bersaglio terapeutico e permette l'estensione dell'approccio del letale sintetico, basato sugli inibitori di PARP, ai tumori proficienti per l'HR in tessuti diversi [20]. Infatti, i tumori che presentano difetti nel pathway dell'HR dipendono dall'attivazione di PARP per preservare l'integrità genomica [21]. L'inibizione farmacologica dell'attività enzimatica di PARP attiva direttamente il pathway dell'HR come via per compensare questa disfunzione; come conseguenza le cellule con difetti nelle proteine dell'HR non possono più riparare il danno al DNA e ripristinare la replicazione, portando alla morte cellulare.

Dato che SMYD3 ha un ruolo fondamentale nel riparo del DSB con la formazione dei complessi dell'HR, come dimostrato da esperimenti con neocarziostatina (che induce DSB) e inibitore di SMYD3 [20], i risultati ottenuti dimostrano come gli alti livelli proteici di SMYD3 nelle cellule tumorali siano richiesti per la riparazione del DNA e responsabili della chemioresistenza.

L'importanza di questa potenziale nuova terapia che prevede la combinata inibizione di SMYD3 e PARP rappresenta una straordinaria strategia per indurre morte cellulare con l'approccio del letale sintetico. Uno studio più approfondito del ruolo di SMYD3 potrà fornire dati interessanti per sviluppare nuovi approcci terapeutici per i tumori gastro/entero/pancreatici (GEP).

Risultati conseguiti nel primo anno di Progetto

SMYD3 risulta over-espresso nei tumori del colon-retto, come anche nel cancro della mammella, dell'ovaio, della prostata, del pancreas, dello stomaco, del polmone e del fegato [17,25,26]. Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica abbiamo valutato per prima cosa l'espressione dell'mRNA di SMYD3 in una coorte di pazienti provenienti dal dataset del TCGA Pan Cancer, nel quale l'analisi ha messo in evidenza che il 25-30% dei pazienti con tumori gastro/entero/pancreatici mostrano un aumento dei livelli di espressione di SMYD3. L'analisi dell'espressione dell'mRNA è stata fatta stratificando i tumori sulla base di uno Z-score dell'RNA-seq di SMYD3 ed è stato considerato per la valutazione dell'espressione dei tumori gastro/entero/pancreatici il terzo quartile del gruppo che mostrava sicuramente una più alta espressione di SMYD3 (identificato come "high SMYD3"). Successivamente, abbiamo valutato l'espressione proteica di SMYD3 per immunocistochimica, aspettandoci un numero di pazienti con alta espressione di SMYD3 sicuramente superiore rispetto all'analisi di mRNA dove avevamo considerato solo il quartile più alto tralasciando l'espressione intermedia. Abbiamo infatti valutato l'espressione tissutale di SMYD3 in una coorte di pazienti con tumori dello stomaco (n=30), del pancreas (n=30) e del CRC (n=30) classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati mostrano elevati livelli di espressione di SMYD3 (nel 40% dei casi, percentuale superiore a quella stimata dopo analisi del TCGA). Il risultato ottenuto ha un significato maggiore dal punto di vista

clinico/traslazionale, visto che il target farmacologico è rappresentato proprio dalla proteina SMYD3 e l'espressione del suo mRNA può dare solo un'indicazione predittiva. La valutazione dell'espressione di SMYD3 è stata effettuata con metodica immunoistochimica. Sono stati valutati i dati clinici, il grado istologico (sistema TNM) e l'espressione dei marcatori molecolari. In particolare si è osservato che nei tumori del colon l'espressione di SMYD3 risulta più diffusa nella componente invasiva più differenziata (**figura 2**). Come controllo della colorazione viene sempre incluso una porzione di tessuto normale (staining negativo) e porzione muscolare nel quale SMYD3 risulta fisiologicamente espresso (staining positivo). Interessante notare che nelle neoplasie di alto grado dello stomaco la porzione ghiandolare di tipo intestinale risulta più fortemente colorata confermando una aumentata espressione di SMYD3 (**figura 2**). Particolarmente interessante è il numero di tessuti positivi riscontrati nei pazienti con tumore del pancreas (15/30).

Parallelamente abbiamo definito e strutturato le caratteristiche del pannello che verrà utilizzato per l'analisi molecolare dei tessuti che esprimono alti livelli di SMYD3 (**figura 3**).

Nello specifico, la preparazione di librerie di DNA parte da campioni di DNA purificati da tessuto tumorale e tessuto normale, al fine di generare un pool di amplificazione delle regioni target dei geni coinvolti nell'HR pathway, secondo i protocolli IonAmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) e mediante l'utilizzo dello strumento Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion S5 XL Sequencer" (Thermo Fisher Scientific). Verrà utilizzato un pannello con più di 500 geni, compresi quelli che hanno già indicazione per farmaci approvati (nelle linee guida cliniche e nei criteri di reclutamento nei clinical trials); geni del riparo del DNA; geni di risposta dei checkpoint immunitari; CNV, MSI, TMB, geni di fusione (**figura 3**). Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific). Verranno successivamente utilizzate pipelines bioinformatiche implementate nei softwares "Torrent Suite" e "Ion Reporter" per la determinazione e l'annotazione di varianti genomiche somatiche coinvolgenti i geni HR sequenziati.

L'identificazione delle alterazioni somatiche nei principali geni coinvolti nell'HR pathway che determinano perdita di funzione della proteina, potrà permettere la classificazione molecolare dei tumori analizzati nei due sottotipi principali: HR-proficienti (HR+) e HR-difettivi (HR-). Questo ci permetterà di individuare realmente i pazienti eligibili per una terapia combinata con inibitori di SMYD3 e di PARP (nei pazienti con profilo HR+/SMYD3 high) e pazienti

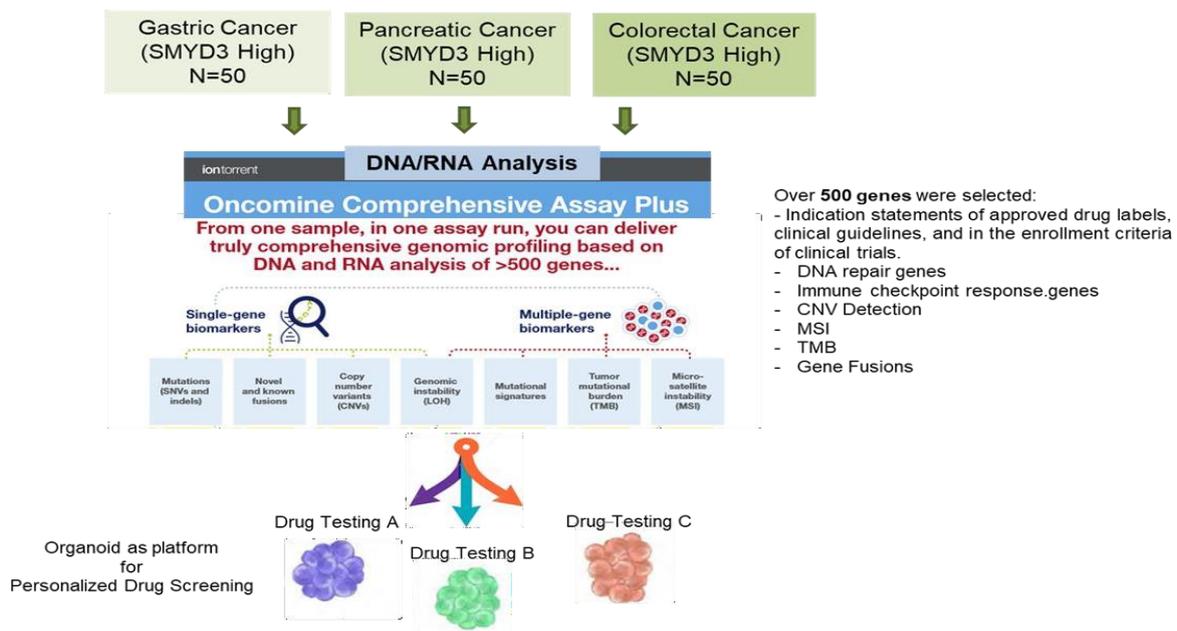


Figura 3. Schema rappresentativo per analisi di next generation sequencing nel profiling genomico per i tumori gastrointestinali per biomarkers chiave nella terapia a bersaglio molecolare. Il pannello è comprensivo dell'analisi di 500 geni, compresi quelli che hanno già indicazione per farmaci approvati (nelle linee guida cliniche e nei criteri di reclutamento nei clinical trials); geni del riparo del DNA; geni di risposta dei checkpoint immunitari; CNV, MSI, TMB, geni di fusione. I risultati di questa analisi ci permetteranno di individuare realmente i pazienti eligibili per una terapia combinata.

eligibili per una terapia chemo-sensibilizzante con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei pazienti con profilo HR-/SMYD3 high).

Inoltre, è stato possibile standardizzare e perfezionare i protocolli di estrazione delle cellule staminali cancerose e la coltura degli organoidi originati dai tessuti dei pazienti con tumori del colon e del pancreas e dello stomaco (**figura 4**). E' stato verificato anche che l'organoide originato da tessuto di paziente conservasse tutte le principali caratteristiche strutturali e molecolari espresse dal tessuto di origine. Per questo è stata ottimizzata una particolare tecnica di immunohistochimica che prevede una preventiva inclusione in agar e successiva manipolazione con procedura di inclusione in paraffina per preservare il delicato tessuto e mantenerlo integro per le successive colorazioni. I risultati ottenuti nel primo anno confermano il potenziale innovativo del progetto e ci esortano a proseguire e approfondire maggiormente i risultati ottenuti nei pazienti al fine di poter sviluppare negli anni successi i nuovi approcci terapeutici basati sulla medicina di precisione di un particolare sottogruppo di pazienti con caratteristiche molecolari ben definite (profilo HR+/SMYD3 high e profilo HR-/SMYD3 high).

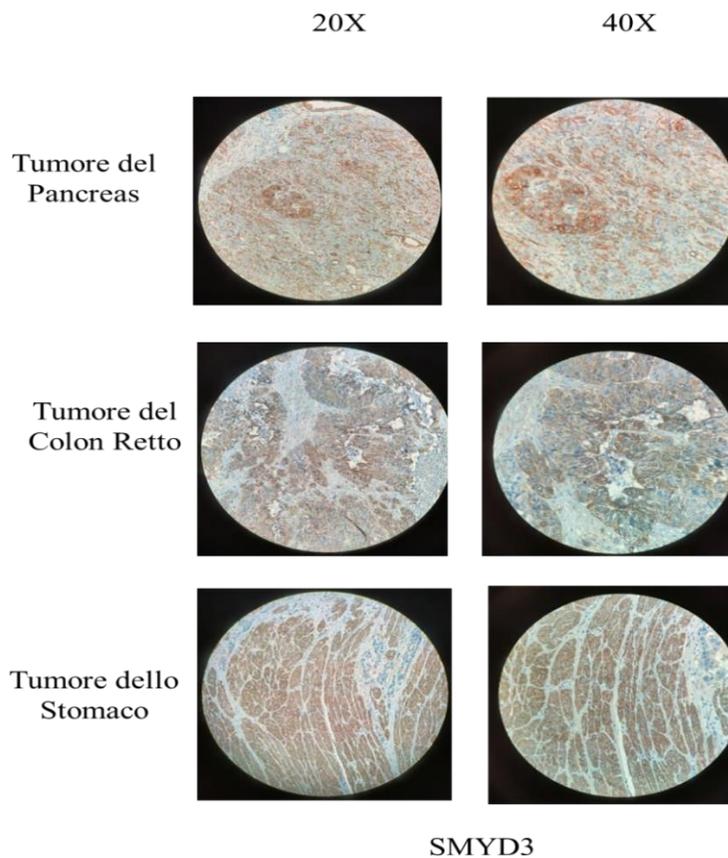


Figura 2. Analisi rappresentativa immunohistochimica di SMYD3 in tessuti di pazienti affetti da tumore del pancreas, del colon retto e dello stomaco.

Obiettivi specifici dello studio:

Scopo del progetto è quello di validare e sviluppare un approccio terapeutico per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3 – il quale può essere utilizzato anche come marcatore predittivo – basata sull'uso di trattamento combinato con nuovi SMYD3i e chemioterapici attualmente in uso o farmaci inibitori di PARP (sulla base delle caratteristiche tumorali dei geni relativi al pathway dell'HR) al fine di contrastare la resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia tradizionale.

Dato che SMYD3 è parte dei complessi dell'HR ed ha un ruolo fondamentale nel riparo del DNA a seguito di DSB da parte dei chemioterapici, l'ipotesi è che SMYD3 possa fungere da bersaglio molecolare per superare la chemioresistenza. Il piano sperimentale ha lo scopo di sfruttare il ruolo di SMYD3 nel riparo del DNA e la sua interazione funzionale con le proteine del pathway dell'HR (ATM, BRCA2, CHK2) con l'obiettivo di sviluppare nuovi approcci terapeutici per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3, basati su terapie combinate con i chemioterapici attualmente in uso e gli inibitori di SMYD3. Questa strategia può aiutare ad attenuare la tossicità dei farmaci, riducendo la dose richiesta, ed allo stesso tempo a prevenire la chemioresistenza. Allo stesso tempo, la combinata inibizione di SMYD3 e PARP apre la strada a nuovi protocolli terapeutici con la possibilità di estendere questi trattamenti combinati in tumori che sono proficienti per l'HR e che esprimono alti livelli di SMYD3. Questi rappresentano una significativa proporzione nei tumori gastro/entero/pancreatici come riportato nei database del TCGA Pan-Cancer Atlas.

Obiettivo specifico 1: Studio dell'espressione tissutale di SMYD3 nei tumori gastro/entero/pancreatici e caratterizzazione dei geni coinvolti nel pathway dell'HR.

Obiettivo specifico 2: Validazione dell'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti con tumori dello stomaco, del pancreas, del colon-retto con lo scopo di identificare nuovi approcci terapeutici.

Obiettivo specifico 3: Validazione delle strategie terapeutiche personalizzate basate sulla valutazione degli alti livelli di SMYD3 e le alterazioni dei geni correlati al pathway dell'HR in modelli murini preclinici.

Obiettivo 1:

Negli ultimi anni, SMYD3 ha riscosso particolare interesse tra i ricercatori e le case farmaceutiche tanto che diversi inibitori chimici sono stati sviluppati [23,24]. Infatti SMYD3 risulta over-espresso nei tumori del colon-retto, come anche nel cancro della mammella, dell'ovaio, della prostata, del pancreas, dello stomaco, del polmone e del fegato [17,25,26]. Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica abbiamo valutato per prima cosa l'espressione dell'mRNA di SMYD3 in una coorte di pazienti provenienti dal dataset del TCGA Pan Cancer, nel quale l'analisi ha messo in evidenza che il 25-30% dei pazienti con tumori gastro/entero/pancreatici mostrano un aumento dei livelli di espressione di SMYD3. Lo studio è stato ampliato e sono stati integrati dati sulle mutazioni somatiche troncanti, delezioni, variazioni del numero di copie, eventi di silenziamento epigenetico che coinvolgono i geni di tutte le maggiori pathway del riparo del DNA. Abbiamo quindi valutato quello che viene chiamato "score HRD (*HR deficiency*)" [27] nei pazienti riportati nel dataset con alti livelli di espressione di SMYD3 scoprendo che un importante percentuale dei pazienti presentava alti livelli di SMYD3 e basso HRD score e sarebbero stati eligibili per la terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP. Inoltre, è stato interessante vedere che l'over-espressione dell'mRNA di SMYD3 risulta essere mutualmente esclusiva con alterazioni di perdita di funzione (*loss-of-function*) in diversi geni associati con HRD nel cancro (per esempio, TP53, BRCA1, NEIL2, HERC2, ATM, RAD51C, and BRCA2), supportando il potenziale terapeutico del protocollo che prevede la combinazione degli inibitori di SMYD3 e PARP nei tumori HR-proficienti con alti livelli di SMYD3.

Questi dati sono stati associati a partire dal dataset del PanCanAtlas negli adenocarcinomi del colon-

retto (COAD-READ) e del pancreas (PAAD, dove la terapia con inibitori di PARP è stata già approvata per il trattamento di pazienti con mutazioni germinali o somatiche di BRCA1/ BRCA2), confermando la correlazione e il potenziale beneficio della terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP.

Le analisi di queste alterazioni molecolari (l'over-espressione di SMYD3 e le mutazioni dei geni coinvolti nel pathway dell'HR) identificano clinicamente due differenti sottotipi di tumori: uno che è proficiente nei geni coinvolti nell'HR ed esprime alti livelli di SMYD3 (HR+/SMYD3 high) e l'altro che mostrerà difetti nei geni coinvolti nell'HR (HR-/SMYD3 high). Come mostrato dai nostri dati preliminari nei modelli cellulari di linee continue cancerose che over-esprimono SMYD3, l'ablazione genica o l'inibizione farmacologica di SMYD3 scatena un meccanismo compensatorio del riparo del DNA mediato da PARP.

Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica valuteremo per prima cosa l'espressione tissutale di SMYD3 in una coorte di pazienti con tumori dello stomaco (n=100), del pancreas (n=100), del CRC (n=100) classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati che mostreranno elevati livelli di espressione di SMYD3 (risultato atteso nel 30% dei casi) verranno avviati all'analisi su pannelli NGS per la valutazione dei principali geni coinvolti nel pathway dell'HR (estrazione di DNA da paraffinato).

Questo ci permetterà di individuare realmente i pazienti eligibili per una terapia combinata con inibitori di SMYD3 e di PARP (nei pazienti con profilo HR+/SMYD3 high) e pazienti eligibili per una terapia chemio-sensibilizzante con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei pazienti con profilo HR-/SMYD3 high).

Obiettivo 2:

L'importanza del dato di popolazione permetterà di traslare l'idea sperimentale e validare l'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti con tumori dello stomaco, del pancreas, del CRC. Pezzi operatori freschi di pazienti con tumori dello stomaco, del pancreas e del CRC, verranno sottoposti ad analisi per valutare i livelli di espressione proteica di SMYD3 e quelli che mostreranno elevati livelli di espressione verranno avviati all'analisi su pannelli NGS per la valutazione dei principali geni coinvolti nel pathway dell'HR (estrazione di DNA da tessuto). Successivamente saranno processati per la coltura *in vitro* al fine di ottenere organoidi che ricapitolino le caratteristiche funzionali e strutturali del tessuto d'origine.

Inoltre, dato che gli organoidi originano prevalentemente da un pool di cellule staminali, questi esperimenti potranno fornire nuove conoscenze rispetto al ruolo di SMYD3 nelle cellule staminali tumorali. Data la loro capacità di mantenere inalterate le caratteristiche del tessuto e del paziente d'origine e di espandersi illimitatamente, gli organoidi saranno poi utilizzati per gli studi *in vitro*.

Gli inibitori di PARP si presentano come il trattamento più promettente per i tumori associati a BRCA [28]. Almeno 5 inibitori di PARP sono attualmente oggetto di studi clinici. Considerando l'osservazione che tumori con mutazioni in BRCA mostrano un difetto nel riparo HR, verrà valutato l'uso di inibitori di PARP in combinazione con inibitori di SMYD3 (compromettendo così l'attività di BRCA2) per il trattamento degli organoidi tumorali.

Sulla base delle analisi di queste alterazioni molecolari (l'over-espressione di SMYD3 e le mutazioni dei geni coinvolti nel pathway dell'HR) i due differenti sottotipi di organoidi tumorali identificati HR+/SMYD3 high e HR-/SMYD3 high, verranno trattati secondo protocolli personalizzati con inibitori di SMYD3 in combinazione con inibitori di PARP nei HR+ e in combinazione con CHT convenzionale negli HR-.

- Obiettivo 3:

Allo scopo di validare i potenziali protocolli terapeutici basati sulla valutazione degli alti livelli di SMYD3 e le alterazioni dei geni correlati al pathway dell'HR, gli organoidi dei pazienti ottenuti da pezzi operatori freschi dei tumori dello stomaco, del pancreas, del CRC, che ricapitolano i due differenti sottotipi tumorali identificati HR+/SMYD3 high e HR-/SMYD3 high, verranno inoculati sottocute in topi nudi atimici e sottoposti a trattamento con inibitori di SMYD3 e

PARP (nei gruppi HR+/SMYD3 high) per valutare l'effetto letale sintetico e con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei gruppi HR-/SMYD3 high) per valutare l'effetto chemo-sensibilizzante dell'inibizione farmacologica di SMYD3.

- Dati preliminari:

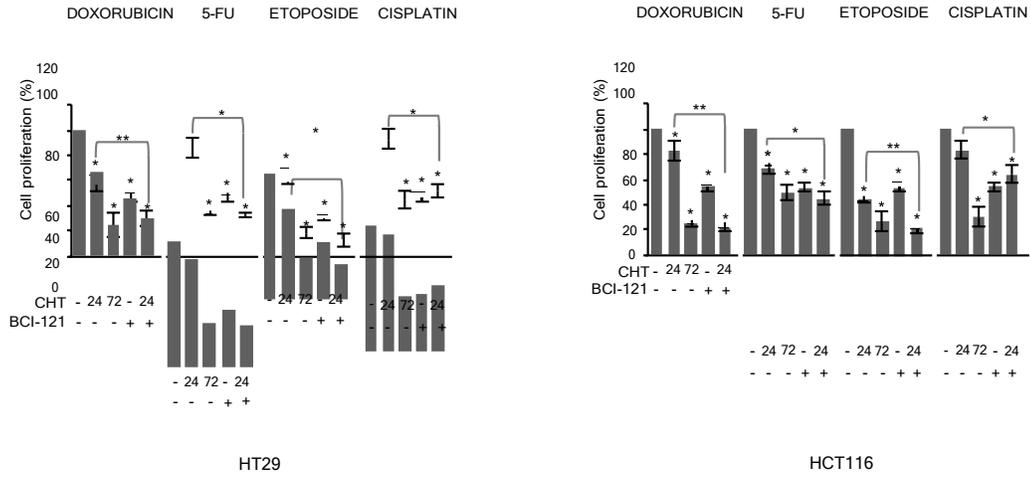
Abbiamo recentemente pubblicato che SMYD3 è un interattore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA (DSBs). La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi dell'HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di DBS in risposta al danno endogeno o alla somministrazione di agenti danneggianti il DNA (come i chemioterapici) nel cancro del colon-retto e della mammella [20]. Dato il suo ruolo nel complesso dell'HR, SMYD3 risulta un valido bersaglio terapeutico e permette l'estensione dell'approccio del letale sintetico, basato sugli inibitori di PARP, ai tumori proficienti per l'HR in tessuti diversi [20]. L'inibizione farmacologica dell'attività enzimatica di PARP attiva direttamente il pathway dell'HR come via per compensare questa disfunzione; come conseguenza le cellule con difetti nelle proteine dell'HR non possono più riparare il danno al DNA e ripristinare la replicazione, portando alla morte. L'importanza di questa potenziale nuova terapia che prevede la combinata inibizione di SMYD3 e PARP rappresenta una straordinaria strategia per indurre morte cellulare con l'approccio del letale sintetico.

Dato che SMYD3 ha un ruolo fondamentale nel riparo del DSB con la formazione dei complessi dell'HR, come dimostrato da esperimenti con neocarziostatina (che induce DSB) e inibitore di SMYD3 [20], i risultati ottenuti dimostrano come gli alti livelli proteici di SMYD3 nelle cellule tumorali siano richiesti per la riparazione del DNA e siano responsabili della chemioresistenza.

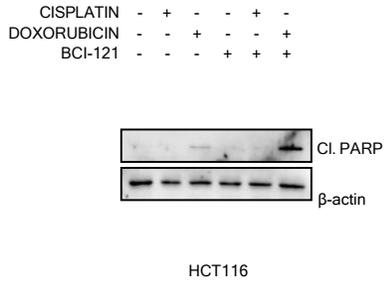
Quindi, abbiamo valutato se BCI-121 (inibitore di SMYD3) possa sensibilizzare cellule di CCR con alti livelli di SMYD3 a CHTs. A questo scopo, abbiamo trattato due linee cellulari di CCR aventi alti livelli di SMYD3 (HCT116, HT19) [10] con una combinazione di SMYD3i BCI-121 e CHTs, dimostrando che l'uso di BCI-121 riduce il tempo richiesto affinché i chemioterapici abbiano un effetto inibitorio sulla crescita cellulare (Fig1A). Inoltre, il trattamento combinato con la doxorubicina (DOX) e BCI-121 aumenta la risposta apoptotica, con attivazione delle caspasi (Fig1B-C). Questo effetto è dipendente dall'inibizione di SMYD3, così come è stato dimostrato mediante ablazione genetica (Fig1D). In particolare, il saggio di proliferazione cellulare ha dimostrato che il trattamento combinato induce citotossicità (Fig1E-F).

A

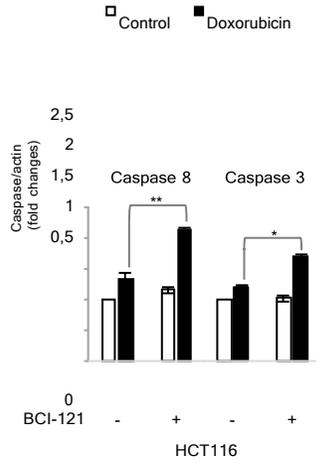
CRC cell lines



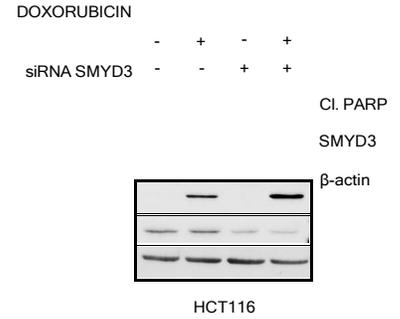
B



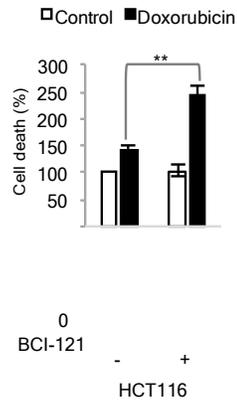
C



D



E



F

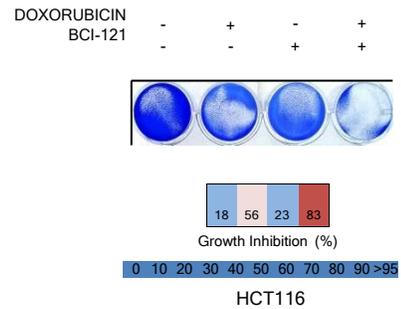


Figure 1 (A) Trattamento combinato di linee cellulari di CRC (HT29, HCT116) con BCI-121 e chemioterapici. Pre-trattamento di 48 ore con BCI-121 seguito dalla somministrazione dei chemioterapici per 24 ore. La vitalità è stata paragonata a quella ottenuta somministrando i chemioterapici per 72 ore. **(B, C)** Il pre-trattamento con BCI-121 (48 ore) delle HCT116 aumenta i livelli di PARP (B) e caspasi (C) clivate ottenuti dopo il trattamento con doxorubicina per 24 ore. **(D)** L'effetto SMYD3-dipendente del trattamento combinato BCI-121+doxorubicina è stato confermato mediante ablazione genetica di SMYD3. **(E, F)** Conta cellulare (E) e saggio di formazione delle colonie (F) hanno confermato l'effetto citotossico del trattamento combinato. Doxorubicina 1 μ M; Etoposide 40 μ M; 5-FU 2 μ M; Cisplatino 30 μ M. Student's t- test: *P<0.05 and **P<0.01 statisticamente significativo

- Metodologie e analisi statistiche:

Obiettivo 1. La valutazione dell'espressione di SMYD3 sarà effettuata con metodica immunistochemica. I dati clinici, il grado istologico e l'espressione dei marcatori molecolari saranno analizzati con analisi statistiche adeguate allo studio: test esatto di Fisher o il test χ^2 a seconda dei casi, analisi ANOVA, test T per campioni indipendenti. Le curve di sopravvivenza saranno stimate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier, e le differenze tra di loro saranno valutate dal log-rank test di Mantel Cox. Tutte le analisi statistiche saranno effettuate utilizzando la SPSS Statistics V21.

La caratterizzazione molecolare dei tessuti tumorali, verrà effettuata mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) al fine identificare alterazioni genomiche somatiche coinvolgenti i principali geni coinvolti nell'HR pathway. Nello specifico si procederà con l'estrazione di DNA dai tessuti FFPE tumorale e normale di ciascun paziente mediante l'utilizzo del kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen). La quantità e qualità dei campioni di DNA genomico purificato verrà valutata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), del fluorimetro Qubit4.0 (Thermo Fisher Scientific) e della piattaforma TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Successivamente si procederà con la preparazione di librerie di DNA, partendo da campioni di DNA purificati da tessuto tumorale e tessuto normale, al fine di generare un pool di amplificazione delle regioni target dei geni coinvolti nell'HR pathway, secondo i protocolli IonAmpliseq (Thermo Fisher Scientific) e mediante l'utilizzo dello strumento Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion S5 XL Sequencer" (Thermo Fisher Scientific). Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific). Verranno successivamente utilizzate pipelines bioinformatiche implementate nei softwares "Torrent Suite" e "Ion Reporter" per la determinazione e l'annotazione di varianti genomiche somatiche (mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni, e variazioni del numero di copie) coinvolgenti i geni HR sequenziati.

L'identificazione delle alterazioni somatiche nei principali geni coinvolti nell'HR pathway che determinano perdita di funzione della proteina, potrà permettere la classificazione molecolare dei tumori analizzati nei due sottotipi principali: HR-proficienti (HR+) e HR-difettivi (HR-).

Obiettivo 2. Verrà valutata l'espressione di SMYD3 da tessuti operatori freschi con saggi di nuova generazione (Pro-Quantum Assay, Thermo Fisher Scientific) e avviata la caratterizzazione molecolare di tali tessuti mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) finalizzata all'identificazione di alterazioni genomiche somatiche coinvolgenti i principali geni coinvolti nell'HR pathway. Nello specifico si procederà con l'estrazione di DNA da tessuto tumorale e normale di ciascun paziente mediante l'utilizzo del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Successivamente i campioni di DNA, purificati da tessuto tumorale e tessuto normale di ciascun paziente, verranno sottoposti a sequenziamento mirato di pannelli di geni coinvolti nel pathway HR, secondo protocolli/metodi riportati nel paragrafo "Obiettivo 1". Le mutazioni somatiche dei geni HR che determinano una perdita di funzione della proteina, permetterà di classificare molecularmente i tumori analizzati nei due sottotipi principali: HR-proficienti (HR+) e HR-difettivi (HR-). Successivamente i tessuti verranno processati secondo protocolli validati e pubblicati al fine di ottenere organoidi tumorali GEP umani. Verranno testati in vitro gli inibitori di SMYD3 e PARP (nei gruppi HR+/SMYD3 high) per valutare l'effetto letale sintetico e gli inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei gruppi HR-/SMYD3 high) per valutare l'effetto chemo-sensibilizzante dell'inibizione farmacologica di SMYD3. Verranno condotti saggi per valutare la risposta apoptotica, l'induzione autofagica e la sopravvivenza cellulare (ad es. clivaggio delle caspasi, conversione di LC3, analisi di microscopia e biochimiche).

Obiettivo 3. Gli organoidi dei pazienti ottenuti da pezzi operatori freschi di dei tumori dello stomaco, del pancreas, del CRC, che ricapitolano i due differenti sottotipi tumorali identificati HR+/SMYD3 high e HR-/SMYD3 high, verranno inoculati sottocute nei 2 fianchi di topi nudi atimici e una volta che i tumori raggiungono le dimensioni di 3-5 mm di diametro, gli animali verranno sottoposti a trattamento intraperitoneale con inibitori di SMYD3 e PARP (nei gruppi HR+/SMYD3 high) e con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei gruppi HR-/SMYD3 high). Verrà testata la capacità di influenzare la crescita dei tumori *in vivo* e verrà testata la capacità di modulare la sensibilità agli inibitori e agli agenti chemioterapici. Gli animali verranno trattati ogni giorno per 15-20 giorni con i farmaci sopra citati (in dipendenza dalla dimensione massima che possono raggiungere i vehicle o eventuale precoce o tardivo effetto/tossicità del farmaco). I topi verranno pesati 2-3 volte alla settimana, come indice di tossicità generale. I diametri dei tumori verranno misurati 3 volte alla settimana, per tutta la durata dell'esperimento. Al termine dell'esperimento i topi verranno sacrificati e solo le masse tumorali verranno espianate. Ogni massa verrà suddivisa per valutazione in IHC, proteina ed RNA.

Obiettivo 1-3. I risultati verranno analizzati mediante media +/- SEM con n>3. Verrà usato il t test student per definire il p value (< 0.05 verrà considerato statisticamente significativo).

- Risultati attesi:

Il nostro piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione del coinvolgimento di SMYD3 nel HR pathway nella chemio-resistenza. Quindi, ci permetterà di valutare come attraverso l'inibizione di SMYD3 sarà possibile migliorare gli effetti della chemioterapia ed estendere l'approccio del letale sintetico ai tumori HR+.

Permetterà anche di approfondire il potenziale dell'inibizione di SMYD3 per futuri trial clinici in modo da valutare l'effetto degli inibitori di SMYD3 in nuovi protocolli terapeutici.

- Innovazioni:

Grazie al piano sperimentale proposto, ci aspettiamo di caratterizzare a livello funzionale l'interazione tra SMYD3 e dell' HR pathway, focalizzandosi specificatamente sul loro ruolo nei processi di riparo del DNA e nella risposta alla terapia. Ci aspettiamo anche di valutare il potenziale della manipolazione di SMYD3 per aumentare la chemiosensibilizzazione. Una piena comprensione del significato funzionale dell'interazione tra SMYD3 e BRCA2 e HR pathway può essere utile per concepire strategie terapeutiche mirate. In particolare, nuovi approcci terapeutici per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3, basati sull'uso di inibitori *small molecule* di SMYD3, può aiutare a superare la resistenza tumorale ai farmaci esistenti, così da permettere non solo di ridurre la dose e gli effetti collaterali, ma anche di trattare i tumori che non rispondono alle comuni terapie. Infine, la straordinaria potenzialità di una nuova terapia che prevede la combinata inibizione di SMYD3 e PARP (oggi il trattamento più promettente per i tumori associati a BRCA con almeno 5 inibitori di PARP oggetto di studi clinici) rappresenta una importante strategia per indurre morte cellulare con l'approccio del letale sintetico.

- Bibliografia:

1. Carreira A, et al. Cell. 2009;136:1032-43.
2. Venkitaraman AR, et al. Cell, 2002; 108(2):171-82.
3. Hine CM, et al. Proc Natl Acad Sci 2008;105:20810-20815.
4. Ohnishi T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1998;245:319-324.
5. Husain A, et al. Cancer Res. 1998;58:1120-1123.
6. Huang L and Xu AM. Am J Transl Res. 2017; 9(1): 1-14.
7. <http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5883840>.
8. Cock-Rada AM, et al. 2012;72:810-20.
9. Luo XG, et al. Cancer Letters. 2014;344:129-37.
10. Peserico A, et al., J Cell Physiol. 2015. 230(10):2447-2460.
11. Kim H, et al. Journal of Biological Chemistry. 2009;284:19867-77.
12. Yoshioka Y, et al. Oncotarget 2016; 7:75023-75037.
13. Kunizaki M, et al. Cancer Research. 2007;67:10759-65.

14. Yoshioka Y, et al. *Cancer Medicine*. 2017;6:1665–72.
15. Brown MA, et al. *Oncotarget*. 2015;6:4005–19.
16. Tsai CH, et al. *Cancer Research*. 2016;76:6043–53.
17. Mazur PK, et al. *Nature*. 2014;510:283–7.
18. Thomenius MJ, et al. *PLoS ONE*. 2018; 13(6):e0197372.
19. Chen YJ, et al. *Scientific Reports*. 2017; 7: 3842.
20. Sanese P, et al. *iScience*. 2020; 23,101604.
21. Telly ML and Ford JM. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2010; 8, 629-635.
22. Wang X and Weaver DT. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1, 301-327.
23. Fabini E, et al. *Future Med. Chem.* 2019; 11,901-921.
24. Bottino C, et al. *Cancers*. 2020; 12, E142.
25. Hamamoto R, et al. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6, 731-740.
26. Tsuge M, et al. *Nat. Genet.* 2005; 37, 1104.
27. Knijnenburg TA, et al. *Cell Rep.* 2018; 23, 239-254.
28. Faraoni I, Graziani G. *Cancers*. 2018;10(12):48

- Timeline (Gantt chart)

Timeline Obiettivo 1: questi esperimenti verranno completati nel primo anno del progetto

Timeline Obiettivo 2: questi esperimenti inizieranno nella seconda decade del primo anno e verranno completati nel secondo anno del progetto

Timeline

Progetto 04/2022: “Caratterizzazione epigenetica mediata da SMYD3 e valutazione di nuovi approcci terapeutici nel trattamento dei tumori del tratto gastrointestinale”

Responsabile: dott.ssa Vittoria Disciglio

Partecipanti: Paola Sanese, Valentina Grossi, Giovanna Forte, Candida Fasano, Martina Lepore Signorile, Katia De Marco, Cristiano Simone

Introduzione

Le alterazioni epigenetiche sono caratterizzate da cambiamenti dinamici e reversibili che non derivano da alterazioni nella sequenza nucleotidica del DNA, bensì da variazioni nei livelli di metilazione del DNA, modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche, rimodellamento cromatinico, oppure interferenze nei meccanismi mediati da molecole di RNA non codificanti, che determinano alterazioni della regolazione temporale e spaziale dell'espressione genica [1].

I principali processi di regolazione dell'espressione genica sono guidati da complessi meccanismi di rimodellamento della struttura tridimensionale della cromatina, mediati da enzimi epigenetici che, mediante modifiche a carico degli istoni che fungono da marchi epigenetici, la rendono più o meno accessibile al macchinario trascrizionale [2].

L'introduzione di tecnologie ad alta processività, come il sequenziamento di nuova generazione (NGS), ha permesso di studiare lo stato, la distribuzione e le alterazioni dei marchi epigenetici nei tessuti tumorali e normali, mostrando che alterazioni a carico dello stato di metilazione e del rimodellamento della cromatina, così come alterazioni coinvolgenti geni che codificano per le proteine complessate a livello della cromatina, sono state identificate in una percentuale cospicua (>50%) di tutti i tumori nell'uomo[3].

Uno dei principali meccanismi di regolazione epigenetica coinvolto nella regolazione della trascrizione, sia durante lo sviluppo normale e patologico, è la metilazione delle proteine istoniche. Tale meccanismo è attuato da importanti proteine epigenetiche chiamate metiltrasferasi (*Protein methyltransferases*, PMTs), di cui fanno parte le lisine metiltrasferasi (*Protein lysine methyltransferases*, PKMTs) [4]. La metilazione istonica delle lisine si verifica generalmente a livello di specifici residui degli istoni, quali H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H4K5 e H4K20. La metilazione di questi marchi istonici determina attivazione/repressione dell'accessibilità cromatinica, in base al tipo di istone e residuo aminoacidico sottoposto a metilazione [5, 6].

La famiglia delle proteine SMYD (SET and MYND-Domain), che comprende cinque proteine (SMYD1-5), fa parte della famiglia delle PKMTs, proteine capaci di interagire con e metilare diverse proteine istoniche e non istoniche determinando alterazioni dell'accessibilità della cromatina e alterazioni dell'espressione genica [7].

SMYD3 è coinvolta in diversi tipi di cancro, il che la rende un interessante bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci. Diversi studi riportati nella letteratura scientifica hanno messo in evidenza un'associazione tra livelli elevati di espressione di SMYD3 e progressione del tumore, suggerendo che l'overespressione del gene *SMYD3* potrebbe rappresentare un potenziale fattore prognostico in diversi tipi di tumore. SMYD3 è stata dapprima caratterizzata come istone H3K4/H4K5 metiltrasferasi, coinvolta nell'attivazione trascrizionale quale membro del complesso dell'RNA polimerasi. I suoi geni bersaglio sono i regolatori chiave della proliferazione cellulare, del ciclo cellulare e della transizione epitelio-mesenchimale. Topi SMYD3-KO non hanno mostrato significative alterazioni dopo una completa fenotipizzazione [8]. In cellule normali, SMYD3 sembra non essere essenziale per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza. La sua elevata espressione è sufficiente per accelerare la crescita cellulare ed attiva geni coinvolti nella trasformazione tumorale e nella migrazione [9, 10]. Abbiamo dimostrato che, in un modello preclinico di CCR (APCMin/+ trattati con il carcinogeno azossimetano), risulta fortemente espresso durante la tumorigenesi. Inoltre, l'ablazione di SMYD3 comporta una riduzione della proliferazione di cellule di CCR, ciò quindi implica che sia coinvolta nella crescita delle cellule tumorali. Pertanto, abbiamo realizzato uno screening virtuale al fine di identificare nuovi inibitori di SMYD3 (SMYD3i) testando diversi composti. Uno di questi (BCI-121) riduce l'attività di SMYD3 in maniera significativa sia in vitro che in cellule di CCR. Ulteriori analisi hanno dimostrato che SMYD3 è altamente espressa in molte linee cellulari derivanti da diversi tessuti, e che cellule cancerose con alti livelli di SMYD3 risultano essere molto sensibili all'inibizione farmacologica data da BCI-121. BCI-121 inibisce significativamente l'interazione tra SMYD3 ed il substrato istonico ed il suo reclutamento sulla cromatina, inoltre riduce la proliferazione promuovendo l'arresto del ciclo cellulare nella transizione tra le fasi S/G2, suggerendo il possibile coinvolgimento di SMYD3 nel checkpoint S/G2 [11]. È stato inoltre scoperto che SMYD3 esercita primariamente il suo ruolo oncogenico attraverso l'interazione con e la metilazione di proteine non istoniche, mediante cui transattiva specifiche vie di segnalazione cancro-specifiche [12-18]. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che il suo principale contributo nella regolazione della tumorigenesi sia ancora sconosciuto, in quanto non è basato sul sostegno della proliferazione autonoma delle cellule cancerose.

Inoltre, è stato proposto che il riparo delle rotture del DNA a doppio filamento (*Double strand breaks*, DSBs) mediante ricombinazione omologa (*Homologous Recombination*, HR) sia promosso dalla modulazione dell'espressione genica SMYD3-mediata. Infatti, abbiamo recentemente pubblicato che SMYD3 è un interruttore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture DSBs. La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di DSBs in risposta al danno endogeno o alla somministrazione di agenti danneggianti il DNA (come i chemioterapici) nel cancro del colon-retto e della mammella [20]. In tale lavoro scientifico abbiamo inoltre dimostrato che approcci terapeutici mirati, volti alla doppia inibizione di SMYD3 e PARP, mediante l'utilizzo del meccanismo di "letalità sintetica", rappresentano strategie terapeutiche innovative volte a indurre morte cellulare in tumori del tratto gastroenterico [20]. Ad oggi, l'unico approccio terapeutico mediante letalità sintetica utilizzato in clinica è basato sull'utilizzo degli inibitori di PARP (es. olaparib, rucaparib, niraparib, and talazoparib) in tumori della mammella, dell'ovaio e del pancreas in cui si verifica concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparo del DNA via HR, nei quali le proteine BRCA1/2 svolgono un ruolo principale. Diversi lavori scientifici pubblicati in letteratura hanno inoltre messo in evidenza i principali meccanismi di interazione che mediano la regolazione dei meccanismi per il riparo dei DSBs in relazione alla struttura e conformazione della cromatina. Ad esempio è stato dimostrato come H2AX sia rapidamente fosforilato da ATM ad una distanza di diverse megabasi dalla sede in cui si è verificata la rottura DSB [21, 22]. Inoltre è stato dimostrato che alcune metiltransferasi istoniche possono regolare il reclutamento e/o la stabilizzazione delle proteine coinvolte nel riparo al DNA (es. CtIP, 53BP1, BRCA1) [23]. Nell'insieme, questi aspetti dimostrano che le modificazioni epigenetiche a carico della cromatina guidano i processi di riparo del DNA mediante il reclutamento di proteine specifiche, la scelta delle principali vie di segnalazione per i meccanismi di riparo e l'attivazione di checkpoint nella risposta al danno al DNA. La caratterizzazione delle alterazioni nella regolazione dello stato epigenetico e della natura dinamica alla base dei meccanismi regolatori dello stato epigenetico guidati da SMYD3 rappresenta una interessante strategia per costruire una mappatura epigenetica nei tumori del tratto gastrointestinale (GI) e fornire dati interessanti per sviluppare approcci terapeutici innovativi.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Caratterizzazione della mappatura epigenetica mediata da SMYD3 in modelli cellulari di tumori del tratto GI.

Obiettivo specifico 2: Caratterizzazione della mappatura epigenetica mediata dall'inibizione di SMYD3 in modelli cellulari di tumori del tratto GI.

Obiettivo specifico 3: Valutazione di nuovi potenziali approcci terapeutici basati sull'inibizione di SMYD3 come fattore epigenetico coinvolto nella via HR.

Obiettivo 1:

Studiare, in modelli cellulari di tumori del tratto GI, l'effetto regolatorio di SMYD3 sui processi di danno e riparo del DNA. Focalizzeremo l'analisi sulla via HR coinvolta nel riparo dei DSBs e sulle modificazioni post-traduzionali che influenzano il rimodellamento della cromatina e promuovono così il riparo del DNA. La nostra attenzione si rivolgerà dunque alle modificazioni epigenetiche degli istoni che sono coinvolte nella risposta al danno al DNA, in quanto fungono da sensori in grado di indurre l'attivazione dei meccanismi di riparo [24]. Infatti, specifiche modificazioni istoniche fungono da sito di attacco per varie proteine effettrici coinvolte nella risposta al danno al DNA, determinando quindi la scelta della via di riparazione del DNA da attivare [24].

Ci avvarremo di un sistema cellulare ingegnerizzato, il quale permette di ottenere un alto numero di DSBs in siti specifici lungo tutto il genoma in risposta all'azione di un agente danneggiante [25, 26]. Ci occuperemo quindi della generazione di tale modello per diversi distretti del tratto GI, in particolare di colon, stomaco e pancreas. Le linee cellulari da ingegnerizzare (es. HT29, HCT116, AGS, PANC1) verranno sottoposte a caratterizzazione molecolare, mediante sequenziamento NGS, al fine di determinare lo stato mutazionale dei geni coinvolti nei principali meccanismi di riparo, in particolare quello HR. Le stesse linee cellulari precedentemente analizzate mostrano alti livelli di SMYD3. Le analisi delle alterazioni molecolari (livelli di SMYD3 e le mutazioni dei geni coinvolti nell'HR) identificano differenti sottotipi molecolari, che permettono di classificare le cellule tumorali oggetto di studio in: i) cellule tumorali proficue nei geni coinvolti nell'HR che esprimono alti livelli di

SMYD3 (HR+/SMYD3 high) e ii) cellule tumorali che mostrano difetti nei principali geni coinvolti nell'HR e che esprimono alti livelli di SMYD3 (HR-/SMYD3 high).

Una volta ottenute queste linee cellulari ingegnerizzate, effettueremo immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) seguita da sequenziamento massivo NGS (ChIP-Seq) per la valutazione del reclutamento di SMYD3, di modificazioni istoniche e dei complessi di riparo sui siti di danno [27].

Valuteremo dapprima le dinamiche di reclutamento di SMYD3 sui foci di danno DSB. Successivamente, verificheremo la presenza, sugli stessi siti, dei componenti della via HR ed analizzeremo i possibili patterns di modificazioni istoniche coinvolti nella risposta HR. Nello specifico, andremo a valutare in primis l'arricchimento dei marchi di metilazione istonica specifici di SMYD3 (es. H3K4me2/3, H4K5me, H4K20me), il cui ruolo nel riparo del DNA è stato precedentemente dimostrato [28, 29]. Successivamente, analizzeremo tutti i marchi istonici coinvolti nella risposta al danno al DNA (es. γ H2AX, H3K9me2/3, H3K27me2/3, H3K79me2/3, H3K36me2/3), in modo tale da caratterizzarne l'arricchimento a livello dei siti di DSB per ogni modello tumorale che studieremo. L'analisi in diverse linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas che presentano alti livelli di SMYD3 e classificate come HR-proficienti (HR+) ci permetterà, infatti, di determinare i profili epigenetici mutualmente esclusivi che mediano le differenze nei meccanismi di risposta al danno al DNA.

La caratterizzazione della mappatura epigenetica ottenuta mediante la tecnologia ChIP-Seq, ci permetterà di eseguire contemporaneamente l'analisi dei molteplici DSBs ottenuti, con una resa superiore al sequenziamento tradizionale, e di valutare complessivamente il reclutamento di SMYD3 e di altri fattori coinvolti nel riparo e l'arricchimento dei marchi istonici, in modo da ottenere così risultati univoci e d'insieme per l'intero genoma.

Obiettivo 2:

Una volta valutato, mediante sequenziamento massivo, il profilo di reclutamento di SMYD3 e degli altri fattori di riparo e quello di arricchimento delle modifiche istoniche, il nostro obiettivo sarà quello di caratterizzare il ruolo epigenetico di SMYD3 nel regolare l'apposizione delle modifiche istoniche a ridosso dei DSBs e, dunque, il rimodellamento della cromatina in quei siti, fondamentale affinché la cellula tumorale attivi i meccanismi di riparo del DNA.

Testeremo dunque l'attività di SMYD3 nel modulare la risposta ai DSBs nei sistemi cellulari ingegnerizzati, precedentemente generati ed analizzati, mediante silenziamento/inibizione di SMYD3 e di altri fattori coinvolti nella via di segnalazione HR.

Valuteremo quindi in che modo l'assenza/inattivazione di ogni fattore contribuisca ad una eventuale rimodulazione dei profili di reclutamento specifici della risposta al danno e, di conseguenza, se questo vada a rimodulare l'attività di SMYD3 sui siti DSBs. Analizzeremo, inoltre, l'arricchimento dei marchi istonici identificati e caratterizzati precedentemente (es. H3K4me2/3, H4K5me, H4K20me), al fine di esaminare come l'inibizione di SMYD3, così come di altri attori principali della risposta al danno al DNA, possa influenzare l'apposizione di marchi istonici che svolgono un ruolo di *priming* nel riparo del DNA. Questa analisi permetterà, in particolare, di identificare le modificazioni istoniche regolate da SMYD3.

I risultati ottenuti dallo svolgimento delle analisi prefissate nell'Obiettivo 2, permetteranno di chiarire il ruolo epigenetico di SMYD3 nell'influencare la via di riparo del DNA, se la sua attività sui siti DSBs sia a sua volta regolata dagli altri fattori del complesso HR e quindi di caratterizzare la loro correlazione. Tali risultati porranno le basi per lo sviluppo dell'obiettivo cardine di questo piano sperimentale (Obiettivo 3), volto all'identificazione di nuove strategie terapeutiche per tumori del tratto GI che esprimono alti livelli di SMYD3.

Obiettivo 3:

Gli inibitori di PARP si presentano come il trattamento più promettente per i tumori che presentano mutazioni a carico dei geni *BRCA1/2* [30]. Utilizzando inibitori di (PARPi), si sfrutta la strategia della letalità sintetica per le sole cellule cancerose, nelle quali i geni *BRCA1/2* risultano mutati. Trattandosi però di mutazioni poco frequenti, le possibilità di applicazione di questa terapia sono ad oggi ridotte. Dato il successo dell'applicazione degli inibitori di PARP, un numero elevato di inibitori specifici per fattori coinvolti nei meccanismi di riparo, definiti "inibitori DDR" (*DNA damage response (DDR) inhibitors*) sono attualmente testati in studi preclinici e clinici, come gli inibitori di ATM, ATR, CHK1/2 [31]. La combinazione di inibitore di PARP e di altri inibitori DDR, o altre combinazioni di inibitori di DDR specifici per fattori coinvolti nella stessa pathway possono dare un potenziale effetto letale sintetica. Inoltre, aberrazioni nelle modificazioni epigenetiche che interessano la regolazione dei meccanismi di riparo del DNA possono essere considerati nuovi potenziali approcci per la strategia della letalità sintetica [32]. SMYD3 risulta quindi essere un valido bersaglio terapeutico e permette l'estensione dell'approccio del letale sintetica, in combinazione con altri inibitori DDR, a quei tumori HR-proficienti. Scopo di questo obiettivo sarà dunque quello di valutare il potenziale di nuovi approcci terapeutici basati sull'inibizione di SMYD3 come fattore epigenetico coinvolto nella via HR, combinata all'inibizione di PARP ed altri inibitori DDR.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'Obiettivo 2, che mostreranno come i singoli inibitori possano influenzare i profili di reclutamento delle proteine sulla cromatina e l'arricchimento dei marchi istonici che ne regolano il rimodellamento, valuteremo le giuste strategie che vedono la combinazione dell'inibizione di SMYD3 con un altro inibitore DDR. I primi sei mesi di questo anno procederemo dunque all'analisi dello status cromatinico (reclutamento SMYD3 ed altri fattori associati al riparo, arricchimento dei marchi istonici), mediante Chip-Seq, di linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas (HR+/SMYD3 high) sottoposte a doppia inibizione (inibitore SMYD3 + inibitore DDR). Valuteremo dal punto di vista molecolare la risposta al danno indotto dalla doppia inibizione.

Allo scopo di investigare il potenziale della strategia del letale sintetico ottenuta mediante manipolazione di SMYD3 ed altro inibitore DDR, valuteremo gli effetti citotossici dei trattamenti combinati nelle stesse linee cellulari precedentemente analizzate. Inoltre, a partire da queste linee cellulari, genereremo sfere tridimensionali non aderenti, chiamate tumorsfere, che assicurano rilevanze fisiologiche maggiori rispetto alle colture monostrato. Sceglieremo linee cellulari che ci permetteranno di ricapitolare il sottotipo tumorale HR+/SMYD3 high, al fine di valutare l'effetto della strategia terapeutica adottata, che permette di estendere l'approccio del letale sintetico a tumori HR-proficienti.

Dati preliminari:

In un lavoro scientifico pubblicato recentemente è stato dimostrato che terapie mirate all'inibizione della proteina SMYD3 potrebbero estendere gli approcci terapeutici mediante l'utilizzo del meccanismo di "letalità sintetica" in combinazione con gli inibitori di PARP1 per il trattamento farmacologico di tumori solidi, tra cui tumori del tratto gastrointestinale, HR proficienti [20]. Al fine di valutare il potenziale utilizzo della terapia combinata con SMYD3i/PARPi nella pratica clinica, abbiamo condotto un'analisi di integrazione di dati omici, depositati nel TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*), relativi a diversi tipi di tumore (mammella, colon-retto, pancreas) al fine di valutare la percentuale di pazienti che potrebbero usufruire di questo nuovo approccio terapeutico combinato. Nello specifico, dati dei livelli di espressione del gene *SMYD3* sono stati integrati con dati di mutazioni somatiche (mutazioni missenso e troncanti), delezioni genomiche, ed eventi di silenziamento epigenetico coinvolgenti geni strettamente associati a difetti nel processo del riparo del DNA. I tumori con deficit di HR (HRD) sono stati descritti per la prima volta in tessuti portatori di mutazioni germinali dei geni oncosoppressori *BRCA1* e *BRCA2*. Tuttavia, eventi di tipo genetico ed epigenetico possono anche provocare l'inattivazione di altri componenti HR, portando a HRD nei tumori sporadici. Per tutti i campioni tumorali analizzati è stato pertanto valutato lo stato di HRD (*HRD score*) che viene determinato considerando la presenza delle seguenti alterazioni genomiche: perdita di eterozigotità, squilibrio allelico telomerico e stato delle transizioni su larga scala.

La nostra analisi, condotta su 981 casi di tumore della mammella, ha mostrato che il gene *SMYD3* è altamente espresso nel 25% (245/981) dei tumori analizzati e che il 62.4% (153/245) dei tumori della mammella con elevata espressione di *SMYD3* sono HR proficienti. Tale dato suggerisce che il 15% (153/981) dei tumori della mammella possono usufruire della terapia combinata con SMD3i/PARPi (Figure 1A, 1B). È stato inoltre messo in evidenza che i livelli di overespressione di *SMYD3* sono mutualmente esclusivi con alterazioni geniche indicative di una perdita di funzione delle principali proteine coinvolte nel riparo del DNA (*TP53*, *BRCA1*, *NEIL2*, *HERC2*, *ATM*, *RAD51C* e *BRCA2*) (Figura 1C). Questo dato mette in evidenza la rilevanza di potenziali approcci terapeutici che prevedono la combinazione di SMYD3i/PARPi nei tumori HR proficienti e alti livelli di SMYD3.

L'analisi di integrazione dei dati omici eseguita su 459 tumori del colon-retto ha messo in evidenza che il 27% dei tumori analizzati (126/459) mostra livelli di espressione elevata del gene *SMYD3* e che il 41.2% (52/126) dei tumori con alta espressione di *SMYD3* è classificato come HR proficiente (Figure 1D, 1E). Tale analisi ha inoltre evidenziato che circa l'83% dei tumori del colon retto (383/459) mostra una o più alterazioni genetiche associate a perdita di funzione nei principali geni coinvolti nel riparo al DNA, tra cui *MLH1*, *ATM*, *EXO5*, *HERC2* e che alterazioni genetiche coinvolgenti tali geni sono mutualmente esclusive con alti livelli di espressione del gene *SMYD3* (Figura 1F). Questi dati dimostrano che l'11% di tutti i tumori del colon-retto (HR+/SMYD3 high) potrebbe beneficiare dell'approccio terapeutico che prevede la combinazione dell'inibizione di SMYD3 e PARP (Figura 1E). Poiché la terapia con inibitori di PARP è stata approvata per il trattamento di pazienti con mutazioni germinali e somatiche dei geni *BRCA1/2* nei tumori del pancreas, abbiamo utilizzato dati del TCGA per valutare la prevalenza dei pazienti che potrebbero usufruire della terapia combinata con SMYD3i/PARPi. Tale analisi è stata effettuata su 152 tumori del pancreas rilevando che circa il 27% di tutti i tumori analizzati mostra alti livelli di espressione del gene *SMYD3* e che circa il 65% dei tumori del pancreas presenta almeno una mutazione nei geni associati a difetti nel processo di riparo del DNA (Figura 1G). Inoltre è stato messo in evidenza che il 10% dei tumori del pancreas, che presentano alti livelli di espressione di *SMYD3* sono HR proficienti, potrebbe usufruire della terapia combinata con SMYD3i/PARPi. (Figura 1H).

L'analisi delle alterazioni somatiche di SMYD3 (overespressione di SMYD3 e mutazioni geni coinvolti nel meccanismo HR) potrebbe identificare due categorie di tumori: una prima categoria di pazienti che è HR competente con alti livelli di espressione di SMYD3 (HR+/SMYD3 high) e una seconda categoria di pazienti che mostra alterazioni genetiche responsabili dei difetti a carico dei geni HR e alti livelli di espressione di SMYD3 (HR-/SMYD3 high).

L'utilizzo degli inibitori di SMYD3 in associazione a inibitori PARP, apre le strade all'utilizzo di nuovi approcci terapeutici personalizzati con la possibilità di estendere terapie con PARPi/SMYD3i anche in tumori HR proficienti e alti livelli di SMYD3. Questi ultimi rappresentano una percentuale significativa non solo dei tumori alla mammella, ma anche dei tumori del colon-retto (11%) e dei tumori del pancreas (10%), in accordo all'analisi dei dati omici del TCGA.

Metodologie e Analisi statistiche:

Obiettivo 1. I meccanismi di riparo del DNA SMYD3-dipendenti verranno studiati in cellule ingegnerizzate ER-AsiSI-inducibili, un sistema cellulare largamente utilizzato per l'induzione di specifici DSBs attraverso la somministrazione di 4-idrossitamoxifene [33]. Questo agente promuove la localizzazione nucleare dell'endonucleasi ingegnerizzata AsiSI, la quale causa la rapida induzione di circa 150 DSBs su siti specifici lungo tutto il genoma, fornendo l'opportunità di studiare a livello molecolare gli eventi di riparo che avvengono sui molteplici DSBs localizzati in differenti siti cromatinici. Linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas (es. HT29, HCT116, AGS, PANC1) verranno analizzate mediante sequenziamento NGS per una valutazione più approfondita dello stato dei geni coinvolti nei meccanismi di riparo, in particolare quello HR.

Nello specifico, la caratterizzazione molecolare delle linee cellulari tumorali, verrà effettuata mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) al fine identificare alterazioni genomiche coinvolgenti i principali geni coinvolti nell'HR pathway. Nello specifico si procederà con l'estrazione di DNA dalle linee cellulari kit QIAamp DNA Tissue (Qiagen). La quantità e qualità dei campioni di DNA genomico purificato verrà valutata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), del fluorimetro Qubit4.0 (Thermo Fisher Scientific) e della piattaforma TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Successivamente si procederà con la preparazione di librerie di DNA, partendo da campioni di DNA purificati dalle linee cellulari, al fine di generare un pool di amplificazione delle regioni target dei geni coinvolti nell'HR pathway, secondo i protocolli IonAmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) e mediante l'utilizzo dello strumento Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion GeneStudio S5 Sequencer" (Thermo Fisher Scientific). Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific). Verranno successivamente utilizzate pipelines bioinformatiche implementate nei softwares "Torrent Suite" e "Ion Reporter" per la determinazione e l'annotazione di varianti genomiche somatiche (mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni) coinvolgenti i geni HR sequenziati.

Sarà possibile quindi scegliere linee cellulari di ogni distretto in modo da procedere con l'analisi di tumori HR+/SMYD3 high. Cellule "HR-/SMYD3 high", "HR-/SMYD3 low" e "HR+/SMYD3 low" verranno analizzate come controllo. Monitoreremo il reclutamento di SMYD3 e delle proteine appartenenti ai complessi di riparo sui siti DSBs (es. RAD51, BRCA2, 53BP1, ATM, PARP1) mediante ChIP-seq, una metodica che sfrutta il sequenziamento NGS per mappare i punti interazione delle proteine lungo tutto il genoma. Valuteremo, inoltre, l'arricchimento delle modificazioni istoniche associate a SMYD3 (H3K4me2/3, H4K5me, H4K20me) ed altre modifiche associate al riparo del DNA (es. γ H2AX, H3K9me2/3, H3K27me2/3, H3K79me2/3, H3K36me2/3).

Nello specifico le linee cellulari ER-AsiSI verranno processate mediante l'utilizzo del Kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFischer Scientific). In breve, le cellule verranno trattate con formaldeide al fine di stabilizzare i legami cromatinici nativi proteina-DNA. Tali cellule verranno successivamente lisate al fine di estrarre la cromatina nucleare che verrà poi sottoposta a sonicazione per generare frammenti di DNA (~100–300 paia di basi).

Le proteine di interesse legate al DNA verranno catturate utilizzando anticorpi specifici. I campioni verranno poi sottoposti a trattamento termico al fine di indurre la reversione dei "crosslinks" prodotti dalla formaldeide. Successivamente i campioni di DNA associati alle proteine di interesse (CHIP- DNA) verranno sottoposti a preparazione di librerie genomiche secondo i protocolli "Ion ChIP-Seq Library Preparation" (ThermoFischer Scientific). Le librerie di DNA generate verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion GeneStudio S5 Prime" (Thermo Fisher Scientific).

Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific).

L'analisi di copertura delle regioni genomiche sequenziate verrà eseguita mediante il software statistico R e l'utilizzo del pacchetto "rtracklayer R".

L'identificazione dei siti di legame delle proteine al DNA e l'annotazione dei picchi a livello del genoma verranno eseguite mediante l'utilizzo dell'algoritmo MACS.

Il tool bioinformatico "UCSC genome browser" verrà utilizzato per la visualizzazione dei dati

Obiettivo 2. Le linee cellulari di colon, stomaco e pancreas inducibili con il sistema ER-AsiSI, ottenute precedentemente, verranno sottoposte a silenziamento e/o inibizione di SMYD3 e delle altre proteine analizzate (es. BRCA2, RAD51, ATM, PARP1) attraverso ablazione genetica o trattamento con inibitori specifici (es. BCI-121, KU66019, Olaparib). Analizzeremo il reclutamento di SMYD3 e degli altri fattori (es. RAD51, BRCA2, 53BP1, ATM, PARP1) sui siti DSBs e l'arricchimento dei marchi istonici (es. H3K4me2/3, H4K5me, H4K20me, γ H2AX, H3K9me2/3, H3K27me2/3, H3K79me2/3, H3K36me2/3), per ognuna di queste condizioni sperimentali, mediante ChIPseq.

Nello specifico le linee cellulari ER-AsiSI verranno processate mediante l'utilizzo del Kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFischer Scientific). I campioni di DNA associati alle proteine di interesse (CHIP-DNA) verranno sottoposti a preparazione di librerie genomiche secondo i protocolli "Ion ChIP-Seq Library Preparation" (ThermoFisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion GeneStudio S5 Prime" (Thermo Fisher Scientific). Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific).

L'analisi di copertura delle regioni genomiche sequenziate verrà eseguita mediante il software statistico R e l'utilizzo del pacchetto "rtracklayer R".

L'identificazione dei siti di legame delle proteine al DNA e l'annotazione dei picchi a livello del genoma verranno eseguite mediante l'utilizzo dell'algoritmo MACS.

Il tool bioinformatico "UCSC genome browser" verrà utilizzato per la visualizzazione dei dati.

Obiettivo 3. Linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas, che presentano un profilo HR+/SMYD3high, verranno testate per trattamento combinato di inibitori di SMYD3 ed inibitori DDR (es. KU66019, Olaparib). Per quanto riguarda SMYD3, utilizzeremo sia composti precedentemente utilizzati da noi ed in commercio (es. BCI-121), sia nuove molecole, sintetizzate da nostri collaboratori esterni, al fine di identificare nuovi composti in grado di legare SMYD3 in maniera covalente ed irreversibile, manifestando quindi una potenza maggiore ed effetti di più lunga durata. Analizzeremo il profilo cromatinico (reclutamento di SMYD3 ed altri fattori del riparo, arricchimento marchi istonici precedentemente analizzati) per ogni tipologia di trattamento combinato, mediante ChIP-seq utilizzando il Kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFischer Scientific). I campioni di DNA associati alle proteine di interesse (CHIP-DNA) verranno sottoposti a preparazione di librerie genomiche secondo i protocolli "Ion ChIP-Seq Library Preparation" (ThermoFisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion GeneStudio S5 Prime" (Thermo Fisher Scientific).

Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific).

L'analisi di copertura delle regioni genomiche sequenziate verrà eseguita mediante il software statistico R e l'utilizzo del pacchetto "rtracklayer R".

L'identificazione dei siti di legame delle proteine al DNA e l'annotazione dei picchi a livello del genoma verranno eseguite mediante l'utilizzo dell'algoritmo MACS.

Il tool bioinformatico "UCSC genome browser" verrà utilizzato per la visualizzazione dei dati.

Allo scopo di valutare l'efficienza dell'uso combinato di questi inibitori, testeremo l'effetto citotossico sulle stesse linee cellulari, precedentemente analizzate per ChIP-seq, mediante saggi di vitalità/morte cellulare. Successivamente, genereremo tumorsfere partendo dalle stesse linee cellulari e condurremo saggi di migrazione, invasione, saggi per osservare la capacità delle tumorsfere di formare colonie, saggi per valutare la risposta apoptotica, e la sopravvivenza cellulare (ad es. clivaggio delle caspasi, Annessina V, analisi di microscopia ed analisi biochimiche).

Risultati attesi:

Il piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella regolazione dello stato epigenetico e del rimodellamento della cromatina in relazione ai processi di riparo del DNA nei tumori del tratto GI. Mediante l'utilizzo di tecnologie ad alta processività per il sequenziamento genomico (NGS) sarà possibile costruire una mappatura epigenetica e caratterizzare dal punto di vista molecolare le modificazioni epigenetiche a carico della cromatina mediate dal reclutamento di SMYD3 in associazione con le principali proteine coinvolte nei meccanismi di riparo del DNA.

Tale caratterizzazione molecolare ci permetterà di individuare nuove strategie terapeutiche basate sull'inibizione di SMYD3 in combinazione all'utilizzo di inibitori DDR al fine di estendere l'approccio del letale sintetico ai tumori del tratto GI.

Innovazioni:

Grazie al piano sperimentale presentato, ci aspettiamo di decifrare il pattern epigenetico mediato da SMYD3 in associazione con le principali proteine coinvolte nel riparo del DNA.

Una piena comprensione del significato funzionale delle attività mediate da SMYD3 e dalle principali proteine coinvolte nel riparo del DNA può essere utile per elaborare strategie terapeutiche mirate. In particolare, nuovi approcci terapeutici per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3, basati sull'uso di inibitori di SMYD3, può aiutare a valutare nuove strategie terapeutiche basate sull'approccio del letale sintetico, che prevede la combinata inibizione di SMYD3 e di fattori coinvolti nei meccanismi di riparo, nei tumori del tratto GI.

Bibliografia:

1. Allis, C. D. & Jenuwein, T. *Nat. Rev. Genet.* 2016; 17:487–500.
2. Misteli T, Finn EH. *Nat Genet.* 2021;53(4):426-427.
3. Pfister SX, Ashworth A. *Nat Rev Drug Discov.* 2017; 16(4):241-263.
4. Kouzarides T. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(2):198–209.
5. Wang H, et al. *Mol Cell.* 2001;8(6):1207–17.
6. Santos-Rosa H, et al. *Nature.* 2002;419(6905):407–11.
7. Tracy C, et al. *Curr Opin Physiol.* 2018;1:140–52.
8. <http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5883840>
9. Cock-Rada AM, et al. 2012;72:810–20.
10. Luo XG, et al. *Cancer Letters.* 2014;344:129–37
11. Peserico A, et al. *J Cell Physiol.* 2015. 230(10):2447-2460.
12. Kim H, et al. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284:19867–77.
13. Yoshioka Y, et al. *Oncotarget* 2016; 7:75023-75037.
14. Kunizaki M, et al. *Cancer Research.* 2007;67:10759–65.
15. Yoshioka Y, et al. *Cancer Medicine.* 2017;6:1665–72.
16. Brown MA, et al. *Oncotarget.* 2015;6:4005–19.
17. Tsai CH, et al. *Cancer Research.* 2016;76:6043–53.
18. Mazur PK, et al. *Nature.* 2014;510:283–7.
19. Thomenius MJ, et al. *PLoS ONE.* 2018; 13(6):e0197372.
20. Sanese P, et al. *iScience.* 2020; 23,101604.
21. Caron, P., et al., *Cell Rep.* 2015; 13:1598–1609.
22. Iacovoni, J.S., et al. *EMBO J.* 2010; 29: 1446–1457.
23. Clouaire T. et al. *Mol Cell.* 2018;72(2):250-262.e6.
24. Wei et al. *Journal of Cancer* 2018; 9 (12): 2072-2081

Progetto 05/2021: “Marcatori sierici e fecali dello stato di salute della barriera intestinale in pazienti con disturbi glutine correlati: Uno studio clinico e pre-clinico.”

Responsabile: dott.ssa Antonella Orlando

Partecipanti: Francesco Russo, Giuseppe Riezzo, Michele Linsalata, Benedetta D’Attoma, Manuela Martulli, Guglielmina Alessandra Chimienti, Antonio Pisani

Introduzione

Il complesso di proteine del glutine contenute in grano, segale e orzo è responsabile di un gruppo di patologie umane definite come “disturbi glutine-correlati” che comprendono la celiachia, l’allergia al grano e la sensibilità al glutine non-celiaca (NCGS) [1].

La celiachia è una patologia infiammatoria del piccolo intestino, caratterizzata da atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrazione a livello della lamina propria di cellule immunitarie quali neutrofili e linfociti [2]. Si ipotizza che in seguito all’ingestione del glutine, i peptidi non digeriti di gliadina inducano il rilascio di zonulina portando ad un aumento della permeabilità intestinale [3]. L’alterazione della barriera permette la traslocazione dei peptidi gliadinici verso la lamina propria e la successiva interazione con i macrofagi e le altre cellule del sistema immunitario. I peptidi gliadinici inducono la secrezione di IL-8 e IL-15 da parte degli enterociti, con il conseguente richiamo di neutrofili [4] e linfociti intraepiteliali [5]. L’interazione delle cellule T con le cellule presentanti il peptide gliadinico determina, infine, la perdita della tolleranza al glutine e l’attivazione della risposta immune adattativa Th1/Th17.

La catena di eventi ipotizzata implica che l’interazione tra l’ospite e il trigger sia necessaria e sufficiente, suggerendo che l’insorgenza della celiachia avvenga durante l’infanzia, cioè al momento della prima introduzione di cibi contenenti glutine. I dati epidemiologici, però, suggeriscono che la celiachia può svilupparsi a qualsiasi età, anche diversi anni dopo l’introduzione del glutine nella dieta [6]. Di conseguenza, altri fattori devono giocare un ruolo nello stabilire “se e quando” un individuo geneticamente predisposto alla celiachia perde la tolleranza al glutine. Nuove evidenze suggeriscono come anche il microbiota del tratto gastrointestinale possa giocare un ruolo nella patogenesi della celiachia [7] [8].

La NCGS rappresenta una condizione clinica definita dall’insorgenza di sintomi gastrointestinali ed extra-intestinali in risposta all’ingestione di alimenti contenenti glutine, in assenza però di alcun marcatore sierologico o di caratteristiche istologiche tipiche della malattia celiaca [9]. Infatti, gli anticorpi anti-transglutaminasi e le IgA anti-endomisio risultano costantemente negativi, anche se, nel 50% dei pazienti è stata riportata la presenza di IgG anti-gliadina [10].

La NCGS viene spesso considerata simile alla sindrome da colon irritabile (IBS), data l’apparente natura funzionale di entrambe le sindromi e l’evidente sovrapposizione dei sintomi [11]. E’ stato osservato che entrambe le tipologie di pazienti migliorano dopo la riduzione degli alimenti contenenti FODMAPs (Frutto oligosaccaridi, disaccaridi, monosaccaridi e polioli) [12], e che i pazienti IBS, specialmente il sottotipo IBS-D (con alvo prevalentemente diarroico), traggono dei benefici da una dieta priva di glutine [13]. Recenti evidenze circa l’efficacia di una dieta low-FODMAPs in questo sottogruppo di pazienti suggeriscono l’ipotesi che alcune componenti del grano, piuttosto che il glutine, possano essere responsabili dell’insorgenza dei sintomi [14]. Infatti, gli oligosaccaridi come i fruttani, contenuti nel grano e negli alimenti correlati, si sono dimostrati in grado di esercitare un effetto osmotico nel lume intestinale e di aumentare la produzione di gas in seguito alla fermentazione batterica [15].

La diagnosi di NCGS resta quindi principalmente una diagnosi di esclusione. Attualmente non esistono biomarcatori per la NCGS, anche se ricerche recenti puntano verso una base biologica, rilevando uno stato di attivazione immunologica sistemica accompagnato da una compromissione dell’epitelio intestinale [16]. E’ stato dimostrato nei soggetti NCGS un aumento significativo degli anticorpi IgG nei confronti del glutine, paragonabile a quello osservato nei pazienti celiaci [16]. Tale aumento potrebbe rappresentare un link comune tra malattia celiaca e NCGS. Uno studio recente ha dimostrato una differenza significativa nella distribuzione delle sottoclassi di anticorpi IgG anti-gliadina e una loro possibile correlazione con il danno cellulare intestinale [17].

La mancanza di un modello animale di celiachia ha sicuramente limitato nel tempo la ricerca scientifica: i dati ottenuti sono derivati da studi sperimentali in vitro su biopsie o su linee cellulari immortalizzate.

Attualmente, grazie al recente sviluppo di nuove tecnologie, quale il sistema di coltura tridimensionale degli organoidi, è possibile generare organoidi da intestino umano che diventano, quindi, uno strumento importante per la creazione di un modello in vitro derivato direttamente da paziente [18] [19].

Un organoide è definito come un organo in miniatura cresciuto in vitro [20]. Può essere prodotto a partire dalle cellule staminali multipotenti adulte o dalle cellule pluripotenti indotte, coltivate in un sostituto stromale quale il Matrigel.

Mentre le prime si differenziano esclusivamente nell'epitelio intestinale, le seconde, derivate da cellule staminali embrionali, sono in grado di differenziarsi in un ampio spettro di cellule [21]. Di conseguenza, quando si fa riferimento agli organoidi intestinali, il tessuto da cui originano definisce la struttura e le caratteristiche dell'organoide risultante, che avrà una struttura tridimensionale di cellule epiteliali. La struttura di queste cellule rispecchia perfettamente la loro organizzazione in vivo, quando è supplementata da un cocktail di fattori di crescita e piccole molecole, necessari per ricreare le condizioni ideali per la crescita delle cellule a lungo termine. La possibilità di creare questa struttura consente ai ricercatori di disporre così di un modello ex vivo di tessuto intestinale. Inoltre, la proprietà di auto-rinnovarsi degli organoidi intestinali permette la propagazione indefinita e l'espansione usando le tecniche standard di colture cellulari.

Stato di Avanzamento:

Il primo anno di attività è stato dedicato alla raccolta di campioni bioptici di tessuto della seconda porzione del duodeno prelevati da pazienti afferenti al Servizio di Endoscopia Digestiva. Tali biopsie sono state utilizzate per la messa a punto della metodica di coltura degli organoidi.

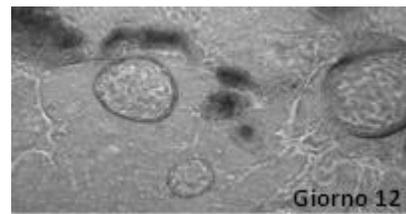
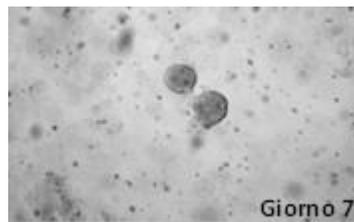
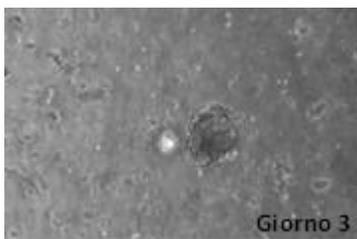
Nel dettaglio:

Da ogni paziente si prelevano 3 biopsie duodenali che vengono poste immediatamente in 5 ml di Basal Medium freddo (Advanced DMEM/F12, Hepes 15 mM, Glutamax 2 mM, Penicillin/Streptomycin 100 U/ml) e poi lavate per 2 volte nel suddetto medium. Dopo averle tagliate in piccoli pezzi si procede con la digestione enzimatica in 1 ml di Basal Medium + Collagenase 2 mg/ml a 37°C. Si pipetta ogni 5' e si effettua ogni volta un controllo al microscopio. All'incirca dopo 20'-25', avvenuta la digestione, si filtra il tutto con un filtro da 100 µm e successivamente si riempie il filtro con 10 ml di Basal Medium. Si procede quindi con la centrifugazione a 200×g per 5' e si raccoglie il pellet risospingendolo in 1 ml di Basal Medium. Si trasferisce il tutto in un eppendorf da 2 ml e si centrifuga a 2000×g per 5'. Si scarta il sovrantante e si risospinge il pellet in 120 µl di Matrigel. In ogni pozzetto di una multiwell da 24 si posizionano aliquote di 30 µl di pellet in Matrigel e si mette la multiwell nell'incubatore per 10' in modo tale da far solidificare il Matrigel. Dopo, in ogni pozzetto, si aggiungono 300 µl di Cell Culture Medium arricchito di supplementi: Basal medium, Wnt 3A 100ng/ml, Noggin 100 ng/ml, R-spondin 1 µg/ml, FBS 15%, N-acetyl cysteine 1mM, N2 1×, B27 1×, EGF 50 ng/ml, Nicotinamide 10 mM, SB202190 10 µM, Y-27632 10 µM, Gastrin 10 nM, A-8301 500 nM. Si cambia il medium ogni 2 o 3 giorni.

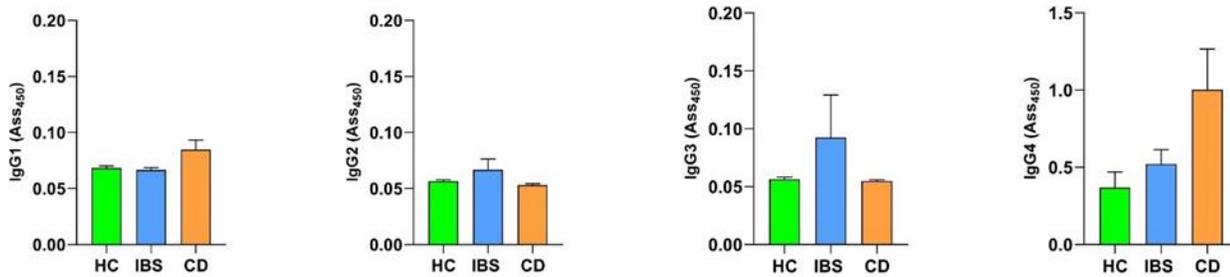
Per il differenziamento intestinale, si sostituisce il Cell Culture Medium con 300 µl di Basal Medium contenente FBS 15%, Wnt 3A 100ng/ml, Noggin 100 ng/ml, R-spondin 1 µg/ml, Y-27632 10 µM, TGF-β secretase inhibitor 5 µM.

Gli organoidi si lasciano in coltura per altri 2 giorni e quindi si procede con lo splittaggio: si lavano gli organoidi con PBS freddo e si pipetta diverse volte con 500 µl di PBS freddo. Si trasferiscono gli organoidi in una provetta, si aggiungono 10 ml di PBS e si centrifuga a 200×g per 5'. Si risospinge il pellet in Matrigel come descritto sopra e si piastra.

Di seguito sono mostrate le immagini delle colture di organoidi duodenali ottenuti a differenti giorni di coltura:



Inoltre, considerato il fatto che non esistono biomarcatori per la NCGS e che Uhde et al. (Gastroenterology 2020; 159:1965-67) hanno dimostrato nei soggetti NCGS un aumento significativo degli anticorpi IgG nei confronti del glutine, seguendo tale studio, è stata messa a punto la metodica immunoenzimatica per il dosaggio sierico delle diverse sottoclassi di anticorpi IgG diretti verso la gliadina, al fine di dimostrare una differente distribuzione delle diverse sottoclassi degli anticorpi suddetti. A tale scopo, utilizzando preliminarmente dei campioni di siero disponibili provenienti da n°19 soggetti controllo (HC), n° 53 pazienti con sindrome del colon irritabile (IBS) e n° 12 pazienti celiaci (CD), è stata testata la nuova metodica. Come mostrato nel grafico, i pazienti IBS mostravano un aumento delle IgG3 e delle IgG4, mentre nei pazienti celiaci si riscontrava un aumento delle IgG1 e delle IgG4. Data l'esigua numerosità del campione non è stato possibile rilevare alcuna significatività statistica.



In conclusione, il primo anno di attività è stato principalmente dedicato al reclutamento dei pazienti al fine della messa a punto dei protocolli sperimentali. Il materiale raccolto e l'elaborazione dei dati ottenuti saranno propedeutici alla redazione di articoli per riviste scientifiche da inviare nelle prossime fasi dell'attività progettuale.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Valutare una serie di marcatori, sierici e fecali, indicatori dello stato di salute della barriera e del microbiota intestinale nonché di eventuali disordini su base immunitaria in pazienti con disturbi glutine correlati (in special modo celiachia e NCGS).

Obiettivo specifico 2: Applicare una tecnologia basata sull'uso di organoidi derivati da campioni di tessuto duodenale di pazienti affetti da disturbi glutine correlati al fine di investigare le alterazioni epiteliali e la risposta infiammatoria in seguito ad esposizione di gliadina insieme o meno a già proposti fattori protettivi di derivazione batterica quali butirrato e lattato.

Obiettivo 1:

La prima fase del progetto prevede il reclutamento di pazienti afferenti al Servizio di Endoscopia dell'IRCCS "S. de Bellis" con sospetto clinico di disturbo glutine-correlato da indagare mediante EGDS. Durante l'esame verranno prelevati n. 3 campioni biotici di tessuto proveniente dalla seconda porzione del duodeno necessari alla realizzazione della coltura di organoidi. Sarà eseguito anche un prelievo ematico destinato al dosaggio delle diverse sottoclassi di IgG anti-gliadina, dei principali peptidi di barriera, e per l'analisi dei miRNA circolanti. Su un campione di feci verrà effettuata l'analisi del microbiota intestinale.

Obiettivo 2:

La seconda fase del progetto prevede l'utilizzo della coltura di organoidi derivati da campioni di tessuto duodenale di pazienti celiaci e con NCGS al fine di investigare le diverse alterazioni cui l'epitelio intestinale è soggetto (con particolare riferimento alla permeabilità intestinale e al profilo infiammatorio), nonché saggiare le potenzialità terapeutiche di particolari sostanze di derivazione batterica nella gestione di tale patologia.

Le colture di organoidi saranno trattate con un digerito gliadino, previo o meno trattamento con butirrato o lattato. Si procederà quindi alla valutazione della permeabilità intestinale attraverso l'uso di un tracciante fluorescente, il rilascio di zonulina e l'espressione genica di alcune proteine delle giunzioni intercellulari. Sarà anche valutato il profilo infiammatorio attraverso il dosaggio nel medium di coltura delle principali citochine pro-infiammatorie.

Dati preliminari:

Ad oggi, la tecnologia degli organoidi non è stata applicata allo studio della NCGS. Gli organoidi duodenali sono stati utilizzati prevalentemente negli studi sulla malattia celiaca. Recentemente Fasano e coll. [22] hanno investigato come l'epitelio intestinale possa contribuire alla patogenesi della celiachia, confrontando l'espressione genica globale negli organoidi derivati da pazienti celiaci e da soggetti sani, al fine di identificare differenze rilevanti per l'enteropatia.

Metodologie e analisi statistiche:

1. STUDIO CLINICO

Reclutamento pazienti: Saranno reclutati n.15 pazienti afferenti al Servizio di Endoscopia dell'IRCCS "S. de Bellis", con sospetto clinico di disturbo glutine-correlato da indagare mediante EGDS. Durante l'esame verranno prelevati n. 3 campioni biotici di tessuto proveniente dalla seconda porzione del duodeno necessari alla realizzazione della coltura di organoidi.

Dosaggio delle IgG anti-gliadina: Il dosaggio su siero delle diverse sottoclassi di anticorpi anti-gliadina IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 sarà effettuato utilizzando la metodica immunoenzimatica descritta da Uhde e coll. [17].

Dosaggio peptidi di barriera: Il dosaggio su siero di I-FABP e DAO sarà effettuato utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio. La zonulina sarà valutata sia su siero che su feci mediante appropriate metodiche ELISA.

Analisi del Microbiota Intestinale: La valutazione su campione di feci della popolazione microbica intestinale sarà effettuata mediante appropriate indagini genetiche e molecolari (Illumina/Solexa Genetic Analyzer HiSeq).

Analisi dei miRNA: L'RNA totale sarà estratto dalle biopsie e dai leucociti usando il miRNeasy Kit (Qiagen, Germany). L'analisi dell'espressione dei miRNA sarà effettuata secondo quanto descritto da Clemente e coll. [23].

2. STUDIO PRE-CLINICO

Coltura di organoidi: La coltura di organoidi sarà realizzata a partire da biopsie duodenali ottenute da pazienti celiaci e con NCGS. I campioni biotici saranno processati seguendo la metodica di Dieterich e coll. [24]. Una volta ottenuto l'organoide, quest'ultimo verrà sottoposto a trattamento per 4h con un digerito gliadinico (PTG 1 mg/ml) previo o meno trattamento per 48h con butirrato (1 µg/ml) e lattato (1.5 µg/ml).

Determinazione della permeabilità paracellulare: Il trasporto della fluoresceina isotiocianato destrano (FD4, massa molecolare di 4000 kDa) attraverso il monostrato di cellule rappresenta un indicatore del trasporto paracellulare. Una soluzione di FD4 viene aggiunta al monostrato cellulare derivato dall'organoide nel compartimento apicale e l'intensità di fluorescenza dell'FD4 viene misurata dopo 24h nel compartimento basolaterale utilizzando un lettore di piastra a fluorescenza ad una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente pari a 485 nm e 535 nm.

Rilascio di zonulina: Il contenuto in zonulina del medium di coltura cellulare è misurato ad intervalli di tempo crescenti (da 30' a 24h) attraverso metodiche ELISA disponibili in commercio.

Immunofluorescenza: Le cellule sono fissate in paraformaldeide 4% a 37°C per 40 minuti. Vengono poi lavate con la Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) e permeabilizzate con Triton X-100 0.1% a temperatura ambiente per 40 minuti. Quindi vengono incubate nel blocking buffer contenente albumina di siero bovino (BSA) 3% in PBS, pH 7.4, a 37°C per due ore, e lavate con HBSS. Successivamente le cellule vengono incubate a 4°C overnight con gli anticorpi primari. Il mattino seguente si effettua un lavaggio con HBSS e si aggiungono gli anticorpi secondari coniugati con Alexa-488. Dopo un ulteriore lavaggio con HBSS, le cellule sono colorate per 5 minuti con diamidino-2-fenilindolo (DAPI) e osservate al microscopio confocale.

Profilo infiammatorio: Il contenuto in IL-6, IL-8, IL-15, TNF- α , IFN- γ è misurato nel medium di coltura attraverso metodiche ELISA disponibili in commercio.

Analisi dell'espressione genica: Gli organoidi sono lavati con PBS e incubati con 500 µl di cell recovery solution (Corning, Germany) a 4°C per 30'. Vengono diluiti con 10 ml di PBS e centrifugati a 200xg.

L'estrazione di RNA è effettuata tramite l'RNeasy Kit (Qiagen, Germany). La concentrazione e il grado di purezza dell'RNA estratto sono determinati tramite spettrofotometro (Nanodrop 2000, ThermoScientific, Germany). Due µg di RNA totale vengono usati per la sintesi del cDNA. La trascrizione inversa (RT) è effettuata in 20 µl di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). La real-time PCR viene effettuata in 25 µl di volume finale contenente 2 µl di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisense di ogni gene. Il gene della β -actina è utilizzato come controllo interno e come gene di riferimento in quanto housekeeping. La Real-time PCR viene effettuata in un CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Milano, Italia) usando il seguente protocollo: 45 cicli a 95°C per 3', 95°C per 10s, 55°C per 30s seguiti da un melting curve step a 65-95°C con una velocità di riscaldamento di 0.5°C per ciclo per 80 cicli. I prodotti della PCR sono quantizzati con curve di calibrazione esterne, una per ogni gene testato, ottenute con diluizioni seriali di un numero noto di molecole (10^2 - 10^7 molecole). Tutti i dati sono poi normalizzati, dividendo la quantità target per la quantità di β -actina usata come controllo interno per ciascun campione. La specificità del prodotto della PCR è confermata da una gel elettroforesi.

Per quanto riguarda l'analisi di Western Blot, la lisi cellulare è effettuata in RIPA buffer (Pierce Ripa buffer, ThermoScientific, Rockford, IL, USA), seguita da una centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C. La concentrazione delle proteine viene

misurata tramite dosaggio Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia). Aliquote di 50 µg di proteine totali sono separate in un 4-12% pre-cast gel di poliacrilammide (Invitrogen, Life Technologies, OR, USA) e trasferite su una membrana PVDF (Bio-Rad, Milano, Italia) mediante Transblot Turbo (Bio-Rad, Milano, Italia). L'espressione di tutte le proteine da testare viene valutata con anticorpi specifici. Dopo un'incubazione overnight, le membrane sono poi incubate con lo specifico anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. Le proteine sono rilevate mediante chemiluminescenza (ECL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA) e l'analisi densitometrica di ogni proteina viene effettuata usando il Molecular Imager Chemidoc (Bio-Rad, Milano, Italia) e normalizzata vs il contenuto di β-actina.

Analisi statistica:

Data la probabile distribuzione non normale dei dati, saranno usati tests non-parametrici. La significatività delle differenze tra i gruppi sarà determinata applicando l'analisi della varianza di Kruskal Wallis. Le differenze saranno considerate significative con la $P < 0.05$. Sarà impiegato uno specifico software statistico (SigmaStat for Windows version 3.00 SPSS Inc. San Jose, CA, USA).

Risultati attesi:

- Identificazione di possibili marcatori per la diagnosi di NCGS.
- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari alla base dei disturbi glutine-correlati.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

Innovazioni:

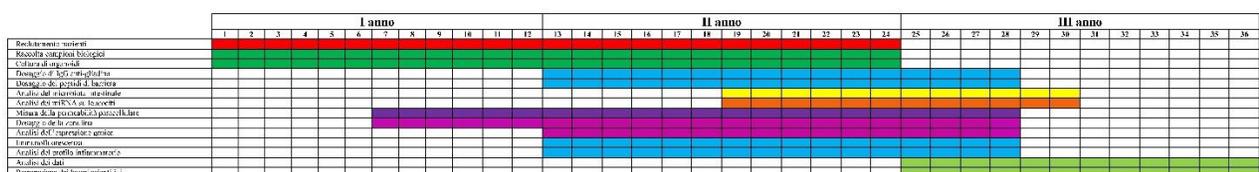
- Identificazione di possibili marcatori per la diagnosi di NCGS.
- Impiego della tecnologia degli organoidi per lo studio dei disturbi glutine-correlati. Gli organoidi potrebbero rappresentare un'alternativa alla ricerca animale: sono infatti generati da cellule umane e perciò mostrano un metabolismo e un turnover cellulare di tipo umano. Lo sviluppo di questa nuova tecnologia cellulare 3D permetterebbe quindi di ridurre al minimo il ricorso alla sperimentazione animale nella ricerca biomedica. Inoltre, la possibilità di stabilire linee di organoidi da pazienti, permetterà di dimostrare l'eterogeneità intra e inter-paziente.

Bibliografia:

1. Balakireva AV, Zamyatnin AA. *Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities*. *Nutrients* 2016; 8(10):644. doi: 10.3390/nu8100644.
2. Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. *Coeliac disease: an update for pathologists*. *J Clin Pathol* 2006; 59(10):1008-16. doi: 10.1136/jcp.2005.035345.
3. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. *Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity*. *Nutrients* 2015; 7(3):1565-76. doi: 10.3390/nu7031565.
4. Lammers KM, Khandelwal S, Chaudhry F, Kryszak D, Puppa EL, Casolaro V, Fasano A. *Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with coeliac disease*. *Immunology* 2011; 132(3):432-40. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03378.x.
5. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. *Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease*. *Gut*. 2006; 55(4):469-77. doi: 10.1136/gut.2005.068684.
6. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppa E, Sferruzza A, Fasano A. *Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974*. *Ann Med* 2010; 42(7):530-8. doi: 10.3109/07853890.2010.514285.
7. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease*. *J Clin Pathol* 2009; 62(3):264-9. doi: 10.1136/jcp.2008.061366.

8. Cukrowska B, Sowińska A, Bierała JB, Czarnowska E, Rybak A, Grzybowska-Chlebowczyk U. *Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease*. World J Gastroenterol 2017; 23(42):7505-7518. doi: 10.3748/wjg.v23.i42.7505.
9. Pinto-Sanchez MI, Verdu EF. *Non-celiac gluten or wheat sensitivity: It's complicated!* Neurogastroenterol Motil 2018; 30(8):e13392. doi: 10.1111/nmo.13392.
10. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, Fiorini E, Caio G. *Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance)*. J Clin Gastroenterol 2012; 46(8):680-5. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182372541.
11. Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. *Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity*. Am J Gastroenterol 2009; 104(6):1587-94. doi: 10.1038/ajg.2009.188.
12. Shepherd SJ, Halmos E, Glance S. *The role of FODMAPs in irritable bowel syndrome*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2014; 17(6):605-9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000116.
13. Vazquez-Roque MI, Camilleri M, Smyrk T, Murray JA, Marietta E, O'Neill J, Carlson P, Lamsam J, Janzow D, Eckert D, Burton D, Zinsmeister AR. *A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: effects on bowel frequency and intestinal function*. Gastroenterology 2013;144(5):903-911.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.049.
14. Gibson PR, Shepherd SJ. *Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach*. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25(2):252-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06149.x.
15. Gibson PR, Shepherd SJ. *Food choice as a key management strategy for functional gastrointestinal symptoms*. Am J Gastroenterol 2012; 107(5):657-66; quiz 667. doi: 10.1038/ajg.2012.49.
16. Caio G, Volta U, Tovoli F, De Giorgio R. *Effect of gluten free diet on immune response to gliadin in patients with non-celiac gluten sensitivity*. BMC Gastroenterol 2014; 14:26. doi: 10.1186/1471-230X-14-26.
17. Uhde M, Caio G, De Giorgio R, Green PH, Volta U, Alaedini A. *Subclass Profile of IgG Antibody Response to Gluten Differentiates Nonceliac Gluten Sensitivity From Celiac Disease*. Gastroenterology 2020; S0016-5085(20)34992-1. doi: 10.1053/j.gastro.2020.07.032.
18. Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E. *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells*. Nat Med 2011; 17(10):1225-7. doi: 10.1038/nm.2470.
19. Senger S, Ingano L, Freire R, Anselmo A, Zhu W, Sadreyev R, Walker WA, Fasano A. *Human Fetal-Derived Enterospheres Provide Insights on Intestinal Development and a Novel Model to Study Necrotizing Enterocolitis (NEC)*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2018; 5(4):549-568. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.01.014.
20. Wallach TE, Bayrer JR. *Intestinal Organoids: New Frontiers in the Study of Intestinal Disease and Physiology*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2017; 64(2):180-185. doi: 10.1097/MPG.0000000000001411.
21. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature 2007; 448(7151):313-7. doi: 10.1038/nature05934.
22. Freire R, Ingano L, Serena G, Cetinbas M, Anselmo A, Sapone A, Sadreyev RI, Fasano A, Senger S. *Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease*. Sci Rep 2019; 9(1):7029. doi: 10.1038/s41598-019-43426-w.
23. Clemente E, Efthymakis K, Carletti E, Capone V, Sperduti S, Bologna G, Marchisio M, Di Nicola M, Neri M, Salles M. *An explorative study identifies miRNA signatures for the diagnosis of non-celiac wheat sensitivity*. PLoS One. 2019 Dec 13;14(12):e0226478. doi: 10.1371/journal.pone.0226478.
24. Dieterich W, Neurath MF, Zopf Y. *Intestinal ex vivo organoid culture reveals altered programmed crypt stem cells in patients with celiac disease*. Sci Rep; 10(1):3535. doi: 10.1038/s41598-020-60521-5.

Timeline (Gantt chart)



Progetto 06/2021: “Nuove formulazioni liposomali per il targeting simultaneo del pathway di NOTCH in epatocarcinoma e dell’inflammasoma NLRP3 in macrofagi associati a tumore”

Responsabile: dott. Francesco Dituri

**Partecipanti: Roberto Negro, Maria Principia Scavo, Serena Mancarella, Isabella Gigante, Rosanna Scialpi, Valentina Arrè
Federica Rizzi**

Introduzione

I tumori epatici figurano come la seconda causa di morte correlata al cancro a livello globale. Circa il 90% di queste neoplasie è rappresentato dal carcinoma epatocellulare (HCC). L’HCC si sviluppa generalmente come conseguenza di una patologia cronica infiammatoria/cirrotica a carico del fegato, a sua volta scatenata da agenti eziologici di natura virale (HBV, HCV, HDV), alterazioni dello stesso organo legate a malattie metaboliche (come NASH o NAFLD), ingestione di alimenti contenenti l’aflatossina B1, o eccessivo consumo di alcool. L’HCC mostra modesta responsività agli agenti chemoterapici comunemente in uso nel trattamento di altri tumori solidi. L’approccio chirurgico (mediante resezione, termoablazione o chemoembolizzazione) costituisce in effetti l’opzione terapeutica di maggior impatto sul tasso di sopravvivenza complessiva dei pazienti con HCC. Le ragioni dello scarso effetto curativo dei farmaci disponibili dipendono almeno in parte dall’elevata complessità biologica a livello cellulare e molecolare dell’HCC. Il microambiente tumorale ha un ruolo notevole nell’accrescere la malignità e l’eterogeneità intra-tumorale (nello stesso paziente) e inter-tumorale (tra pazienti diversi). Tale componente include molteplici tipi cellulari, come le cellule stromali (fibroblasti), endoteliali vascolari e immunitarie (come diverse sottoclassi linfocitarie e macrofagi), e le molecole della matrice extracellulare (come collagene, fibronectina, laminine ecc.) e si sviluppa in concomitanza con l’instaurarsi delle condizioni pre-neoplastiche associate all’epatopatia cronica, ossia l’infiammazione e la degenerazione fibrotico/cirrotico. Le cellule del microambiente interagiscono mutuamente ed in modo complesso con le cellule tumorali, sia per interazione diretta, che tramite secrezione di molecole solubili (fattori di crescita, citochine, chemochine ecc.), macro, microvescicole e nanovescicole (esosomi), o della matrice. L’architettura del tipico microambiente tumorale è composta da fibroblasti associati al cancro (CAF), cellule endoteliali, periciti, cellule adipose, cellule del sistema immunitario tra cui i macrofagi associati al tumore (TAM) ed elementi della matrice extracellulare (ECM). Queste interazioni sono mediate e si evolvono costantemente attraverso la segnalazione paracrina e juxtacrina utilizzata da molti pathway. Tra questi, vi è la segnalazione di Notch che ha un ruolo importante nella regolazione del *crosstalk* tra cellule tumorali e i componenti del microambiente indotta dal contatto cellula-cellula, tra una cellula che invia ed una che riceve il segnale. I segnali scambiati tra le cellule attraverso queste interazioni determinano così i destini delle cellule stesse, mentre la disfunzione della via di segnalazione di Notch interessa diversi aspetti della biologia del tumore, come l’angiogenesi, il mantenimento delle cellule staminali del cancro, l’infiltrato immunitario o la resistenza alla terapia.

Molti studi che attribuiscono a Notch un ruolo di promotore del, hanno evidenziato che i recettori della famiglia Notch sono sovraespressi in campioni di HCC umano e hanno mostrato che esiste, almeno in parte, un’associazione tra la loro espressione e la prognosi infausta.

Nel contesto del microambiente tumorale, che costituisce un substrato implicato nel mantenimento dell’infiammazione cronica, che è a sua volta il principale fattore trainante per lo sviluppo di HCC, l’elevata densità di macrofagi associati al tumore (TAM) è proporzionale alla grandezza del tumore, stadio TNM avanzato, metastasi intraepatica, recidiva della malattia e scarsa in generale sopravvivenza nei pazienti con HCC.

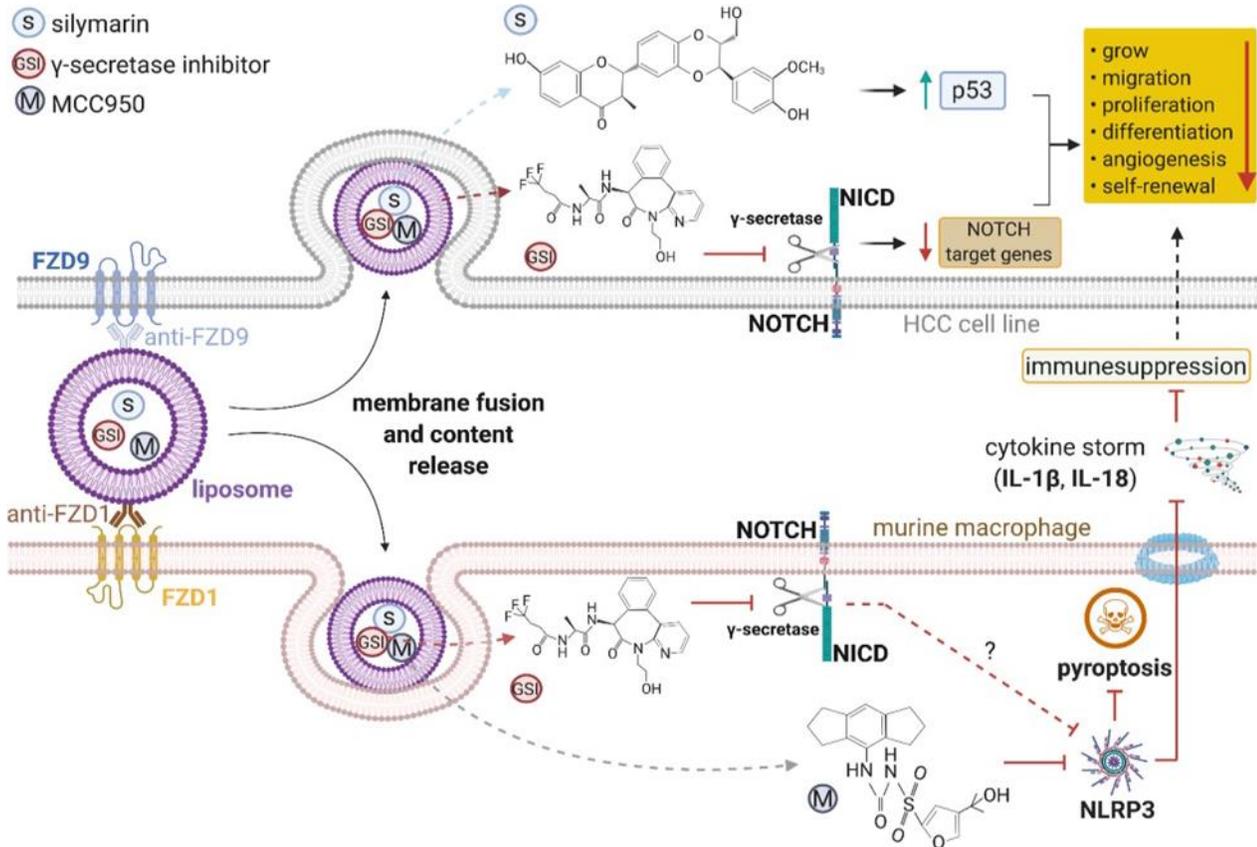
Nel 2010, Akira e colleghi hanno dimostrato che uno step fondamentale per attivare qualsivoglia risposta infiammatoria, da parte del sistema immunitario innato, è rappresentato dal riconoscimento di molecole prodotte e secrete dai microorganismi da parte di recettori presenti sulle cellule appartenenti al sistema stesso. Un pathway fondamentale in questo contesto è rappresentato dall’inflammasoma, descritto per la prima volta nel 2002, e che, soprattutto nell’ultimo decennio, sta emergendo essere il mediatore principale dell’interazione tra organismo ospite e patogeno. L’inflammasoma è un complesso multi-proteico che si assembla in risposta ad un ampio spettro di patogeni culminando con l’attivazione di proteine, quali caspasi-1 e gasdermina D, che garantiscono rispettivamente la maturazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, interleuchina (IL) IL-1 β e IL-18, in circolo da un lato e la morte cellulare dall’altro, in un processo chiamato piroptosi, il quale contribuisce alla propagazione dell’infiammazione stessa. Tuttavia, un’attivazione incontrollata dell’inflammasoma determina un cambio di ruolo dello stesso, in particolare, da azione protettiva contro la perdita dell’omeostasi tissutale, allo sviluppo di patologie autoimmuni, immunosoppressione, cancro e insorgenza di metastasi. La sua completa attivazione avviene in due fasi temporalmente distinte. La prima fase, anche chiamata *priming* step, prevede

l'attivazione del Toll-like Receptor (TLR), da parte di LPS, e del signaling pathway sottostante, che mediante NF- κ B, aumenta le concentrazioni citoplasmatiche delle proteine coinvolte. La seconda fase, *activation step*, prevede l'oligomerizzazione dei monomeri di NLRP3 in una struttura sferica ad anello, in grado di reclutare una proteina scaffold, chiamata Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC), che a sua volta polimerizza in un filamento di dimensioni comprese fra 2 e 5 μ m. Tale filamento rappresenta la base per il reclutamento delle pro-caspasi-1 e per il loro successivo processamento nella forma matura. Infine, le caspasi-1 attive tagliano le citochine pro-infiammatorie nella loro forma biologicamente attiva e, parallelamente, le gasdermine D, il cui frammento N-terminale, il frammento attivo, forma dei pori sulla membrana citoplasmatica, promuovendo il rilascio delle citochine neoformate, nonché la piroptosi. Attraverso metodiche di microscopia ottica, si evince che l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, comporta la formazione di un singolo speck (o punctum) perinucleare per cellula al quale convogliano tutte le molecole facenti parte del pathway al fine di potenziarne l'azione. Il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nell'infiammazione dell'apparato gastrointestinale, nonché nella tumorigenesi, sta emergendo negli ultimi anni. Ad esempio, alcuni studi hanno evidenziato che topi knockout per NLRP3, per caspasi-1 o per IL-1 β sviluppano coliti o infiammazioni intestinali con una incidenza significativamente ridotta rispetto ai corrispettivi wild-type. Inoltre, IL-1 β e IL-18 svolgono un ruolo di immunosoppressione, favorendo la formazione di un microambiente pro-tumorale. IL-1 β risulta avere un ruolo chiave nella soppressione della risposta immunitaria verso lo sviluppo tumorale attraverso un meccanismo di richiamo e attivazione in situ delle Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC), componenti chiave del microambiente tumorale e caratterizzate dalla loro abilità di produrre citochine con funzioni inibitorie, ossido nitrico sintasi, arginasi, e di indurre ed attivare le cellule T- regolatorie, tutti fattori con potenti azioni immunosoppressive. Diventa fondamentale, quindi, riuscire a prevenire, o convertire, un'over-attivazione di NLRP3 nel microambiente tumorale al fine di sollecitare il sistema immunitario verso un fenotipo più marcatamente anti-tumorale che pro-tumorale. Per far sì che questo possa avvenire efficacemente ed in modo tessuto-cellula-specifico, quindi interessando solo il tessuto tumorale e il microambiente ad esso correlato, di cui fa parte anche la componente infiammatoria, diversi studi si stanno orientando sull'utilizzo di nanoparticelle di natura organica e/o inorganica, da far giungere per via sistemica al sito di trattamento.

La particolarità di queste composizioni liposomali in commercio, però è di contenere liposomi non coniugati con molecole quali recettori, anticorpi, peptidi, in grado di riconoscere strutture cellulari peculiari delle cellule patologiche. Questa struttura permette loro di essere considerati tra i farmaci di tipo sistemico e non tessuto-specifici, rendendoli sicuramente più efficaci delle somministrazioni di farmaci liberi, ma probabilmente meno efficaci di liposomi che coniugati con molecole funzionali riconoscerebbero solo le cellule tumorali e non le normali. In nostri recenti lavori, effettuati su cellule di carcinoma del colon, abbiamo dimostrato infatti che nel caso di liposomi potenziati nella struttura delle membrane mediante coniugazioni di anticorpi che riconoscono un recettore di membrana della cascata del Wnt, si è aumentata l'efficienza di rilascio, l'efficacia della somministrazione, diminuendo notevolmente le concentrazioni del farmaco, migliorando *in vitro* il trattamento con il chemioterapico 5-FU. Perseguendo lo studio per l'utilizzo dei liposomi, della loro funzionalizzazione per rendere le terapie più efficienti, nell'ambito delle terapie dell'HCC, contemporaneamente al trattamento dell'infiammazione insita in ogni sviluppo della carcinogenesi, abbiamo pensato di funzionalizzare con anticorpi specifici le nostre nanoparticelle sfruttando come targets i recettori del Wnt quali FZD1 che risulta sovraespressa nei macrofagi in caso di infiammazione e FZD9, sovraespressa in HCC ed epatociti tumorali. Inoltre, alcuni studi effettuati nei nostri laboratori, ci consentono di indicare come farmaci da veicolare nei nostri nanocostrutti, sia inibitori della carcinogenesi epatobiliare, basati sull'inibizione della β -secretasi (GSI) che bloccano la scissione proteolitica dei recettori di Notch al fine di inibire il processo di segnalazione a valle, sia inibitori delle molecole attivatrici dell'inflammasoma, quali il MMC950 che inibisce NLRP3. Oltre ciò, per potenziare la capacità epatoprotettiva, verso le cellule sane presenti nell'ambito dell'organo epatico ove persistono dei noduli neoplastici, ai liposomi veicolanti gli inibitori per β -secretasi ed inflammasoma, aggiungeremo una molecola nutraceutica con proprietà epatoprotettive, cioè la Silimarina. La Silimarina, è una molecola naturale, contenuta nel cardo mariano, che oggi viene usata principalmente come integratore nella prevenzione dell'evoluzione della steatosi epatica nei pazienti NAFLD. E' stato inoltre ampiamente dimostrato che durante l'utilizzo di chemioterapici, nelle terapie oncologiche, non soltanto epatiche, somministrandola ai pazienti, riduce l'effetto citotossico sugli epatociti sede principale del metabolismo dei farmaci, riducendo la produzione di radicali liberi, e aumentando l'efficacia dei trattamenti.

Alla luce di quanto discusso fino ad ora, lo scopo del nostro progetto è quello di procedere allo studio e alla preparazione di nanoparticelle a base liposomale, funzionalizzate con anticorpi specifici, in grado di arrivare direttamente sul tessuto patologico, costituito dalle cellule tumorali ed infiammatorie, preservando il tessuto normale, e riversare all'interno delle cellule tumorali e delle cellule infiammatorie, inibitori in grado di fermare entrambi i processi. In più l'idea è quella di introdurre nel veicolo, anche una molecola epatoprotettiva, in grado di preservare la funzionalità epatica e di amplificare la potenza dei farmaci veicolati.

Di seguito riportiamo schematicamente lo scopo del progetto



Obiettivi specifici dello studio:

Gli obiettivi proposti per il primo anno del progetto sono stati i seguenti:

Obiettivo 1:

Il primo obiettivo dello studio sperimentale proposto è stato quello di preparare e caratterizzare i liposomi caricati con i diversi farmaci coniugati con gli anticorpi FZD1 e FZD9 che andranno a riconoscere le differenti proteine di membrana presenti rispettivamente sui macrofagi e su linee cellulari tumorali di HCC, che avranno caratteristiche di bassa o alta aggressività. Andremo così ad individuare la nano-formulazione più idonea da somministrare durante la seconda fase ai modelli murini prescelti, per avere una massima efficacia, con una dose minima di farmaco nel trattamento contestuale dell'infiammazione insita nella massa tumorale e del tumore stesso.

Obiettivo 2:

Il secondo obiettivo del presente studio sperimentale sarà quello di valutare come il trattamento con agenti biologici e farmacologici, quali Silimarina, Inibitore di γ -secretasi, MCC950 e la loro combinazione, influenzi l'attività infiammatoria dei macrofagi murini attivati, lo sviluppo e la progressione dell'HCC in modelli *xenograft* murini.

Materiali e Metodi utilizzati nello sviluppo dell'obiettivo specifico 1:

Preparazione dei Liposomi coniugati con anti-FZD1 e anti-FZD9

I liposomi vuoti o caricati con il farmaco MCC950 (Sigma-Aldrich Milan, Italy), sono stati preparati seguendo il metodo dell'iniezione, dopo aver caratterizzato chimicamente mediante la tecnica FT-IR e spettro UV-Visibile, sia MCC950 che la Silimarina, mentre la caratterizzazione dell'inibitore della gamma secretasi è in corso. Si è proceduto alla preparazione di una soluzione con volume di 0.274 mL di cloroformio contenente il mix lipidico di colesterolo, fosfaditilcolina e stearilamina (7:3:1 ratio molare) (Sigma-Aldrich Milan, Italy) e 11 μ L di una soluzione di cloroformio e DSPE-PEG2000 con una ratio molare di 3:0.3. Quindi, 3 mL di soluzione acquosa contenente MCC950, sono stati rapidamente aggiunti mediante siringa in vetro

nella soluzione lipidica, in continua agitazione su piastra magnetica. I liposomi vuoti sono stati ottenuti mediante lo stesso protocollo, ma senza l'aggiunta dei farmaci. Tutte le formulazioni liposomiali, sono state liofilizzate e ricostituite in PBS o acqua sterile all'occorrenza, per gli esperimenti successivi e per le caratterizzazioni e i farmaci all'interno saranno utilizzati a diverse concentrazioni in piastra. Si è proceduto a valutare in vitro l'efficienza di incapsulazione del singolo farmaco ed il rilascio e l'efficacia delle preparazioni, somministrando i liposomi contenenti il farmaco nelle diverse linee cellulari di rispettivamente: BMDM, HEPA-RG, HEPG2, HLC19 ed HLC19M.

Valutazione dell'efficienza di incapsulazione (EE%).

L'efficienza di incapsulazione (EE%), di MCC950, è stata valutata mediante la seguente formula: $EE\% = Wt/Wi \times 100$ dove Wt è la quantità di farmaco effettivamente incorporato nella formulazione, Wi la quantità totale inizialmente aggiunta durante la preparazione. Per la valutazione del contenuto di farmaco il campione è stato liofilizzato e diluito in metanolo (1:100) e sono state effettuate le misurazioni alle varie lunghezze d'onda di assorbimento della soluzione contenente i liposomi con il farmaco, versus una soluzione di metanolo contenente il mix lipidico componente la preparazione liposomiale.

Valutazione delle dimensioni, del potenziale zeta e del PDI.

Il diametro idrodinamico, il potenziale zeta e l'indice di polidispersione (PDI), delle varie lipoformulazioni sono state identificate mediante l'utilizzo dello Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK (DTS 5.00), effettuando tre differenti misurazioni per ogni campione per tutti e tre i parametri valutabili.

Studio dei rilasci in vitro.

In una membrana da dialisi è stato caricato 1 mL della preparazione liposomiale e posta in un becker contenente 50 mL di PBS (10 mM e pH=7.4). La dialisi è stata condotta a 37°C in agitazione. Ad intervalli definiti, fino a 48 ore, 100 µL alla volta di soluzione esterna sono stati prelevati e sostituiti con PBS sterile fresco. Ogni aliquota è stata liofilizzata, risolubilizzata in metanolo ed è stata misurata la concentrazione del farmaco rilasciato.

Culture Cellulari. Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti in vitro, in particolare procedendo dalle normali alle più aggressive sono: HEPA-RG, HLC19 e HLC19M, mentre per i macrofagi sono state utilizzate le BMDM. Tutte le linee cellulari verranno coltivate come da protocollo in DMEM addizionato da 10% di FBS, 1% penicillina/streptomycin e 1% di glutamina (Gibco) per HLC19, HLC19M e BMDM, mentre per le HEPA-RG è stato usato l'HBM, specifico per la linea cellulare. Ad una confluenza del 70%, lo strato cellulare è stato lavato con PBS e trattato con tripsina, per staccarle dalla piastra, e poi risospenderle in numero consono agli esperimenti di trattamento con i liposomi, per la valutazione della vitalità cellulare e del tempo di uptake dei liposomi nelle cellule.

Uptake dei liposomi nelle cellule epatocitarie normali, di HCC e Macrofagi.

Nelle linee cellulari considerate, sono stati effettuati studi di uptake, utilizzando carbon dot fluorescenti al posto del Bodipy descritto nella proposta progettuale. Abbiamo quindi caricato i carbon dot nei liposomi a varie concentrazioni e questo ha consentito di studiare le tempistiche di acquisizione delle vescicole da parte delle cellule. Abbiamo effettuato il trattamento con i liposomi caricati con i carbon dot, e a tempi prestabiliti, quindi abbiamo acquisito le immagini a T0=1h, T1=4h, T2=8h, mediante l'utilizzo del microscopio confocale.

Test di proliferazione cellulare.

Per il test di proliferazione è stato utilizzato il CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), il cui principio è basato sulla determinazione dell'attività metabolica cellulare. Tutte le linee cellulari sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità di 2×10^3 cellule/pozzetto. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate rispettivamente con:

- a. CTR (non trattate)
- b. MCC950
- c. Liposomi vuoti coniugati
- d. Liposomi con MCC950

I trattamenti sono stati effettuati per 24, 48 e 72 h e successivamente le cellule sono state testate per la vitalità, misurando l'assorbimento dei sali di tetrazolio prodotti a 490 nm

Sviluppo del progetto: Obiettivo 1

Preparazione e caratterizzazione delle nanoformulazioni e dei farmaci incapsulati

Nella prima fase di studio, sviluppando il primo obiettivo, abbiamo preparato e studiato a livello chimico fisico e conformazionale, la formulazione liposomiale, caratterizzandola, sia da vuota che in presenza dell'inibitore dell'inflammasoma MCC950. Schematicamente, il liposoma che stiamo realizzando è costituito da una shell fosfolipidica, costituita da un bilayer in cui si intercalano la gamma-secretasi e la silimarina, mentre nell'interno sono presenti le molecole di MCC950 (Figura 1).

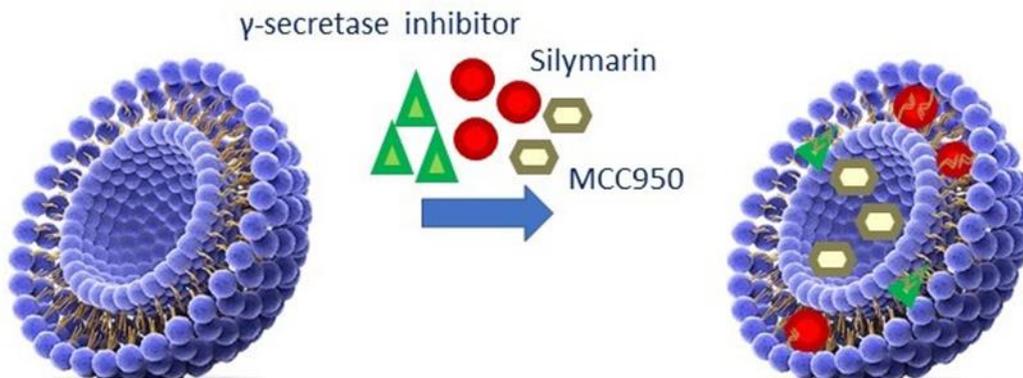
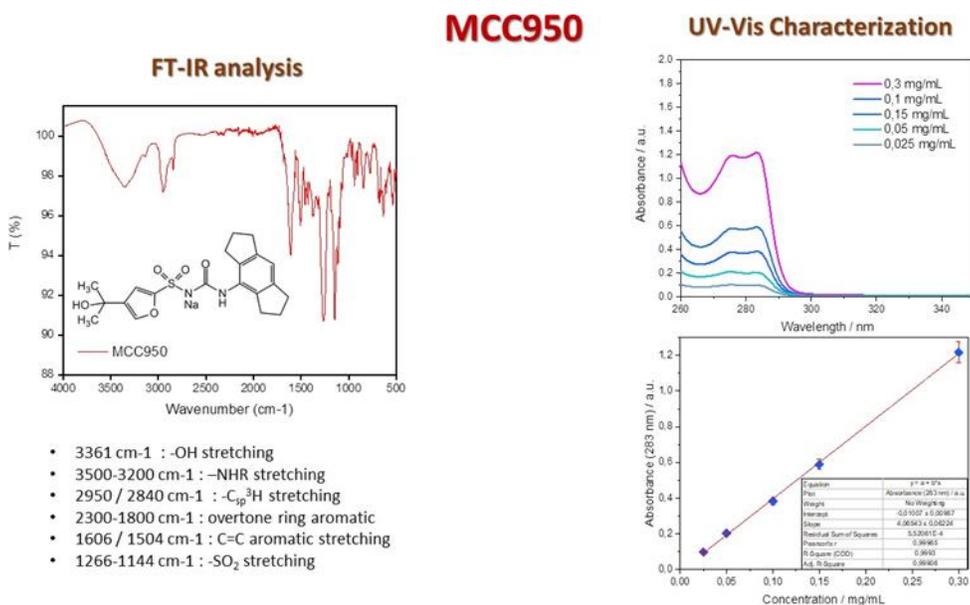


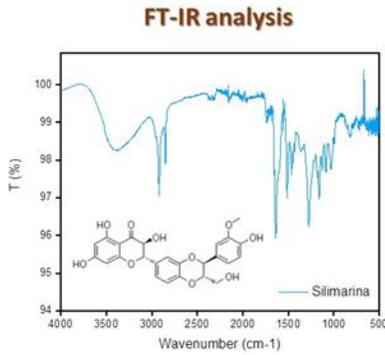
Figura 1. Schema di preparazione dei liposomi contenuti i diversi farmaci e localizzazione degli stessi all'interno della shell fosfolipidica.

In figura 2 riportiamo i dati di caratterizzazione delle molecole fino ad ora analizzate, cioè MCC950 e Silimarina. In particolare modo in figura 2A riportiamo la caratterizzazione di MCC950 ed in figura 2B la caratterizzazione della silimarina. La caratterizzazione dei farmaci è stata fondamentale per prevedere quali fosfolipidi utilizzare per ottenere la massima efficienza nell'incapsulazione e nei trattamenti



Silymarin

UV-Vis Characterization



- 3400 cm⁻¹ : -OH stretching
- 2916 / 2850 cm⁻¹ : -C_{sp}³H stretching
- 1639 cm⁻¹ : -CO ketone stretching
- 1508 / 1467 cm⁻¹ : C=C aromatic stretching
- 2300-1700 cm⁻¹ : overtone aromatic ring
- 1277 cm⁻¹ : stretching asimmetrico -C-O-C- aryl alkyl ether
- 1162 cm⁻¹ : stretching simmetrico -C-O-C- aryl alkyl ether

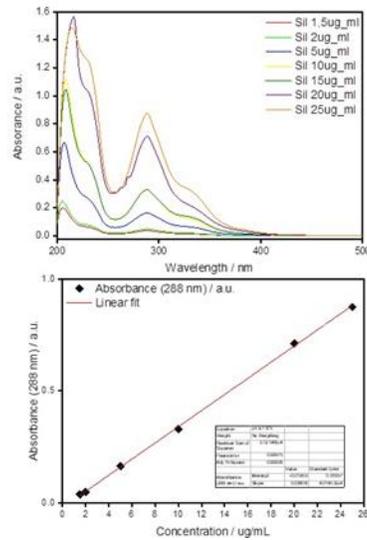


Figura 2 FT-IR e Spettrometria di 2 delle 3 molecole proposte come farmaci per la produzione del nanosistema da drug delivery

La preparazione delle varie formulazioni liposomiali (LP), in particolare in figura 3A è riportata la tabella riassuntiva delle varie formulazioni utilizzate per produrre liposomi che fossero biocompatibili soprattutto con le cellule normali epatocitarie. Dalla tabella si evince che la formulazione liposomiale più adeguata da utilizzare è la LP_3, poiché il potenziale negativo si avvicina al potenziale ζ di membrana delle cellule. In figura 3B il grafico estrapolato dal DLS, ripropone una popolazione particellare con una distribuzione monomodale, ed un indice di polidispersione (0.238 ± 0.010) adeguato ad una sospensione particellare adeguata all'uso per il drug delivery di nostro interesse. In figura 3C e 3D invece, riportiamo immagini descrittive di microscopia elettronica, rispettivamente TEM e SEM, in cui viene confermata l'omogeneità dimensionale delle particelle.

A	SAMPLE	Dh(nm)	PDI	ζ -POTENTIAL
	LP_1	141,9±1,6	0,105±0,006	26±0,7
	LP_2	144±4	0,27±0,03	-20±1
	LP_3	155±4	0,238±0,010	-21±2

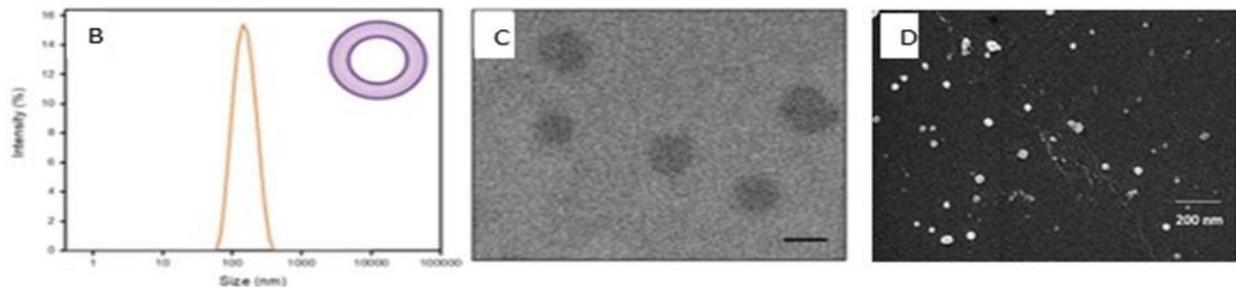


Figura 3 Caratterizzazione delle diverse formulazioni liposomiali vuote, effettuata con DLS, TEM e SEM

Nella formulazione LP_3 abbiamo caricato il farmaco MCC950, inibitore dell'inflammasoma, specificatamente per NLRP3, ottenendo nelle varie preparazioni diverse concentrazioni di farmaco, da cui abbiamo ottenuto sempre delle preparazioni omogenee, da un punto di vista conformazionale, un potenziale zeta di membrana negativo, per cui consono alla somministrazione cellulare e dimensioni nanoparticellari che non hanno superato i 150 nm. In tabella 4A, riportiamo l'analisi DLS dei liposomi contenenti MCC950, nella quale si evince che le dimensioni dei liposomi sono aumentate così come è aumentata la negatività del potenziale zeta.

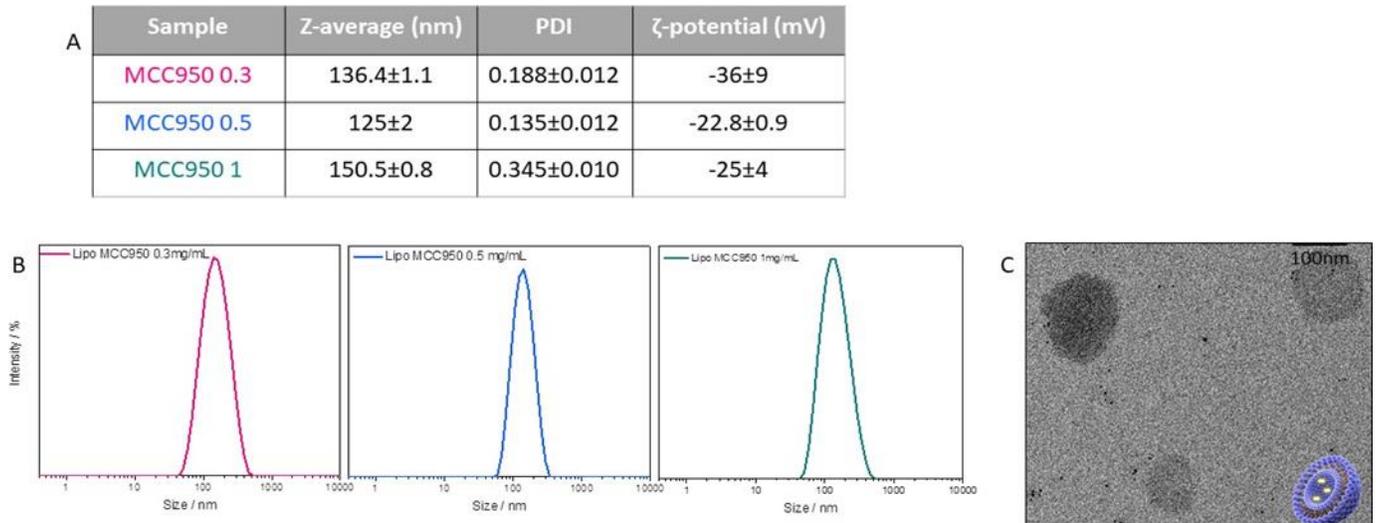


Figura 4 Caratterizzazione delle formulazioni complete con MCC950, attraverso l'utilizzo del DLS e del TEM

In figura 5A e 5B sono osservabili gli studi di rilascio e di efficienza di incapsulazione delle tre formulazioni liposomiali contenenti MCC950, che mostrano che l'efficienza di incapsulazione di tutte le formulazioni prodotte sia notevolmente alta, ed in particolar modo che l'efficienza massima la si ottiene utilizzando una concentrazione iniziale molto bassa di MCC950 (tabella 5C).

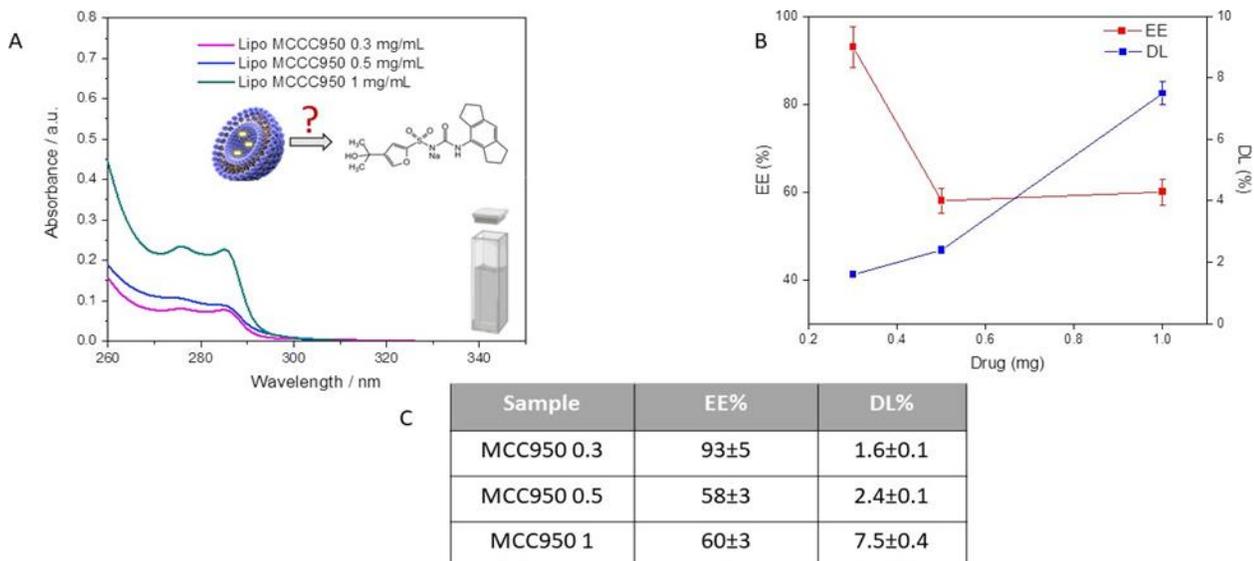


Figura 5 Studio del rilascio e dell'efficienza di incapsulazione del farmaco a varie concentrazioni

Uptake dei liposomi nelle diverse linee cellulari

I liposomi utilizzati negli esperimenti in vitro, sono stati studiati anche per le tempistiche di uptake. Questo studio risulta essere determinante per definire le tempistiche di somministrazione durante gli esperimenti di attivazione dell'inflammasoma, poiché la finalità progettuale prevede l'inibizione del processo di infiammazione. L'esperimento è stato condotto mediante realizzazione di un time course su HEPA-RG, HLC19, e macrofagi murini BMDM, utilizzando diverse concentrazioni di carbon dot fluorescenti incapsulati nei liposomi; è noto infatti che i liposomi si fondono con la membrana cellulare, rilasciando all'interno delle cellule il loro contenuto. Utilizzando il colorante BODIPY, che si coniuga ai fosfolipidi, la misura sarebbe stata falsata, poiché avremmo potuto sicuramente osservare l'adesione alla membrana cellulare dei liposomi, ma il rilascio del contenuto all'interno sarebbe stato pressoché impossibile. Essendo i carbon dot utilizzati a concentrazioni relativamente alte, si nota la sofferenza cellulare ed in alcuni casi la morte. In figura 6A è possibile osservare l'uptake liposomiale nelle HEPA-RG. Si osserva nettamente, che nei primi due tempi la fluorescenza risulta confinata alla membrana, mentre è completamente all'interno delle cellule dopo 8 ore.

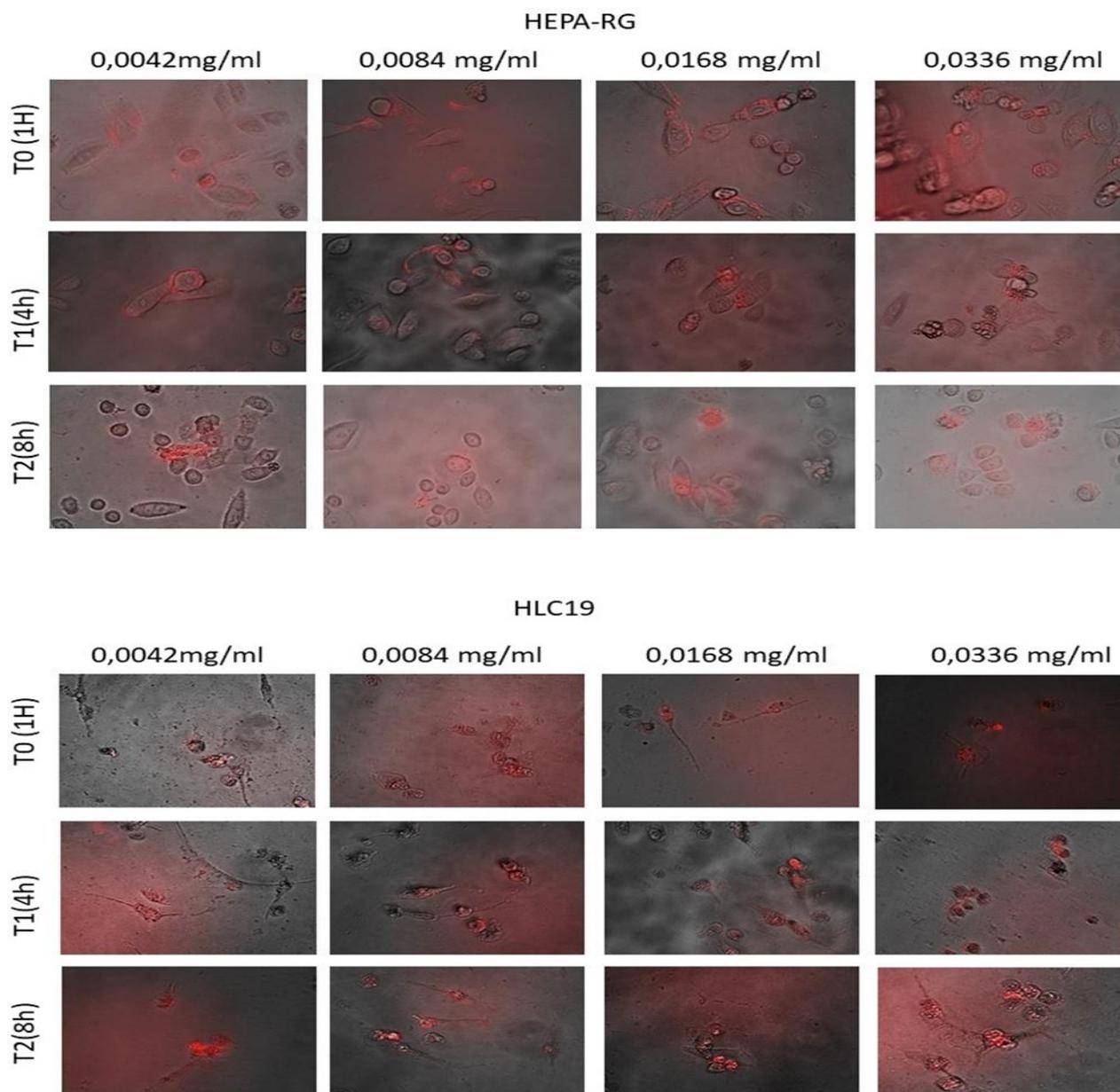


Figura 6 Uptake dei liposomi con carbon dot. (A) uptake nelle cellule HEPA-RG, (B) uptake nelle cellule HLC19

A conferma dell'ingresso dei carbon dot all'interno della cellula, vi è anche una sofferenza cellulare osservabile dal cambiamento morfologico delle cellule in cui i nanocristalli sono entrati; le cellule risultano essere non più distese con un rapporto nucleo citoplasma basso, ma risultano essere contratte, tondeggianti e con rapporto nucleo citoplasma alto. In figura 6B riportiamo l'esperimento di uptake riferibile alla linea cellulare tumorale HLC19, in cui al contrario di quanto si possa osservare nelle HEPA-RG, i carbon dot, vengono riversati all'interno delle cellule già nella prima ora, risultando dopo 8 ore stabilmente all'interno del citoplasma cellulare. In questa linea cellulare più che nelle HEPA-RG, è valutabile maggiormente la sofferenza cellulare con la formazione di bubble cells, assimilabili a bolle cellulari necroptotiche.

Studio di vitalità cellulare in cellule trattate con liposomi vuoti, farmaco libero e farmaco incapsulato

In Figura 7 riportiamo i risultati degli esperimenti di vitalità cellulare su 3 linee cellulari, di cui una linea epatocitaria normale (HEPA_RG) una linea tumorale (HLC19) e sui macrofagi murini (BMDM) in cui non è stato ancora attivato l'inflammasoma ed in cui abbiamo investigato la citotossicità delle preparazioni sia vuote, che a varie concentrazioni di farmaco sia libero che incapsulato negli esosomi. In figura 7A riportiamo la vitalità cellulare osservata sulle tre linee cellulari prese in considerazione per la valutazione dei liposomi vuoti a varie concentrazioni, ed è evidenziabile un'ottima tolleranza cellulare in tutte le linee prese in considerazione con tutte le concentrazioni utilizzate. In figura 7B è stato ripetuto l'esperimento di analisi della vitalità cellulare, tenendo conto della formulazione completa con il farmaco incapsulato (liposoma + MCC950), sempre sulle stesse linee cellulari. Anche in questo caso, la nanoformulazione è ben tollerata in tutte le linee cellulari e utilizzando tutte le concentrazioni sia di farmaco libero che di farmaco incapsulato.

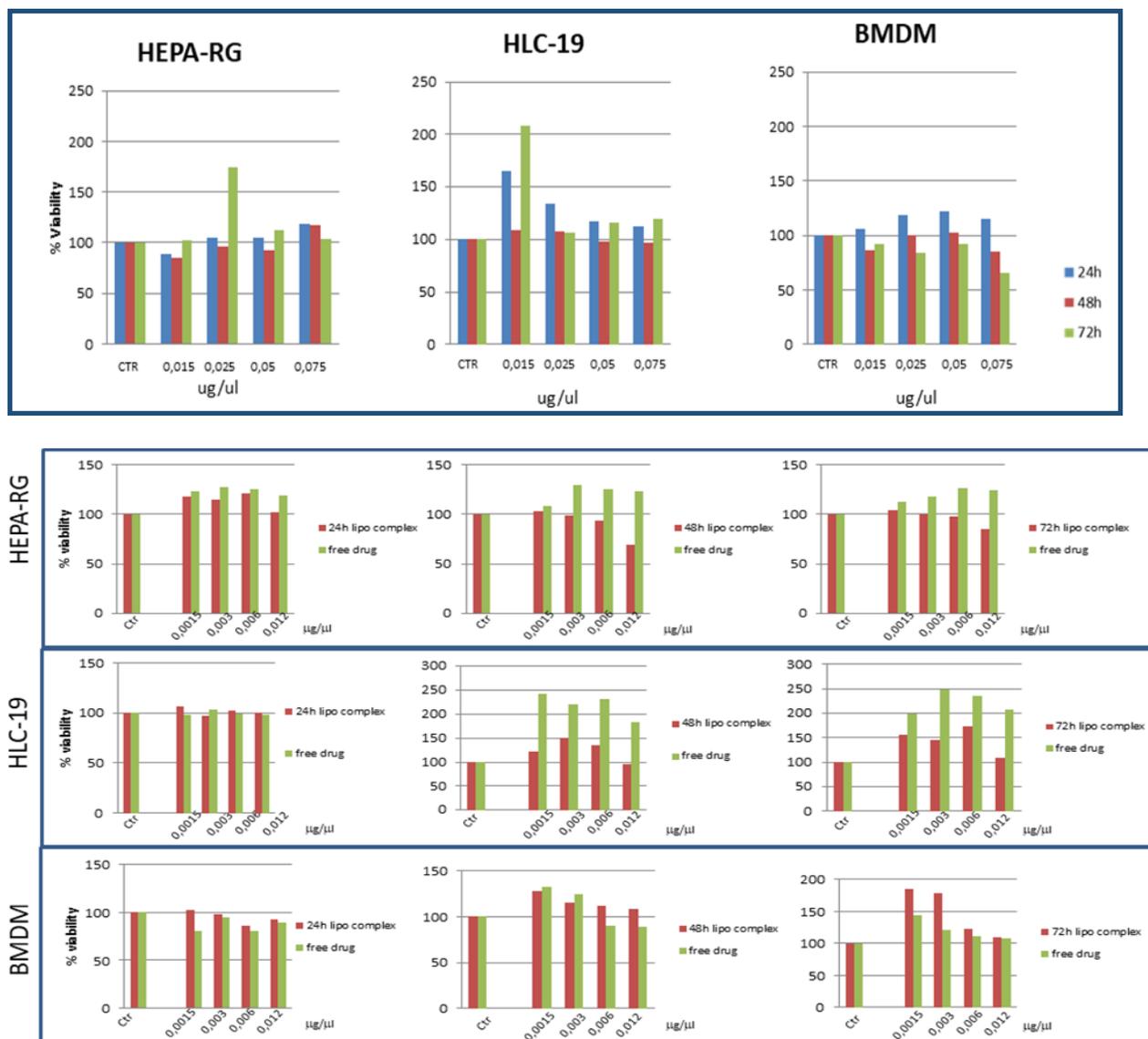


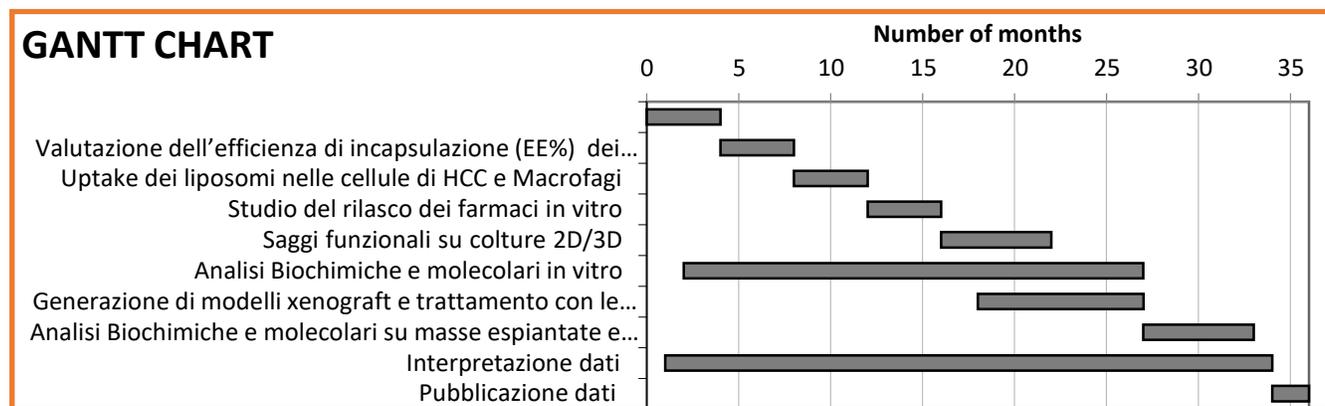
Figura 7. Tests di vitalità cellulare nelle diverse linee cellulari. (A) liposomi vuoti a diverse concentrazioni, (B) liposomi contenenti il farmaco a diverse concentrazioni e farmaco libero.

Risultati attesi:

In linea con i risultati attesi lo scorso anno, e nel rispetto del timeline e del gantt proposti con il progetto, con i risultati ottenuti siamo ottimisticamente confidenti sul prosieguo dello stesso, nella linea prestabilita, considerando comunque gli eventuali problemi sperimentali che potrebbero insorgere durante lo sviluppo e la messa in opera del progetto stesso. Ci aspettiamo quindi che i risultati futuri saranno coerenti con quanto ottenuto sino ad ora e con quanto proposto nel progetto sottomesso lo scorso anno.

Timeline (Gantt chart)

Event / Name	Start	End	Length
Preparazione dei Liposomi coniugati con anti-FZD1 e anti-FZD9	0	4	4
Valutazione dell'efficienza di incapsulazione (EE%) dei farmaci	4	8	4
Uptake dei liposomi nelle cellule di HCC e Macrofagi	8	12	4
Studio del rilascio dei farmaci in vitro	12	16	4
Saggi funzionali su colture 2D/3D	16	22	6
Analisi Biochimiche e molecolari in vitro	2	27	25
Generazione di modelli xenograft e trattamento con le varie formulazioni	18	27	9
Analisi Biochimiche e molecolari su masse espianate e prelievi	27	33	6
Interpretazione dati	1	34	33
Pubblicazione dati	34	36	2



Bibliografia:

1. Llovet, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2016). doi:10.1038/nrdp.2016.18
2. Llovet, J. M. *et al.* EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* (2012). doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001
3. Omer, R. E. *et al.* Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutr. Cancer* (2004). doi:10.1207/s15327914nc4801_3
4. Kudo, M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Latest advances. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10110412
5. Giannelli, G., Villa, E. & Lahn, M. Transforming growth factor- β as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0243
6. El Dika, I., Khalil, D. N. & Abou-Alfa, G. K. Immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma. *Cancer* (2019). doi:10.1002/cncr.32076
7. Gui, C. H., Baey, S., D'cruz, R. T. & Shelat, V. G. Trans-arterial chemoembolization + radiofrequency ablation versus surgical resection in hepatocellular carcinoma – A meta-analysis: TACE+RFA vs Surgery in HCC – a Meta-analysis.

European Journal of Surgical Oncology (2020). doi:10.1016/j.ejso.2020.01.004

8. Calderaro, J. *et al.* Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J. Hepatol.* (2017). doi:10.1016/j.jhep.2017.05.014
9. Birgani, M. T. & Carloni, V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2017). doi:10.3390/ijms18020405
10. Galun, D., Srdic-Rajic, T., Bogdanovic, A., Loncar, Z. & Zuvela, M. Targeted therapy and personalized medicine in hepatocellular carcinoma: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *J. Hepatocell. Carcinoma* (2017). doi:10.2147/jhc.s106529
11. Rani, B. *et al.* Role of the tissue microenvironment as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* (2014). doi:10.3748/wjg.v20.i15.4128
12. Wu, J. *et al.* M2 macrophage-derived exosomes facilitate hepatocarcinoma metastasis by transferring α M β 2 integrin to tumor cells. *Hepatology* (2020). doi:10.1002/hep.31432
13. Liu, G. *et al.* The miR-92a-2-5p in exosomes from macrophages increases liver cancer cells invasion via altering the AR/PHLPP/p-AKT/ β -catenin signaling. *Cell Death Differ.* (2020). doi:10.1038/s41418-020-0575-3
14. Fane, M. & Weeraratna, A. T. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer* (2020). doi:10.1038/s41568-019-0222-9
15. Rossi, G. R., Trindade, E. S. & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Tumor Microenvironment-Associated Extracellular Matrix Components Regulate NK Cell Function. *Frontiers in Immunology* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.00073
16. Dituri, F., Mancarella, S., Cigliano, A., Chieti, A. & Giannelli, G. TGF- β as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Semin. Liver Dis.* **39**, (2019).
17. Oya, Y., Hayakawa, Y. & Koike, K. Tumor microenvironment in gastric cancers. *Cancer Science* (2020). doi:10.1111/cas.14521
18. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2019). doi:10.3390/ijms20040840
19. Nowell, C. S. & Radtke, F. Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer* (2017). doi:10.1038/nrc.2016.145
20. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J. & Aifantis, I. From fly wings to targeted cancer therapies: A centennial for notch signaling. *Cancer Cell* (2014). doi:10.1016/j.ccr.2014.02.018
21. Strazzabosco, M. & Fabris, L. Notch signaling in hepatocellular carcinoma: Guilty in association! *Gastroenterology* (2012). doi:10.1053/j.gastro.2012.10.025
22. Meurette, O. & Mehlen, P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* (2018). doi:10.1016/j.ccell.2018.07.009
23. Meurette, O. Shaping of the Tumor Microenvironment by Notch Signaling. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2020). doi:10.1007/978-3-030-35582-1_1
24. Gramantieri, L. *et al.* Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* (2007). doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01544.x
25. Zhou, L. *et al.* The Significance of Notch1 Compared with Notch3 in High Metastasis and Poor Overall Survival in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0057382
26. Villanueva, A. *et al.* Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology* (2012). doi:10.1053/j.gastro.2012.09.002
27. Tschaharganeh, D. F. *et al.* Yes-associated protein up-regulates jagged-1 and activates the NOTCH pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2013). doi:10.1053/j.gastro.2013.02.009
28. Dill, M. T. *et al.* Constitutive Notch2 signaling induces hepatic tumors in mice. *Hepatology* (2013). doi:10.1002/hep.26165
29. Evert, M. *et al.* On the role of notch1 and adult hepatocytes in murine intrahepatic cholangiocarcinoma development. *Hepatology* (2013). doi:10.1002/hep.26411
30. Fan, B. *et al.* Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J. Clin. Invest.* (2012). doi:10.1172/JCI63212
31. Franklin, R. A. *et al.* The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (80-.). (2014). doi:10.1126/science.1252510
32. Wang, Y. C. *et al.* Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0269
33. Zhao, J. L. *et al.* Forced activation of notch in macrophages represses tumor growth by upregulating MIR-125a and disabling tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2019
34. Monsalve, E. *et al.* Notch-1 Up-Regulation and Signaling following Macrophage Activation Modulates Gene Expression Patterns Known to Affect Antigen-Presenting Capacity and Cytotoxic Activity. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.9.5362
35. Jansson, J. I., Xiang, Z., Pettersson, M., Lardelli, M. & Nilsson, G. Distinct and regulated expression of Notch receptors in

- hematopoietic lineages and during myeloid differentiation. *Eur. J. Immunol.* (2001). doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3240::AID-IMMU3240>3.0.CO;2-E
36. Singh, N., Phillips, R. A., Iscove, N. N. & Egan, S. E. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* (2000). doi:10.1016/S0301-472X(00)00146-6
 37. Fung, E. *et al.* Delta-like 4 induces Notch signaling in macrophages: Implications for inflammation. *Circulation* (2007). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675462
 38. Levi, B. Macrophages take rheumatoid arthritis up a Notch. *Science Translational Medicine* (2017). doi:10.1126/scitranslmed.aan3022
 39. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
 40. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* (2002). doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
 41. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology* (2016). doi:10.1038/nri.2016.58
 42. Baroja-Mazo, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* (2014). doi:10.1038/ni.2919
 43. Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology* (2009). doi:10.1038/nrmicro2070
 44. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
 45. Rathinam, V. A. K. & Fitzgerald, K. A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* (2016). doi:10.1016/j.cell.2016.03.046
 46. Karki, R. & Kanneganti, T. D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nature Reviews Cancer* (2019). doi:10.1038/s41568-019-0123-y
 47. Stutz, A. *et al.* NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J. Exp. Med.* (2017). doi:10.1084/jem.20160933
 48. Wang, L., Negro, R. & Wu, H. TRPM2, linking oxidative stress and Ca²⁺ permeation to NLRP3 inflammasome activation. *Current Opinion in Immunology* (2020). doi:10.1016/j.coi.2020.01.005
 49. Magupalli, V. G. *et al.* HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science* (80-.). (2020). doi:10.1126/SCIENCE.AAS8995
 50. Bauer, C. *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* (2010). doi:10.1136/gut.2009.197822
 51. Coccia, M. *et al.* IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4 + Th17 cells. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20111453
 52. Marvel, D. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: Expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation* (2015). doi:10.1172/JCI80005
 53. Song, X. *et al.* CD11b + /Gr-1 + Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 β -Secreting Cells. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.175.12.8200
 54. Bunt, S. K. *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* (2007). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2354
 55. Voigt, C. *et al.* Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1705165114
 56. Terme, M. *et al.* IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* (2011). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0993
 57. Dinevska, M. *et al.* Inhibition of radiation and temozolomide-induced glioblastoma invadopodia activity using ion channel drugs. *Cancers (Basel)*. (2020). doi:10.3390/cancers12102888
 58. Chappuis, F. *et al.* Immunogenicity and estimation of antibody persistence following vaccination with an inactivated virosomal hepatitis A vaccine in adults: A 20-year follow-up study. *Vaccine* (2017). doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.031
 59. Allen, T. M. & Martin, F. J. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.001
 60. Krown, S. E., Northfelt, D. W., Osoba, D. & Stewart, J. S. Use of liposomal anthracyclines in Kaposi's sarcoma. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.003
 61. Markman, M., Gordon, A. N., McGuire, W. P. & Muggia, F. M. Liposomal anthracycline treatment for ovarian cancer. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.004
 62. Rose, P. G. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer. *Oncologist* (2005). doi:10.1634/theoncologist.10-3-205
 63. Scavo, M. P. *et al.* Effectiveness of a controlled 5-fu delivery based on fzd10 antibody-conjugated liposomes in colorectal cancer in vitro models. *Pharmaceutics* (2020). doi:10.3390/pharmaceutics12070650

64. Neumann, J. *et al.* Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis -infected macrophages . *FASEB J.* (2010). doi:10.1096/fj.10-160994
65. Fujimoto, T., Tomizawa, M. & Yokosuka, O. SiRNA of Frizzled-9 suppresses proliferation and motility of hepatoma cells. *Int. J. Oncol.* (2009). doi:10.3892/ijo-00000400
66. Mancarella, S. *et al.* Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. *Cell Death Differ.* (2020). doi:10.1038/s41418-020-0505-4
67. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* (2015). doi:10.1038/nm.3806
68. Yurtcu, E., Iseri, O. D. & Sahin, F. I. Effects of silymarin and silymarin-doxorubicin applications on telomerase activity of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J. B.U.ON.* (2015).
69. Curcio, A. *et al.* Silymarin in combination with vitamin C, vitamin E, coenzyme q10 and selenomethionine to improve liver enzymes and blood lipid profile in NAFLD patients. *Med.* (2020). doi:10.3390/medicina56100544
70. Vargas-Mendoza, N. *et al.* Hepatoprotective effect of silymarin. *World Journal of Hepatology* (2014). doi:10.4254/wjh.v6.i3.144
71. Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E. & Ladas, E. Clinical applications of Silybum marianum in oncology. *Integrative Cancer Therapies* (2007). doi:10.1177/1534735407301727
72. Hidalgo, M. *et al.* Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* (2014). doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001
73. Szadvari, I., Krizanova, O. & Babula, P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiological Research* (2016). doi:10.33549/physiolres.933526
74. Depalo, N. *et al.* Imaging modification of colon carcinoma cells exposed to lipid based nanovectors for drug delivery: A scanning electron microscopy investigation. *RSC Adv.* (2019). doi:10.1039/c9ra02381j
75. Scavo, M. P. *et al.* A possible role of fzd10 delivering exosomes derived from colon cancers cell lines in inducing activation of epithelial–mesenchymal transition in normal colon epithelial cell line. *Int. J. Mol. Sci.* (2020). doi:10.3390/ijms21186705
76. Azzariti, A. *et al.* Hepatic stellate cells induce hepatocellular carcinoma cell resistance to sorafenib through the laminin-332/ α 3 integrin axis recovery of focal adhesion kinase ubiquitination. *Hepatology* (2016). doi:10.1002/hep.28835
77. Tomayko, M. M. & Reynolds, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1989). doi:10.1007/BF00300234

Progetto 07/2022: “Decifrando l’interattoma di SMYD3 nella cancerogenesi e nella progressione del cancro del colon retto”

Responsabile: dott.ssa Candida Fasano

Partecipanti: Valentina Grossi, Giovanna Forte, Martina Lepore Signorile, Katia De Marco

Introduzione

Il cancro è una malattia multifattoriale che rimane una delle principali cause di morte in tutto il mondo nonostante decenni di intensi sforzi della comunità scientifica volti a chiarire le sue basi molecolari. Una migliore comprensione della complessità molecolare di questa malattia e l'identificazione di nuovi bersagli oncogenici restano obiettivi fondamentali per la formulazione di protocolli antitumorali più efficaci e con minori effetti collaterali. In questo contesto, approcci di ricerca basati su analisi omiche di “big data” possono essere utili sia per identificare in breve tempo nuovi fattori coinvolti delle diverse fasi della cancerogenesi, che per indagare nel loro insieme tutte le differenti vie di segnalazione molecolare del cancro. In effetti, uno dei principali punti di forza delle metanalisi omiche è la stratificazione dei dati in crescenti livelli di complessità che forniscono al ricercatore una visione d’insieme più chiara delle possibili correlazioni funzionali tra i diversi effettori della cancerogenesi e della progressione tumorale [1].

Come tutti i processi biologici, anche la cancerogenesi dal punto di vista evolutivo può essere considerata come un processo adattativo multistep che prevede una riprogrammazione dell’epigenetica e dell’omeostasi metabolica della cellula precancerosa in risposta a diversi stimoli stressori endogeni (checkpoints cellulari). In particolare, le cellule tumorali sono spesso soggette a condizioni di stress persistenti e sviluppano sofisticati meccanismi adattativi per superare la pressione evolutiva imposta da diversi meccanismi di controllo cellulare [2,3]. Tale processo adattativo culmina con l’acquisizione di una o più caratteristiche adattative note come “hallmarks” del cancro. Oggi si conoscono 10 hallmarks del cancro che quindi rappresentano delle abilità adattative che permettono alla cellula pre- cancerosa di sopravvivere, di trasformarsi in cellula tumorale e di progredire nella sequela patologica del cancro che generalmente culmina con la metastatizzazione, ovvero la formazione di metastasi in distretti corporei differenti dalla sede del tumore primario [2].

I fattori distintivi del cancro (hallmarks) sono adattamenti dinamici delle cellule tumorali che si manifestano in tre diverse fasi della cancerogenesi: fase precoce, fase intermedia, e fase tardiva. Nella fase precoce della cancerogenesi le cellule tumorali sviluppano instabilità e mutazioni del genoma, resistenza alla morte cellulare programmata, e ai soppressori della crescita cellulare. Nella fase intermedia della cancerogenesi le cellule sviluppano l’abilità ad eludere il sistema immunitario, ad attivare in alcuni casi meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore, ad abilitare programmi epigenetici che ne permettono l’immortalità replicativa e la riprogrammazione metabolica. Infine nella fase tardiva della cancerogenesi la cellula attiva costitutivamente vie di segnalazione proliferative, dell’angiogenesi, dell’invasione e della metastatizzazione [2,3].

Dal punto di vista molecolare, in risposta agli stimoli stressori di vario genere (ossidativo, genotossico, metabolico, ed ipossico) le cellule sviluppano nella fase precoce riarrangiamenti della cromatina soprattutto attraverso modifiche istoniche per promuovere la riprogrammazione epigenetica della cellula tumorale. Al persistere dello stimolo stressorio durante la fase intermedia si verifica l’attivazione di vie di segnalazione dello stress da parte di sensori specifici (per es. ATM, AMPK, HIF1a, HSP90). In fine nelle fasi più tardive della cancerogenesi vengono attivati effettori specifici che modulano l’adattamento dell’omeostasi cellulare in risposta agli stimoli stressori [4].

L’enzima SMYD3 è una metiltransferasi, che può essere considerato un modulatore versatile di tutte e tre le fasi della cancerogenesi, in quanto attiva e regola finemente diverse risposte allo stress per promuovere la sopravvivenza della cellula tumorale [5].

Con questo progetto si vuole investigare l’ipotesi che il ruolo oncogenico di SMYD3 venga svolto in vari momenti della risposta adattativa allo stress che una cellula cancerosa mette in atto fin dalle primissime fasi della cancerogenesi. Nella fase precoce della cancerogenesi, SMYD3 interagendo con HSP90 e RPB1, può mediare la risposta epigenetica a diversi stimoli stressori (per es. stress ossidativo, genotossico e metabolico) [5]. Al persistere dello stimolo stressorio nella fase intermedia della cancerogenesi, SMYD3 interagendo direttamente con i principali sensori dello stress (ad es. HSP90, ATM, AMPK) può favorire l’attivazione di specifiche vie di segnalazione in risposta allo stress, mentre in una fase tardiva della cancerogenesi SMYD3 può interagire con effettori delle vie di segnalazione proliferative, angiogenetiche e della metastatizzazione (come AKT1, VEGFR1, p53, MAP3K2), promuovendo la proliferazione e la progressione delle cellule tumorali [5,6].

In letteratura, un numero crescente di prove indica che SMYD3 è sovraespresso in diversi tumori umani, evidenziando il suo ruolo cruciale nella cancerogenesi e nella progressione tumorale [5]. *In vivo*, la sovraespressione di SMYD3 promuove la progressione del cancro del pancreas [7], del polmone [8], del fegato, del colon-retto (CCR) [9], del seno [10],

dell'esofago [11] e dell'ovaio [12]. Tuttavia, ad oggi l'attività oncogenica specifica di SMYD3 in questi processi è oggetto di un dibattito emergente in cui il ruolo di questa metil transferasi non è stato ancora completamente compreso. Tuttavia, un recente studio condotto su centinaia di linee cellulari tumorali di diversa origine e background genetico ha mostrato che l'ablazione genetica di SMYD3 o il blocco farmacologico non compromettono la proliferazione autonoma delle cellule tumorali [13]. A livello molecolare, SMYD3 esercita la sua attività oncogenica in vari modi. Inizialmente SMYD3 è stato caratterizzato come "enzima modificatore" della cromatina che, metilando la lisina 4 dell'istone H3 (H3K4), favorisce l'espressione di vari geni correlati al cancro [14–17]. Inoltre, SMYD3 agisce come attivatore trascrizionale di diversi geni bersaglio coinvolti in vie di segnalazione della morte cellulare e della proliferazione (ad esempio, hTERT, Wnt10b) [14,16], della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) (ad esempio, SLUG, MMP2, Vim, Met) [9,10,18–20], nonché oncogeni (es. c-MYC, JAK/STAT, CTNNB1) [9] e geni regolatori del ciclo cellulare (es. CCNA2, CCND1, CCNE1, PCNA, CDK2) [5]. Inoltre, SMYD3 interagisce e metila diverse proteine non istoniche (es. VEGFR1, HSP90, H2A.Z.1, MAP3K2, AKT1, ER, HER2), regolando finemente vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione delle cellule tumorali [5,8,21]. Inoltre, l'attività della metiltransferasi SMYD3 innesca l'attivazione costitutiva della chinasi AKT1, un fattore metabolico cruciale per la riprogrammazione metabolica della cellula tumorale e per i meccanismi infiammatori che favoriscono la cancerogenesi [22].

In questo scenario, il coinvolgimento diretto e indiretto di SMYD3 in vari processi correlati al cancro appare semplice, anche se molti aspetti importanti sul suo ruolo oncogenico devono ancora essere chiariti.

Obiettivi specifici dello studio:

Lo scopo ultimo di questo progetto è approfondire il ruolo oncogenico di SMYD3 nelle fasi precoce, intermedia e tardiva della cancerogenesi. Diverse evidenze di letteratura dimostrano come SMYD3 sia un modulatore chiave della risposta a diversi stimoli stressori a cui le cellule sono normalmente sottoposte già dai primissimi momenti della cancerogenesi fino alle fasi più avanzate della progressione tumorale. Quindi, al fine di investigare il ruolo oncogenico di SMYD3 andremo a caratterizzare *in silico* e a validare in diversi modelli cellulari di progressione de cancro del colon retto (cellule normali, cellule tumorali e cellule staminali tumorali) nuove interazioni di SMYD3 in risposta agli stimoli stressori (metabolico, ossidativo, ipossico e genotossico) che notoriamente favoriscono la sequela di eventi molecolari distintivi della cancerogenesi e della progressione tumorale (hallmarks del cancro). In fine, analizzeremo gli effetti sulla vitalità cellulare in HCT116 (linee di CCR) e in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti (già disponibili presso il nostro laboratorio) e in HCEC-1CT (linee di colonociti normali come controllo), sottoposte a trattamenti terapeutici combinati (doppio bersaglio molecolare, letalità sintetica) a base di inibitori di SMYD3 associati ad inibitori dei nuovi partner di SMYD3 già in uso nella pratica clinica e nelle attuali sperimentazioni cliniche.

Obiettivo specifico 1:

Identificazione e caratterizzazione *in silico* di nuove interazioni di SMYD3 nelle 3 fasi (precoce, intermedia e tardiva) della cancerogenesi.

Obiettivo specifico 2:

Validazione *in cellulo* delle nuove interazioni di SMYD3 in linee cellulari di colon retto (normali, tumorali, staminali tumorali) sottoposte a differenti stimoli stressori.

Obiettivo specifico 3:

Studio della vitalità cellulare in linee cellulari tumorali e staminali tumorali di colon retto sottoposte a inibizione combinata di SMYD3 e dei suoi nuovi interattori.

OBIETTIVO 1:

Obiettivo 1a: *Clusterizzazione in silico delle P-proteine rispetto alle tre fasi della cancerogenesi.*

Partendo dalle 2249 P-proteine dei 10 clusters corrispondenti a ciascun hallmarks del cancro raggrupperemo ulteriormente *in silico* tali proteine rispetto alle diverse fasi della cancerogenesi. In particolare otterremo 3 raggruppamenti (clusters) proteici: a) P- proteine coinvolte nella fase precoce della cancerogenesi; b) P- proteine coinvolte nella fase intermedia della cancerogenesi; c) P- proteine coinvolte nella fase tardiva della cancerogenesi. Nel primo gruppo rientreranno tutte le proteine associate ai tre hallmarks ricorrenti nella fase precoce della cancerogenesi di diversi tipi di tumori, ovvero

l'instabilità e le mutazioni del genoma, la resistenza alla morte cellulare programmata e la resistenza ai soppressori della crescita cellulare [2,3]. Nel secondo gruppo saranno incluse tutte le proteine associate alla fase intermedia della cancerogenesi ovvero quando le cellule acquisiscono i seguenti 4 segni distintivi del cancro: capacità di eludere il sistema immunitario, ad attivare meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore, ad abilitare programmi epigenetici che ne permettono l'immortalità replicativa e la riprogrammazione metabolica [2,3]. Nel terzo gruppo saranno incluse le proteine che rientrano nelle fasi tardive della cancerogenesi, ovvero quelle in cui la cellula attiva costitutivamente vie di segnalazione della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasione e della metastatizzazione [2,3].

Obiettivo 1b: *Analisi quantitativa e qualitativa delle proteine che rientrano nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi.*

Quantitativamente analizzeremo la frequenza (n. matches) dei P-tripeptidi e il numero complessivo di P-proteine che rientrano in ognuno dei cluster proteici corrispondenti alle fasi della cancerogenesi. L'analisi quantitativa dei tre cluster della cancerogenesi è particolarmente utile per investigare e identificare un potenziale motivo peptidico consenso di interazione con SMYD3. Dal punto di vista qualitativo analizzeremo *in silico* le funzioni delle 2249 proteine coinvolte negli hallmarks del cancro e raggruppate nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi. Questa analisi *in silico* sarà condotta sulla base delle informazioni funzionali di ogni proteina riportate nel database UniProt e delle relative vie di segnalazione del cancro in cui esse intervengono, queste ultime disponibili nel database Reactome. Al termine delle analisi quantitative e qualitative delle 2249 P-proteine distribuite nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi, selezioneremo come potenziali interattori di SMYD3 quegli effettori arricchiti in P-tripeptidi e che notoriamente rivestono ruoli chiave nella cancerogenesi.

Obiettivo 1c: *Analisi dei profili mutazionali dei nuovi interattori di SMYD3 in tumori coloretali di casi clinici annotati nei dataset proteogenomici (CBioPortal, TCGA e CPTAC).*

Al fine di confermare la significatività biologica dei P-tripeptidi come motivi consenso per l'interazione con SMYD3, andremo ad analizzare i dati molecolari dei tumori di CCR riportati nei più importanti portali online di dataset clinici (CBioPortal, TCGA e CPTAC). In particolare, andremo a valutare nei set di dati molecolari riferiti a casi clinici di tumori coloretali la presenza di mutazioni somatiche in corrispondenza delle regioni codificanti per i P-tripeptidi nei potenziali interattori di SMYD3 identificati *in silico*. L'eventuale presenza di alterazioni in corrispondenza dei P-tripeptidi nella sequenza dei nuovi interattori di SMYD3 rappresenterà un'ulteriore conferma della validità del nostro approccio analitico *in silico* per l'identificazione di nuovi interattori di SMYD3.

OBIETTIVO 2:

In questa fase del progetto valuteremo *in cellulo* la possibilità che SMYD3 interagisca fisicamente con i principali mediatori delle cascate di segnalazione delle fasi della cancerogenesi identificati nella precedente analisi *in silico*.

Obiettivo 2a: *Valutazione dei livelli di espressione di SMYD3 e dei nuovi interattori nei modelli di cellule coloretali selezionati per la validazione delle nuove interazioni di SMYD3.*

Una volta identificati *in silico* i potenziali interattori di SMYD3, prima di procedere alla validazione *in cellulo* delle nuove interazioni, andremo innanzitutto a valutare i livelli di espressione di SMYD3 e dei potenziali interattori nelle linee HCEC-1CT (linee di colonociti normali), in HCT116 (linee di CCR) e in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti. In particolare, dovendo valutare delle interazioni endogene dobbiamo assicurarci di utilizzare linee cellulari esprimenti elevati livelli di SMYD3 e competenti per l'espressione degli interattori in esame e delle cascate di segnalazione in cui essi intervengono.

Obiettivo 2b: *Validazione delle nuove interazioni di SMYD3 in linee cellulari di colon retto che mimano gli stadi della cancerogenesi (in HCT116, linee di CCR e in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti e in HCEC-1CT, linee di colonociti normali).*

Ogni nuova interazione di SMYD3 sarà validata attraverso saggi di co-immunoprecipitazione che ci permetteranno di valutare l'interazione tra i livelli endogeni di SMYD3 e dei suoi nuovi partner in differenti modelli di linee cellulari di colon retto (HCEC-1CT, linee di colonociti normali; in HCT116, linee di CCR e in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti). Come modelli per la validazione *in cellulo* delle nuove interazioni di SMYD3 sono stati selezionati le linee HCEC-1CT, (colonociti normali) come controllo, le HCT116 (linee primarie di cancro coloretale) e le linee cellulari staminali di CCR derivanti da pazienti (stadio III e stadio IV della progressione tumorale) che mimano i diversi stadi della cancerogenesi. Al termine della validazione *in cellulo*, per avere una visione d'insieme delle nuove interazioni di SMYD3 nelle diverse fasi della cancerogenesi, costruiremo un nuovo interattoma di SMYD3. Tale interattoma rappresenterà la mappa che ci guiderà nella fase successiva del progetto, ovvero la valutazione della risposta allo stress mediata da SMYD3.

Obiettivo 2c: *Valutazione della risposta allo stress mediata da SMYD3 in diversi modelli di linee cellulari coloretali (HCEC-1CT, HCT116 e in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti).*

Al fine di investigare sul possibile ruolo di SMYD3 come modulatore della risposta allo stress nelle diverse fasi della cancerogenesi effettueremo i saggi di co-immunoprecipitazione in assenza ed in presenza di stimoli stressori. In particolare,

in ogni modello di linee cellulari di colon retto (HCEC- 1CT, HCT116, in cellule staminali di CCR derivanti da pazienti) utilizzato per validare le interazioni di SMYD3 impiegheremo differenti stimoli stressori (metabolico, ossidativo, genotossico e ipossico) per valutarne gli effetti sull'espressione di SMYD3 e sull'interazione in esame. In particolare, per indurre lo stress metabolico utilizzeremo basse concentrazioni di glucosio (0,75 mM per 24 ore), per quello ossidativo utilizzeremo il perossido di idrogeno (1mM per 24 ore), per quello genotossico impiegheremo la doxorubicina (1µm per 6h) e per indurre lo stress ipossico l'idralazina (50 µm per 24 ore). Inoltre, al termine di ogni trattamento per valutare la risposta ai diversi stimoli stressori esamineremo l'espressione di SMYD3 e dei suoi nuovi interattori mediante real time PCR (mRNA) e analisi per immunoblotting (proteina, densitometria) dei lisati cellulari.

OBIETTIVO 3:

Con l'identificazione di nuove interazioni di SMYD3 si definirebbero nuovi meccanismi oncogenici nelle tre fasi della cancerogenesi (precoce, intermedia e tardiva) che certamente andrebbero approfonditi dal punto di vista funzionale attraverso studi successivi, ma che da subito offrono spunti promettenti per nuovi approcci di terapie combinate (co-targeting, a doppio bersaglio e letale sintetico) nella medicina di precisione delle terapie antitumorali del cancro coloretale. Infatti, in questa fase del progetto andremo ad analizzare l'effetto sulla vitalità cellulare di linee tumorali e staminali tumorali di CCR, dei trattamenti combinati di inibitori di SMYD3 (SMYD3i) associati ad inibitori farmacologici dei suoi nuovi interattori già in uso nella pratica clinica. Per esempio, consideriamo l'interazione tra SMYD3 e MET, uno dei nuovi interattori di SMYD3 già identificati con lo stesso approccio *in silico* nel nostro recentissimo studio (Fasano et al. in fase di revisione presso la rivista "*Computational and Structural Biotechnology Journal*"), andremo a valutare gli effetti sulla vitalità cellulare dell'inibizione combinata di SMYD3 e MET, due effettori oncogeni sinergici. Un approccio di co-targeting che includa SMYD3 potrebbe potenziare l'efficacia clinica dell'inibizione del MET in pazienti resistenti al solo inibitore MET (tivantinib), favorendo una risensibilizzazione delle cellule tumorali alla terapia.

Dopo i trattamenti, la vitalità cellulare sarà valutata indirettamente monitorando l'apoptosi attraverso i seguenti test: MTT/proliferazione, analisi di crescita clonogenica, analisi FACS (Annessina V/PI).

Dati Preliminari:

In un nostro recente studio abbiamo caratterizzato una nuova funzione di SMYD3 nel riparo del DNA per ricombinazione omologa in cellule tumorali di cancro del colon e della mammella. In particolare, abbiamo identificato ATM, BRCA2 e CHK2 come nuovi diretti interattori di SMYD3 nella formazione del complesso di riparo del DNA che favorisce il reclutamento di RAD51 sui foci di danno e quindi il riparo del DNA per ricombinazione omologa nelle cellule tumorali esaminate [6]. La caratterizzazione di questi nuovi interattori di SMYD3 è avvenuta partendo da una libreria di composti tripeptidici P1- P19 che *in vitro* mostravano una specifica affinità di legame per SMYD3 osservata per SPR (Risonanza plasmonica di superficie). Successivamente questi tripeptidi sono stati utilizzati *in silico* come sonde di sequenza per screenare l'intero proteoma umano al fine di selezionare le proteine aventi questi tripeptidi (P-proteine) con l'idea che i tripeptidi fossero motivi consenso di sequenza per l'interazione con SMYD3. Lo screening tripeptidico *in silico* del proteoma umano ci ha permesso di identificare 8650 proteine umane (P-proteine) contenenti i nostri P-tripeptidi e quindi per questo eleggibili come nuovi potenziali interattori di SMYD3 [6]. Tra le 8650 P-proteine solo 214 proteine mostravano un arricchimento in P-tripeptidi (almeno 4 diversi tripeptidi). Analizzando la funzione biologica di queste 214 proteine ricche in tripeptidi abbiamo osservato una prevalenza di proteine coinvolte nel riparo del DNA tra cui BRCA2 e ATM. Le interazioni di SMYD3 con ATM, BRCA2, e CHK2 sono state caratterizzate *in vitro* e *in cellulo* e attraverso saggi di competizione *in vitro* abbiamo confermato il coinvolgimento diretto dei P-tripeptidi nel legame di SMYD3 a BRCA2 e ATM [6].

Una vasta letteratura corrente conferma che brevi peptidi lineari, come i tripeptidi, mediano una miriade di interazioni tra proteine. In effetti, i tripeptidi rappresentano i minimi determinanti strutturali e funzionali che mediano le interazioni proteiche [23–27]. In aggiunta, i nostri P-tripeptidi sono prevalentemente composti da amminoacidi rari cioè amminoacidi codificati da pochi (1-3) codoni, che secondo la "teoria degli amminoacidi rari" si localizzano in corrispondenza di domini funzionali delle proteine [28,29]. Diversi studi computazionali infatti, supportano l'ipotesi che gli amminoacidi rari, abbiano un significato biologico maggiore rispetto agli amminoacidi più comuni (che sono codificati da 4-6 codoni) nel "cell talk" biologico [28–30].

I nostri studi sul ruolo oncogenico di SMYD3 sono proseguiti al fine di identificare nuovi suoi interattori con ruoli chiave nelle principali vie di segnalazione della cancerogenesi e della progressione tumorale, ovvero coinvolti in uno o più processi distintivi (hallmarks) del cancro.

Abbiamo quindi eseguito un'analisi di clusterizzazione funzionale *in silico* delle 8650 P-proteine ricavate dal nostro precedente screening *in silico*. In primis, abbiamo selezionato per ogni hallmark del cancro le più pertinenti vie di segnalazione cancro-specifiche riportate nel database Reactome utilizzando un criterio omnicomprensivo per essere certi di includere nell'analisi il maggior numero di proteine possibile. Tra le 8.650 P-proteine iniziali, abbiamo osservato un arricchimento (2.108 proteine, corrispondenti all'1,2% dell'intero proteoma umano e al 24,4% dell'intero set iniziale di P-proteine) di proteine coinvolte nei processi distintivi del cancro. In aggiunta nel set delle 2.108 proteine associate agli hallmarks del cancro, 130 proteine contengono almeno quattro diversi tripeptidi P (Fig. 1, Tabella 1). Successivamente, tra le 2.108 P-proteine incluse nei raggruppamenti di Reactome associati ai segni distintivi del cancro, abbiamo calcolato la percentuale (Tabella 1). Da notare, i cluster di Reactome relativi ai segni distintivi del cancro "induzione dell'angiogenesi", "instabilità e mutazioni del genoma", "deregolazione energetica cellulare" e "sostegno dei segnali proliferativi" hanno mostrato la più alta percentuale di P-proteine riportata in grassetto nella tabella 1 ($\geq 45\%$) (Tabella 1).

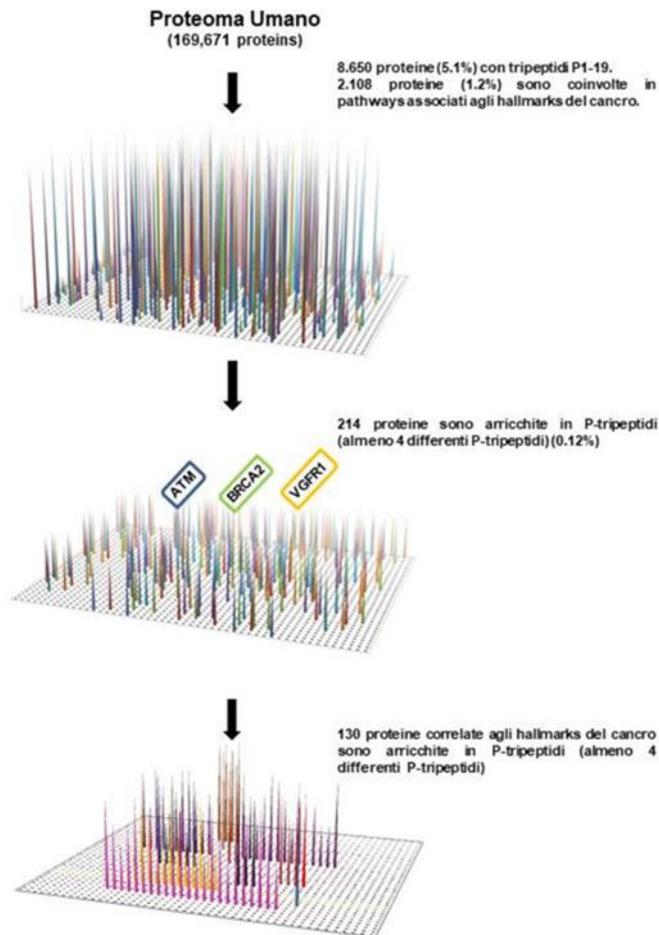


Figura 1: Schema procedurale dell'analisi della distribuzione dei P-tripeptidi nel proteoma umano. Il proteoma umano è stato sottoposto a screening tripeptidico per cercare corrispondenze esatte di ciascun P-tripeptide nelle proteine umane. Tra le 8.650 P-proteine identificate, 2.108 proteine (escludendo le ripetizioni) sono coinvolte in pathways correlati ai segni distintivi del cancro e solo 214 (escludendo le ripetizioni) contengono almeno quattro diversi P-tripeptidi. In questo sottoinsieme, 130 proteine (escludendo le ripetizioni) sono incluse in cluster relativi ai segni distintivi del cancro. Le proteine sono state raggruppate in base alla loro funzione biologica annotata nella corrispondente entry di Uniprot e in base ai pathway in cui intervengono riportati nel database Reactome (<https://reactome.org/>).

Tabella 1: Clusterizzazione *in silico* delle P-proteine nei gruppi funzionali degli hallmarks del cancro a cui corrispondono una più vie di segnalazione cellulari annotate nel server Reactome (<https://reactome.org/>). In grassetto le più alte percentuali di P-proteine associate funzionalmente ad uno specifico hallmark.

Hallmarks of cancer	Pertinent Reactome pathways (Reactome ID)	Total proteins included in pertinent Reactome pathways	Total P-proteins included in pertinent Reactome pathways	% of P-proteins on total proteins included in pertinent Reactome pathways
Avoiding immune destruction	Immune system (R-HSA-168256.7)	2249	872	38.80%
Enabling replicative immortality	Telomere Maintenance (R-HSA-157579.5)	93	28	30.10%
Tumor-promoting inflammation	Costimulation by the CD28 family (R-HSA-388841.4) Inflammasomes (R-HSA-622312.1) Cytokine Signaling in Immune System (R-HSA-1280215.5)	856	277	32.40%
Activating invasion & metastasis	Signaling by MET (R-HSA-6806834.2) Signaling by TGF-beta Receptor Complex in Cancer (R-HSA-3304351.2) TGF-beta receptor signaling in EMT (R-HSA-2173791.1) Signaling by NOTCH4 (R-HSA-9013694.2) Signaling by NOTCH3 (R-HSA-9012852.2)	194	79	40.70%
Inducing angiogenesis	Signaling by VEGF (R-HSA-194138.2)	108	55	50.90%
Genome instability & mutation	DNA Repair (R-HSA-73894.3)	314	147	46.80%
Resisting cell death	Programmed Cell Death (R-HSA-5357801.2)	217	73	33.60%
Deregulating cellular energetics	Metabolism (R-HSA-1430728.10)	2146	987	46%
Sustaining proliferative signaling	Signaling by EGFR (Reactome Id: R-HSA-177929.2)	52	26	48%
Evading growth suppressors	Cell Cycle Mitotic (R-HSA-69278.4) Diseases of mitotic cell cycle (R-HSA-9675126.2)	540	225	41.60%

Con questo approccio computazionale, abbiamo identificato in ognuno dei 10 cluster degli hallmarks del cancro interattori noti di SMYD3. Tra gli interattori noti di SMYD3 ritroviamo RPB1 associato all' hallmark del "sostegno dei segnali proliferativi"; AKT1 associato all' hallmark "meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore"; VGFR1 associato all' hallmark "induzione dell' angiogenesi"; ATM, BRCA2 e CHK2 associati all' hallmark "instabilità e mutazioni del genoma"; HSP90 associato all' hallmark della "resistenza alla morte cellulare programmata". I restanti cinque hallmarks del cancro (evasione ai segnali di soppressione della crescita cellulare; evasione dal controllo immunitario; attivazione dell' immortalità replicativa; attivazione dell' invasione e della metastatizzazione; deregolazione del metabolismo energetico) non presentavano interattori noti di SMYD3. Analizzando i gruppi di proteine associate ai cinque hallmarks per i quali finora non era noto alcun interattore di SMYD3, abbiamo selezionato come nuovi potenziali interattori di SMYD3 quelle proteine che presentavano un arricchimento in P-tripeptidi e soprattutto un ruolo oncogenico rilevante nell' hallmark a cui afferivano. Sorprendentemente, questa analisi computazionale ci ha permesso di identificare *in silico* nuovi interattori di SMYD3 cruciali nei processi distintivi del cancro, come mTOR associato all' evasione dal controllo immunitario, BLM associato all' attivazione dell' immortalità replicativa, MET associato all' attivazione dell' invasione e della metastatizzazione tumorale, AMPK associato alla deregolazione del metabolismo energetico e in fine p130 (RBL2) associato all' evasione ai segnali di soppressione della crescita cellulare. Queste interazioni sono state successivamente validate attraverso saggi di co-immunoprecipitazione in linee cellulari di tumori gastrointestinali (Fig. 2, 3).

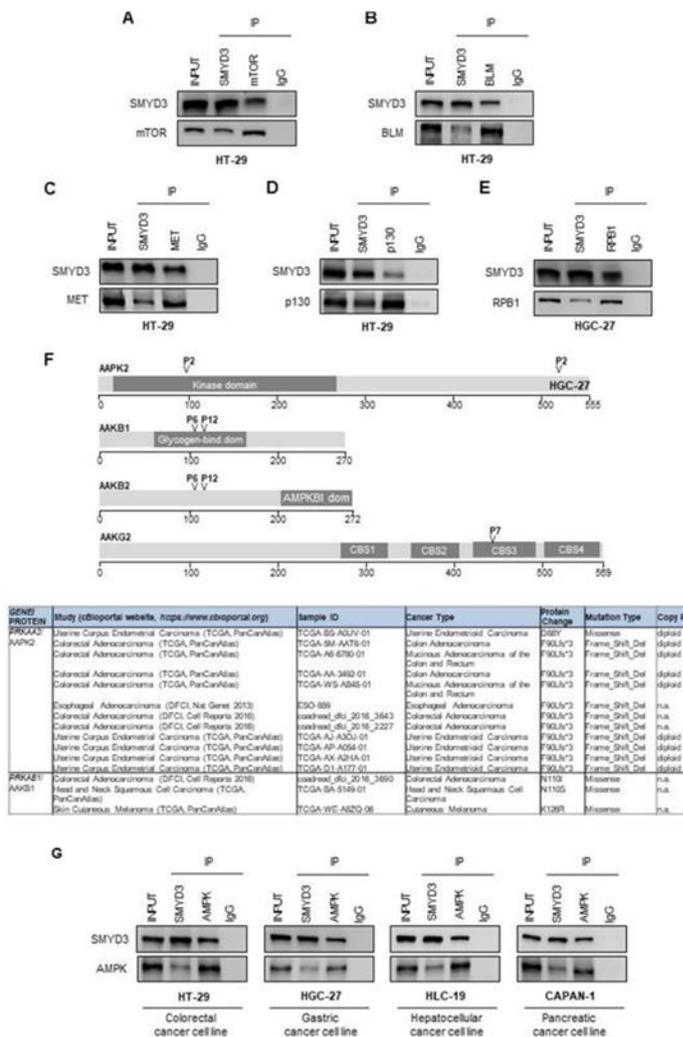


Figura 2: Validazione *in cellulo* delle interazioni di SMYD3 identificate *in silico*.

A-E Validazione delle interazioni di SMYD3 in linee cellulari di tumori gastrointestinale. Co-immunoprecipitazione di SMYD3 e mTOR (A), BLM (B), MET (C), p130 (D) e RPB1 (E) endogeni, utilizzando anticorpi specifici in cellule di cancro coloretale HT-29 (A-D) e di tumore gastrico HGC-27 cellule (E). RPB1 è stato utilizzato come controllo della nostra analisi *in silico*. L'input corrisponde al 10% del lisato. Gli anti-IgG sono stati utilizzati come controlli negativi. I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti. (F) Pannello superiore: localizzazione dei P- tripeptidi nei domini specifici delle subunità di AMPK. Pannello inferiore: alterazioni genetiche somatiche in corrispondenza dei P-tripeptidi delle subunità A2 e B1 di AMPK, riportate nei dati molecolari di pazienti oncologici disponibili nel database cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). (G) Validazione dell'interazione SMYD3-AMPK in linee cellulari di cancro gastrointestinale. Co-immunoprecipitazione di SMYD3 e AMPK endogeni utilizzando anticorpi anti-SMYD3 e anti-AMPK in cellule di cancro coloretale, HT-29; in cellule di cancro gastrico, HGC-27; in cellule di epatocarcinoma, HLC-19 e in cellule di tumore pancreatico, CAPAN-1. L'input corrisponde al 10% del lisato. Gli anti-IgG sono stati utilizzati come controlli negativi. I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

Si noti che l'interazione tra SMYD3 e AMPK è stata confermata in diverse linee di tumori gastrointestinali, supportando il coinvolgimento di SMYD3 nella riprogrammazione del metabolismo energetico correlata al cancro (Fig.2, Fig.3).

AMPK è una proteina eterotrimerica comprendente due subunità A catalitiche (AAK1 e AAK2), due subunità B regolatorie (AAKB1 e AAKB2) e tre subunità G non catalitiche (AAKG1, AAKG2 e AAKG3) [31].

Curiosamente, le subunità A, B e G di AMPK presentano almeno un P-tripeptide. In particolare, abbiamo trovato un P-tripeptide nel dominio chinasi di AAK2, quattro nelle subunità AAKB (due nel dominio di legame del glicogeno e due nella regione centrale di AAKB2) e un P-tripeptide nel dominio CBS3 della subunità G2 (Fig. 3F). Analizzando i profili delle

mutazioni somatiche dei geni codificanti per le diverse subunità di AMPK si osserva che soprattutto nei tumori gastrointestinali le mutazioni somatiche dei geni PRKAA2 e PRKAB1 comportano alterazioni della sequenza proteica in corrispondenza dei P-tripeptidi (Fig. 3F). Questa evidenza ci conferma la significatività biologica dei P-tripeptidi. Ad oggi, questo studio è in fase di revisione presso la rivista "Computational and Structural Biotechnology Journal" (IF=7,3).

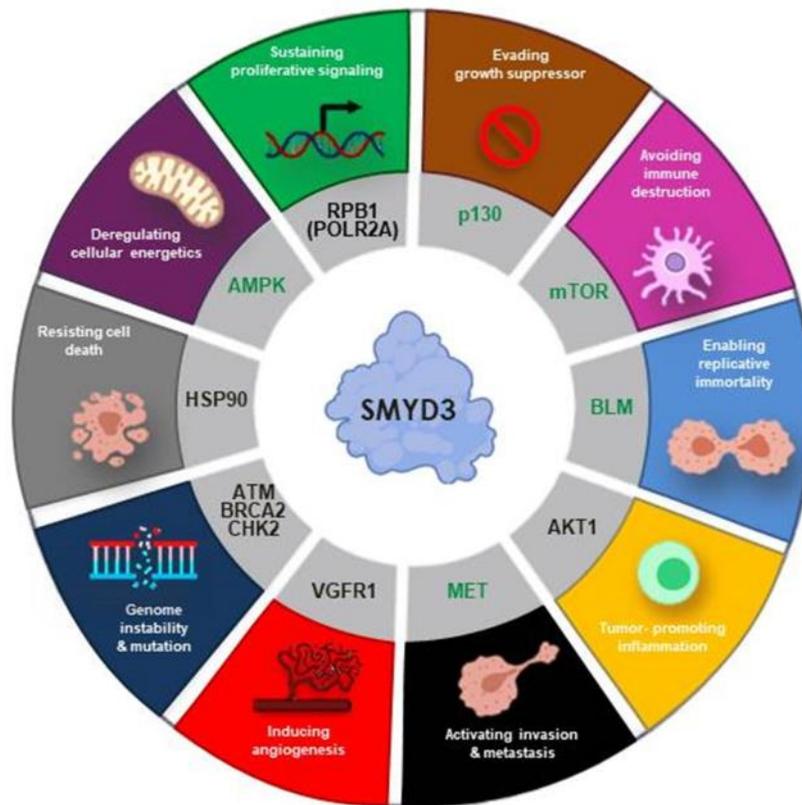


Figura 3: Diagramma degli interattori di SMYD3 coinvolti negli Hallmarks del cancro. Nel cerchio interno del diagramma sono riportati in nero gli interattori SMYD3, mentre i nuovi interattori SMYD3 identificati in questo studio sono mostrati in verde.

Metodologie e Analisi statistiche:

Analisi *in silico*

-Clusterizzazione delle P-proteine rispetto alle tre fasi della cancerogenesi.

Analizzeremo *in silico* le informazioni riportate nei database UniProt e Reactome per raggruppare le P- proteine del precedente screening in tre cluster proteici sulla base della loro funzione oncogenica. I tre cluster proteici comprenderanno: a) le P- proteine coinvolte nella fase precoce della cancerogenesi; b) le P- proteine coinvolte nella fase intermedia della cancerogenesi; c) le P- proteine coinvolte nella fase tardiva della cancerogenesi. Nel primo gruppo rientreranno tutte le proteine associate all'instabilità e le mutazioni del genoma, la resistenza alla morte cellulare programmata e la resistenza ai soppressori della crescita cellulare [2,3]. Nel secondo gruppo saranno incluse tutte le proteine associate alla fase intermedia della cancerogenesi in cui le cellule neoplastiche acquisiscono capacità di eludere il sistema immunitario, di attivare meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore, di attivare l'immortalità replicativa e la riprogrammazione metabolica [2,3]. Nel terzo gruppo saranno incluse le proteine che rientrano nella fase tardiva della cancerogenesi in cui la cellula attiva costitutivamente vie di segnalazione della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasione e della metastatizzazione [2,3].

-Analisi quantitativa e qualitativa delle proteine che rientrano nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi.

Calcolo del numero complessivo di P-proteine che rientrano in ognuno dei tre clusters rappresentativo delle tre fasi della cancerogenesi. Parallelamente andremo a calcolare la frequenza (n. matches) dei P- tripeptidi contenuti nelle proteine di ogni cluster delle fasi della cancerogenesi. Successivamente analizzeremo i pathway oncogenici riportate nel database Reactome per ogni proteina dei tre clusters.

-Costruzione dell'interattoma aggiornato di SMYD3.

Per avere una visione d'insieme delle nuove interazioni di SMYD3 nelle diverse fasi della cancerogenesi, costruiremo un nuovo interattoma di SMYD3 utilizzando lo strumento My Payload plus (STRING database e Cytoscape) per personalizzare la rete di interazioni di SMYD3 con tutte le proteine interagenti rappresentate come nodi. Nell'interattoma tutte le proteine interagenti sono indicate con il loro corrispondente entry name del database Swiss-Prot. L'analisi delle interazioni sarà impostata su un livello di rigore medio (punteggio STRING=0,4). Secondo i criteri predefiniti del database STRING, le proteine risulteranno collegate da linee continue di diverso colore e spessore. Il colore della linea di connessione varia a seconda dell'evidenza di associazione tra le due proteine connesse (fusione genica, co-occorrenza, co-espressione, prove sperimentali, etc). Lo spessore delle linee di connessione tra due nodi è proporzionale al livello di confidenza dell'associazione.

- Analisi dei profili mutazionali dei nuovi interattori di SMYD3 in dataset di tumori colorettali. Inerogheremo i portali proteogenomici *CBioPortal*, *TCGA* e *CPTAC* al fine di confermare la significatività biologica dei P-tripeptidi come motivi consenso per l'interazione con SMYD3. In particolare, andremo a valutare nei set di dati molecolari riferiti a casi clinici di tumori colorettali la presenza di mutazioni somatiche in corrispondenza delle regioni codificanti per i P-tripeptidi nei potenziali interattori di SMYD3 identificati *in silico*.

Colture cellulari

Tutte le linee cellulari che useremo in questo progetto sono già disponibili presso il nostro laboratorio. Le HCT116 saranno coltivate in DMEM ad alto contenuto di glucosio (HG) senza piruvato (#11360-070, Gibco) con 10% FBS (#0270-106, Gibco) e 100 UI/ml di penicillina-streptomina (#15140-122, Gibco). Le cellule HCEC-1CT saranno coltivate in terreno COLO-UP (Evercyte) integrato con 100 UI/ml penicillina-streptomina (#15140-122, Gibco). Le cellule saranno propagate in condizioni standard ad una confluenza massima del 60% per ogni passaggio. Le cellule staminali di pazienti con CCR saranno propagate come precedentemente descritto [32]. Tutte le linee cellulari saranno testate più volte durante lo studio con kit specifici (#117048; Minerva Biolabs) per essere certi che siano prive di infezioni da micoplasma. Tutte le colture cellulari saranno mantenute in coltura in un incubatore umidificato a 37°C e 5% CO₂.

Saggi di vitalità cellulare

La vitalità cellulare sarà valutata utilizzando il kit di test di vitalità cellulare luminescente CellTiter-Glo (G7570, Promega) secondo le indicazioni del produttore Istruzioni. Il segnale luminescente è stato letto utilizzando a Lettore di micropiastre SPECTROstar Omega (BMG Labtech). Per valutare la vitalità delle cellule staminali di CCR utilizzeremo il kit di imaging cellulare LIVE/DEAD® (R37601, Thermo Fisher Scientific) secondo le indicazioni del produttore.

In fine dopo i trattamenti con basse concentrazioni di glucosio e con agenti genotossici, ossidanti e ipossici, la vitalità cellulare sarà valutata indirettamente monitorando l'apoptosi attraverso i seguenti test: MTT/proliferazione, analisi di crescita clonogenica, analisi FACS (Annessina V/PI). Analogamente si procederà per valutare la vitalità cellulare dopo i trattamenti combinati con inibitori farmacologici di SMYD3 e dei nuovi interattori identificati nello studio.

Co-immunoprecipitazioni

Le cellule sono state raccolte e omogeneizzate in tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl e 1% Triton X-100) integrato con inibitori di proteasi e fosfatasi. L'accoppiamento tra Dynabeads Protein A (10002D, Thermo Fisher Scientific) o Dynabeads Protein G (10003D, Thermo Fisher Scientific) e gli anticorpi è stato eseguito in 100 µl di Tween 20-1X PBS allo 0,01% per 45 minuti a temperatura ambiente su una piattaforma oscillante. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con complessi anticorpo-sfere. Gli immunocomplessi sono stati lavati ampiamente, sottoposti a ebollizione in tampone Laemmli e sottoposti ad analisi SDS-PAGE e immunoblot. Le IgG sono state utilizzate come controllo negativo.

Risultati attesi:

Con la presente proposta progettuale ci aspettiamo di approfondire il ruolo oncogenico di SMYD3 nella cancerogenesi del cancro coloretale identificando suoi nuovi interattori con ruoli oncogenici altrettanto rilevanti nelle diverse fasi della cancerogenesi del cancro del colon retto. Dal punto di vista terapeutico identificare nuove interazioni tra SMYD3 e nuovi effettori di rilievo in pathway oncogenici significa poter valutare il potenziale della manipolazione di SMYD3 per aumentare la chemiosensibilizzazione delle attuali terapie del cancro del colon retto e più in generale di tumori caratterizzati da elevate espressioni di SMYD3. In particolare, nuovi approcci terapeutici per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3, basati sull'uso di inibitori *small molecule* di SMYD3, può aiutare a superare la resistenza tumorale ai farmaci esistenti, così da permettere non solo di ridurre la dose e gli effetti collaterali, ma anche di trattare i tumori che non rispondono alle comuni terapie. Infine, sulla base del ruolo oncogenico di ogni interattore di SMYD3 si possono valutare differenti approcci terapeutici combinati (co-targeting, dual targeting, letale sintetico) a cui associare l'inibizione farmacologica di SMYD3.

Per esempio, considerando l'interazione tra SMYD3 e MET, uno dei nuovi interattori di SMYD3 già identificati nel nostro recentissimo studio (Fasano et al. in fase di revisione presso la rivista "*Computational and Structural Biotechnology Journal*"), potremmo valutare gli effetti sulla vitalità cellulare dell'inibizione combinata di SMYD3 e MET che rappresentano due effettori oncogeni sinergici. In particolare, un approccio di co-targeting che includa SMYD3 potrebbe potenziare l'efficacia clinica dell'inibizione del MET in pazienti resistenti al solo inibitore MET (tivantinib), favorendo una risensibilizzazione delle cellule tumorali alla terapia.

Innovazioni:

In questo progetto sarà impiegata una metodologia innovativa di analisi *in silico* che, come dimostrato nei nostri recentissimi studi [6, Fasano et al. *Computat. Struct. Biotech. J* under review], permette di identificare in generale nuove interazioni proteina-proteina e nel caso specifico sono interazioni tra SMYD3 e altri effettori di rilievo delle principali vie del cancro. Questo approccio potrebbe essere adatto per definire la rete dell'interattoma di molte altre proteine. La nostra metodologia si basa su un solido rationale: abbiamo identificato i tripeptidi che sono in grado di legarsi a SMYD3 *in vitro* e abbiamo usato queste brevi sequenze aminoacidiche come sonde *in silico* per cercare tutte le proteine che li contengono e che per tale caratteristica possono quindi essere considerati potenziali interattori di SMYD3. Il passaggio critico in questa analisi *in silico* è la scelta della lunghezza minima della sonda peptidica da impiegare per uno screening del proteoma umano che sia significativo dal punto di vista statistico e che allo stesso tempo non escluda proteine promettenti ai fini dello scopo dell'analisi *in silico*. Affinchè lo screening *in silico* di un proteoma non sia stocastico è fondamentale che le sonde peptidiche scelte per l'analisi abbiano caratteristiche biochimico-molecolari peculiari. Nel nostro screening *in silico*, da cui parte lo studio proposto in questo progetto, abbiamo utilizzato i tripeptidi come sonda per screenare il proteoma umano, che sono considerati i motivi consenso più brevi in grado di mediare le interazioni proteiche. In aggiunta, tali tripeptidi (P1-P19) presentano come peculiarità molecolare la prevalente composizione in amminoacidi rari. Gli amminoacidi rari, sono amminoacidi codificati da un basso numero di codoni che, come dimostrato dalla teoria degli amminoacidi rari, hanno un significato biologico più elevato rispetto agli amminoacidi più frequenti nella composizione delle proteine. Infatti, crescenti evidenze dimostrano che gli amminoacidi rari giocano un ruolo chiave nella funzione della proteina costituendo domini funzionali e motivi consenso di interazione proteica [28–30].

Bibliografia:

1. Gout, A.M.; Arunachalam, S.; Finkelstein, D.B.; Zhang, J. Data-Driven Approaches to Advance Research and Clinical Care for Pediatric Cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2021**, *1876*, 188571, doi:10.1016/j.bbcan.2021.188571.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Senga, S.S.; Grose, R.P. Hallmarks of Cancer-the New Testament. *Open Biol.* **2021**, *11*, 200358, doi:10.1098/rsob.200358.
4. Galluzzi, L.; Yamazaki, T.; Kroemer, G. Linking Cellular Stress Responses to Systemic Homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 731–745, doi:10.1038/s41580-018-0068-0.
5. Bottino, C.; Peserico, A.; Simone, C.; Caretti, G. SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12010142.

6. Sanese, P.; Fasano, C.; Buscemi, G.; Bottino, C.; Corbetta, S.; Fabini, E.; Silvestri, V.; Valentini, V.; Disciglio, V.; Forte, G.; et al. Targeting SMYD3 to Sensitize Homologous Recombination-Proficient Tumors to PARP-Mediated Synthetic Lethality. *iScience* 2020, 23, 101604, doi:10.1016/j.isci.2020.101604.
7. Zhu, C.-L.; Huang, Q. Overexpression of the SMYD3 Promotes Proliferation, Migration, and Invasion of Pancreatic Cancer. *Dig. Dis. Sci.* 2020, 65, 489–499, doi:10.1007/s10620-019-05797-y.
8. Mazur, P.K.; Reynoird, N.; Khatri, P.; Jansen, P.W.T.C.; Wilkinson, A.W.; Liu, S.; Barbash, O.; Van Aller, G.S.; Huddleston, M.; Dhanak, D.; et al. SMYD3 Links Lysine Methylation of MAP3K2 to Ras-Driven Cancer. *Nature* 2014, 510, 283–287, doi:10.1038/nature13320.
9. Sarris, M.E.; Moulos, P.; Haroniti, A.; Giakountis, A.; Talianidis, I. Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development. *Cancer Cell* 2016, 29, 354–366, doi:10.1016/j.ccell.2016.01.013.
10. Fenizia, C.; Bottino, C.; Corbetta, S.; Fittipaldi, R.; Floris, P.; Gaudenzi, G.; Carra, S.; Cotelli, F.; Vitale, G.; Caretti, G. SMYD3 Promotes the Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, 1278–1293, doi:10.1093/nar/gky1221.
11. Zhu, Y.; Zhu, M.-X.; Zhang, X.-D.; Xu, X.-E.; Wu, Z.-Y.; Liao, L.-D.; Li, L.-Y.; Xie, Y.-M.; Wu, J.-Y.; Zou, H.-Y.; et al. SMYD3 Stimulates EZR and LOXL2 Transcription to Enhance Proliferation, Migration, and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Hum. Pathol.* 2016, 52, 153–163, doi:10.1016/j.humpath.2016.01.012.
12. Jiang, Y.; Lyu, T.; Che, X.; Jia, N.; Li, Q.; Feng, W. Overexpression of SMYD3 in Ovarian Cancer Is Associated with Ovarian Cancer Proliferation and Apoptosis via Methylating H3K4 and H4K20. *J. Cancer* 2019, 10, 4072–4084, doi:10.7150/jca.29861.
13. Thomenius, M.J.; Totman, J.; Harvey, D.; Mitchell, L.H.; Riera, T.V.; Cosmopoulos, K.; Grassian, A.R.; Klaus, C.; Foley, M.; Admirand, E.A.; et al. Small Molecule Inhibitors and CRISPR/Cas9 Mutagenesis Demonstrate That SMYD2 and SMYD3 Activity Are Dispensable for Autonomous Cancer Cell Proliferation. *PLoS One* 2018, 13, e0197372, doi:10.1371/journal.pone.0197372.
14. Hamamoto, R.; Furukawa, Y.; Morita, M.; Iimura, Y.; Silva, F.P.; Li, M.; Yagyu, R.; Nakamura, Y. SMYD3 Encodes a Histone Methyltransferase Involved in the Proliferation of Cancer Cells. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6, 731–740, doi:10.1038/ncb1151.
15. Hamamoto, R.; Silva, F.P.; Tsuge, M.; Nishidate, T.; Katagiri, T.; Nakamura, Y.; Furukawa, Y. Enhanced SMYD3 Expression Is Essential for the Growth of Breast Cancer Cells. *Cancer Sci.* 2006, 97, 113–118, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00146.x.
16. Liu, C.; Fang, X.; Ge, Z.; Jalink, M.; Kyo, S.; Björkholm, M.; Gruber, A.; Sjöberg, J.; Xu, D. The Telomerase Reverse Transcriptase (HTRT) Gene Is a Direct Target of the Histone Methyltransferase SMYD3. *Cancer Res.* 2007, 67, 2626–2631, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4126.
17. Zou, J.-N.; Wang, S.-Z.; Yang, J.-S.; Luo, X.-G.; Xie, J.-H.; Xi, T. Knockdown of SMYD3 by RNA Interference Down-Regulates c-Met Expression and Inhibits Cells Migration and Invasion Induced by HGF. *Cancer Lett.* 2009, 280, 78–85, doi:10.1016/j.canlet.2009.02.015.
18. Zhou, Z.; Jiang, H.; Tu, K.; Yu, W.; Zhang, J.; Hu, Z.; Zhang, H.; Hao, D.; Huang, P.; Wang, J.; et al. ANKHD1 Is Required for SMYD3 to Promote Tumor Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 2019, 38, 18, doi:10.1186/s13046-018-1011-0.
19. Wang, H.; Liu, Y.; Tan, W.; Zhang, Y.; Zhao, N.; Jiang, Y.; Lin, C.; Hao, B.; Zhao, D.; Qian, J.; et al. Association of the Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism in the Promoter Region of the SMYD3 Gene with Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Relation to Tobacco Smoking. *Cancer Sci.* 2008, 99, 787–791, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00729.x.
20. Wang, Y.; Xie, B.-H.; Lin, W.-H.; Huang, Y.-H.; Ni, J.-Y.; Hu, J.; Cui, W.; Zhou, J.; Shen, L.; Xu, L.-F.; et al. Amplification of SMYD3 Promotes Tumorigenicity and Intrahepatic Metastasis of Hepatocellular Carcinoma via Upregulation of CDK2 and MMP2. *Oncogene* 2019, 38, 4948–4961, doi:10.1038/s41388-019-0766-x.
21. Sanese, P.; Fasano, C.; Simone, C. Playing on the Dark Side: SMYD3 Acts as a Cancer Genome Keeper in Gastrointestinal Malignancies. *Cancers* 2021, 13, 4427, doi:10.3390/cancers13174427.
22. Yoshioka, Y.; Suzuki, T.; Matsuo, Y.; Nakakido, M.; Tsurita, G.; Simone, C.; Watanabe, T.; Dohmae, N.; Nakamura, Y.; Hamamoto, R. SMYD3-Mediated Lysine Methylation in the PH Domain Is Critical for Activation of AKT1. *Oncotarget* 2016, 7, 75023–75037, doi:10.18632/oncotarget.11898.
23. Gouget, A.; Senchou, V.; Govers, F.; Sanson, A.; Barre, A.; Rougé, P.; Pont-Lezica, R.; Canut, H. Lectin Receptor Kinases Participate in Protein-Protein Interactions to Mediate Plasma Membrane- Cell Wall Adhesions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2006, 140, 81–90, doi:10.1104/pp.105.066464.

Progetto 08/2022: "Nanoparticelle Biomimetiche come nuova strategia per il trasporto di farmaci nelle terapie oncologiche del tratto gastro-enterico"

Responsabile: dott.ssa Maria Principia Scavo

Partecipanti: Roberto Negro, Livianna Carrieri, Serena Mancarella, Isabella Gigante, Francesco Dituri, Rosanna Scialpi, Valentina Arrè, Federica Rizzi

Introduzione

Le malattie oncologiche che riguardano il tratto gastroenterico, risultano essere tra le più comuni cause di morte relative all'oncologia nel mondo in entrambi i sessi. Per questi pazienti vi è bisogno di approcci terapeutici su misura avanzati da sviluppare nel quadro della medicina di precisione. Nell'ambito di queste patologie l'infiammazione e l'immunità sono determinanti per lo sviluppo della carcinogenesi, della progressione e della metastatizzazione. Recentemente, Deng et al. ha riportato che i macrofagi associati al tumore (TAMs), risiedenti nel microambiente tumorale, non solo esprimono i recettori dei cluster di differenziazione 68 (CD68) (1), ma sono coinvolti nell'attivazione dell'inflammasoma rispetto ai macrofagi risiedenti nei tessuti non patologici, stimolando, in tal modo, le capacità migratorie e invasive delle cellule tumorali.

L'inflammasoma è un complesso intracellulare multiproteico tipico del sistema immunitario innato che media in prima linea le difese in risposta ad agenti patogeni attraverso l'attivazione e il rilascio delle citochine pro-infiammatorie (2). L'inflammasoma consiste in una proteina sensore, NLRP3, la quale riconosce e lega le molecole induttrici, con conseguente attivazione delle proteine effettrici, quali la caspasi-1 (3). L'attivazione della caspasi-1 produce forme mature delle pro-interleuchine 1 β e 18, così come la forma matura della proteina Gasdermina D, il cui frammento N-terminale si autoassembla formando pori nella membrana plasmatica per il successivo rilascio delle citochine bioattive che inducono l'infiammazione e la morte cellulare, conosciuta come piroptosi dando quindi luogo alla risposta immunitaria sviluppata verso il complesso attivatore (4). Inoltre, una anomala risposta infiammatoria, risulta essere anche associata all'infiammazione che si sviluppa nelle malattie metaboliche, neurodegenerative e maligne. L'infiammazione cronica perpetuata nel tempo gioca un ruolo predominante in tutti gli stadi della tumorigenesi, inclusa l'immunosoppressione, la proliferazione, l'angiogenesi e metastasi (5). A dispetto dell'efficacia terapeutica, l'utilizzo dell'agente chemioterapico, 5-fluoracile (5FU), da solo o associato con altri farmaci quali l'oxaliplatino, la capecitabina o l'irinotecan, ha dimostrato avere limitazioni come l'aumento della farmacoresistenza ed una breve emivita (da 5 a 20 minuti), data dal rapido turnover cellulare nell'organismo umano. Per questo motivo, le somministrazioni multiple ad alto dosaggio, per mantenere invariata la concentrazione terapeutica nel siero, spesso causa una tossicità severa. Lo sviluppo di nuove nanoformulazioni targhettanti ha portato ad un rilascio selettivo ed alternativo delle molecole farmacologiche, che potenzialmente riducono gli effetti collaterali e migliorano la qualità di vita dei pazienti con patologie oncologiche del tratto gastroenterico (6, 7, 8). Le emergenti vescicole extracellulari (EVs) rappresentano delle nanoparticelle naturali che potrebbero essere utilizzate a scopo terapeutico nel rilascio dei componenti farmacologici direttamente nei distretti cellulari colpiti. Le EVs sono nanovesicole rilasciate nello spazio extracellulare sia dalle cellule normali che da quelle patologiche e, possono essere isolate a partire da differenti fluidi biologici come sangue, urine e saliva. Svariati studi hanno messo in evidenza che le EVs derivanti dalle cellule tumorali contengono e trasportano frammenti di acidi nucleici, proteine e lipidi che possono essere trasferiti attivamente in cellule riceventi, con conseguente induzione di modifiche cellulari quali la riprogrammazione, le metastasi e la resistenza terapeutica (9, 10). Le EVs possiedono delle proprietà superficiali peculiari dei tessuti di provenienza e la modifica delle loro proprietà di superficie può causare la riduzione o la completa inattivazione della loro attività. La sintesi di nanoparticelle derivanti da biomateriali organici ed inorganici può migliorare l'attività terapeutica delle EVs nel trattamento dei tumori del tratto gastroenterico mediante la sintesi di nanoparticelle ibride ottenute attraverso la combinazione di nanoparticelle organiche, come liposomi e/o micelle ed EVs. Tali nanoparticelle ibride, possono essere utilizzate come "cavallo di Troia" per il rilascio mirato degli agenti chemioterapici solo sulle cellule tumorali, lasciando integre le cellule normali. La modifica delle proprietà di superficie delle nanoparticelle ibride, mediante l'utilizzo di RNAi/DNAi, sistemi diagnostici e biomolecole sintetiche, consente un targeting specifico. In accordo con questi limiti, abbiamo posto come obiettivo la produzione di nanoparticelle lipidiche innovative basate su nanomedicina, che possano soddisfare determinati requisiti fornendo così lo strumento più moderno e all'avanguardia per il targeting del tumore e il suo microambiente. Le nuove particelle saranno definite come Vescicole Asimmetriche con doppio bilayer (AVs), dove si potranno caricare componenti bioattivi come RNAi/DNAi. Le nostre AVs (Figura 1) hanno una struttura sovramolecolare con bilayer interno (IL) costituito da fosfolipidi a carica positiva e un bilayer esterno (EL) costituito da colesterolo, polietilenglicole e fosfolipidi.

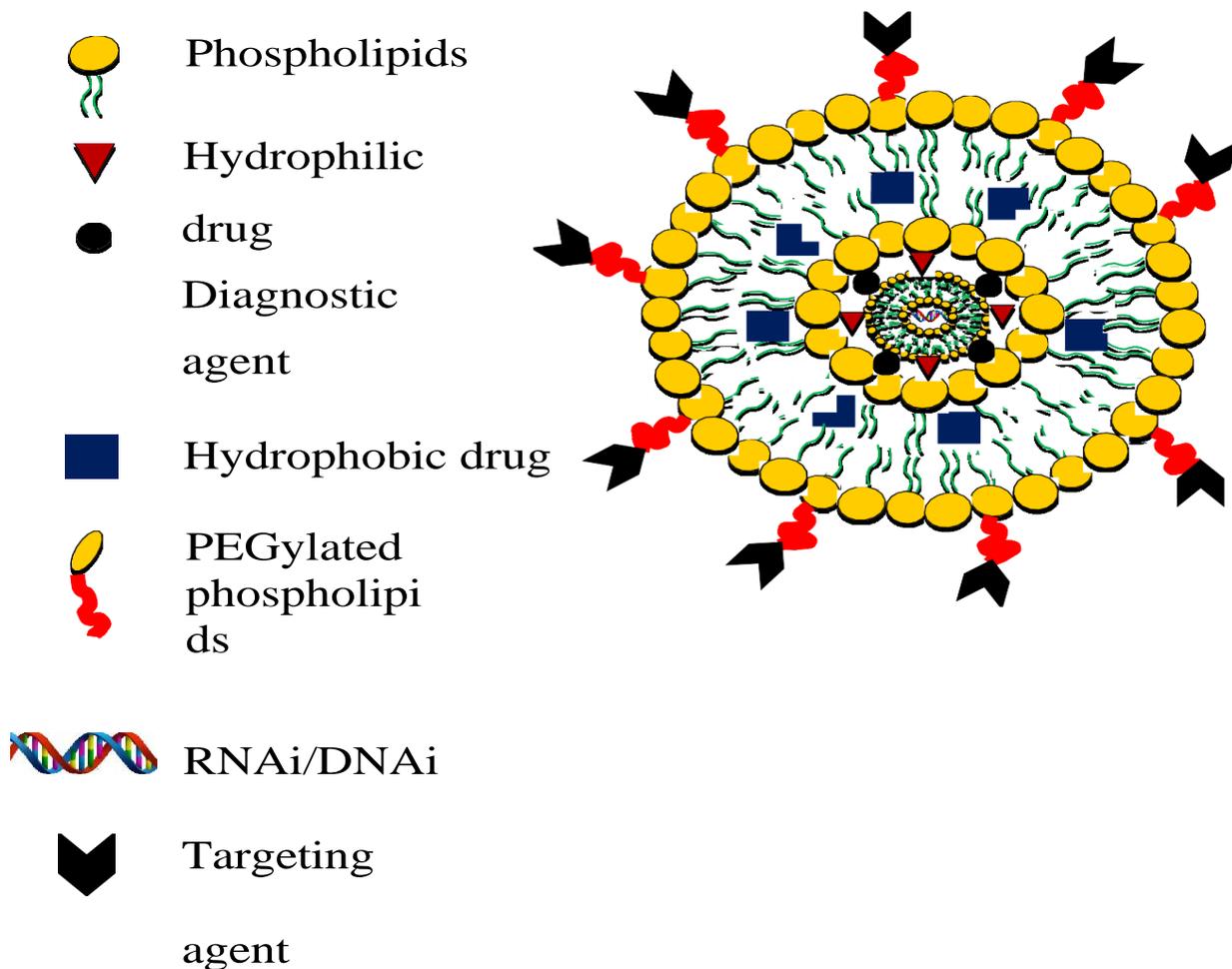


Figura 1: Schema descrittivo e proprietà delle AVs

Tutte queste componenti sono approvate dall'Agencia di Medicina Europea e dalla Food and Drug Administration per uso clinico, non essendo tossiche per macrofagi e per le cellule sane dell'organismo. Il complesso cationico IL con RNAi/DNAi promuove i contatti con le membrane delle cellule con carica netta negativa, producendo un'internalizzazione endocitica, mediante meccanismi clatrina dipendenti o indipendenti. La porzione di EL delle nostre nanoparticelle contenente fosfolipidi, PEG e altri derivati sintetici, come polimeri biocompatibili (acido ialuronico ed i suoi derivati), consente ai macrofagi di internalizzare le AVs legando il recettore per CD68 e/o per l'acido ialuronico, garantendo in tal modo un lungo tempo di circolazione, un basso accumulo nel fegato, nella milza e nel polmone, migliorando la farmacocinetica, la biodistribuzione e l'efficacia terapeutica (11).

Obiettivi specifici dello studio:

Lo sviluppo delle nanoparticelle biomimetiche ibride, basate sull'ingegnerizzazione delle EVs e AVs preserva l'integrità delle componenti biologiche delle membrane, garantendo un targeting specifico, mediante l'utilizzo dell'anticorpo contro il CD68, proteina associata ai macrofagi naturali, e rendendo disponibile il contenuto terapeutico, quale il 5-FU, l'inibitore di NLRP3 (MCC950) e gli siRNA specifici per la Gasdermina D (siGSDMD) per l'inibizione dell'inflammasoma.

La nostra ipotesi di lavoro è schematicamente riassunta nei seguenti punti:

1. Preparazione ed ingegnerizzazione delle nanoparticelle EVs ottenute dalla fusione di EVs con AVs.
2. Caricamento delle nanoparticelle EVs con la combinazione degli siGSDMD nella regione IL della struttura AV (e/o l'inibitore MCC950) e il 5-FU nella regione EL della struttura AV; funzionalizzazione delle loro superfici con l'anticorpo monoclonale anti-CD68 mediante un peptide di adesione al PEG o all'acido ialuronico per il trattamento target dei tumori gastro-enterici. L'overespressione del CD68, infatti, è risaputo essere legata ad uno stato avanzato della malattia, sia nel tessuto tumorale

che nel peri-tumorale. Questi ibridi sono, quindi, eccellenti candidati per l'aumento della concentrazione farmacologica, nonché per la capacità di permeazione dei farmaci antitumorali, degli agenti diagnostici e di contrasto pur per i tessuti tumorali profondi.

3. Tests *in vitro* e *in vivo* per le nanoparticelle ibride targhettanti CD68 utilizzando culture cellulari in 2D e 3D di linee cellulari tumorali, normali di stomaco e di colon per investigare i loro effetti sulla vitalità cellulare e sulla capacità di internalizzazione. Gli esperimenti *in vivo* invece, saranno effettuati utilizzando topi APC/min+, considerati un eccellente modello per il cancro coloretale umano. Mentre per il tumore gastrico verrà utilizzato un modello murino basato sulla degenerazione dei tessuti, provocato chimicamente con azossimetano (AOM) e sodio destran solfato (DSS).

4. Utilizzo degli organoidi tumorali e normali derivanti dagli stessi pazienti affetti da carcinoma del colonretto e carcinoma gastrico per lo studio degli effetti nel sistema tumorale mediante l'assorbimento tissutale delle nanoparticelle, per la vitalità cellulare e per l'eventuale riduzione della massa tumorale.

Dati preliminari:

È stato effettuato uno studio preliminare per studiare la sintesi delle nanoparticelle ibride EV e ottimizzare le fasi preparative, mediante l'utilizzo di idonei strumenti di caratterizzazione complementari. A tal fine sono stati effettuati esperimenti molto preliminari per ottenere ibridi derivati da EVs e micelle. In primo luogo, gli EVs sono stati isolati e colorati in rosso utilizzando Exoglo EVs Labeling Kit, mentre le micelle sono state colorate di verde-fluorescente e sono state ottenute da PEG- 2-PE e PEG-2-PE-CF e fosfolipidi. Sono stati eseguiti cicli multipli di congelamento istantaneo utilizzando azoto liquido, per indurre la fusione diretta tra EVs e micelle. Dopo un'attenta procedura di isolamento, effettuata con il metodo del gradiente di densità di saccarosio, la frazione raccolta attribuita alle EVs-micelle è stata caratterizzata mediante spettroscopia, microscopia confocale e fotoluminescenza (PL) (Figura 2).

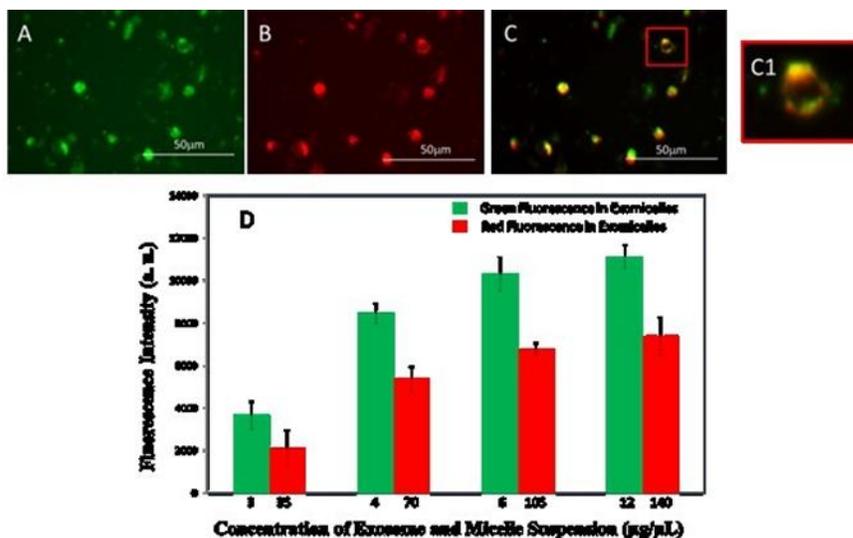


Figura 2: Dati preliminari sulla caratterizzazione di ibridi EVs-micelle ottenuti per fusione diretta di EV con le micelle. Immagine rappresentativa mediante microscopia confocale di Evs-micelle rossi e verdi ottenuti per fusione diretta di Evs marcati rossi con micelle di PEG-funzionalizzati in verde: canale verde (A), canale rosso (B) e fusione (C e C1).

Nella Figura 3 è stato riportato un esperimento preliminare sulle nanoparticelle ibride ottenute con la fusione di liposomi ed EVs. La popolazione di nanoparticelle ottenuta era omogenea, con una distribuzione monomodale e la dimensione riportata con l'acquisizione DLS era quasi la stessa della dimensione riportata nella micropotografia TEM. La morfologia era evidente con forma rotonda, una regione di densità all'interno delle nanoparticelle e la densità negativa per la membrana di nanoparticelle, che risultano brillanti rispetto alla regione interna.

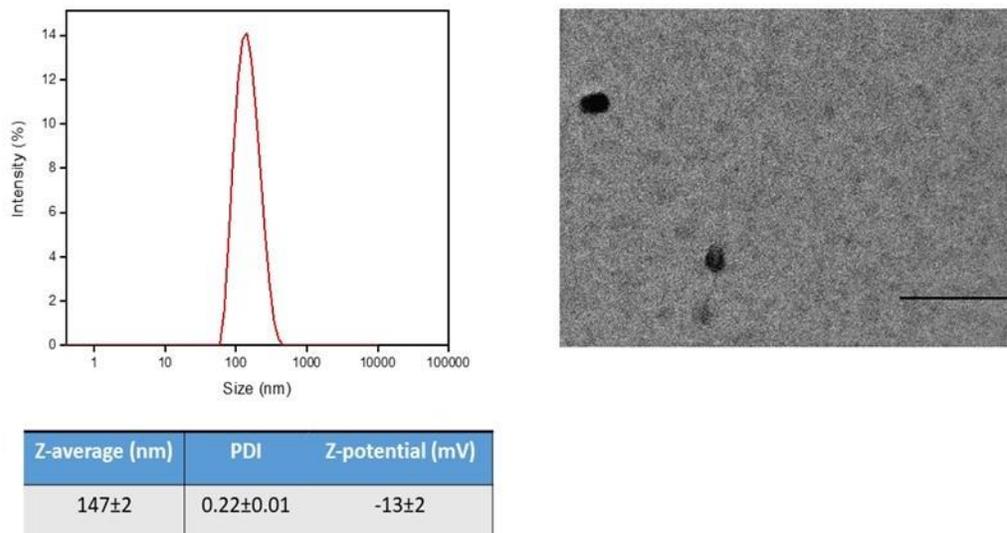


Figura 3: Dati preliminari sulla caratterizzazione di ibridi EV-micelle ottenuti per fusione diretta di EV con micelle. Immagine rappresentativa tramite TEM e diagramma ottenuti con DLS. La distribuzione monomodale è stata riportata nel diagramma DLS dopo la fusione, e nell'immagine TEM la forma, le dimensioni e la morfologia erano visibili. Scala 200 nm.

Uno studio preliminare in vitro è stato eseguito mediante esperimenti di colture cellulari per la crescita di sferoidi di carcinoma del colon retto, coltivati in 3D (sferoidi). In effetti, è stata necessaria un'indagine approfondita sulle linee cellulari CRC più adatte alle condizioni sperimentali per ottenere sferoidi coltivati in 3D senza l'uso di supporti organici in grado di assorbire gli EV ibridi ottenuti. La Figura 4A mostra le immagini rappresentative di questi sferoidi coltivati in 3D in stadi di crescita crescenti registrati dalla microscopia a campo luminoso. Gli sferoidi sono stati coltivati fino ad un tempo massimo di 96 ore. Già dopo le prime 6 ore, le cellule si sono aggregate dando luogo alla struttura sferica tipica delle colture 3D. Infatti, il fatto che gli sferoidi non richiedono alcun sostegno organico, quale il matrigel, è sicuramente rilevante, poiché, come qualsiasi supporto organico, esso può interferire durante l'incubazione delle EVs con gli 3D-sferoidi. Le colture in 3D effettuate per 72 ore sono state caratterizzate dall'utilizzo di due marcatori specifici per la proliferazione cellulare e la necrosi, rispettivamente Ki-67 e RIP-1, in quanto gli sferoidi sono tipicamente inclini a sviluppare un nucleo necrotico, a causa delle condizioni anossiche che si verificano quando si è in presenza di una crescita anormale delle cellule sulla loro superficie (Figura 4B). E' possibile osservare una totale assenza di proliferazione cellulare nel centro dello sferoide ascrivibile ad una necrosi evidente evidenziata dall'espressione del marcatore RIP-1. Il monitoraggio degli sferoidi a diversi tempi di crescita utilizzando marcatori di proliferazione e necrosi permette di determinare il tempo di trattamento più lungo possibile con esosomi ibridi prima che le cellule nella struttura sferoidale comincino a soffrire. Ulteriori esperimenti preliminari sono stati eseguiti per studiare la capacità delle EVs nell'essere interiorizzata da colture in 3D. Per questo scopo, sferoidi 3D di cellule Caco-2 coltivate per un massimo di 48 ore sono state incubate per 6, 24 e 48 ore con EVs marcati con colorante fluorescente verde, derivanti da colture cellulari di Caco-2. La Figura 4C mostra che lo sferoide in coltura 3D ha interiorizzato con successo la fluorescenza verde degli EVs.

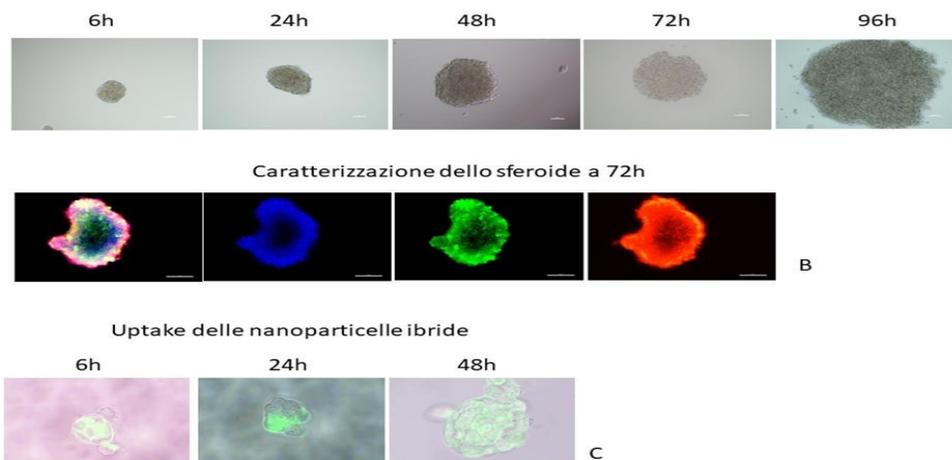


Figura 4: Crescita e caratterizzazione di sferoidi coltivati in 3D. A) Immagini rappresentative di microscopia a campo luminoso di sferoidi coltivati in 3D di cellule Caco-2 in fase di crescita crescente (senza matrigel). Scala 50 µm. B) Immagini rappresentative mediante microscopia confocale di uno sferoide in coltura 3D di cellule Caco-2 a 72 ore e colorato con DAPI per l'etichettatura dei nuclei (canale blu), il marcatore di necrosi RIP-1 (canale rosso) e in verde il marcatore di proliferazione. Scala 50 µm Ingrandimento 20x. Immagine rappresentativa della microscopia confocale di sferoidi coltivati in 3D di cellule Caco-2 a 6, 24 e 48 ore dalla loro incubazione con EV marcati verdi. Ingrandimento 40x. Scala 50 µm

Metodologie e analisi statistiche:

Generazione di nanoparticelle EVs ibride che trasportano diversi farmaci, a partire da EVs da sangue di pazienti CRC, combinato con liposomi o micelle.

Isolamento delle Evs totali dal sangue dei pazienti.

Abbiamo già riportato l'isolamento e la caratterizzazione degli EVs in pazienti con CRC e cancro gastrico (GC). Dopo aver ricevuto il consenso del comitato etico, i pazienti saranno iscritti garantendo la parità di genere in tutti i gruppi:

A: 100 pazienti senza sintomi tumorali provenienti dal reparto di endoscopia, recuperati per disturbi intestinali sconosciuti;
B: 100 pazienti con diagnosi di cancro CRC e assegnati per la rimozione del tumore al reparto di chirurgia. Per l'estrazione di EVs da 10 mL di sangue umano si applica una sequenza appropriata di ultracentrifugazione. I pazienti sottoposti a intervento chirurgico saranno inoltre invitati a donare ulteriori 10 mL di sangue durante i trattamenti di chemioterapia;

C: 50 soggetti sani come controllo. Gli esosomi saranno decorati con lipidi fluorescenti verdi utilizzando Exoglow Membrane EV labeling Kit (System Biosciences), per consentire l'indagine in vitro mediante spettrofotometro e microscopia confocale. Preparazione delle AVs.

Il metodo di evaporazione in strato sottile verrà utilizzato per far sì che le AVs siano composte dai due bilayer fosfolipidici, IL e EL, sintetizzati separatamente, poi mescolati insieme e in seguito uniti per la formazione della particella AV. In breve, l'IL sarà sintetizzato utilizzando 1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano/colesterolo o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina/3β - [N'(N', N'- dimetilamminoetano) - carbamoil] colesterolo cloridrato/colesterolo in rapporto 7/3 molare, mentre la EL sarà costituita da 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina/colesterolo/1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole)-2000] o suoi derivati sintetici in rapporto 5/3/2 molare. L'IL sarà idratata utilizzando acqua deionizzata doppia da vortice-miscelazione della sospensione lipidica e alternativamente riscaldamento a 65 °C. I liposomi risultanti, per la formazione del complesso IL, saranno estrusi utilizzando un dispositivo di estrusione in acciaio inossidabile riscaldato a 55 °C attraverso due filtri a membrana di policarbonato impilati di 400 nm, 200 nm e poi 100 nm, rispettivamente. La EL sarà sintetizzata e idratata come riportato per IL. siRNA specifici per Gadermina D verranno aggiunti alla soluzione acquosa di IL, durante la procedura di preparazione. L'inibitore NLRP3 (MCC950), il 5-FU e/o Rhodamina DHPE (0,1% molare) e/o [3H] - colesteril esadecil etere ([3H] CHE) saranno aggiunti ai fosfolipidi di IL e EL durante la preparazione del film lipidico.

L'anti-CD68 monoclonale è stato coniugato con il derivato PEG da un distanziatore amminoacidico direttamente alle catene PEG o acido ialuronico in attesa di essere generato da reazioni di Maleimide e Timolo in condizioni di acidità.

Caratterizzazione fisicochimica di AVs.

Per dimensione media, distribuzione dimensionale, concentrazione di particelle (spettroscopia di correlazione fotonica) e potenziale Z (anemometria laser Doppler) di AVs l'analisi sarà effettuata utilizzando un Zetasizer Ultra (Malvern). Il potenziale Z di AVs sarà effettuato utilizzando l'anemometria laser Doppler e quindi la mobilità elettroforetica. La stabilità e la morfologia di AVs saranno determinate da Turbiscan Lab® Expert e microscopia elettronica (JEM-1400Plus, JEOL), rispettivamente. Il legame degli siGSDMD con AVs sarà valutato qualitativamente, mediante elettroforesi in gel di agarosio, e quantitativamente utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop®ND1000. L'efficienza di incapsulazione dell'inibitore NLRP3 (MCC950) e del 5-FU sarà effettuata mediante ultracentrifugazione. L'inibitore di NLRP3 (MCC950) AVs sarà quantificato sia nel sovrantante che nel precipitato attraverso una cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

L'efficienza di incapsulazione dell'inibitore MCC950 sarà valutata come la percentuale che diventa associata a AVs. Mentre la cinetica di rilascio dell'inibitore NLRP3 (MCC950) e del 5-FU sarà eseguita utilizzando membrane di cellulosa rigenerata (10 kDa) per una durata di 72 ore. Il rilascio di MCC950 e/o del 5-FU sarà valutato mediante HPLC. La stabilità del siero di AVs sarà effettuata incubando diverse formulazioni in FBS 60%, al fine di studiarne le modifiche dimensionali, la carica di superficie e la capacità di AVs, al fine di proteggere gli siGSDMD contro la Ribonucleasi A. Infine, la degradazione sarà valutata attraverso elettroforesi su gel di agarosio.

Preparazione di liposomi e micelle.

Se la preparazione delle AVs dovesse essere fallace, saranno sintetizzati liposomi e micelle funzionalizzati sulla loro superficie con anti-CD68 monoclonale e caricati con i due diversi composti, vale a dire gli siGSDMD (e/o MCC950) e 5-FU. I

liposomi caricati con combinazioni differenti dei composti saranno preparati usando il metodo di iniezione dell'etanolo e una miscela lipidica composta principalmente di colesterolo, stearylamina, fosfatidilcolina e fosfolipidi pegilati. Le micelle invece saranno preparate utilizzando fosfolipidi pegilati e/o acido ialuronico opportunamente selezionati secondo procedure sperimentali ben definite da effettuare a temperatura ambiente. L'aggiunta di lipidi fluorescenti nella miscela lipidica consentirà di ottenere liposomi marcati o micelle utili per lo studio *in vitro*. I liposomi e le micelle vuote saranno preparati seguendo gli stessi protocolli senza l'aggiunta dei composti. I liposomi e le micelle saranno coniugati in superficie con anticorpo monoclonale anti-CD68 sfruttando la chimica cross-linking. Entrambi i nanovettori artificiali saranno caratterizzati in termini di proprietà morfologiche (TEM, SEM, DLS, Nanosight) e ottiche (assorbimento UV-Vis e spettroscopia di fotoluminescenza, FT-IR-ATR). L'efficienza di carico e incapsulamento dei farmaci sarà valutata mediante spettroscopia di assorbimento UV-Vis o tecnica HPLC.

Preparazione di nanoparticelle ibride EV.

Entrambi i tipi di EVs ibridi, combinati con EVs e, se necessario, con EV-liposomi e EV-micelle, saranno ottenuti dalla fusione diretta tra EV verdi e AVs rossi e, se necessario, liposomi o micelle, funzionalizzate con l'anti-CD68 e caricato con gli siGSDMD, MCC950 e 5-FU, per ottenere quattro diverse nanoformulazioni ibride. Saranno esaminati diversi metodi, tra cui sonicazione, congelamento istantaneo ed estrusione, omogeneizzazione, combinata o in singoli metodi per identificare l'approccio più adatto per la fabbricazione di nanoparticelle ibride con elevata efficienza di incapsulazione dei farmaci, preservando l'integrità strutturale degli EVs incontaminati. Le nanoparticelle degli EVs ibridi, così come le EVs, saranno caratterizzate in modo completo in termini di proprietà ottiche, morfologiche, carico di farmaci ed efficienza di incapsulamento. Il metodo della dialisi sarà utilizzato per studiare la loro cinetica di rilascio *in vitro*.

Valutazione *in vitro* dell'efficacia terapeutica delle nanoparticelle ibride EV.

Generazione di linee cellulari in cultura 2D e 3D, e isolamento degli EVs.

Per la coltura 3D, le linee cellulari selezionate, vale a dire Caco-2 ed N-87, e la linea cellulare normale epiteliale del colon, vale a dire HCEC-1CT saranno trattati in micropiastre da 96 pozzetti dedicate alla formazione degli sferoidi, con lo stesso complesso di mezzo di colture cellulari 2D. EVs saranno isolate dal mezzo di coltura cellulare condizionata e caratterizzato in termini di dimensioni e morfologia (TEM, SEM, DLS, Nanosight) così come in termini di contenuto proteico per mezzo di Western blotting. Successivamente, l'isolamento e l'analisi dell'RNA e delle proteine di EVs saranno effettuati utilizzando il kit totale di isolamento RNA esosomale e proteine (Invitrogen).

*Studio dell'efficacia degli EVs ibridi nei test funzionali *in vitro*.*

Linee cellulari normali e tumorali saranno piastrate per la cultura cellulare 2D e 3D. Le cellule saranno trattate con le nanoparticelle ibride sintetiche EVs a diverse concentrazioni di farmaci (siGSDMD, MCC950 e 5-FU) a diversi tempi di incubazione. I cambiamenti molecolari nell'apoptosi, nel danno al DNA e nell'attività di segnalazione di Wnt saranno analizzati nelle linee cellulari normali e tumorali, dopo il trattamento con gli esosomi ibridi mediante l'uso del saggio MTS e TUNEL, e il rilevamento di Ki-67, RIP-1 e ph-RIP-1, Cleaved Caspase-1 e Cell Clock. I composti liberi come gli siGSDMD, MCC950 e 5-FU saranno utilizzati per il confronto. I livelli di espressione di diverse proteine che di solito sono sovraregolati o downregolati durante la carcinogenesi, come FZD10, c-Myc, MAPK3, CDX2, E-CADHERIN, N-CADHERIN, VIMENTIN saranno valutati da analisi Western blotting, immunofluorescenza e microscopia confocale. La localizzazione di β -CATENINA, CASPASI 8 e phRIP-1 sarà anche studiata utilizzando lo stesso insieme di tecniche.

Valutazione *in vivo* dell'efficacia terapeutica delle nanoparticelle ibride di EVs.

Caricamento di nanoparticelle EVs ibride in microsfele gastroresistenti.

Le quattro diverse nanoparticelle di EVs ibride saranno caricate in microparticelle gastriche resistenti per la somministrazione orale, utilizzando metodi di prilling con composto alginato salino. La cinetica del rilascio di farmaci da EVs ibride, sarà testato *in vitro* utilizzando fluido gastrico simulato secondo i protocolli farmacologici europei e statunitensi.

*Valutazione *in vivo* della farmacocinetica delle nanoparticelle ibride di EV caricate in capsule.*

Le microsfele saline di alginato contenenti le diverse nanoparticelle ibride di EV saranno somministrate disperdendole in una quantità definita di gelatina di frutta (2 g al giorno) prima della normale somministrazione di cibo. Lo sviluppo dei polipi sarà monitorato con l'uso dell'endoscopia per i piccoli mammiferi su base settimanale. Dopo 12 settimane i topi saranno sacrificati. La somministrazione *in vivo*, la tossicità e la biodistribuzione dei nanoparticolati ibridi carichi di farmaci mirati saranno valutati sia nei topi transgenici che nei topi AOM/DSS. Il numero e le dimensioni dei polipi saranno calcolati per ogni animale, e la tossicità e biodistribuzione nei topi saranno valutati in mucosa del colon, stomaco, muscoli femorali, midollo osseo, milza, rene, fegato. I dati risultanti saranno correlati ai risultati *in vitro*

*Trattamento *in vivo*.*

Per ogni nanoparticella ibrida di EVs, sei gruppi di animali, sia degli APC che degli AOM/DSS, saranno testati come segue:

- 1- animali di controllo;
- 2- animali trattati con nanoparticelle ibride vuote non mirate;
- 3- animali trattati con nanoparticelle ibride vuote mirate;
- 4- animali trattati con farmaci liberi;
- 5- animali trattati con nanoparticelle ibride cariche e non mirate;
- 6- animali trattati con nanoparticelle ibride drogate e mirate.

Analisi statistica. Per questa proposta, un'analisi di potenza è stata condotta considerando l'effetto (0,8), $\alpha = 0,05$ e $p = 0,80$. Il numero di topi per ogni gruppo di trattamento sarà 8. Considerando che 3 formulazioni saranno testate, saranno trattati complessivamente 120 topi APC/min+ e 120 AOM/DSS.

Impatto Scientifico ed Economico-Sociale.

Impatto scientifico.

Questa nostra ricerca, rappresenterà il primo studio in campo scientifico rispetto all'uso di nanoparticelle innovative, basate sulla tecnologia ibrida. I risultati saranno pubblicati su riviste open access con alto fattore di impatto. Inoltre, sarà presentato un brevetto nazionale degli EVs ibridi innovativi per le loro applicazioni sul trattamento dei tumori del tratto gastrointestinale. L'innovazione delle nanoparticelle ibride di EV per il trattamento del CRC e del GC deve avere non solo un impatto verticale nella nanomedicina ma anche orizzontale nella medicina del cancro e nella medicina in generale, aprendo così un nuovo scenario nella medicina personalizzata per il trattamento di patologie aggressive e letali come CRC e GC. Inoltre, lo sviluppo di nanoparticelle ibride innovative in biomateriali e nanomedicine sviluppando biomateriali combinati naturali e sintetici per la somministrazione di farmaci avanzati può rappresentare una potenziale alternativa terapeutica alla chemioterapia convenzionale ed ai protocolli standard.

Impatto economico sociale.

Le nanoparticelle innovative EVs ibride mirano a migliorare il trattamento di CRC e/o malattie del cancro gastrico. In particolare, il progetto prevede la progettazione e lo sviluppo di nuove nanoparticelle ibride innovative e il trattamento gold standard per questo tipo di tumori consentono miglioramenti nel trattamento oncologico utilizzando la nano-biotecnologia applicata alla salute umana. Lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati su nanoparticelle ibride di EVs in grado di ridurre il fallimento della chemioterapia convenzionale e non solo, ma anche di migliorare le risposte biologiche del sistema immunitario umano, può offrire benefici a lungo termine e migliorare l'assistenza sanitaria, la vita sociale dei pazienti con un impatto sociale significativo.

Bibliografia:

1. Deng Q, Geng Y, Zhao L, Li R, Zhang Z, Li K, Liang R, Shao X, Huang M, Zuo D, Wu Y, Ma Q. NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver. *Cancer Lett.* 2019 Feb 1;442:21-30. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.030. Epub 2018 Oct 28
2. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677-87. doi: 10.1038/nm.3893. Epub 2015 Jun 29
3. Venkat Giri Magupalli, Roberto Negro, Yuzi Tian, Arthur V. Hauenstein, Giuseppe Di Caprio, Wesley Skillern, Qiufang Deng, Pontus Orning, Hasan B. Alam, Zoltan Maliga, Humayun Sharif, Jun Jacob Hu, Charles L. Evavold, Jonathan C. Kagan, Florian I. Schmidt, Katherine A. Fitzgerald, Tom Kirchhausen, Yongqing Li, Hao Wu. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. doi: 10.1126/science.aas8995
4. Huang, Y., Xu, W. & Zhou, R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00740-6>
5. Karki, R., Kanneganti, TD. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer* 19, 197–214 (2019). doi: 10.1038/s41568-019-0123-y
6. Bishop D, Smith R, Smith M, Rigby H. Effect of plyometric training on swimming block start performance in adolescents. *Journal of Strength & Conditioning Research.* doi: 10.1519/JSC.0b013e3181b866d0
7. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Sep;78(3):447-64. Epub 2016 May 23. doi: 10.1007/s00280-016-3054-2
8. Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Synergistic antitumor activity of capecitabine in combination with irinotecan. *Clin Colorectal Cancer.* 2005 Jan;4(5):336-43. doi: 10.3816/cc.2005.n.007

LINEA 2

MEDICINA PREVENTIVA/PREDITTIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 2 “Medicina preventiva/predittiva in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell’anno 2022 sono i seguenti:

Progetto 09/2020: “Nuovi target molecolari nella diagnostica dei GEP-NET”

Responsabile: dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: Elisabetta Cavalcanti, Grazia Serino, Rossella Donghia

Introduzione

I tumori neuroendocrini (NET) sono tumori rari ed eterogenei con un ampio spettro di caratteristiche cliniche e biologiche (1). Negli ultimi anni, sono stati condotti numerosi studi per comprendere meglio la patogenesi dei NET, il sistema di classificazione e la classificazione in base al sito di origine, ai tipi di cellule e alle caratteristiche patologiche.

Nonostante la nuova classificazione (WHO 2010/2017), la bassa incidenza, l'eterogeneità del tumore, i sintomi non specifici, le nomenclature e le classificazioni indefinite, i NET rimangono una malattia imprevedibile, pertanto, i casi di basso grado possono presentare inaspettatamente spesso malattie avanzate alla diagnosi. In effetti, l'assenza di sintomi patognomonici rende difficile la diagnosi; rimangono asintomatici per anni e vengono scoperti solo quando sono già metastatici. I NET sono comunemente localizzati nel tratto gastrointestinale, nel pancreas e nel polmone con tassi di incidenza che aumentano da 1,52 a 7,41 casi per 100.000 abitanti (2,3). Secondo l'ultima classificazione WHO, i NET sono classificati in base agli aspetti morfologici e alla valutazione della proliferazione in due categorie principali: ben differenziati (WD) e scarsamente differenziati (PD). I NET ben differenziati: hanno una bassa o bassissima attività proliferativa, per cui si associano generalmente a buone prospettive di sopravvivenza a lungo termine. La loro natura meno aggressiva, ma comunque maligna, fa sì che questi tumori possano dare metastasi, anche molto tempo dopo l'identificazione del tumore primitivo. I NET scarsamente differenziati hanno un'alta attività proliferativa ed un più elevato grado di malignità, per cui si associano generalmente ad una maggiore probabilità di evolvere precocemente verso la fase metastatica.

Sul piano anatomico-patologico i GEP NET sono classificati in G1-G2-G3 in base all'indice di proliferazione Ki-67 e all'indice mitotico (4-5). Secondo la classificazione WHO 2010, i tumori di grado G1 e G2 sono definiti tumore neuroendocrino (NET) mentre quelli di grado G3 sono classificati come carcinoma neuroendocrino G3 (NEC3) ma tutti con approcci di prognosi, esito e trattamento diversi. Di recente, una nuova classificazione dei tumori neuroendocrini del pancreas (WHO 2017) ha aggiunto un nuovo gruppo chiamato "NET G3" che include pazienti con un alto indice di proliferazione e morfologia ben differenziata (6); ma questo termine è attualmente limitato ai pazienti con NET pancreatici (pNET). Le strategie terapeutiche attualmente disponibili per i NET, considerate sempre all'interno di un approccio integrato e multidisciplinare, possono assicurare al paziente una buona sopravvivenza e qualità di vita. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET, infatti, la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti. L'obiettivo del trattamento è quello di migliorare i sintomi ad essi associati, nonché di controllare la crescita tumorale, al fine di migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti. I tumori neuroendocrini sono rari, ma la natura indolente della malattia porta ad una prevalenza molto più alta. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti. A differenza della chemioterapia tradizionale, la terapia molecolare (target therapy) e l'immunoterapia rappresentano una svolta e una rivoluzionaria strategia nelle nuove terapie oncologiche. In particolare, tumori rari che sono difficili da diagnosticare, come i tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (GEP-NET), spesso definiti occulti, sono privi di marcatori mirati e terapie precise. Attualmente nonostante la loro nuova classificazione (WHO 2010/2017), il comportamento clinico dei NET è altamente imprevedibile ed al momento è difficile definire le caratteristiche biologiche, patologiche o cliniche che potrebbero essere in grado di caratterizzare il tumore e di definire la prognosi e la risposta ai trattamenti nei tre gruppi G1, G2 e G3.

Studi recenti hanno dimostrato che i marcatori molecolari potrebbero essere utilizzati come strumenti adiuvanti per una classificazione accurata a complemento della valutazione morfologica, in particolare nelle piccole biopsie in cui i materiali

diagnostici possono essere limitati. Nei nostri studi precedenti, abbiamo evidenziato l'importanza di una migliore caratterizzazione della classificazione NET per fornire anche indicazioni prognostiche e terapeutiche affidabili. In particolare, abbiamo analizzato il ruolo del ligando di morte cellulare programmato 1 (PD-L1) nei GEP-NET: l'espressione del PD-L1 era significativamente associata con un alto grado istologico (G3), diventando un nuovo gold standard ai fini terapeutici per la discriminazione G3 NET (7). Inoltre, gli approcci farmacologici che utilizzano anticorpi anti-PD-1 possono diventare la scelta più appropriata per il trattamento di casi G3 con prognosi sfavorevole, mentre per i casi G1 / G2 i farmaci anti-angiogenici potrebbero essere un'ottima scelta terapeutica, come dimostrato in un altro nostro recente studio (8). Nello studio abbiamo evidenziato che il PDGFR rappresenta un bersaglio efficace per un nuovo trattamento anti-angiogenico nei WD-GEP-NEN, in particolare nei casi G2.

Nei NET, i tradizionali farmaci citotossici hanno mostrato un'efficacia limitata, sebbene le loro caratteristiche biologiche siano state caratterizzate e possano essere sfruttate terapeuticamente (9,10,11). Pertanto, ulteriori studi sono necessari per definire meglio i differenti profili molecolari, la prognosi ed il trattamento più adeguato per i pazienti con tumore neuroendocrino. I microRNA sono una nuova classe di piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post- trascrizionale inibendo la traduzione di mRNA specifici. Studi recenti hanno suggerito che incrementi o decrementi nell'espressione delle miRNA sono correlati alla regolazione di oncogeni o soppressori tumorali e perciò possono esplicare una funzione importante nello sviluppo del cancro, nella progressione della malattia e nella sua prognosi (12,13,14,15). Attualmente in letteratura le alterazioni molecolari nei NET rimangono ancora non completamente caratterizzate (16,17) e la combinazione dello studio del profilo di espressione dei miRNA, unitamente al profilo di espressione genica e molecolare, potrebbe aiutare delineare e differenziare le caratteristiche clinico patologiche e molecolari in una ben caratterizzata coorte di GEP-NET in modo da poter definire e monitorare la migliore terapia farmacologica. Nei GEP-NET l'instabilità dei microsatelliti (MSI) è stata poco studiata e il ruolo di altri meccanismi epigenetici è ancora poco conosciuto. Anche se GEP-NET sono tumori in genere aggressivi e con prognosi infausta, recenti studi (18) evidenziano che c'è una frazione di pazienti con GEP-NET che mostra una migliore tasso di sopravvivenza atteso. La Rosa et al. hanno evidenziato un'alta instabilità dei micro satelliti (MSI-H) con una perdita di espressione immunohistochemica delle proteine del MLH1 and PMS2 nel 15% dei carcinomi neuroendocrini colon-rettali scarsamente differenziati per i quali è atteso un vantaggio prognostico (19). Inoltre, le alterazioni molecolari nei NET rimangono non completamente caratterizzate in particolare per quanto riguarda mutazioni in BRAF e KRAS che hanno un ruolo sia nei processi di cancerogenesi che nella comparsa di recidiva nei carcinomi colon retтали (20,21). La maggior parte degli studi suggeriscono che carcinomi neuroendocrini colon retтали scarsamente differenziati sono biologicamente aggressivi ed associati ad una scarsa sopravvivenza. Pertanto il nostro studio mira a differenziare i NET in base alla rilevazione di mutazioni in BRAF e KRAS associate ad una mancata espressione delle proteine del MMR ed MSI. Pertanto il miRNA profiling insieme con l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF potrebbe portare all'identificazione di sottogruppi tumorali con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica. Nel corso degli anni il numero di biomarcatori è aumentato grazie agli studi di sequenziamento del genoma del tumore, che mostrano la presenza di nuove mutazioni associate ai tumori, e alle conoscenze sulle conseguenze funzionali di tali alterazioni genetiche. Anche se le terapie mirate hanno notevolmente cambiato il trattamento del cancro negli ultimi 10 anni, sono stati messi in luce diversi nuovi problemi e sfide, tra cui l'eterogeneità del tumore e l'evoluzione molecolare, i costi e la potenziale morbilità delle biopsie, la mancanza di farmaci efficaci contro la maggior parte delle alterazioni genomiche, i limiti tecnici dei test molecolari, l'eventuale rimborso di queste indagini e gli ostacoli di carattere normativo (22).

Oggi, uno dei temi biologici più importanti è l'eterogeneità intratumorale. Quasi tutti i tumori trattati acquisiscono resistenza alla terapia, come risultato dell'eterogeneità tumorale, dell'evoluzione clonale e della selezione. I NET presentano un'enorme eterogeneità ed attualmente le decisioni terapeutiche sono prese considerando solo il risultato della singola biopsia, senza alcuna conoscenza della genetica del tumore. Per di più, i tumori evolvono e durante la loro progressione possono presentarsi dei subcloni, con alterazioni molecolari differenti tra il tumore primario e le metastasi o le recidive. In particolare, nei NET l'enorme eterogeneità e la mancanza di conoscenza circa la composizione genetica del tumore fanno sì che spesso le ragioni della resistenza primaria o lo sviluppo di resistenza secondaria non sono spiegabili. Quindi, poiché i marcatori correlati alla terapia possono variare durante la progressione del tumore, l'identificazione di marcatori in diversi momenti temporali può fornire informazioni fondamentali per la corretta gestione clinica del paziente. Pertanto a supporto dello studio del profilo di espressione genica e molecolare la messa appunto della biopsia liquida per i NET sarebbe utile per seguire l'evoluzione della malattia e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Stato di avanzamento del progetto:

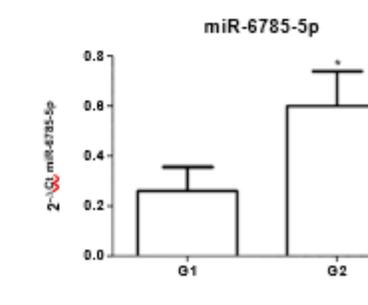
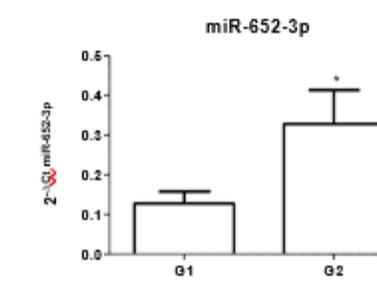
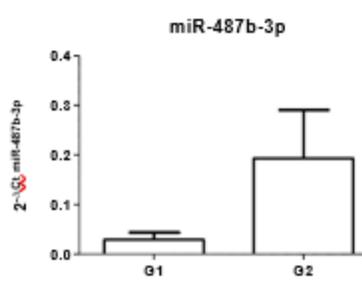
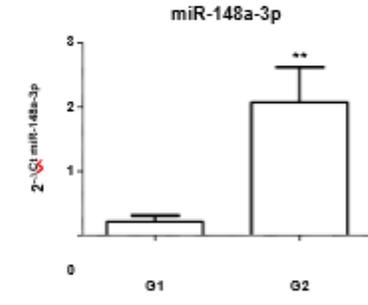
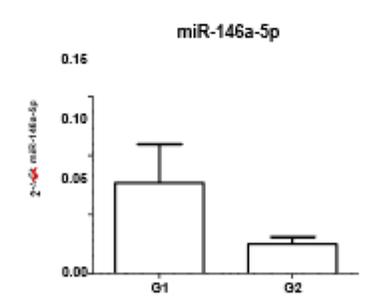
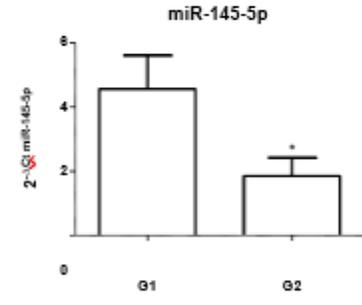
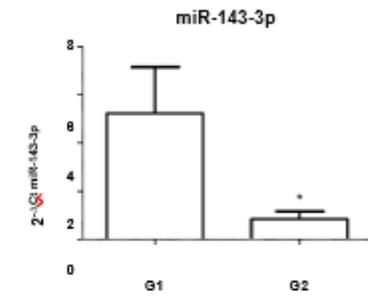
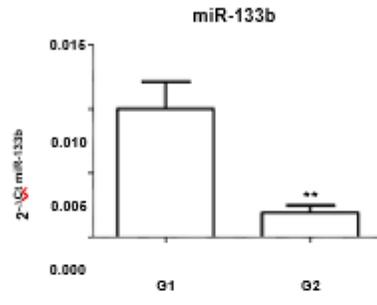
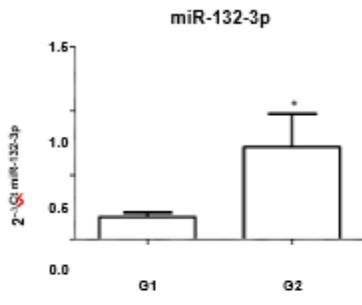
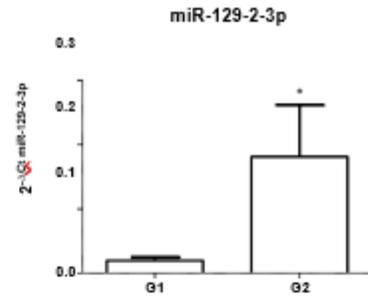
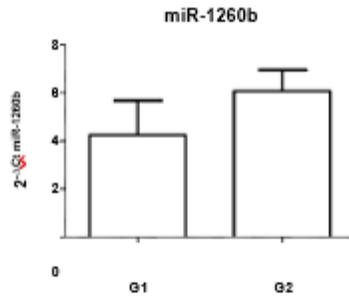
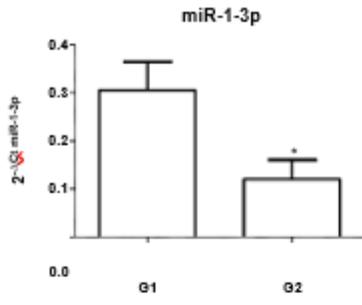
Nei due anni precedenti è stata allestita la casistica dei casi NET pervenuti all'IRCCS de Bellis dal gennaio 2006 a dicembre 2019, sono stati arruolati 90 pazienti: 48 M e 42 F e comprendono NET dell'apparato GEP: 27.7% stomaco, 14.4 % fegato, 2 % colecisti, 7.8 % colon, 12.2 % pancreas, 26.7% piccolo intestino, 7.78 % appendice e 3.33 % ampolla di Vater. Tutti i casi sono stati rivisti e classificati secondo la WHO 2017 e su tutti è stato rivalutato il Ki 67. Di questi pazienti è stato anche valutato l'infiltrato perineurale, la permeazione vascolare, la necrosi e i linfonodi metastatici. Successivamente sono stati selezionati i campioni prelevati da pazienti con GEP-NET ben differenziati (grado G1 e G2) e si è proceduto con l'estrazione dei campioni di miRNAs dai blocchetti inclusi in paraffina utilizzando il miRNeasy FFPE kit (Qiagen). La concentrazione del campione estratto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop.

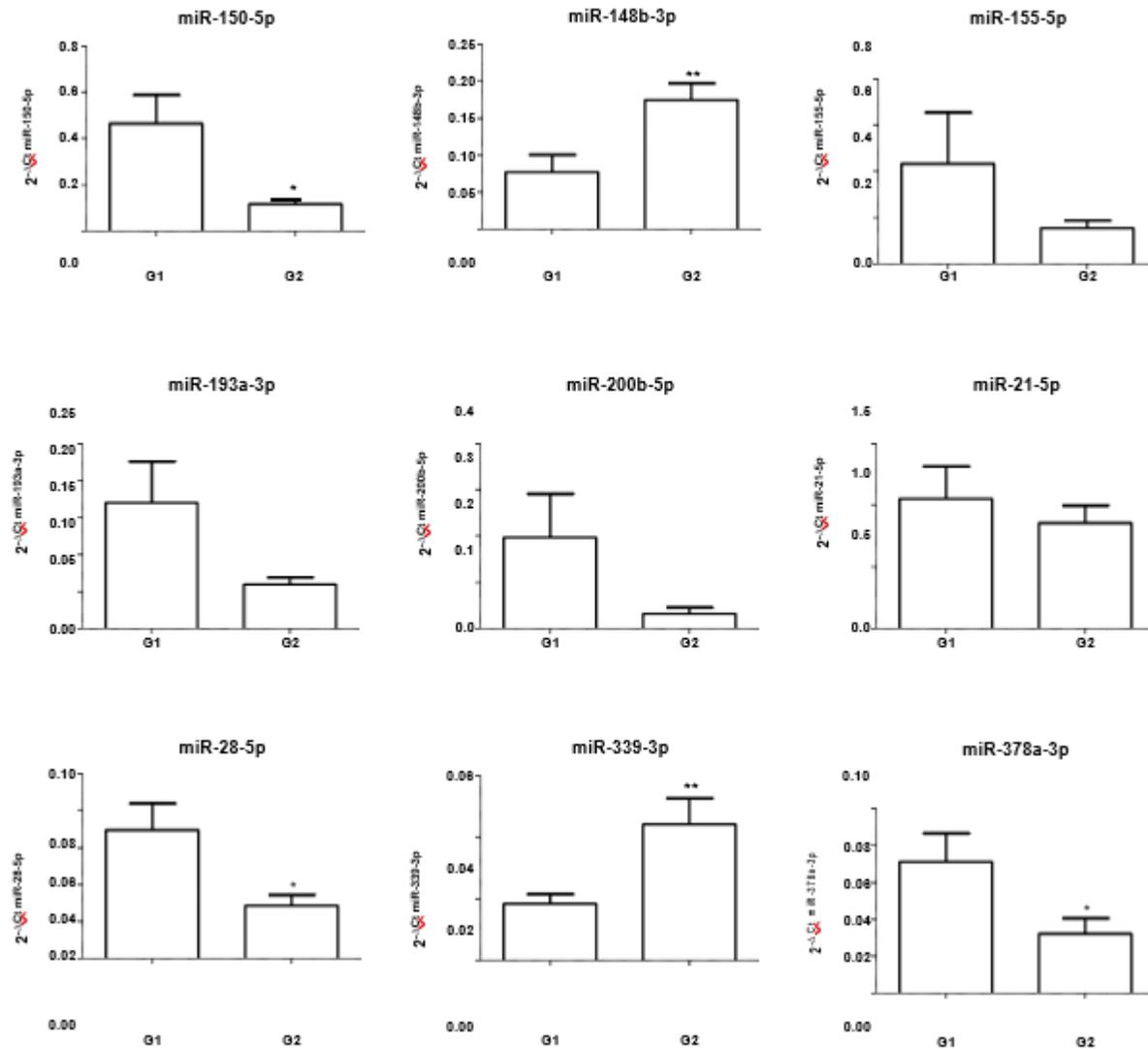
I dati di espressione totale dei miRNAs ottenuti dall'analisi mediante microarray (Cavalcanti E. et al. *Frontiers in Oncology*, ;10:1187, 2020) sono stati rielaborati ed è stata individuata la lista di miRNAs differenzialmente espressi tra i pazienti con grado G2 e i pazienti con grado G1. Inoltre, è stata identificata una lista di 24 miRNAs specifica dei GEP-NETs ben differenziati.

ID miRNA	Regolazione
hsa-miR-1-3p	down
hsa-miR-1260b	up
hsa-miR-129-2-3p	up
hsa-miR-132-3p	up
hsa-miR-133b	down
hsa-miR-143-3p	down
hsa-miR-145-5p	down
hsa-miR-146a-5p	down
hsa-miR-148a-3p	up
hsa-miR-148b-3p	up
hsa-miR-150-5p	down
hsa-miR-155-5p	down
hsa-miR-193a-3p	down
hsa-miR-200b-5p	down
hsa-miR-21-5p	down
hsa-miR-28-5p	down
hsa-miR-339-3p	up
hsa-miR-370-3p	up
hsa-miR-378a-3p	down
hsa-miR-487b-3p	up
hsa-miR-564	up
hsa-miR-652-3p	up
hsa-miR-6785-5p	up
hsa-miR-6807-5p	up

Si è quindi proceduto con la validazione dei risultati ottenuti mediante analisi del microarray con Real-Time PCR. I campioni di miRNAs estratti da campioni biotici di un gruppo indipendente di 10 pazienti con GEP-NET con grado G1 e 10 pazienti GEP-NET con sono stati inizialmente retrotrascritti con con il kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) seguendo il protocollo del produttore. La real-time RT-PCR è stata eseguita con TaqMan Advanced miRNA saggi e TaqFast Advanced Master mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) per la quantificazione dei 24 miRNAs selezionati più due controlli endogeni.

Dei 24 miRNAs analizzati, il miR-370-3p, miR-564 e miR-6807-5p non hanno prodotto nessun amplificato in nessuno dei campioni analizzati. L'andamento degli altri 21 miRNAs hanno confermato i dati ottenuti dall'analisi microarray nella regolazione nonostante alcuni di essi non raggiungevano la significatività statistica.





Al fine di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNAs deregolati che sono stati individuati da quest'ultima analisi, è stata effettuata un'analisi bioinformatica utilizzando diversi software di predizione accessibili pubblicamente on line.

Sono stati utilizzati 6 differenti algoritmi (TargetScan 5.2, miRDB, RNA22, miRWalk, miRPath e miRSystem) e in seguito, per ridurre il numero di falsi positivi, sono stati sovrapposti i risultati ottenuti dai differenti database e considerati solo i geni target putativi predetti da almeno 3 dei 6 database. Basandosi sui risultati ottenuti dalle analisi bioinformatiche sono stati individuati diversi geni, particolarmente coinvolti in vie del segnale caratteristiche della patologia tumorale. Per approfondire le interazioni biologiche tra i miRNAs e i geni regolati dai miRNAs trovati modulati, è stata effettuata un'ulteriore analisi bioinformatica per valutare le pathways e i processi biologici in cui sono coinvolti i geni target dei miRNA. In particolare, risultano significativamente modulate le seguenti pathways canoniche: Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, Cell cycle, ECM- receptor interaction, TGF-beta signaling pathway, Focal adhesion. Inoltre, tra i processi biologici più significativi sono stati identificati la proliferazione, la crescita cellulare e la morfologia cellulare. Inoltre, l'analisi in silico dei geni target regolati dai miRNAs individuati ha messo in evidenza che più miRNAs potrebbe regolare diversi geni coinvolti nella pathway di FGF/FGFR. Attualmente sono in corso le valutazioni dell'espressione tissutale di questi geni e le loro correlazioni con le caratteristiche clinicopatologiche dei NEN.

Obiettivi specifici dello studio:

Anche se le terapie mirate hanno notevolmente cambiato il trattamento del cancro negli ultimi 10 anni, sono stati messi in luce diversi nuovi problemi e sfide, tra cui l'eterogeneità del tumore e l'evoluzione molecolare, i costi e i limiti delle biopsie, la mancanza di farmaci efficaci contro la maggior parte delle alterazioni genomiche, i limiti tecnici dei test molecolari, l'eventuale rimborso di queste indagini e gli ostacoli di carattere normativo. Oggi, uno dei temi biologici più importanti è l'eterogeneità intratumorale. Quasi tutti i tumori trattati acquisiscono resistenza alla terapia, come risultato dell'eterogeneità tumorale, dell'evoluzione clonale e della selezione. I NET presentano un'enorme eterogeneità ed attualmente le decisioni terapeutiche sono prese considerando solo le caratteristiche morfologiche della neoplasia, senza alcuna conoscenza della genetica del tumore. Per di più, i tumori evolvono e durante la loro progressione possono presentarsi dei subcloni, con alterazioni molecolari differenti tra il tumore primario e le metastasi o le recidive. In particolare nei NET l'enorme eterogeneità e la mancanza di conoscenza circa la composizione genetica del tumore fanno sì che spesso le ragioni della resistenza primaria o lo sviluppo di resistenza secondaria non sono spiegabili. Pertanto l'obiettivo dello studio è quello di caratterizzare un 'signature' di miRNAs e di alterazioni molecolari coinvolte nella differenziazione delle caratteristiche clinico patologiche e molecolari nei pazienti GEP NET. Quindi, poiché i marcatori correlati alla terapia possono variare durante la progressione del tumore, l'identificazione di marcatori in diversi momenti temporali può fornire informazioni fondamentali per la corretta gestione clinica del paziente. Pertanto a supporto dello studio del profilo di espressione genica e molecolare questo studio prevede in conclusione la messa appunto della biopsia liquida per i NET. Tutto questo sarebbe utile per seguire l'evoluzione della malattia e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Obiettivo specifico 1:

1. Caratterizzare il gruppo di miRNAs capace di differenziare pazienti con GEP-NET di grado G2 dai pazienti di grado G1
2. Analisi dell'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF nei pazienti G1 e G2

Obiettivo specifico 2:

1. Caratterizzare il gruppo di miRNAs espresso solo nei pazienti con GEP-NET di grado G3
2. Analisi dell'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF nei pazienti G3

Obiettivo specifico 3:

1. Integrazione dei dati ottenuti dai precedenti obiettivi al fine di individuare una *signature* molecolare specifica dei GEP NET
2. Valutazione mediante biopsia liquida della *signature* individuata

OBIETTIVO 1:

1. La caratterizzazione dei miRNAs differenzialmente espressi nei pazienti con GEP-NET di grado G2 dai pazienti di grado G1, ma non nei pazienti con grado G3 ci permetterà di identificare sottogruppi tumorali all'interno della categoria dei GEP-NET ben differenziati con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica. I campioni di miRNA saranno estratti da campioni biopsici fissati in formalina o inclusi in paraffina ottenuti da pazienti con GEP-NET ben differenziati. I 24 miRNAs che dall'analisi di microarray sono risultati differenzialmente espressi nella comparazione tra pazienti con GEP-NET di grado G2 dai pazienti di grado G1 saranno validati mediante Real-Time PCR. Si procederà, quindi, con l'identificazione dei target computazionali dei miRNA mediante diversi programmi bioinformatici e le pathway molecolari da essi regolate. In seguito, andremo a dimostrare mediante tecniche di ibridazione in situ l'effettiva espressione del miRNA e del gene target identificato mediante l'analisi bioinformatica. Infine, con tecniche di immunoistochimica e/o immunofluorescenza andremo a verificare che alla modulazione dell'mRNA corrisponda anche la modulazione della proteina identificata.

2. Successivamente si andrà a caratterizzare i pazienti GEP- NET di grado G1 e G2 dal punto di vista molecolare, nello specifico si andrà a valutare l'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua

correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF. L'instabilità dei MSI sarà valutata mediante software GeneMapper su DNA dei pazienti estratto dai blocchetti in paraffina (QIAamp DNA Mini Kit) Mediante analisi immunocitochimica sarà analizzato il tipo di difetto delle proteine del MMR, nello specifico MHL1, MSH2, MSH6 e PMS2.

OBIETTIVO 2:

1. La caratterizzazione dei miRNAs espressi solo nei pazienti con GEP-NET di grado G3 e non nei pazienti con grado G1 e G2 ci permetterà di identificare sottogruppi tumorali all'interno della categoria dei GEP-NET scarsamente differenziati con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica.

I campioni di miRNA saranno estratti da campioni biotici fissati in formalina o inclusi in paraffina ottenuti da pazienti con GEP-NET ben differenziati. I 4 miRNAs che dall'analisi di microarray sono risultati espressi solo nei pazienti GEP-NET con grado G3 saranno validati mediante Real-Time PCR. Si procederà, quindi, con l'identificazione dei target computazionali dei miRNA mediante diversi programmi bioinformatici e le pathway molecolari da essi regolate. In seguito, andremo a dimostrare mediante tecniche di ibridazione in situ l'effettiva espressione del miRNA e del gene target identificato mediante l'analisi bioinformatica. Infine, con tecniche di immunocitochimica e/o immunofluorescenza andremo a verificare che alla modulazione dell'mRNA corrisponda anche la modulazione della proteina identificata.

2. Anche nei pazienti con GEP-NET di grado G3 si andrà a valutare l'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF

OBIETTIVO 3:

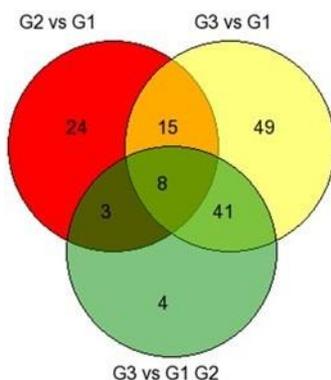
1. In ultima analisi si procederà all'integrazione dei dati ottenuti dai precedenti obiettivi al fine di individuare una signature molecolare specifica dei GEP NET

2. Successivamente si andrà a valutare mediante biopsia liquida della signature individuata. L'analisi del ctDNA potrà essere utilizzata, come una valida integrazione all'esame istologico, per: 1) definire la prognosi del paziente; 2) valutare la risposta alla terapia; 3) monitorare il decorso della malattia nel tempo, con la verifica dell'insorgenza di eventuali mutazioni somatiche secondarie, responsabili dei meccanismi di resistenza, che potranno permettere al clinico di selezionare la sequenza ottimale di trattamento utilizzando farmaci target di seconda linea terapeutica.

Dati preliminari:

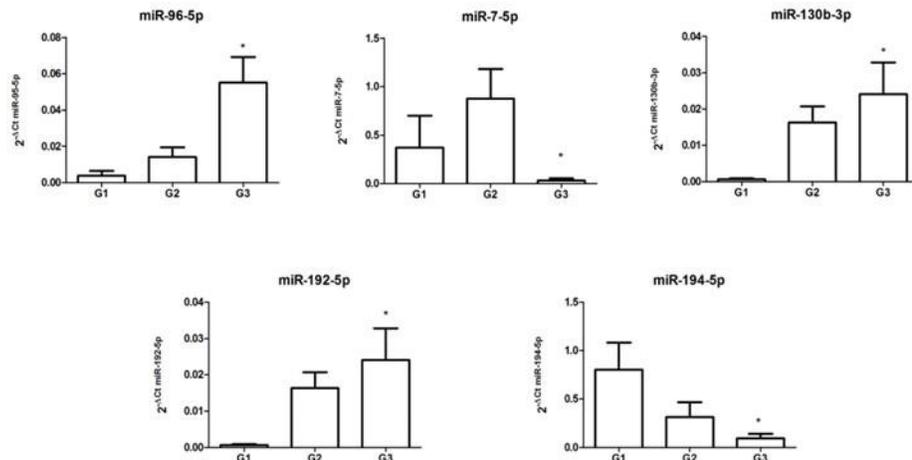
In una prima analisi abbiamo analizzato il profilo di espressione totale dei miRNAs partendo da un'analisi microarray su 7 casi di NEN G1, 6 casi di NEN G2 e 7 casi di NEN G3. A partire dai 2549 miRNA umani rappresentati sul microarray, sono stati identificati 560 miRNA che risultano espressi nei campioni analizzati. Questi dati sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche allo scopo di determinare quali sono i miRNA differenzialmente espressi per ciascun gruppo di pazienti. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati una lista di miRNAs deregolati specifica per ciascun grade. Nello specifico, sono state effettuate le seguenti comparazioni:

- G2 vs G1= 50 miRNA deregolati
- G3 vs G1 = 113 miRNA deregolati
- G3 vs G1+G2 = 56 miRNA deregolati



Quindi abbiamo valutato i geni target degli 8 miRNA selezionati e i processi biologici che andavano a regolare. L'analisi bioinformatica ha messo in evidenza che gli 8 miRNA regolavano le seguenti pathways: FOXO pathway, Pathways in Cancer, TGFB Signalling Pathways, P53 signalling pathway, WNT signalling, P13K-AKT signalling pathway.

Successivamente abbiamo validato con Real-time PCR 5 degli 8 miRNA analizzati. Sono ancora in corso studi per i restanti miRNA di suddetto elenco. I dati ottenuti riportati nell'istogramma sono relativi ai seguenti miRNA: miR-96-5p: miR-7-5p: miR-130b-3p miR-192-5p miR-194-5p. I dati di Real-time PCR hanno validato i dati ottenuti da microarray. Le differenze osservate sono tutte statisticamente significative (*p<0.05).



Metodologia e analisi statistiche:

I dati clinici, il grado istologico e l'espressione dei marcatori molecolari saranno analizzati con analisi statistiche adeguate allo studio: test esatto di Fisher o il test χ^2 a seconda dei casi, analisi ANOVA, test T per campioni indipendenti. Tutte le analisi statistiche saranno effettuate utilizzando la SPSS Statistics V21.

Risultati attesi:

La possibilità di controllare a lungo termine malattie rare e con prognosi infausta pesantemente pre- trattate e poco responsive alla chemioterapia convenzionale attraverso l'identificazione di marcatori molecolari specifici che consentano una targeted therapy mirata e personalizzata.

Innovazioni:

Questo studio è rilevante perché apre la strada alla concreta possibilità di controllare a lungo termine malattie rare e con prognosi infausta pesantemente pre-trattate e poco responsive alla chemioterapia convenzionale. L'individuazione di una signature molecolare coinvolta nella differenziazione delle caratteristiche clinico patologiche e molecolari nei pazienti GEP NET permetterebbe di seguire l'evoluzione della malattia e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Attualmente le nuove evidenze nel campo della classificazione istologica, l'identificazione di criteri nosografici legati all'aggressività clinica, le nuove conoscenze di biologia molecolare hanno reso i NETs oggetto di studi. Pertanto il conseguimento dei migliori risultati nella gestione dei pazienti affetti da tumori neuroendocrini richiede, infatti, un approccio multidisciplinare che coinvolge tutti gli specialisti attivi nel percorso diagnostico terapeutico: il chirurgo, l'anatomopatologo, l'oncologo, l'endoscopista, il genetista ed il biologo molecolare.

Bibliografia:

1. Klöppel G, Anlauf M. Epidemiology, tumour biology and histopathological classification of neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005; 19: 507–517

Progetto 10/2021: “Sviluppo di strategie terapeutiche basate sui miRNAs in modelli preclinici di malattie infiammatorie croniche intestinali”

Responsabile: dott.ssa Grazia Serino

Partecipanti: Viviana Scalavino, Emanuele Piccinno, Giusy Bianco, Angela Tafaro, Raffaele Armentano

Introduzione

La malattia di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), comunemente note come malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI o secondo la nomenclatura anglosassone IBD, inflammatory bowel diseases), sono patologie idiopatiche caratterizzate da uno stato flogistico del tratto gastroenterico ad andamento cronico recidivante.

L'eziologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali non è ancora nota ma è attualmente ipotizzata un'origine multifattoriale. La predisposizione genetica è uno degli elementi preponderanti come dimostra l'aumentata percentuale di IBD nei parenti di persone affette (1). Riguardo i geni responsabili, sono ancora pochi i dati certi a disposizione, ma sono state identificate regioni di suscettibilità in almeno 12 cromosomi.

Nella patogenesi delle IBD l'elemento più importante è l'alterazione dell'equilibrio immunitario a livello della mucosa intestinale che determina una risposta inappropriata ad antigeni normalmente presenti nel lume intestinale, tra cui la flora batterica.

Il preciso meccanismo ancora non è conosciuto ma il difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali può scatenare una cascata di eventi che termina con l'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario (2).

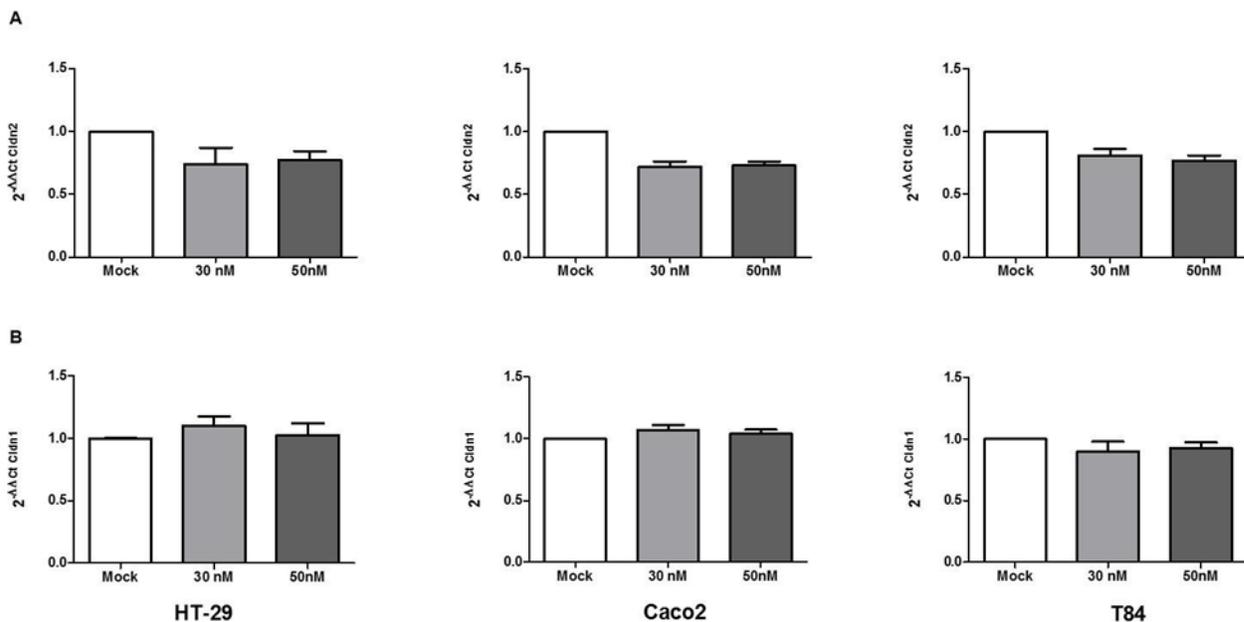
L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50µm (3). È stato dimostrato che una alterazione dell'integrità della barriera intestinale comporta una cascata di eventi quali: passaggio indiscriminato di contenuto luminale attraverso le giunzioni epiteliali, insorgenza di infiammazione e danno tissutale (4).

Infiammazione e cancro sono strettamente collegati. Il tumore crea attorno a sé una risposta infiammatoria così come l'infiammazione prepara il terreno su cui può svilupparsi il tumore. Numerosi studi hanno riportato che l'infiammazione cronica è associata ad un aumentato rischio di insorgenza del cancro (5). L'alterata produzione di mediatori pro-infiammatori (ad es. IL-1, IL-6, TNFα) porta all'attivazione di eventi intrinseci e/o estrinseci che stimolando la proliferazione cellulare, possono favorire la genesi del tumore, la sua progressione e la sua pericolosità (6). Infatti, il cancro del colon associato a colite (CACC) rappresenta un esempio della stretta connessione tra infiammazione e cancro, e l'infiammazione intestinale nei pazienti con IBD rappresenta un significativo fattore di rischio per lo sviluppo del cancro coloretale (7).

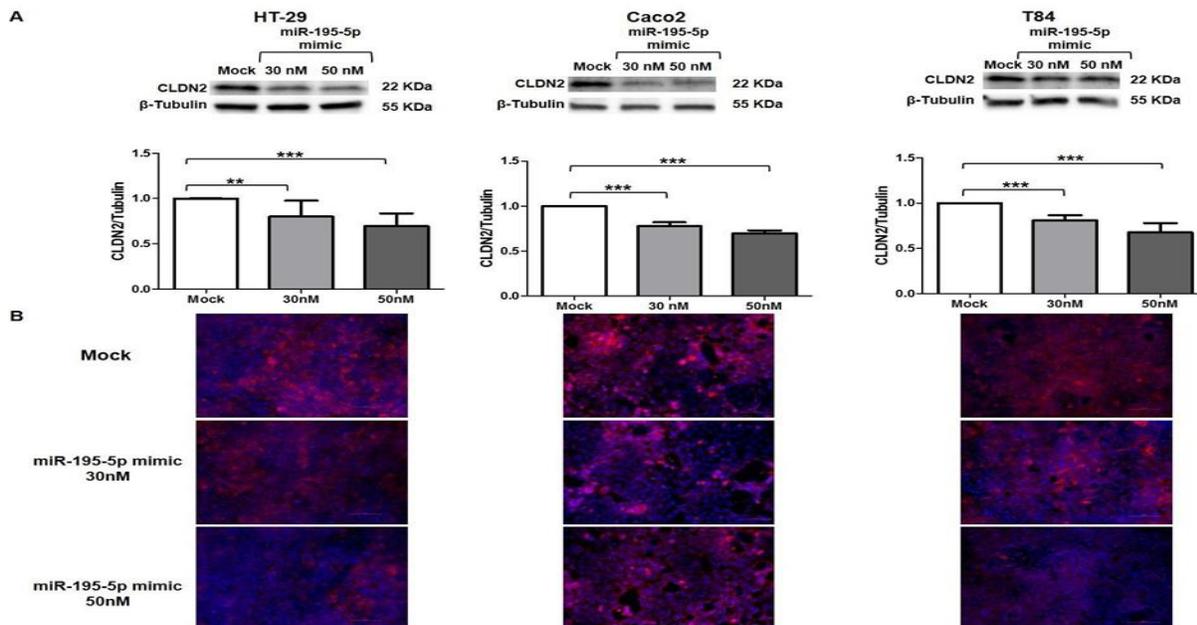
Negli ultimi anni, nella ricerca biomedica particolare interesse hanno destato delle piccole molecole di RNA chiamate microRNA (miRNA) che regolano l'espressione di geni inibendo la trascrizione di RNA messaggero in proteine o favorendo la degradazione dell'RNA messaggero di specifici geni. Diversi studi dimostrano anche che i miRNA giocano un ruolo importante in molte patologie umane come le neoplasie. Inoltre, è stato dimostrato che esiste un profilo unico di espressione dei miRNA per ogni malattia e che l'espressione alterata di uno o più miRNA è specifico di ogni patologia. Per questi motivi, i miRNA potrebbero essere utilizzati sia come potenziali target terapeutici sia come nuovi biomarcatori predittivi e/o diagnostici di malattia. Uno dei principali vantaggi di una terapia basata sull'utilizzo dei miRNA consiste nel fatto che i microRNA sono in grado di regolare simultaneamente più pathway cellulari e ciò li rende farmaci adatti al trattamento di patologie complesse come le IBD che in genere sono associate all'alterazione di diverse vie del segnale (8). In generale, la sovraespressione di un miRNA è ottenuta attraverso la somministrazione di oligonucleotidi sintetici miRNA specifici (mimic) o la somministrazione di vettori esprimenti il microRNA di interesse. L'inibizione di un miRNA invece è ottenuta attraverso la somministrazione di un oligonucleotide anti-senso.

Diversi lavori hanno studiato il ruolo dei miRNA nelle IBD dimostrandone il loro coinvolgimento nella patogenesi (9-10). Tuttavia, il limite della maggior parte degli studi esistenti è rappresentato dal materiale di partenza su cui è stato effettuato il profiling dei miRNA, infatti il tessuto in toto è costituito da una eterogeneità cellulare che rende difficile la comprensione dei risultati ottenuti.

Per validare i risultati dell'analisi bioinformatica, abbiamo studiato l'effetto dell'aumento intracellulare del miR-195-5p sull'espressione del gene target *Cldn2*. Abbiamo effettuato, in vitro, transfezioni transienti con molecole di miR-195-5p mimic in tre linee cellulari epiteliali del colon umano: HT-29, Caco2 e T84. Dopo la transfezione, i livelli di mRNA della *Cldn2* sono risultati significativamente diminuiti in tutte e tre le linee cellulari trattate con miR-195-5p mimic a concentrazioni 30 nM e 50 nM ($p < 0,01$; Figura A). Inoltre, abbiamo anche valutato se l'aumento di miR-195-5p influenzasse l'espressione della *Cldn1*, una componente delle TJ che è ampiamente espressa nell'intestino e ha un ruolo importante nell'integrità dell'epitelio intestinale. Dopo la transfezione, abbiamo scoperto che i livelli di *Cldn1* risultavano simili al controllo in tutte le linee cellulari ($p > 0,05$; Figura B).

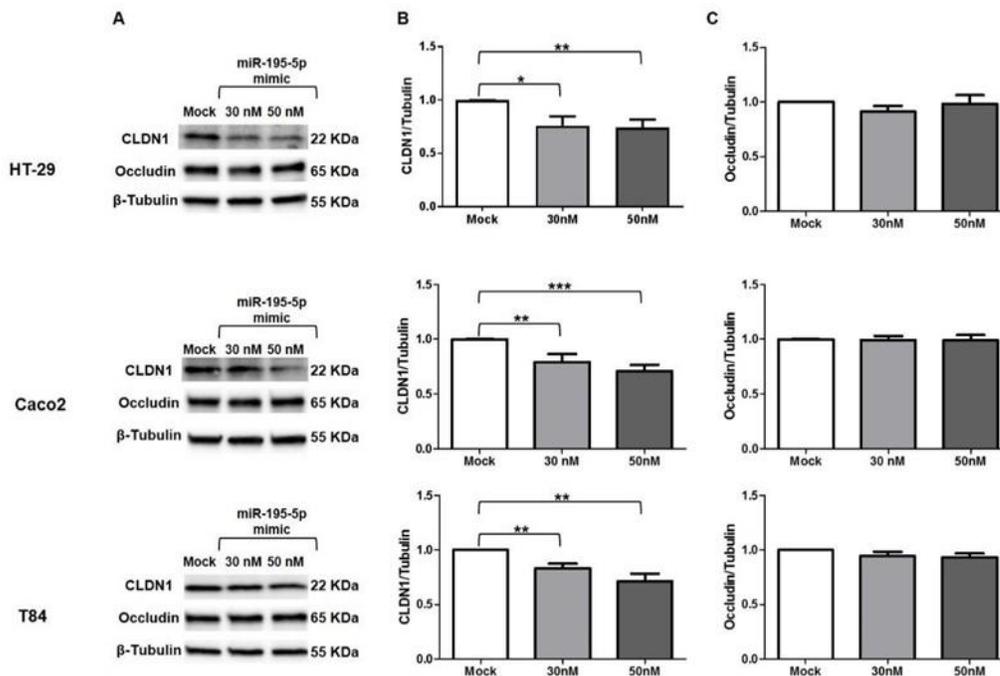


Abbiamo, quindi, utilizzato la stessa strategia per incrementare la forma matura di miR-195-5p nelle HT-29, Caco2 e T84, con l'obiettivo di verificare se anche l'espressione della proteina CLDN2 fosse controllata dai livelli di miR-195-5p. In accordo con i risultati ottenuti a livello di RNA, le analisi del Western blot hanno mostrato che l'espressione della proteina CLDN2 è diminuita dopo la transfezione con miR-195-5p mimic in tutte le linee cellulari ($p < 0,05$; Figura A). Inoltre, abbiamo studiato la localizzazione della CLDN2 in HT-29, Caco2 e T84 in seguito alla transfezione col miR-195-5p mimic. Come mostrato dai risultati dell'immunofluorescenza, nelle colture monostrato la CLDN2 è localizzata sulla membrana plasmatica in tutte le linee cellulari considerate. In accordo con i risultati del western blot, dopo la transfezione transiente con miR-195-5p mimic, l'espressione della CLDN2 è diminuita rispetto al mock utilizzato come controllo (Figura B).



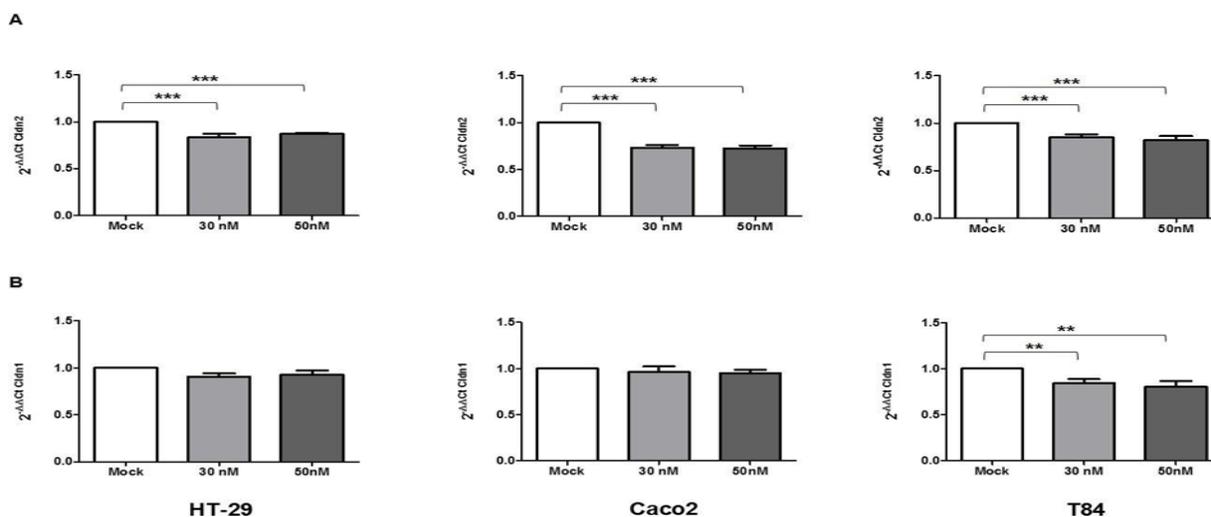
Abbiamo anche studiato l'espressione di CLDN1 a livello proteico, che è risultata significativamente ridotta ($p < 0,05$; Figura A-B). La discrepanza tra i livelli di mRNA e l'espressione proteica della CLDN1 post-transfezione potrebbe essere la causa di un legame indiretto tra il miR-195-5p e la CLDN1. Infatti, la riduzione dell'espressione della CLDN1 probabilmente era una conseguenza della ridotta espressione della CLDN2.

Un'altra proteina che svolge un ruolo cruciale nella struttura della TJ e nella permeabilità dell'epitelio intestinale è l'Occludina. Questa proteina non è coinvolta individualmente nella formazione di TJ, ma il suo reclutamento richiede la co-espressione di claudine come la CLDN1. Per questi motivi, abbiamo anche valutato l'espressione proteica dell'Occludina dopo la transfezione con miR-195-5p in tutte le linee cellulari. Abbiamo trovato una leggera modulazione dell'Occludina in tutte e tre le linee cellulari (Figura A-C).

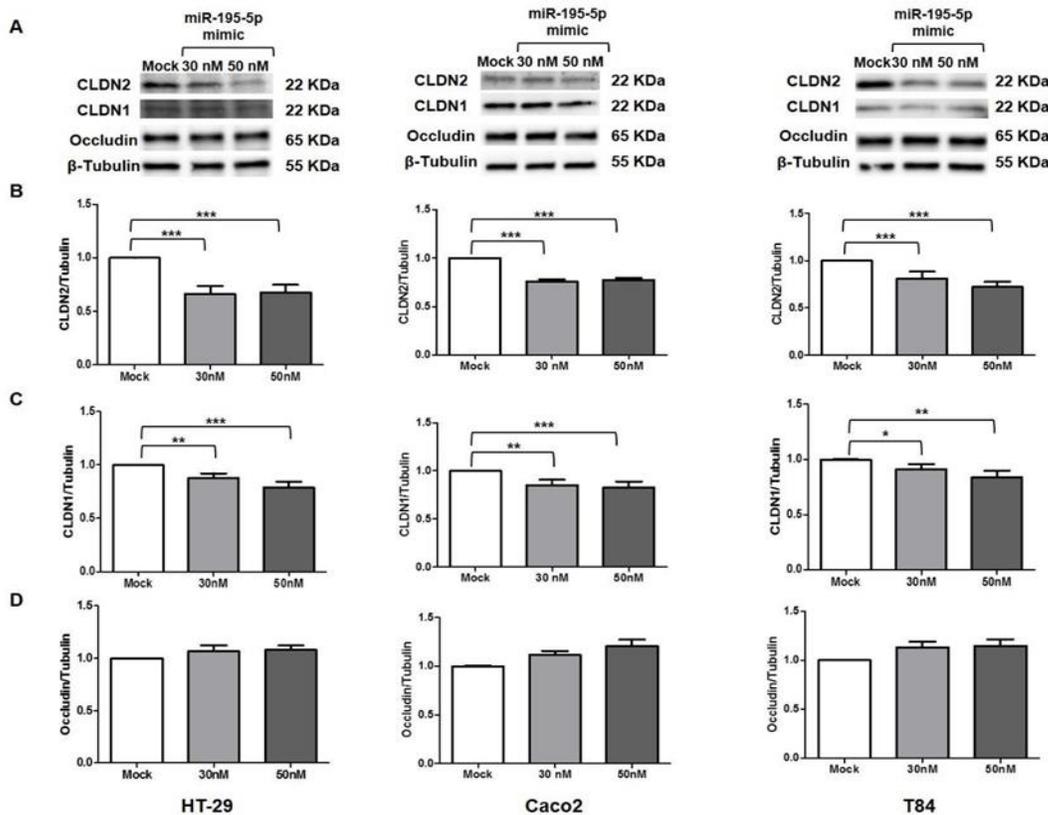


La citochina proinfiammatoria TNF- α ha un ruolo rilevante nella disfunzione della barriera intestinale mediata dalle tight junctions nelle IBD.

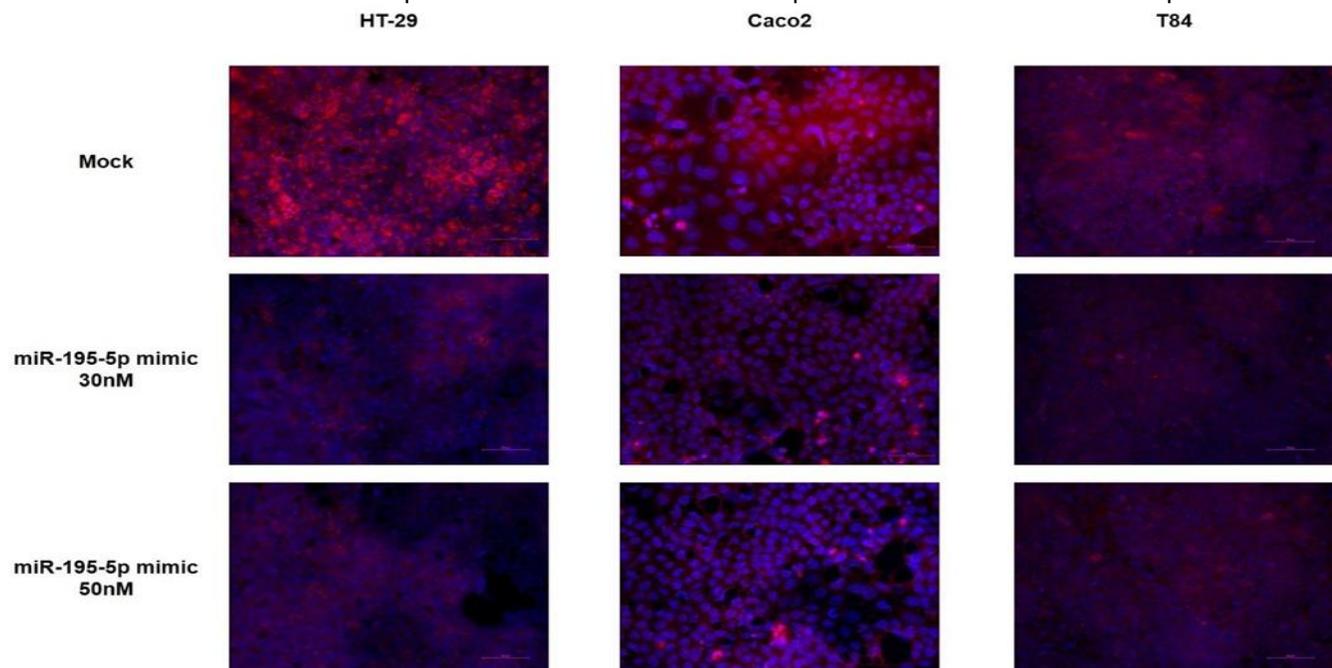
Poiché il TNF- α influenza l'integrità e le funzioni di barriera delle TJ, per simulare questa condizione infiammatoria in vitro, abbiamo esposto le linee cellulari HT-29, Caco2 e T84 al trattamento con TNF- α e valutato l'effetto del miR-195-5p sulla funzione di barriera della TJ epiteliale intestinale. Anche in questo caso, abbiamo dimostrato che la transfezione transiente con miR-195-5p mimic a 30 nM e 50 nM riduceva significativamente l'espressione del gene *Cldn2* ($p < 0,05$; Figura A). Invece, i livelli di mRNA della *Cldn1* erano leggermente modulati dalla transfezione, ma non in modo significativo ad eccezione della linea cellulare T84 ($p > 0,05$ per HT-29 e Caco2 e $p < 0,001$ per T84; Figura B).



Inoltre, abbiamo voluto dimostrare se alla riduzione dell'RNA corrispondeva una riduzione della proteina CLDN2. Anche in presenza di TNF- α , l'aumento dei livelli intracellulari di miR-195-5p ha determinato una ridotta espressione proteica di CLDN2 ($p < 0,05$; Figura A-B) e CLDN1 ($p < 0,05$; Figura A-C) in tutte e tre le linee cellulari. Inoltre, anche se non statisticamente significativi, i nostri dati hanno dimostrato un leggero aumento della proteina Occludina, indicando che la modulazione indiretta da parte del miRNA potrebbe impedirne l'internalizzazione ($p > 0,05$; Figura A-D).



Inoltre, l'immunofluorescenza eseguita su monostrati cellulari stimolati con TNF- α ha dimostrato che il segnale della CLDN2 rilevato nelle linee cellulari dopo transfezione con miR-195-5p è notevolmente ridotto rispetto al controllo.

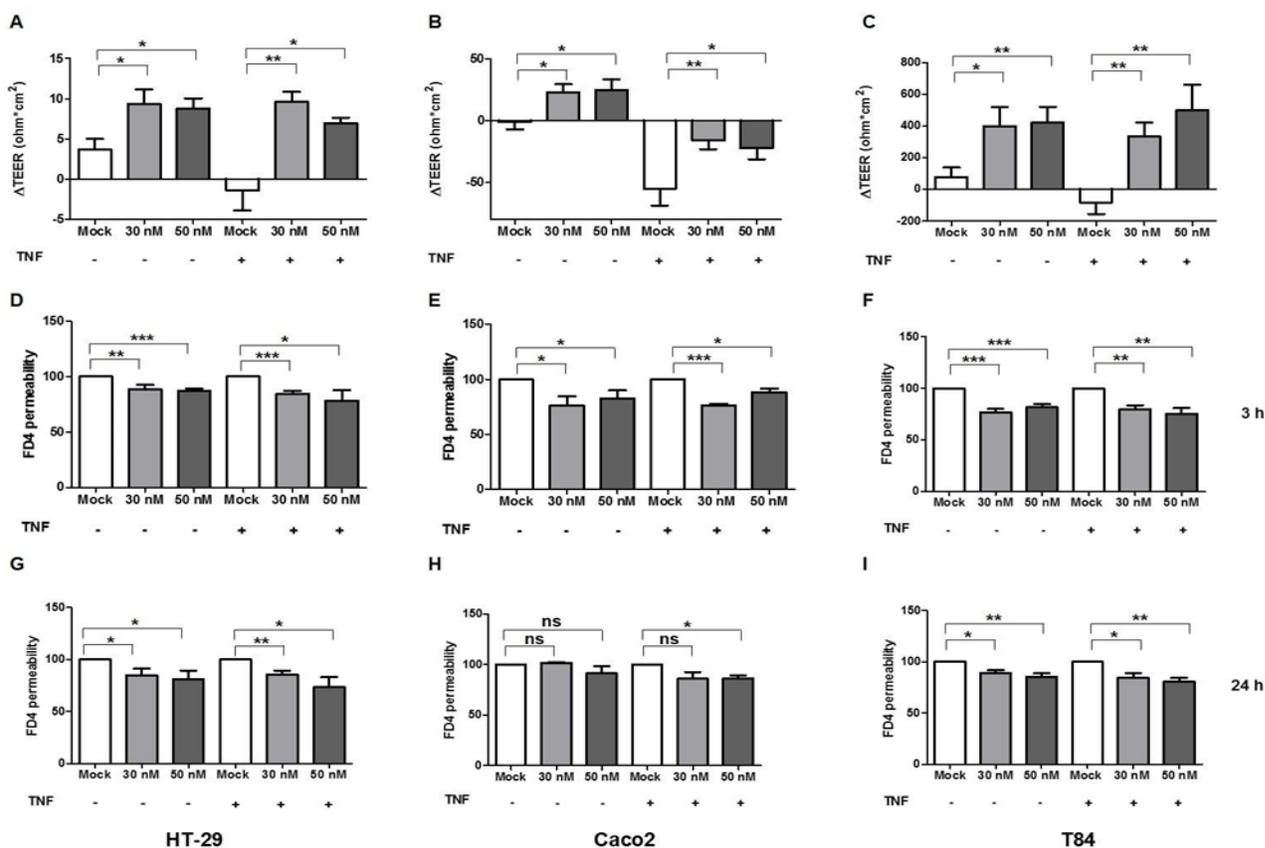


L'espressione dei pori formati dalla CLDN2 porta ad un aumento della permeabilità paracellulare. Per valutare l'integrità e la permeabilità del monostrato cellulare dopo la transfezione con miR-195-5p mimic, abbiamo analizzato la resistenza transepiteliale attraverso la misurazione TEER (un indice per rilevare la forza delle connessioni intercellulari del colon) in monostrati cellulari di HT-29, Caco2 e T84 con e senza stimolo con TNF- α .

I nostri dati hanno dimostrato che dopo aver aumentato la quantità di miR-195-5p intracellulare, la permeabilità delle cellule epiteliali intestinali, espressa sotto forma di TEER, era significativamente ridotta in tutte le linee cellulari ($p < 0,05$). Inoltre, anche dopo la stimolazione del TNF- α , la TEER delle cellule epiteliali intestinali risultava significativamente migliorata in tutte le linee cellulari dimostrando una riduzione della permeabilità intestinale ($p < 0,05$; Figura A-C). Questi risultati hanno confermato il ruolo del miR-195-5p nel promuovere il ripristino dell'epitelio intestinale.

Per confermare ulteriormente il ruolo del miR-195-5p nell'integrità della barriera intestinale, abbiamo studiato l'effetto dell'aumento dei livelli intracellulari di miR-195-5p sulla permeabilità paracellulare, attraverso l'analisi del dosaggio FITC-destrano-4 (FD-4, 4KDa). Il flusso di FD-4 rilevato a 3 e 24 ore di incubazione ha mostrato una riduzione significativa nelle condizioni transfettate in tutte le linee cellulari, considerando il mock come il controllo con la quantità massima di permeabilità (100%). La riduzione è stata osservata anche nelle linee cellulari trattate con TNF- α ($p < 0,05$, Figura D-I).

Questi risultati dimostrano che il miR-195-5p potrebbe regolare la funzione della barriera epiteliale intestinale andando ad agire sul gene CLDN2.



Prospettive future: Sono in corso studi funzionali in vivo per dimostrare che il miR-195-5p è responsabile del miglioramento della permeabilità intestinale in modelli murini di colite ulcerosa e cancro coloretale. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che diverse patologie epatiche quali NASH e altre manifestazioni della sindrome metabolica sono associate a un' aumentata permeabilità intestinale. A questo scopo testeremo l'efficacia della terapia con miR-195-5p anche in modelli murini a cui verrà somministrata una dieta ricca di lipidi (HFD) e DSS che induce oltre alla colite, un'infiammazione a livello epatico.

Pubblicazioni: I risultati di questa parte del progetto sono oggetto di un paper sottomesso alla rivista Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology e stiamo attendendo il parere dei revisori. Inoltre, è stata inoltrata la richiesta per il deposito di brevetto italiano.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Caratterizzazione funzionale dei miRNAs individuati in cellule epiteliali intestinali di linea continua

Obiettivo specifico 2: Studiare in vivo gli effetti dell'incremento dei miRNAs individuati nei modelli animali di colite ulcerosa e cancro coloretale.

Obiettivo specifico 3: Validazione dei risultati ottenuti nel modello murino su campioni di colon provenienti da pazienti affetti da colite ulcerosa e cancro coloretale.

Obiettivo Specifico 1:

WP1. Studi funzionali in vitro

In questo WP andremo a validare biologicamente l'interazione predetta tra lo specifico miRNA e i corrispondenti geni da esso regolati. Vista la difficoltà nella messa in coltura delle cellule epiteliali intestinali murine, gli esperimenti di transfezione saranno effettuati in cellule epiteliali del colon a linea continua quali Caco-2 e HT-29. Per fare ciò, si provvederà ad aumentare i livelli di miRNA nelle cellule in coltura mediante la transfezione transiente con miRNA sintetici detti miRNA mimic. I miRNA mimic sono miRNA sintetici disegnati per inserirsi nella pathway della biogenesi dei miRNA a livello di miRNA maturi. In questo modo, i mimic aumentano i livelli di miRNA già presenti nella cellula determinando una riduzione dell'espressione del gene e quindi della proteina target.

Dopo la transfezione, si valuteranno gli effetti a livello di espressione genica del gene target predetto e i livelli della corrispondente proteina. Inoltre, si andrà anche a valutare il meccanismo biologico in cui i miRNAs sono coinvolti (es. permeabilità intestinale, proliferazione, apoptosi, ecc.).

Obiettivo Specifico 2:

WP2. Studio *in vivo* in modelli animali di colite ulcerosa degli effetti dell'incremento dei miRNAs individuati

Per confermare il diretto coinvolgimento del/i miRNA nel processo di infiammazione intestinale, le molecole di miRNA mimic verranno inoculate in modelli murini di colite ulcerosa indotta chimicamente da destran sodio solfato (DSS) sia in forma acuta sia in forma cronica. Il DSS sarà disciolto in acqua potabile ad libitum al 3% e al 2% rispettivamente secondo lo schema in allegato. Allo scopo di determinare l'impatto dell'aumento di miRNA sull'infiammazione cronica (es. IBD) e sullo sviluppo conseguente di cancro al colon, noi utilizzeremo il modello CACC a due stadi, che ha inizio con l'iniezione intraperitoneale di Azossimetano (AOM) seguito da 4 cicli di somministrazione di DSS in acqua da bere.

La prima parte della sperimentazione avrà lo scopo di determinare la biodistribuzione del farmaco e a questo fine verranno utilizzate molecole di miRNA mimic fluorescenti.

Alla 10[°] settimana di vita saranno somministrate per via intraperitoneale le molecole di miRNA mimic coniugate con molecole lipidiche (liposomi) in PBS pH 7.4 e saranno in modo random formati il gruppo controllo e gruppo trattati. La somministrazione durerà 5 settimane e le iniezioni saranno effettuate due volte a settimana.

Durante la durata degli esperimenti, verrà valutato un punteggio dell'indice di attività della malattia (DAI) per valutare la progressione clinica della colite. Il DAI è il punteggio combinato di perdita di peso rispetto al peso iniziale, consistenza delle feci e sanguinamento. Il DAI verrà valutato giornalmente durante tutta la durata del trattamento con i miRNA mimic.

Gli animali saranno sacrificati dopo 24 ore dall'ultimo trattamento mediante dislocazione cervicale. Verranno raccolti e utilizzati campioni di tessuto di colon per valutare l'entità del danno a livello macroscopico e microscopico. Per i topi trattati con AOM/DSS, andremo a valutare il numero dei polipi intestinali.

Determineremo anche l'espressione delle proteine tight junction delle cellule intestinali epiteliali essenziali per la permeabilità intestinale. Lo stato infiammatorio sarà valutato mediante il dosaggio di citochine/chemochine pro-infiammatorie acute e l'attività della mieloperoxidasi.

Obiettivo Specifico 3:

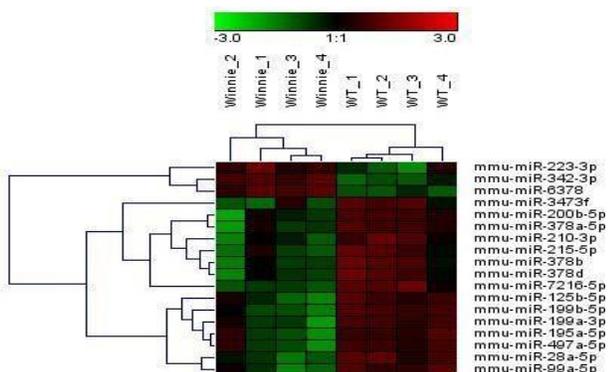
WP3. Validazione dei risultati ottenuti nel modello murino in pazienti affetti da colite ulcerosa Allo scopo di verificare se i risultati ottenuti nel modello murino possono essere traslati nell'uomo, andremo a valutare l'espressione dei miRNA validati biologicamente nel modello murino in campioni biopsici fissati in formalina o inclusi in paraffina ottenuti da pazienti con colite ulcerosa e cancro coloretale archiviati nel Dipartimento di Anatomia Patologica dell'IRCCS "Saverio de Bellis". In questi tessuti la rilevazione dei miRNA avverrà sia tramite Real-Time PCR dopo aver effettuato la microdissezione laser dell'epitelio e sia tramite ibridazione in situ che permetterà una determinazione semi-quantitativa dei miRNA e la loro localizzazione nel tessuto in toto. I livelli di espressione saranno inoltre correlati con i parametri clinici (tissutali e laboratoristici) dei pazienti presi in esame.

Dati Preliminari:

Il modello *Winnie* sviluppato nel nostro Istituto rappresenta un modello per lo studio della colite ulcerosa. Essi, infatti, sono geneticamente predisposti a sviluppare la colite ulcerosa e mostrano a livello fenotipico e a livello istologico i segni dell'infiammazione intestinale. Al raggiungimento delle 16 settimane, dopo il sacrificio, l'analisi macroscopica ha confermato la presenza di segni di infiammazione nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type. Infatti, il colon dei topi Winnie risultava più corto di quello del wild-type, segno di una infiammazione intestinale. Nei colon con mutazione Winnie era, inoltre, frequente la presenza di feci poco consistenti ed a volte la presenza di sangue.

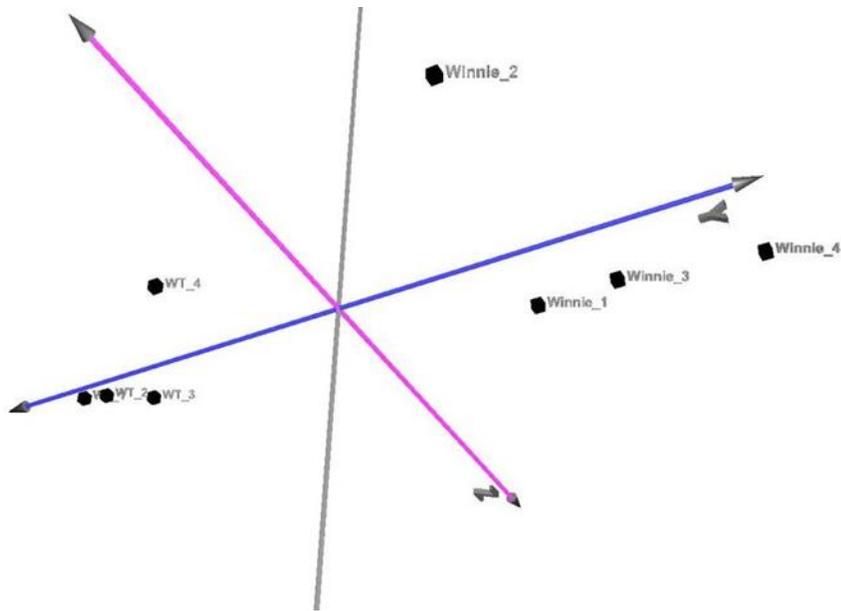
I pezzi di colon sono stati prelevati da 4 topi Winnie e 4 topi wild-type e sottoposti a digestione meccanica con il gentleMACS™ Dissociator ed enzimatica utilizzando il kit Lamina Propria Dissociation kit per topo (Miltenyi Biotec). La sospensione cellulare è stata in seguito utilizzata per selezionare le cellule epiteliali (EpCAM+) mediante separazione immunomagnetica positiva con biglie magnetiche coniugate con anticorpi per EpCAM (CD326). Allo scopo di determinare la purezza delle cellule isolate, al termine della separazione è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica con l'anticorpo EpCAM-PE (Miltenyi Biotec). Sono stati utilizzati solo campioni con una purezza di cellule EpCAM+ superiore al 90%. Inoltre, visto che il marcatore EpCAM è espresso anche sulla popolazione leucocitaria, abbiamo anche valutato la presenza delle cellule CD45 positive nei nostri campioni mediante anticorpo CD45-APC (Miltenyi Biotec). Le cellule selezionate, dopo separazione immunomagnetica, risultavano tutte EpCAM+ e CD45⁻. Le cellule selezionate sono state lisate per RNA e si è proceduto all'estrazione dei miRNAs mediante kit miRNeasy mini (Qiagen), un metodo che combina la lisi del campione con fenolo/guanidina tiocianato e la purificazione dell'RNA totale che comprende anche i piccoli RNA con una membrana di silice. La concentrazione del campione ottenuto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante lo strumento Bioanalyzer (Agilent).

Il profilo di espressione totale dei miRNAs è stato, quindi, effettuato mediante la metodica del microarray su piattaforma Agilent. I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica. A partire dai 1881 miRNA murini rappresentati sul microarray, sono stati identificati 460 miRNA che risultano espressi nelle cellule epiteliali isolate. Questi dati sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche allo scopo di determinare quali sono i miRNA differenzialmente espressi tra topi Winnie e wild-type. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati 18 miRNA che discriminano le cellule epiteliali intestinali dei topi Winnie dalle cellule epiteliali intestinali dei topi wild-type.



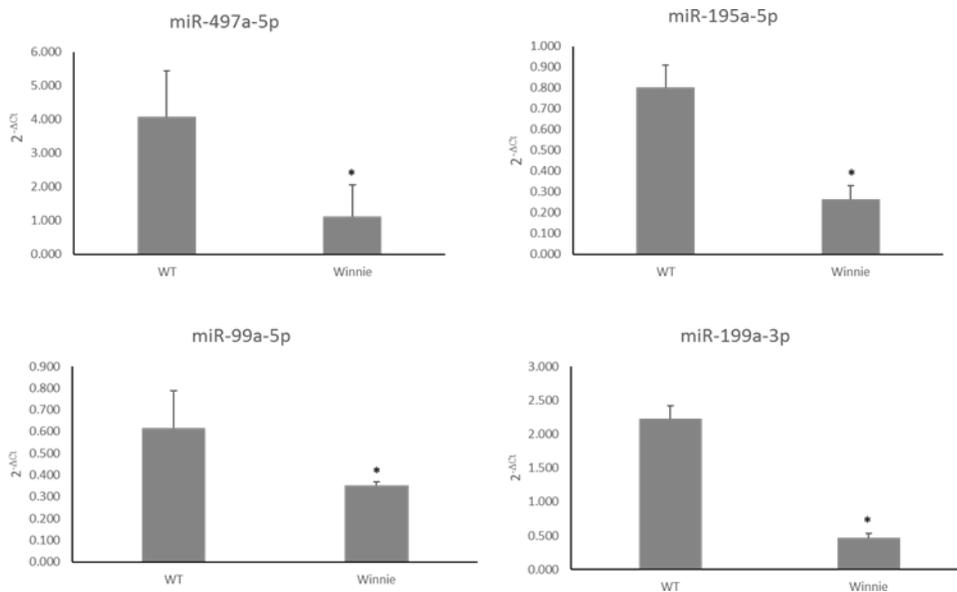
Hierarchical clustering

Il 2-D hierarchical clustering e la principal component analysis, sviluppati con il software Genesis, dimostrano chiaramente che il profilo di espressione dei miRNA delle cellule epiteliali intestinali dei 2 modelli è nettamente distinto



Principal Component Analysis

I dati ottenuti da microarray sono stati validati mediante l'utilizzo della Real-Time PCR su RNA estratto da cellule epiteliali intestinali di un gruppo indipendente di 4 topi Winnie e 4 topi wild-type. Tutti i miRNA analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo nell'espressione nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto a quelle isolate da topi wild-type, confermando i risultati del microarray (* $p < 0.01$).



Al fine di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNA deregolati che sono stati individuati nell'analisi del microarray, è stata effettuata un'analisi bioinformatica utilizzando diversi software di predizione accessibili pubblicamente on line. Sono stati utilizzati 6 differenti algoritmi e in seguito, per ridurre il numero di falsi positivi, sono stati sovrapposti i risultati ottenuti dai differenti database e considerati solo i geni target putativi predetti da almeno 3 dei 6 database. Basandosi sui risultati ottenuti dalle analisi bioinformatiche sono stati individuati diversi geni, particolarmente coinvolti nella fisiopatologia delle cellule epiteliali intestinali, che erano potenzialmente regolati da alcuni dei miRNA individuati. Per approfondire le interazioni biologiche tra i miRNA trovati modulati nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto ai controlli e i geni target regolati dai miRNA, è stata effettuata un'ulteriore analisi bioinformatica per valutare le pathway e i processi biologici in cui sono coinvolti i geni target dei miRNA. In particolare, risultano significativamente modulate le seguenti pathways canoniche: Wnt, MAPK, TGF β , tight junction, Intestinal immune network for IgA production. Inoltre, tra i processi biologici più significativi sono stati identificati la proliferazione e la crescita cellulare, lo sviluppo delle cellule e degli organi, la morfologia cellulare e le interazioni cellula-cellula.

Metodologie e analisi statistiche:

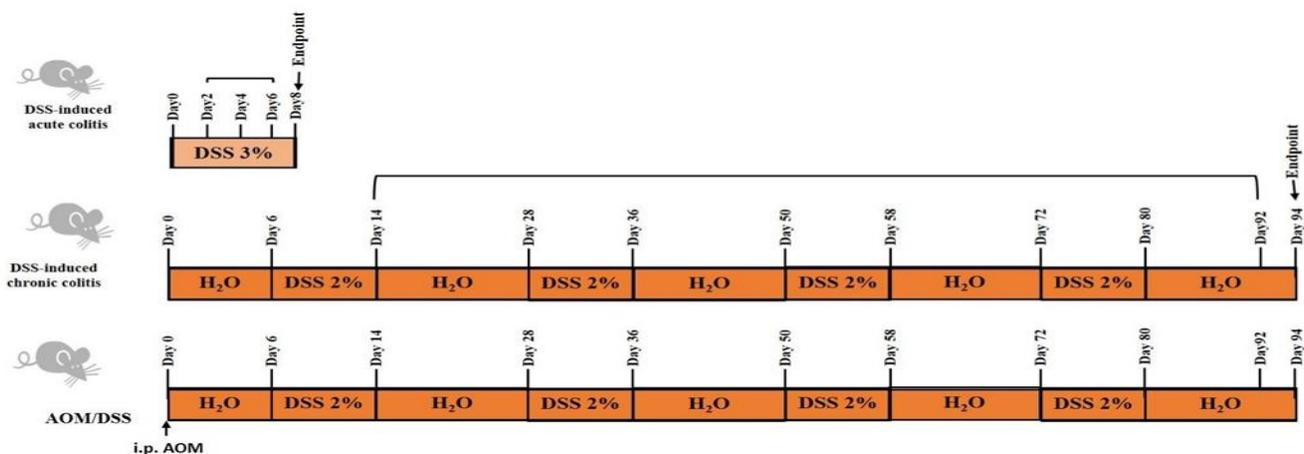
Gli esperimenti di transfezione sulle cellule epiteliali del colon a linea continua quali Caco-2 e HT-29 saranno effettuati utilizzando molecole di miRNA mimic. Queste molecole vanno ad aumentare i livelli del miRNA endogeno. Si utilizzerà un metodo di transfezione transiente a base di liposomi cationici. I liposomi cationici sono delle vescicole lipidiche artificiali, dotati di carica elettrica positiva, in grado di incorporare il miRNA a carica negativa e di trasportarlo all'interno delle cellule mediante fusione con le membrane cellulari o mediante endocitosi mediata dal recettore. Il miRNA mimic, racchiuso nel liposoma, viene successivamente rilasciato nel citoplasma dove va ad aumentare i livelli di miRNA intracellulare.

Ciascun esperimento di transfezione includerà inoltre un controllo negativo (mock) transfettato nelle stesse condizioni senza miRNA per valutare effetti tossici del reagente di transfezione e un controllo non transfettato per valutare il livello basale del gene.

Dopo la transfezione, si valuteranno gli effetti a livello di espressione genica del gene target predetto mediante Real-Time PCR e i livelli della corrispondente proteina mediante esperimenti di Western blot, immunistochemica e immunofluorescenza.

La somministrazione intraperitoneale di molecole di miRNA mimic nei modelli animali sarà effettuata in topi wild-type a partire dalla 10 settimana di vita secondo lo schema di seguito. La somministrazione di molecole di miRNA mimic verrà effettuata in modelli sperimentali di colite acuta e cronica. La colite acuta indotta da DSS sarà effettuata mediante l'aggiunta di 3% di DSS in acqua da bere per 8 giorni, la colite cronica sarà indotta da cicli alternati di DSS al 2% e acqua. I modelli di topi AOM/DSS saranno originati a partire da una iniezione intraperitoneale di AOM seguita da 4 cicli alternati di DSS in acqua da bere.

Le molecole di miRNA mimic saranno veicolate da liposomi a base lipidica e saranno iniettate per via intraperitoneale secondo lo schema di seguito:



Gli animali saranno monitorati nel tempo per i parametri di infiammazione a livello intestinale.

Le sezioni dei campioni biotici derivanti da pazienti con colite ulcerosa saranno utilizzate per effettuare la microdissezione dell'epitelio con la tecnica della "laser capture". Le sezioni verranno lisate e sottoposte direttamente alla reazione di trascrizione inversa. Successivamente verrà eseguita la valutazione quantitativa dei miRNA maturi presenti nei vari campioni mediante "real-time PCR".

Per identificare quali cellule esprimono nell'uomo i miRNA individuati e i rispettivi geni target, verranno eseguiti esperimenti di ibridazione in situ su sezioni FFPE provenienti dai vari gruppi sperimentali utilizzando una sonda specifica per ciascuno dei miRNA e mRNAs identificati.

Risultati attesi:

L'obiettivo principale previsto di questo progetto sarà quello di eseguire saggi preclinici per testare la potenziale efficacia terapeutica del trattamento con miRNA per la colite ulcerosa. In primo luogo testeremo l'effetto dell'aumento del/i miRNA nelle cellule epiteliali in vitro che ci permetterà la comprensione dei meccanismi molecolari che causano l'infiammazione cronica a livello intestinale. Quindi, valuteremo se l'induzione del/i miRNA in vivo può migliorare l'infiammazione intestinale nei modelli di topi di colite ulcerosa indotta da DSS in forma acuta e cronica.

Innovazioni:

L'obiettivo di questo progetto è migliorare il trattamento della malattia infiammatoria cronica intestinale. Ad oggi, non esiste una cura specifica per queste patologie e i trattamenti attuali si focalizzano sul blocco della risposta infiammatoria che può causare diversi effetti collaterali significativi come sovra infezioni dovute ad una carenza della risposta immunitaria nei confronti di agenti patogeni. Di conseguenza, nuovi approcci terapeutici principalmente focalizzati su molecole target specifiche potrebbero portare a una riduzione di questi effetti collaterali.

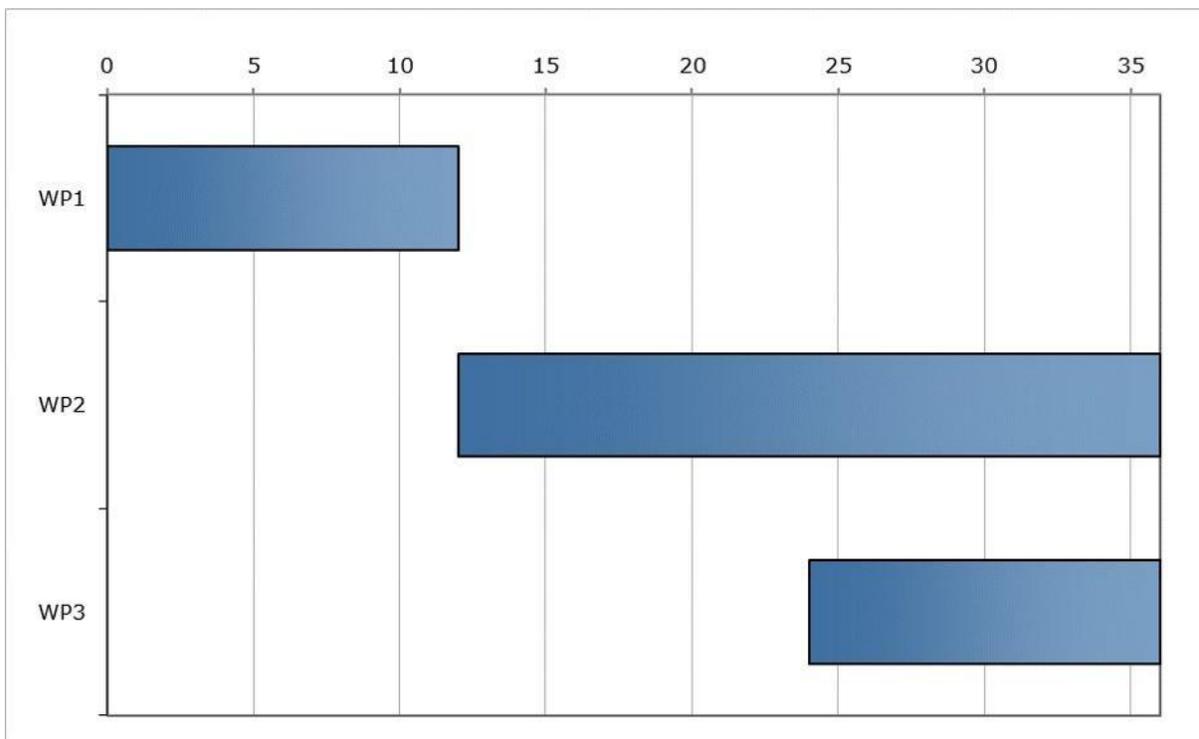
A causa della natura evolutivamente conservata del miRNA, i nostri studi su modelli preclinici potrebbero essere potenzialmente traslati per il trattamento del paziente con IBD. Da notare che i costi di produzione limitati di tali molecole rispetto ai farmaci attualmente in uso potrebbero avere un impatto economico rilevante sulle spese sanitarie pubbliche.

Infine, il meccanismo d'azione di questa nuova famiglia di farmaci faciliterà un approccio terapeutico personalizzato.

Bibliografia:

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 369(9573):1627-40, 2007.
2. Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 16(34):4264-71, 2010
3. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*. 1(2):123-35, 2009.
4. Ahmad R., Sorrell MF, Batra SK, Dhawan P & Singh AB. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol* 10, 307–317, 2017.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5):646-674, 2011.
6. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454(7203) :436-444, 2008.
7. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 372 (15):1441-1452, 2015.
8. Chiranjib Chakraborty, Ashish Ranjan Sharma, Garima Sharma, C. George Priya Doss, Sang-Soo Lee. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*. 8: 132–143, 2017.

Timeline (Gantt chart)



Progetto 11/2020: "Markers tissutali e sierici nella diagnosi differenziale tra le patologie benigne e maligne del pancreas"

Responsabile: dott.ssa Anna Maria Valentini

Partecipanti: Antonio Lippolis, Graziana Arborea, Antonio Pisani, Palma Aurelia Iacovazzi, Nicolò Schena

Introduzione

Il carcinoma pancreatico è la settima causa di morte per neoplasia nel mondo e, nonostante i progressi nella diagnosi e nei trattamenti, la sopravvivenza a 5 anni rimane del 9%. Nell'Europa occidentale ha un'incidenza di 7.7 casi x 100.000, praticamente uguale al tasso di mortalità che è pari a 7.6 x 100.000. L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) rappresenta l'85% -90% delle neoplasie pancreatiche. Quando viene rilevata una massa pancreatica, grazie agli attuali miglioramenti delle tecniche di imaging e del campionamento dei tessuti, è possibile effettuare una diagnosi definitiva di PDAC nella maggior parte dei pazienti. Tuttavia, esistono ancora alcune sfide nel distinguere la malattia maligna da quella benigna. Ciò è particolarmente vero per la pancreatite cronica che può mimare un adenocarcinoma sia in imaging che per l'aumento del CA 19-9 sierico. Di conseguenza, i pazienti a volte subiscono importanti resezioni chirurgiche epatopancreaticobiliari per condizioni che risultano essere benigne. E' stato riportato che i pazienti sottoposti a pancreaticoduodenectomia, per una condizione benigna, presentano un calo del 17% della sopravvivenza a lungo termine. Pertanto, è stata posta una grande attenzione al progresso e allo sviluppo di tecniche diagnostiche per il carcinoma pancreatico. Inoltre poiché i sintomi iniziali non sono specifici, la diagnosi di PDAC è generalmente ritardata e la maggior

parte dei tumori non è operabile al momento della diagnosi. Pertanto l'ecografia endoscopica con aspirazione con ago sottile (EUS-FNA), grazie ad un basso tasso di complicanze e alla capacità di ottenere un campione di tessuto, ha guadagnato il favore come modalità diagnostica per il carcinoma del pancreas. L'uso di EUS-FNA è supportato da un'alta sensibilità e specificità. Tuttavia, permangono difficoltà nell'ottenere campioni di tessuto adeguati che consentano una diagnosi di certezza. Fattori come la dimensione del tumore, la posizione del tumore, il calibro dell'ago, la tecnica utilizzata, l'esperienza dell'endoscopista contribuiscono tutti alla capacità di raccogliere un'adeguata biopsia. Pertanto risulta evidente come la diagnosi differenziale tra PDAC e patologie benigne sia un problema ancora maggiore su campioni derivanti da EUS-FNA per la esiguità del materiale tissutale a disposizione. Di conseguenza, numerosi studi sono stati dedicati all'esplorazione di markers immunoistochimici (IIC) che possano contribuire a mitigare il problema della esiguità del campione. Nonostante l'identificazione di numerosi marcatori IIC utili per la diagnosi di adenocarcinoma pancreatico, nessun marcatore ha dimostrato di avere un valore diagnostico sufficientemente elevato da poter essere utilizzato da solo. Di conseguenza, diversi studi si sono concentrati sulla combinazione di marcatori IHC all'interno di un panel al fine di aumentare la sensibilità e la specificità del test.

Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione immunoistochimica di S100P (S100 calcium binding Protein P), IMP3 (insulin-like growth factor 3 mRNA binding protein 3), Maspina, e la non espressione del prodotto del gene von Hippel-Lindau (pVHL) sono significativamente correlate con il PDAC. Tuttavia, sono pochi gli studi che utilizzano il valore diagnostico di questi anticorpi nella diagnosi differenziale tra PDAC e tessuto pancreatico normale / reattivo su campioni provenienti da FNA.

Recentemente è stato dimostrato in uno studio effettuato su Tissue Macroarray (TMA), non su campioni di FNA, che la diagnosi differenziale tra patologie benigne e PDAC si può avvalere della combinazione di TFFs (trefoil factors) e CA19-9 tissutali e sierici.

Obiettivo 1:

Validazione della metodica immunoistochimica relativa ai marcatori S100P, IMP3, Maspina, pVHL, TFF1-3 su 20 campioni chirurgici di adenocarcinoma pancreatico appartenenti alla istoteca del Servizio di anatomia patologica.

Obiettivo 2:

Arruolamento pazienti (circa 100) sottoposti a EUS-FNA per patologia pancreatica in regime di ricovero presso l'IRCCS "S de Bellis" e concomitante studio prospettico per la indagine tissutale di S100P, IMP3, Maspina, pVHL, TFF1-3 e sierica di TFF1-3 e CA19-9.

Obiettivo 3:

Valutazione del valore diagnostico dei marcatori tissutali e sierici al fine di una loro utilizzazione nella pratica clinica nella diagnosi differenziale tra patologie benigne e maligne del pancreas.

Metodologie e analisi statistiche:

La metodica immunoistochimica sarà utilizzata per la determinazione della espressione tissutale di IMP3, S100P, Maspina, pVHL e TFF1-3.

La determinazione dei livelli sierici di TFF1-3 e CA19-9 sarà eseguita utilizzando rispettivamente la tecnica ELISA su micropiastra e il metodo in chemiluminescenza.

Allo scopo sarà prelevato per ogni paziente un campione di siero in aggiunta a quelli normalmente utilizzati per la routine diagnostica oncologica.

I campioni sierici dello studio saranno conservati a -80°C presso il Laboratorio di patologia clinica.

I risultati ottenuti saranno sottoposti ad adeguate indagini statistiche

Risultati attesi:

Utilizzo del panel di marcatori tissutali e sierici nella pratica clinica routinaria per la diagnosi differenziale tra patologie benigne e maligne del pancreas

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Lo studio si avvarrà delle competenze endoscopiche, istopatologiche, immunofenotipiche e biochimiche assicurate da ciascun componente del gruppo di ricerca.

Stato di Avanzamento:

Il carcinoma pancreatico è la settima causa di morte per neoplasia nel mondo e, nonostante i progressi nella diagnosi e nei trattamenti, la sopravvivenza a 5 anni rimane del 9%. Nell'Europa occidentale ha un'incidenza di 7.7 casi x 100.000, praticamente uguale al tasso di mortalità che è pari a 7.6 x 100.000. L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) rappresenta l'85% -90% delle neoplasie pancreatiche. Quando viene rilevata una massa pancreatica, grazie agli attuali miglioramenti delle tecniche di imaging e del campionamento dei tessuti, è possibile effettuare una diagnosi definitiva di PDAC nella maggior parte dei pazienti. Tuttavia, esistono ancora alcune sfide nel distinguere la malattia maligna da quella benigna. Ciò è particolarmente vero per la pancreatite cronica che può mimare un adenocarcinoma sia in imaging che per l'aumento del CA 19-9 sierico. Di conseguenza, i pazienti a volte subiscono importanti resezioni chirurgiche epatopancreaticobiliari per condizioni che risultano essere benigne. È stato riportato che i pazienti sottoposti a pancreaticoduodenectomia, per una condizione benigna, presentano un calo del 17% della sopravvivenza a lungo termine. Pertanto, è stata posta una grande attenzione al progresso e allo sviluppo di tecniche diagnostiche per il carcinoma pancreatico. Inoltre poiché i sintomi iniziali non sono specifici, la diagnosi di PDAC è generalmente ritardata e la maggior parte dei tumori non è operabile al momento della diagnosi. Pertanto l'ecografia endoscopica con aspirazione con ago sottile (EUS-FNA), grazie ad un basso tasso di complicanze e alla capacità di ottenere un campione di tessuto, ha guadagnato il favore come modalità diagnostica per il carcinoma del pancreas. L'uso di EUS-FNA è supportato da un'alta sensibilità e specificità. Tuttavia, permangono difficoltà nell'ottenere campioni di tessuto adeguati che consentano una diagnosi di certezza. Fattori come la dimensione del tumore, la posizione del tumore, il calibro dell'ago, la tecnica utilizzata, l'esperienza dell'endoscopista contribuiscono tutti alla capacità di raccogliere un'adeguata biopsia. Pertanto risulta evidente come la diagnosi differenziale tra PDAC e patologie benigne sia un problema ancora maggiore su campioni derivanti da EUS-FNA per la esiguità del materiale tissutale a disposizione. Di conseguenza, numerosi studi sono stati dedicati all'esplorazione di markers immunoistochimici (IIC) che possano contribuire a mitigare il problema della esiguità del campione. Nonostante l'identificazione di numerosi marcatori IIC utili per la diagnosi di adenocarcinoma pancreatico, nessun marcatore ha dimostrato di avere un valore diagnostico sufficientemente elevato da poter essere utilizzato da solo. Di conseguenza, diversi studi si sono concentrati sulla combinazione di marcatori IHC all'interno di un panel al fine di aumentare la sensibilità e la specificità del test.

Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione immunoistochimica di S100P (S100 calcium binding Protein P), IMP3 (insulin-like growth factor 3 mRNA binding protein 3), maspina, e la non espressione del prodotto del gene von Hippel-Lindau (pVHL) sono significativamente correlate con il PDAC. Tuttavia, sono pochi gli studi che utilizzano il valore diagnostico di questi anticorpi nella diagnosi differenziale tra PDAC e tessuto pancreatico normale / reattivo su campioni provenienti da FNA.

Recentemente è stato dimostrato in uno studio effettuato su Tissue Macroarray (TMA), non su campioni di FNA, che la diagnosi differenziale tra patologie benigne e PDAC si può avvalere della combinazione di TFFs (trefoil factors) e CA19-9 tissutali e sierici.

Il primo obiettivo dello studio riguardava la validazione della metodica immunoistochimica su campioni chirurgici di carcinoma duttale pancreatico per poi eseguire uno studio prospettico su agobiopsie pancreatiche (FNAB). I maggiori tempi di attesa (dovuti alla elevata percentuale di inadeguati e/o alla esiguità di materiale) per collezionare un numero congruo di agobiopsie pancreatiche che potessero essere utilizzate nello studio ha indotto gli Autori a trasformare lo studio da prospettico a retrospettivo. Pertanto lo studio è stato effettuato su 30 campioni chirurgici di PDAC (16 donne e 14 uomini) e 30 campioni di FNAB (13 donne e 17 uomini).

Le indagini immunoistochimiche hanno riguardato i seguenti biomarkers: TFF2, TFF3, IMP3, Maspina, p53, S100A4, S100P e sono state eseguite nell'immunocoloratore automatico BOND III (Leica).

I risultati dello studio sono in corso di valutazione.

Bibliografia:

Jahan R, Ganguly K, Smith LM et al. Trefoil factor(S) and CA-19.9: A promising panel foe early detection of pancreatic cancer. *EbioMedicine* 42 (2019) 375-85.

Burnett AS, Quinn PL, Ajibade DV et al. Design of an immunohistochemistry biomarker panel for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* <https://doi.org/10.1016/j.pan.2019.08.007>.

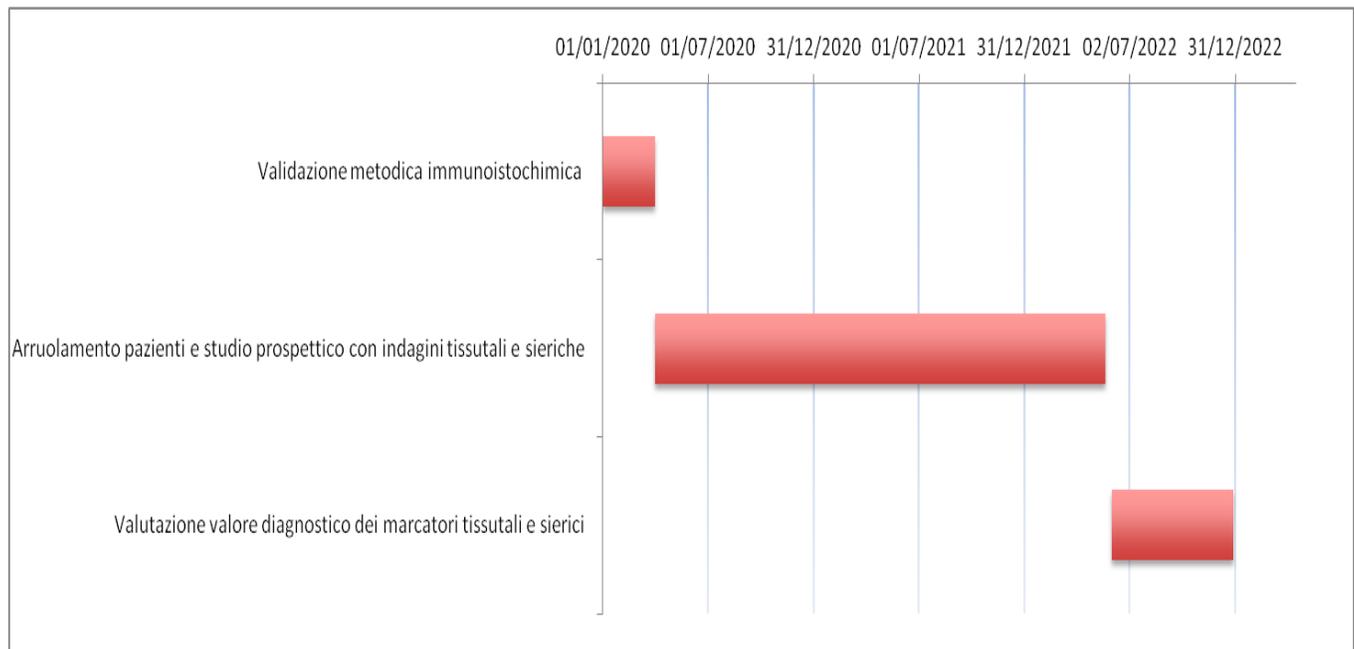
Aksoy-Altinboga A, Baglan T, Umudum H et al. Diagnostic value of S100p, IMP3, Maspin, and pVHL in the differential diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and normal/chronic pancreatitis in fine needle aspiration biopsy. *J Cytol* 35: 247-51.2018

Liu H, Shi J, Anandan V et al: Reevaluation and identification of the best immunohistochemical panel (pVHL, maspin, S100P, IMP3) for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 136 (2012) 601-9.

Burnett AS, Bailey J, Oliver JB et al; Sensitivity of alternative testing for pancreaticobiliary cancer: a 10-Y review of the literature. *J Surg Res* 190 (2014) 535-47.

Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V: Epidemiology of pancreatic cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *W J Oncol* 10 (2019) 10-27.

Timeline (Gantt chart)



Progetto 12/2021: “Studio dei fattori di crescita angiogenici e del profilo immuno-fenotipico nel microambiente tumorale di pazienti con carcinoma gastrico resecabile”

Responsabile: dott.ssa Rosalba Dalessandro

Partecipanti: Claudio Lotesoriere, Ivan Lolli, Caterina Messa, Maria Grazia Refolo, Annalisa Schirizzi, Giampiero De Leonardis, Domenico Mavilio, Joanna Mikulak, Raffaele Armentano, Annamaria Valentini, Giuseppe Lippolis, Leonardo Vincenti, Giuseppe Ingravallo, Cinzia Bizzoca, Salvatore Fedele

Introduzione

Il cancro gastrico (GC) è il quinto tumore più comune al mondo e la prognosi dei pazienti affetti da GC è infausta nelle forme più avanzate [1]. Le crescenti conoscenze sulla patogenesi molecolare hanno dimostrato che i tumori dello stomaco possono presentare diverse caratteristiche molecolari e cliniche. La classificazione molecolare operata grazie al lavoro del — Genome Atlas (TCGA) ha definitivamente chiarito che le differenze cliniche e prognostiche osservate tra i due tipi istologici, intestinale e diffuso, hanno basi molecolari molto peculiari, con specifiche implicazioni cliniche [2,3].

Attualmente, la chirurgia con linfadenectomia D2, (rimozione di almeno 25 linfonodi) e senza residui macro o microscopici (cosiddetta resezione R0), rappresenta l'unico approccio curativo per GC localizzato [4], ma solo il 20% dei pazienti presenta una malattia resecabile alla diagnosi e, anche in caso di resezione curativa, la prognosi rimane infausta a causa dell'alto tasso di recidiva della malattia. In questo contesto, diversi approcci peri-operatori sono stati sviluppati nei paesi occidentali e orientali al fine di diminuire i tassi di ricaduta e migliorare la sopravvivenza. Il recente studio di fase III FLOT4 ha rappresentato un progresso sostanziale nel trattamento peri-operatorio del carcinoma gastrico localmente avanzato e dell'adenocarcinoma della giunzione gastro-esofagea (GEJ). Lo schema FLOT, che prevede la combinazione di fluorouracile, leucoverin, oxaliplatino e docetaxel, ha portato ad un miglioramento significativo della sopravvivenza globale rispetto ad altri schemi [5, 6] migliorando anche la percentuale di resezioni con margini liberi da malattia (85% vs 78%) e la PFS (30 mesi vs 18 mesi) [7]. La chemioterapia neoadiuvante sembra essere più efficace negli istotipi intestinali, ma ci sono indicazioni recenti di una sua efficacia anche in presenza di GC diffuso.

La definizione di fattori predittivi di risposta al trattamento risulta un elemento essenziale per la selezione di pazienti candidabili al trattamento neoadiuvante. Secondo studi recenti, la presenza di deficit del sistema di riparazione del DNA (Mismatch Repair Deficiency -MMRD) e l'instabilità dei microsatelliti, possono costituire possibili fattori predittivi negativi di risposta alla terapia preoperatoria. [8-11]. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento peri-operatorio. Nei pazienti MMRD, le alterazioni molecolari riscontrate consistono in un'espansione o contrazione dei microsatelliti innescata da una disfunzione degli enzimi DNA-MMR a causa di una mutazione in uno dei diversi geni che codificano per questa classe di proteine. In GC, una delle mutazioni più ricorrente è rappresentata dall'ipermetilazione di MLH1. L'effetto delle mutazioni in questa classe di geni comporta l'espressione di un elevato tasso di mutazioni durante la sintesi del DNA (high tumor mutational burden, TMB). Le mutazioni somatiche che ne derivano amplificano il numero di neo- antigeni stimolando il sistema immunitario e determinando un'attivazione dei linfociti T. Pertanto, i tumori MSI sono associati a elevata percentuale di infiltrato linfocitario (TILs) nel loro microambiente. Diversi studi hanno correlato nelle forme di GC metastatico lo stato dei microsatelliti, l'espressione di PD-L1 e l'infiltrazione dei TILs con le caratteristiche clinico-patologiche dell'adenocarcinoma gastrico. In tumori di grandi dimensioni è stata trovata un'associazione significativa tra l'elevata presenza di TILs, l'espressione di PD-L1 e la carenza di proteine di riparazione del DNA. I tumori gastrici positivi per EBV (EBVaGC) presentano specifiche caratteristiche clinico-patologiche e molecolari. Questo sottotipo mostra ricorrenti mutazioni di PIK3CA, elevata ipermetilazione del DNA e amplificazione dei geni JAK2, PD-L1 e PD-L2. Circa il 65% dei casi di EBVaGC è caratterizzato da un microambiente con elevato infiltrato linfocitario, prevalentemente, linfociti CD8+, espressione di un'attiva risposta immunitaria, nonostante la concomitante espressione di PD-L1. Questo si traduce in una maggiore probabilità di risposta positiva alla immunoterapia [12].

Sulla base di queste caratteristiche ben note e grazie ai risultati di numerosi studi effettuati sulla malattia metastatica, sempre maggior interesse è rivolto alla possibilità di integrare, nelle terapie peri- operatorie, lo schema FLOT con farmaci immunoterapici in una coorte selezionata di pazienti in cui venga riscontrato un elevato grado di MSI (rinvenuto in una percentuale di casi compresa tra 8-22%) o positività per EBV [13]. Alla luce di ciò, lo studio di fase III KEYNOTE-585 (NCT03221426) sta indagando l'efficacia del pembrolizumab (anti-PD-1 Ab) in combinazione alla chemioterapia. Inoltre, lo studio ICONIC di fase I/II (NCT03399071), sta invece considerando la somministrazione di avelumab (anti-PD-L1 Ab) in combinazione con FLOT [14-16].

Un altro campo d'interesse nella sperimentazione di possibili approcci terapeutici integrati peri- operatori nelle forme di GC resecabile è rappresentato da farmaci diretti verso specifici bersagli molecolari, che per la loro natura sembrano avere un ruolo cruciale nell'insorgenza e sviluppo del carcinoma gastrico [17, 18].

Particolare attenzione deve essere rivolta al ruolo dei farmaci anti-angiogenici nel trattamento integrato del GC resecabile. Due condizioni principali sono necessarie per consentire lo sviluppo di un tumore: la formazione di nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e l'immunosoppressione dei processi svolti dall'organismo per la riparazione del danno tissutale. Questi due eventi, strettamente interconnessi in quanto guidati dall'attivazione di percorsi molecolari spesso sovrapposti, agiscono in modo sincrono modificando le condizioni del microambiente tumorale. I processi sopra menzionati sono supportati dall'integrazione degli effetti di componenti cellulari e di mediatori molecolari.

Le cellule mieloidi e linfoidi sono riconosciute come capaci di effetti pro-angiogenetici e immunosoppressori. Tra gli attori cellulari, le Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) sono deputate a inibire l'attivazione delle cellule T e Natural Killer (NK) [19] e promuovere l'espansione della popolazione di Treg [20]. Si ritiene inoltre che le MDSC possano secernere fattori pro- angiogenici come VEGFA e MMP9 [21]. Le cellule dendritiche (DC) e i macrofagi associati al tumore (TAM) sono in grado di modificare le loro caratteristiche assumendo un profilo pro-angiogenico, supportato dalla secrezione di VEGFA, bFGF, CXCL8 e cicloossigenasi-2 (COX2) [22]. Inoltre, le DC esprimono proprietà soppressive volte alla regolazione dell'espressione di specifiche interleuchine [23]. Allo stesso modo, tra le sottopopolazioni linfocitarie assumono un'importanza rilevante le cellule Treg, soppressori delle cellule T effettrici in grado di stimolare il processo di angiogenesi. Le cellule tumorali nelle suddette condizioni di ipossia sono in grado di reclutare cellule Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ dal sangue periferico nel distretto tumorale dove contribuiscono a formare un ambiente immunosoppressore allo stesso tempo ricco di VEGFA secreto dagli stessi linfociti [24]. In questo scenario sono presenti anche cellule stromali, come CAF (Cancer-Associated Fibroblasts) capaci di secernere fattori di crescita pro-angiogenici (bFGF e VEGFA) e promuovere il reclutamento di cellule con funzione immunosoppressiva come TAM e MDSC.

Da quanto descritto, il VEGFA è un fattore molecolare che gioca un ruolo primario nel processo di angiogenesi tumorale ed è anche in grado di entrare in diverse fasi del ciclo immunitario del cancro, producendo modifiche sostanziali che alla fine contribuiscono a creare un microambiente tale da consentire al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. Si ritiene che il VEGFA oltre ad essere in grado di alterare il processo di presentazione dell'antigene, compromettendo la maturazione delle DC possa indurre dell'espressione di PD-L1 nelle DC mieloidi associate al tumore [25]. Il priming e l'attivazione degli APC e dei linfociti T possono essere influenzati dal VEGFA che, essendo in grado di compromettere la corretta emopoiesi e rendere i timociti più suscettibili alla morte per apoptosi, esprime il suo effetto sulla soppressione dello sviluppo e delle funzioni dei linfociti T [26, 27]. Si sta anche dimostrando la relazione diretta tra la secrezione di VEGFA da parte delle cellule tumorali e l'aumento della quantità di Treg nel sito tumorale [28]. Inoltre, è stata rilevata una sovra-espressione nei T-reg di NRPI, recettore che lavora in sinergia con VEGFR1-2. Tale aumento è ritenuto responsabile dell'interazione con le DC e dell'aumentata attivazione dei Treg [29].

Nel complesso, queste scoperte suggeriscono che agire su più fattori chiave offre maggiori possibilità di ottenere un intervento terapeutico più efficace. Per quanto riguarda gli studi clinici volti ad esplorare il ruolo di farmaci anti-angiogenici nelle terapie peri-operatorie integrate, i più promettenti sono quelli in cui si utilizza il Ramucirumab che ha già dimostrato di migliorare l'OS e la PFS nel trattamento di seconda linea in pazienti con GC metastatico, (studi REGARD [30] e RAINBOW [31]). Sulla base di questi risultati, lo studio RAMSES (NCT02661971) sta attualmente valutando il ruolo dello schema FLOT con o senza Ramucirumab nel trattamento peri-operatorio degli adenocarcinomi gastrici Her-2 negativi e GEJ. In questo studio di fase II, l'aggiunta di Ramucirumab allo schema FLOT peri-operatorio ha migliorato significativamente i tassi di resezione R0, rispondendo così in modo positivo all' end-point della fase II dello studio.

Una delle sfide principali che la ricerca clinica deve affrontare è rappresentata dalla selezione dei pazienti candidabili ad un dato regime terapeutico pre-operatorio. [32]. Su queste basi, lo scopo del presente studio è quello di indagare le relazioni tra microambiente tumorale e risposta immunitaria avvalendosi delle conoscenze acquisite sulla patogenesi del GC e sull'immunologia del tumore insieme alla possibilità di accedere ad una coorte di pazienti affetti da GC resecabile e trattabili con terapia peri- operatoria.

Stato di Avanzamento:

A seguito dell'approvazione da parte del CE di questo istituto, si è proceduto con il reclutamento dei pazienti afferenti all'unità di Oncologia/Chirurgia. Ad oggi sono stati reclutati 12 pazienti, previo rilascio di consenso informato. È stata preparata una scheda CRF dei pazienti dove verranno raccolti tutti i dati clinici dei pazienti a cui è stato assegnato un codice identificativo. Di ciascun paziente sono raccolti, ove possibile, prelievi ematici prima dell'inizio della terapia (T0), dopo la terapia neo- adiuvante, e dopo l'eventuale terapia adiuvante (follow-up). Dal sangue intero sono stati estratti i linfo-

monociti (PBMC) secondo la procedura descritta nei materiali e metodi e siero/plasma, opportunamente stoccati in azoto liquido e a -80° rispettivamente. Dal tessuto fresco tumorale e peri- tumorale sono state messe a punto le procedure di estrazione dei TILs opportunamente stoccati in azoto liquido. Verrà programmata a breve una prima analisi immuno-fenotipica su 4 pazienti di cui abbiamo completato la raccolta dei campioni.

ID-Paziente	PBMC T0	PBMC post FLOT	TILs (int.chir)	PBMC follow-up
01-001	^	^	Non disponibile	^
01-002	^	^	^	deceduto
01-003	^	^	^	^
01-004	^	^	^	^
01-005	^	^	progressione	deceduto
01-006	^	Non disponibile	Non disponibile	^
01-007	^	^	progressione	
01-008	^	^	^	
01-009	^	In attesa di intervento		
01-010	^	In attesa di intervento		
01-011	^	In attesa di intervento		
01-012	^	In attesa di intervento		

Inoltre, lo studio è stato di recente approvato dal comitato etico del Policlinico di Bari e a breve dovrebbe essere approvato l'MTA per lo scambio di materiale biologico. Pertanto è possibile cominciare ad arruolare pazienti che afferiranno alla chirurgia del policlinico.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1:

Caratterizzazione, in pazienti con GC eleggibili a trattamento chirurgico ed al trattamento peri- operatorio secondo lo schema FLOT, delle popolazioni linfocitarie nell'infiltrato tumorale e nel sangue periferico al fine di rilevare possibili clusters di popolazioni correlabili alle caratteristiche del tumore o alla terapia in atto. I dati immunofenotipici saranno valutati in relazione all'analisi dell'instabilità dei microsatelliti (MSI), al deficit del sistema di ricombinazione omologa (MMRD), e all'espressione di EBV-RNA.

Obiettivo specifico 2:

Valutazione, dell'espressione dei principali fattori angiogenici nel tessuto tumorale e nel sangue periferico, con particolare riferimento all'asse VEGF/VEGFR. I risultati di tali analisi saranno messi in correlazione con l'analisi immunofenotipica.

Obiettivo specifico 3:

Analisi della espressione della tubulina β III (TUBBIII) nel tessuto tumorale e nel sangue periferico, la cui over-espressione è legata a fenomeni di resistenza ai taxani.

OBIETTIVO 1:

Il nostro studio si propone di caratterizzare le popolazioni linfocitarie isolate dal sangue periferico dal punto di vista numerico, fenotipico e funzionale utilizzando citofluorimetria a flusso multi-parametrica, in pazienti con GC resecabile e candidabili a terapia peri operatoria secondo lo schema FLOT. Tale caratterizzazione riguarderà anche i linfociti infiltranti il tumore. Verrà, inoltre, effettuato un confronto tra le diverse classi di linfociti presenti nel sangue e nell'infiltrato tumorale al fine di rilevare possibili clusters di popolazioni linfocitarie correlabili alle caratteristiche del tumore o alla terapia in atto. Saranno caratterizzate le due principali classi di linfociti dell'immunità adattativa, le cellule CD4⁺ e CD8⁺ $\alpha\beta$ T, così come le popolazioni linfocitarie coinvolte nell'immunità innata, i linfociti $\gamma\delta$ T e cellule natural killer (NK.). Queste ultime, oltre a contrastare le cellule tumorali attraverso la loro azione citotossica, regolano processi di differenziamento e attivazione dei linfociti $\alpha\beta$ T e contribuiscono ad abrogare l'immunosoppressione operata dalle cellule Treg.

Pertanto, questo progetto ha tra gli obiettivi quello di conoscere ed esaminare il ruolo delle specifiche classi di cellule T nei tumori gastrici resecabili, basandosi sulle seguenti ipotesi scientifiche:

1. Nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti T_H1 (CD4, CD8, T_{reg}), T_H2 (V α 1, V α 2) e NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione. La stretta relazione tra cellule tumorale microambiente mette in atto distinti meccanismi molecolari che regolano le proprietà di attivazione/inibizione dei linfociti infiltranti il tumore. In particolare, il profilo immunitario dell'infiltrato tumorale è in stretta correlazione con lo stato di attivazione dell'asse VEGF/VEGFR e di altri fattori angiogenici.

2. L'eterogeneità dei tumori gastrici legata alle diverse caratteristiche isto-patologiche e molecolari (MSI status, infezione da EBV) è associata all'eterogeneità delle diverse popolazioni dei linfociti infiltranti il tumore. È noto infatti che i tumori gastrici reseccabili con elevato grado di MSI e MMRD beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento peri-operatorio. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento peri-operatorio. Inoltre, lo stato dei microsatelliti così come la positività per EBV, sono associati ad uno specifico profilo immunitario nel microambiente tumorale. In particolare, tumori gastrici con elevato grado di MSI o EBV+ sono considerati immuno-permissivi e sono quelli che potrebbero beneficiare delle terapie peri-operatorie integrate con farmaci immunoterapici.

3. I linfociti infiltranti il tumore, con il loro fenotipo tumore-dipendente, hanno un ruolo rilevante nella risposta del tumore alla terapia in atto. Nel nostro studio le terapie che verranno prese in considerazione saranno la terapia neo-adiuvante (FLOT), quella chirurgica, e quella post-operatoria.

4. La caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti T_H1, T_H2 e NK nel sangue periferico sarà utile a definire nuovi biomarcatori circolanti, importanti sia per il follow-up dei pazienti, sia per la conoscenza dei meccanismi responsabili del successo o del fallimento del trattamento terapeutico in pazienti con GC.

OBIETTIVO 2:

Il nostro studio si propone altresì di valutare, negli stessi pazienti, l'espressione dei principali fattori angiogenici, con particolare riferimento all'asse VEGF/VEGFR, in pazienti con GC reseccabile. Di particolare interesse saranno i casi sottoposti a trattamento peri-operatorio secondo lo schema FLOT. L'analisi in oggetto verrà eseguita attraverso una determinazione quantitativa di specifici bio-marcatori presenti nel siero dei pazienti. Tali valutazioni verranno eseguite al momento della diagnosi e ad ogni intervento terapeutico. L'analisi degli stessi analiti verrà effettuata anche nel tessuto tumorale rispetto alla controparte sana dello stesso paziente.

OBIETTIVO 3:

Di particolare interesse sarà la valutazione della Tubulina β III (TUBBIII) la cui over espressione è legata a fenomeni di resistenza ai taxani. Tale analisi verrà correlata alle caratteristiche clinico patologiche nonché alle caratteristiche molecolari ed al profilo immunitario del microambiente tumorale, secondo quanto descritto negli obiettivi 1 e 2 rispettivamente. Tali correlazioni saranno supportate da esperimenti ex vivo in cui cellule tumorali isolate dal tessuto tumorale verranno messe in co-cultura con linfociti isolati dal microambiente tumorale o dal sangue periferico. Gli stessi esperimenti si eseguiranno anche con cellule di linee tumorali gastriche (AGS, N87, HGC-27) e con linee cellulari gastriche rese resistenti all'azione di un taxano (paclitaxel). I risultati di questi studi ci permetteranno di approfondire la reciproca relazione tra cellule tumorali e cellule immunitarie.

Dati preliminari:

La proposta progettuale si basa su alcune evidenze sperimentali che i due gruppi di ricerca (IRCCS —S. de Bellis e —Humanitas Clinical and Research Center) hanno raccolto negli ultimi anni nei rispettivi campi di interesse. Il nostro gruppo di ricerca sta svolgendo da qualche anno degli studi volti all'analisi delle variazioni di diversi fattori di crescita pro-angiogenici nel siero di pazienti con carcinoma gastrico metastatico e sottoposti ad una terapia di seconda linea con Paclitaxel e Ramucirumab. Il Paclitaxel è un anti-mitotico, il Ramucirumab un anticorpo monoclonale contro il VEGFR2. Diversi fattori di crescita, con particolare riferimento a quelli dell'asse VEGF/VEGFR, sono stati dosati prima dell'inizio della terapia e nel corso della stessa. Abbiamo, inoltre, effettuato un'analisi immunostochimica su reperti biotipici degli stessi pazienti per rilevare l'espressione VEGF/VEGFR, nonché della TUBBIII, la cui over-espressione è indice di resistenza alla terapia con taxani. Sebbene i dati di queste analisi siano ancora in fase di studio, si può affermare che la terapia con Ramucirumab determina un aumento sostanziale dei livelli sierici di VEGFA e di altri fattori di crescita angiogenici. È di grande interesse studiare la relazione di questi fattori angiogenici con il profilo immuno-fenotipico. Nel presente progetto le nostre analisi saranno condotte su una coorte più ampia di pazienti con GC reseccabile e candidabili a trattamento

chirurgico con possibile chemioterapia peri-operatoria che ad oggi prevede come schema di elezione il FLOT. Come abbiamo sottolineato c'è grande interesse rispetto alla possibilità di integrare questo schema terapeutico con farmaci anti-angiogenici o immunoterapici. Il gruppo dell'Unità di immunologia clinica e sperimentale diretto dal professor Mavilio ha messo a punto metodologie in grado di caratterizzare dal punto di vista fenotipico e funzionale numerose sub- popolazioni di cellule immunitarie. In uno studio recente, il gruppo del professor Mavilio ha identificato una sottopopolazione di linfociti Vδ1 presenti nell'epitelio intestinale e caratterizzati dall'espressione di un recettore citotossico (NKp46) che conferisce a questa popolazione di linfociti un'elevata attività antitumorale, rappresentando una prima linea di difesa simile a quella dell'immunità innata [33]. La caratterizzazione delle sub-popolazioni di linfociti Vδ1 (Vδ1, Vδ2) potrebbe essere di grande interesse anche nel carcinoma gastrico.

Metodologie e Analisi statistiche:

1. Pazienti

Verranno reclutati pazienti con diagnosi di carcinoma gastrico, afferenti all'UO di Oncologia del IRCCS — S. De Bellis, per i quali è previsto l'intervento chirurgico, eleggibili al trattamento peri- operatorio secondo lo schema FLOT. Ai pazienti verrà fornita una scheda informativa circa gli obiettivi dello studio e successivamente sarà acquisito il consenso informato.

1.1 Dimensione del campione

Al fine di valutare, in maniera statisticamente rilevante, l'impatto di potenziali problemi non prevedibili in fase di design dello studio e che potrebbero richiedere una variazione dei criteri di inclusione / esclusione abbiamo utilizzato la formula proposta da W Viechtbauer, L Smits, D Kotz, L Budé, M Spigt, J Serroyen, R Crutzen: —A simple formula for the calculation of sample size in pilot studies. J Clin Epidemiol 2015 Nov;68(11):1375-9:

Valutando la probabilità del verificarsi di un evento imprevisto che determini l'esclusione di un paziente dallo studio nella

$$n = \frac{\ln(1 - \gamma)}{\ln(1 - \pi)}$$

misura del 4% ($\pi = 0.04$) con un limite di confidenza del 95% ($\gamma = 0.95$).

Il risultato di tale calcolo, arrotondato all'intero più vicino, è di 73 soggetti (risultato esatto del calcolo $n=73.4$). Si precisa che tale determinazione si basa su stime prudenziali in quanto una esatta determinazione della probabilità di un evento inatteso risulta impossibile

È previsto, inoltre, che linfociti di sangue periferico isolati da Buffycoats di donatori sani presso il centro Humanitas saranno usati come controlli e selezionati per età omogenea a quella dei pazienti.

2. Campionamento: Raccolta e Stoccaggio dei campioni ematici, biotici e di tessuto fresco

Tutti i reperti biologici derivanti dai pazienti arruolati nello studio saranno ottenuti dal materiale prelevato nel corso degli interventi previsti dal piano terapeutico, pertanto non è previsto alcun cambiamento ai trattamenti in atto.

2.1 Sangue periferico

Verranno ricavate aliquote di sangue intero e siero esclusivamente dai prelievi ematici previsti dal piano terapeutico. In particolare verranno ricavati prelievi ematici prima del trattamento chemioterapico preoperatorio, al termine della terapia neo-adiuvante, dopo l'intervento chirurgico e al termine dell'eventuale terapia post-operatoria. I dati ottenuti dalle analisi sul sangue periferico verranno confrontati con quelli derivanti da una banca dati di donatori sani (in possesso dell'IRCCS Humanitas di Milano) usati come controlli e selezionati per età omogenea a quella dei pazienti in studio.

Dal campione ematico di ciascun paziente verranno ricavate aliquote di siero, di plasma che saranno conservate a -80°. Dal sangue periferico saranno inoltre isolati, mediante gradiente di densità su Ficoll- Paque, linfomonociti (PBMC), che saranno conservati in azoto liquido.

Ciascuna serie di aliquote di siero e linfomonociti, appartenente ad ogni singolo paziente, dovrà essere corredata da una Scheda campioni in cui si preciserà:

- 1) codice identificativo del paziente a cui si riferisce il campione
- 2) data di ciascun prelievo

2.2 Reperti biotici

I reperti biotici fissati in formalina ed inclusi in paraffina per le analisi di immunoistochimica verranno forniti dall'Anatomia Patologica dell'IRCCS — S. De Bellis, dopo che siano state assicurate tutte le analisi previste dal piano terapeutico.

2.3 Tessuto fresco

L'Anatomia Patologica fornirà anche materiale derivante sia dal tessuto tumorale, che dal tessuto sano circostante.

Nello specifico, i campioni a fresco provenienti dai pezzi operatori saranno processati mediante l'utilizzo del gentleMACSDissociator (MiltenyiBiotec), applicando il protocollo specifico per il TumorDissociation Kit, che consente di ottenere una sospensione di cellule singole a partire da tessuti solidi combinando una dissociazione meccanica con una degradazione enzimatica della matrice extracellulare. Le cellule così dissociate, dopo essere state filtrate e lavate con HBSS, potranno essere messe in coltura o isolate. Dal tessuto tumorale e dalla sua controparte normale verranno isolate popolazioni linfocitarie (TILs).

L'analisi immunofenotipica dei PBMC derivanti dal sangue periferico e dei TILs ottenuti dal tessuto gastrico sarà eseguita, mediante citofluorimetria a flusso, presso il laboratorio di Immunologia Clinica e Sperimentale del Centro Humanitas di Milano. I campioni saranno opportunamente stoccati in azoto liquido sino al momento della spedizione che avverrà in ghiaccio secco ed in forma anonima.

3. Isolamento cellule mononucleate da sangue periferico dei pazienti e donatori sani

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) verranno isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità attraverso l'utilizzo del mezzo di separazione cellulare Lympholyte®-H. Seguendo il protocollo per l'isolamento delle PBMC, i campioni di sangue saranno prima diluiti con Hank's Balanced Salt Solution senza calcio e magnesio (HBSS-/-) in un rapporto 1:1 (15 mL sangue:15 mL HBSS-/-). Saranno poi stratificati 30 mL di sangue diluito su 15 mL di Lympholyte®-H, portato a temperatura ambiente, in una provetta Falcon® da 50 mL e quindi centrifugati per 30 minuti a 400 (rcf). Dopo centrifugazione, le cellule PBMC si troveranno a livello dell'anello all'interfase situato tra Lympholyte®-H e plasma. Le cellule PBMC saranno poi raccolte, lavate con HBSS -/- e centrifugate due volte per 10 minuti a 200 rcf per rimuovere le piastrine. Successivamente si procederà al conteggio ed al congelamento in cryovial (1 mL di Fetal Bovine Serum (FBS) con il 10% di Dimetilsolfossidocrioprotettivo (DMSO).

4. Isolamento dei TILs da tessuto tumorale

I campioni di tumore umano fresco ed il tessuto sano circostante di pazienti con GC saranno tagliati in pezzi (3 ~ 5 mm³) e trattati con 1 µg/mL di collagenasi 25 µg/mL di DNasi e FBS al 2% in PBS a 37 °C per 1 - 1,5 ore. Gli omogenati di tessuto saranno filtrati attraverso un filtro cellulare da 70 µm prima della centrifugazione a densità. La centrifugazione a densità sarà eseguita utilizzando il gradiente di densità di Percoll. Verranno raccolte cellule all'interfaccia tra il 40 e l'80% di gradiente di Percoll discontinuo. I linfociti saranno lavati in HBSS^{-/-} e congelati in azoto con FBS con 10% DMSO per le analisi successive.

5. Isolamento delle cellule tumorali

Seguendo il protocollo indicato per il Tumor Cell Isolation Kit human (MiltenyiBiotec), le cellule non tumorali saranno marcate magneticamente con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con micro beads. In seguito, la sospensione cellulare verrà caricata su una colonna posta nel campo magnetico di un separatore MACS. Le cellule non tumorali marcate verranno trattenute all'interno della colonna, al contrario le cellule tumorali prive di marcatura attraverseranno la colonna. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule non tumorali trattenute magneticamente saranno eluite. Le cellule tumorali così ottenute saranno messe in coltura in flask T25 in numero di 5X10⁶ cellule/ml, in RPMI-1640 con 20% FBS, 1% Pen-Strept, 1% glutammina e 1% di amminoacidi non essenziali (NEAA). Dopo 24h verranno rimosse cellule non aderenti e verrà rinnovato il terreno ogni due giorni per circa 2 settimane. Le cellule tumorali potranno poi essere congelate fino alle successive analisi.

6. Caratterizzazione e separazione delle popolazioni linfocitarie mediante Citometria a Flusso

Per l'analisi tramite citometria a flusso multiparametrica, le cellule linfocitarie verranno colorate per la discriminazione tra vitali e morte utilizzando il colorante fluorescente intercalante nel DNA 7- Aminoactinomycin D per 5 minuti, al buio a temperatura ambiente. I campioni verranno acquisiti utilizzando il sistema NAVIOS Flow Cytometer (BeckmanCoulter). Successivamente le cellule verranno lavate con FACS WB (HBSS - / - con 2% di FBS) e incubate con una miscela di specifici Ab monoclonali, precedentemente titolati, per 20 minuti al buio a temperatura ambiente per essere acquisite utilizzando il sistema di analisi delle cellule LSR Fortessa, FACS Canto II e FACS Symphony. La strumentazione FACS Aria III cell sorter verrà utilizzata per la separazione dei sottoinsiemi cellulari specifici da impiegare nei saggi in vitro.

7. Analisi fenotipica e funzionale

I pannelli Polychromatic Flow Cytometry (PFC) verranno applicati per l'analisi fenotipica (colorazione di marcatori della membrana cellulare) e funzionale (colorazione dei marcatori della membrana cellulare e di quelli intracellulari) dei linfociti circolanti dei donatori sani e dei linfociti isolati dal sangue periferico e residenti nei tessuti dei pazienti.

L'analisi fenotipica cellulare prevederà lo studio di markers identificativi di:

-
- a) maturazione e differenziazione (CD45RA/RO, CD27, CD28, CCR7, IL7R, CD127, CD28, CD16, CD26, CD25, CD127, CD96);
 - b) adesione (CD69, CD103, CD49a, CD54, CD58, CX3CR1, CD62L, DNAM1);
 - c) activating receptors (CD69, NKG2C, NKG2D, CD161, CD16, CD56, NCRs, NKp80, CD54, 2B4, DNAM-1, CD161);
 - d) recettori inibitori e immune-checkpoints: (NKG2A, PD-1, CTLA-4, CD96, LAG-3, TIM-3, TIGIT, CD39);
 - e) stato proliferativo (Ki67);
 - f) senescenza (CD57);
 - g) citochine e chemochine (IFN- γ , TNF- α , IL-17, CCL3, CCL4),
 - h) recettori per citochine e chemochine (ex. IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-18R, CCR5, CXCR6, CXCR4, CXCR1).
-

La caratterizzazione funzionale delle cellule isolate prevederà la valutazione della risposta citotossica (marker CD107a) e la produzione e rilascio di citochine e fattori di crescita quali IL-2, IL-4; IL-10, IL- TNF- α , IFN- γ , IL-17A e VEGFA.

La glicoproteina trans membrana delle membrane lisosomiali CD107a può essere utilizzata come marker di degranulazione per i linfociti citotossici CD8+ T, $\gamma\delta$ T e NK in quanto viene esposta sullo strato esterno della membrana durante il processo di esocitosi che si verifica in caso di citotossicità contro le cellule bersaglio. Al fine di testare l'attività citotossica di linfociti umani isolati dal sangue periferico, ex vivo, le cellule saranno piastrate in una 96 multi-well con fondo a U ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml. L'attività citotossica verrà testata in presenza o assenza stimolazione con PMA/Ionomycin (4h a 37°C) o in presenza o assenza di cellule bersaglio. Nel secondo caso i linfociti verranno incubati overnight in RPMI-1640 completo. Il giorno dopo le cellule saranno messe in coltura in presenza di cellule tumorali bersaglio rappresentate da linee cellulari gastriche immortalizzate o da cellule tumorali primarie isolate dal tessuto tumorale gastrico. In seguito, mAb anti-CD107a coniugato con PE verrà aggiunto in ciascun pozzetto e dopo 4 ore di incubazione in atmosfera umidificata a 37°C con 5% di CO₂, le cellule verranno raccolte, lavate con HBSS-/- e colorate per l'analisi citometrica a flusso dei marcatori di membrana cellulare.

Per valutare la produzione di citochine verrà usata la marcatura intracellulare. Dopo la marcatura della membrana cellulare, le cellule saranno trattate con l'inibitore del trasporto proteico Golgi Plug. Dopo 4 ore di incubazione, in atmosfera umidificata a 37°C con 5% di CO₂, le cellule verranno raccolte e lavate con HBSS-/. La colorazione intracellulare sarà eseguita utilizzando i kit Cytofix/Cytoperm e Perm/Wash come descritto nei protocolli di esecuzione e utilizzando mAbs anti-umani specifici per le citochine e i fattori di crescita di interesse. In alternativa, la secrezione dei fattori solubili nel medium di co-coltura con le cellule target sarà misurata tramite saggi immuno-enzimatici ELISA.

7.1 Analisi dei dati derivanti da esperimenti di Citometria a Flusso

I dati grezzi generati dal citofluorimetro —FACS Symphony flow cytometer|| nel formato Flow Cytometry Standard (FCS) 3.0 verranno analizzati con il programma "FlowJo software (TreeStarInc), version 9.9.6.|| che permetterà dopo aver ripulito i dati da debris, cellule morte, doppietti di cellule, di identificare singole popolazioni di linfociti grazie ad modello computazionale che combina le informazioni derivanti dai singoli marcatori al fine di identificare nel campione popolazioni di cellule con le stesse caratteristiche. Per un'analisi unbiased sarà usato l'algoritmo t-SNE che permette di identificare delle sub-popolazioni cellulari con delle specifiche caratteristiche fenotipiche. I dati derivanti da ogni singolo campione verranno concatenati in una singola matrice al fine di produrre l'algoritmo t-SNE. I dati saranno così visualizzati in uno scatter plot bi-dimensionale (t-SNE map) dove le cellule fenotipicamente simili formeranno differenti clusters rendendo così visibili le diverse sub-popolazioni.

8. Valutazione della Instabilità dei microsatelliti

La instabilità dei microsatelliti sarà valutata mediante il sistema Idylla (Biocartis).

Il test Idylla MSI è un test completamente automatizzato che prevede l'utilizzo diretto del campione grezzo, fino al risultato finale, su un unico strumento, con tutti i reagenti integrati in un'unica cartuccia, senza alcuna manipolazione da parte dell'operatore dopo il caricamento (Modalità campione IN/Referto OUT). Il campione è rappresentato da sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina che contengano almeno il 20% di cellule neoplastiche.

Il test Idylla MSI esegue il rilevamento delle mutazioni in 7 biomarkers (ACVR2A, BTBD7, DDO1, MRE11, RYR3, SEC31A e SULF2) utilizzando una reazione di PCR seguita da analisi di melting ad alta risoluzione. La presenza di mutazioni in almeno

2 biomarker sarà refertata come fenotipo instabile (MSI-H), l'assenza di mutazione o soltanto la mutazione in un singolo biomarker sarà refertato come fenotipo stabile (MSS).

9. Valutazione dell'infezione da Epstein-Barr virus (EBV)

La valutazione di EBER (Epstein Barr Encoding Region) sarà effettuata con metodica CISH utilizzando il kit RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA). Le sezioni di tessuto (spessore 4 µm) saranno asciugate in stufa a 60 ° C per 1 ora, sottoposte a sparaffinatura e idratazione. Seguirà smascheramento antigenico mediante incubazione per 10' in tampone citrato (pH 6.0) a 98°C, permeabilizzazione della sezione con proteasi a 40°C per 30', ibridazione con sonda target, amplificazione del segnale e rilevazione dello stesso mediante aggiunta del cromogeno. Saranno considerati positivi i campioni con presenza di positività nucleare nelle cellule neoplastiche e/o infiammatorie.

10. Immunoistochimica per caratterizzazione del profilo immunologico dell'infiltrato linfocitario (TILs)

Tutte le fasi delle indagini di immunoistochimica per i marcatori in studio (PD-L1, CD8, CD4, FOXP3 -VEGFA, VEGFR2/VEGFR1/VEGFR3, TUBBIII) saranno effettuate mediante l'utilizzo dell'immuno-coloratore automatico Bond III (Leica).

Per la valutazione immunoistochimica delle cellule CD4+ e CD8+ saranno selezionati 5 campi nelle aree intra e peritumorali della sezione istologica al fine di ottenere un valore medio per ogni campione. La mediana dei valori medi sarà il cut-off per classificare i casi con alta o bassa concentrazione di CD8+/CD4+.

11. Analisi dei fattori angiogenetici

Per la determinazione dei livelli dei fattori di crescita e delle citochine presenti nel siero ci avvarremo della tecnologia Bio-PlexMagPIX Suspension Array System che è un sistema integrato per analisi quantitative multiparametriche di molecole biologiche in sospensione ottenute da campioni di siero, plasma, medium di colture cellulari, fluidi biologici in genere. Verrà indagato un pannello 13 di fattori coinvolti in angiogenesi tumorale che vengono di seguito elencati, nonché altri marcatori coinvolti nei meccanismi di resistenza ai taxani, tra cui la TUBBIII:

-
1. VEGF-A
 2. VEGF-C
 3. VEGF-D
 4. sVEGFR-1
 5. sVEGFR-2
 6. VEGFR3
 7. PDGF-AB/BB
 8. FGF-basic
 9. EGF
 10. sEGFR
 11. PLGF
 12. sTIE-2
 13. Angiopoietin-2
-

12. Estrazione e quantificazione di RNA

L'RNA totale sarà estratto dalle cellule tumorali utilizzate negli esperimenti di co-cultura mediante kit commerciali e misurato mediante spettrofotometria. Aliquote di RNA totale (500 ng) saranno utilizzate per la retrotrascrizione di cDNA che saranno successivamente amplificati mediante specifici primers. I livelli saranno calcolati e la quantificazione relativa sarà effettuata considerando la β-actina, come standard interno. I livelli di RNA saranno espressi utilizzando la formula $2^{-\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct$ di RNA incognito - Ct dello standard interno. Il Ct è il numero di cicli di amplificazione con cui il termociclatore riesce a rivelare la minima quantità di prodotto di amplificazione.

13. Western-blotting (WB)

Le cellule tumorali utilizzate negli esperimenti di co-cultura saranno impiegate in tecniche di WB al fine di esplorare come le cascate fosforilative di alcune vie del segnale implicate nei processi cellulari di proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione si modificano in un ambiente condizionato dalla presenza dei linfociti. Saranno studiate le vie delle MAPK e di PI3K/Akt, in particolare sarà analizzata l'espressione dei principali marcatori a valle del complesso mTORC1 come S6, p70S6, 4EBP1, nella loro forma fosforilata e non, nonché delle proteine responsabili della sua regolazione come PI3K/Akt/TSC2. In

modo simile, saranno poi analizzati i principali bersagli di mTORC2 come Akt, GSK3b, PKC. Questi studi saranno condotti anche in seguito a trattamento con inibitori dei componenti al crocevia delle diverse vie del segnale.

14. Analisi Statistica

L'analisi statistica sarà ottimizzata grazie alla collaborazione con esperti in statistica presenti nel nostro istituto. In base al numero di variabili, al tipo di variabili, all'adattamento atteso tra le ipotesi parametriche e l'ipotesi da testare, verrà utilizzato il miglior test statistico includendo approcci parametrici non accoppiati o accoppiati (Studentttest, ANOVA, correlazione di Pearson) e non parametrici (correlazione Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal Wallis, Spearman). Una volta scelto e applicato il test statistico, i risultati verranno interpretati e rappresentati con un grafico o una tabella contenente il numero di esperimenti e il valore P. Valori di P statisticamente significativi > 0,05 saranno considerati non statisticamente significativi.

Risultati Attesi

- 1- Analisi dell'assetto immunofenotipico del tumore gastrico operabile. Saranno di grande interesse i risultati ricavati dal confronto del profilo linfomonocitario del tessuto tumorale rispetto a quello delle aree non tumorali circostanti. In particolare sarà confrontata nei diversi tessuti l'espressione di popolazioni linfocitarie $\alpha\beta$ T e $\gamma\delta$ T CD4+/CD8+ e le popolazioni NK. Questo perché nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti $\gamma\delta$ T (CD4, CD8, Treg), $\gamma\delta$ T (V α 1, V α 2) ed NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione del sistema immunitario
- 2- Analisi immunofenotipica dei PBMC. Dal confronto delle sub popolazioni presenti nel distretto tumorale e nel sangue periferico sarà interessante individuare popolazioni di linfociti il cui aumento nel distretto tumorale corrisponda ad un aumento della loro presenza in circolo. Una caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti $\gamma\delta$ T, $\gamma\delta$ T e NK nel sangue periferico sarà utile alla definizione di nuovi bio-marcatori circolanti.
- 3- Analisi funzionale delle popolazioni linfocitarie. Gli studi funzionali ci permetteranno di definire le interazioni tra cellule immunitarie e cellule tumorali del tumore gastrico. In particolare sarà valutata la capacità delle cellule tumorali di inibire l'espansione di specifiche popolazioni linfocitarie anti-tumorali e stimolare il rilascio di particolari classi di citochine.
- 4- Analisi immunofenotipica in pazienti MSI/EBV positivi. I pazienti con MMRD ed elevato grado di MSI o in con positività per EBV sono caratterizzati da un elevato grado di infiltrazione linfocitaria nel tessuto e sembrano rispondere meglio ai trattamenti immunoterapici. Caratterizzare le popolazioni linfocitarie presenti risulterà di grande interesse.
- 5- Analisi dell'espressione di fattori angiogenici. Il profilo immunitario dell'infiltrato tumorale è in stretta correlazione con lo stato di attivazione dell'asse VEGF/VEGFR e di altri fattori angiogenici. Sarà interessante correlare l'espressione dei diversi fattori angiogenici analizzati (VEGF, FGF, Angiopoietina, PDGF) con l'assetto immunofenotipico del tumore. Ad un aumento dell'espressione di marcatori come VEGFA dovrebbe corrispondere un aumento di linfociti con caratteristiche di immuno-soppressione, come le cellule Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nell'infiltrato linfocitario nel tumore (TILs), rispetto alle aree adiacenti non tumorali.

Innovazioni:

Lo studio dei fattori di crescita angiogenici e del profilo immuno-fenotipico nel microambiente tumorale di pazienti con carcinoma gastrico resecabile è considerato di grande interesse al fine di selezionare una coorte di pazienti da indirizzare ad uno specifico piano terapeutico. Le terapie peri- operatorie attualmente considerate come standard (FLOT) potranno essere integrate con farmaci anti- angiogenici o immunoterapici per migliorare la sopravvivenza globale e ridurre la percentuale di recidive. Inoltre, una caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti $\alpha\beta$ T, T e NK nel sangue periferico sarà utile a definire nuovi biomarcatori circolanti importanti per il follow-up dei pazienti affetti da GC dopo l'intervento chirurgico e l'eventuale trattamento chemioterapico adiuvante.

Bibliografia:

-
1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394–424.
 2. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal- type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *ActaPathol. Microbiol. Scand.* 1965, 64, 31–49.

3. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014, 513, 202–209.
 4. Smith, D.D.; Schwarz, R.R.; Schwarz, R.E. Impact of Total Lymph Node Count on Staging and Survival After Gastrectomy for Gastric Cancer: Data from a Large US-Population Database. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 7114–7124.
 5. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11–20.
 6. Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1715–21.
 7. SE Al-Batran, N Homann, C Pauligk, T O Goetze, J Meiler, S Kasper, HG Kopp, F Mayer, G M Haag, K Luley, U Lindig, on behalf of the FLOT4-AIO Investigators. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 2019; 393: 1948–57.
 8. A. Petrillo, L. Pompella, G. Tirino, A. Pappalardo, M.M. Laterza, M. Caterino, M. Orditura, F. Ciardiello, E. Lieto, G. Galizia, C. Castoro and F. De Vita. Perioperative Treatment in Resectable Gastric Cancer: Current Perspectives and Future Directions. *Cancers* 2019, 11, 399.
 9. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(11): 863–875.
 10. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol* 2017; 3(9): 1197–1203.
 11. Choi YY, Kim H, Yang H-K et al. Clinical Impact of Microsatellite Instability in Patients with Stage II and III Gastric Cancer: Results from the CLASSIC Trial. Alexandria: American Society of Clinical Oncology 2017.
 12. M. G. Refolo C. Lotesoriere C. Messa M.G. Caruso R. D’Alessandro. Integrated immune gene expression signature and molecular classification in gastric cancer: New insights. *J Leukoc Biol.* 2020 Aug;108(2):633-646.
 13. V. Aggelis, D. Cunningham, F. Lordick & E. C. Smyth. Peri-operative therapy for operable gastroesophageal adenocarcinoma: past, present and future. *Annals of Oncology* 29: 1377–1385, 2018. 14. Kang YK, Boku N, Satoh T et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10111): 2461–2471.
 14. Fuchs CS, Doi T, Jang RW et al. KEYNOTE-059 cohort 1: efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *JAMA Oncol* 2018; 4(5): e180013.
 15. Le DT, Durham JN, Smith KN et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017; 357(6349): 409–413.
 16. Rivera, F.; Jimenez-Fonseca, P.; Alfonso, P.G.; Gallego, J.; Limon, M.L.; Alsina, M.; Lopez-Gomez, L.; Galan, M.C.; Falco, E.; Manzano, J.L.; et al. NEOHX study: Perioperative treatment with trastuzumab in combination with capecitabine and oxaliplatin (XELOX-T) in patients with HER 2 resectable stomach or esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma—18 m DFS analysis. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33 (Suppl. 3).
 17. Hofheinz, R.; Hegewisch-Becker, S.; Thuss-Patience, P.; Kunzmann, V.; Fuchs, M.; Ullrich Graeven, U.; Homann, N.; Heinemann, V.; Pohl, M.; Tannapfel, A.; et al. HER-FLOT: Trastuzumab in combination with FLOT as perioperative treatment for patients with HER2-positive locally advanced esophagogastric adenocarcinoma: A phase II trial of the AIO Gastric Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2014, 32, 4073.
 18. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006;116:2777-2790.
 19. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66: 1123-1131.
 20. Bo Huang Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:409-421.
 21. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *NatRevCanc.* 2008;8: 618-631.
 - 22.
-

Timeline (Gantt chart)

PRIMO ANNO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS									Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici									Orange	Orange		
Analisi MSI/EBV	Red											
Sperimentazione in vitro	Light Blue											
Elaborazione dati											Dark Blue	Dark Blue

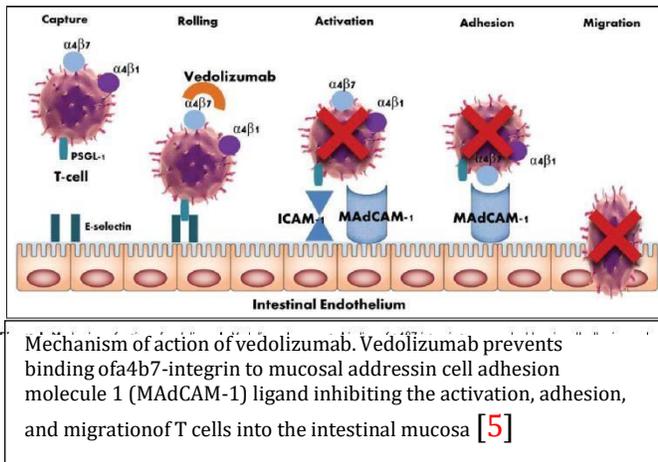
SECONDO ANNO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS									Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici									Orange	Orange		
Analisi MSI/EBV	Red											
Sperimentazione in vitro	Light Blue											
Elaborazione dati											Dark Blue	Dark Blue

TERZO ANNO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS								Yellow	Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici								Orange	Orange	Orange		
Analisi MSI/EBV	Red											
Sperimentazione in vitro	Light Blue											
Elaborazione dati									Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue

superiore se osservata al termine del ciclo di induzione (14 settimane). Questi risultati sono in linea con quanto osservato da numerosi altri studi riportati in letteratura [6].

Il presente progetto proposto vuole rispondere alla richiesta di indicatori predittivi in grado di individuare i pazienti che risponderanno al trattamento con Vedolizumab e differenziarli da quelli che invece dovranno indirizzarsi verso strategie terapeutiche differenti.

Mediante un approccio multiomico valuteremo parametri sierici, immunologici, metabolomici e metagenomici, utilizzando il materiale biologico raccolto dai pazienti arruolati nello studio.



Inoltre verrà introdotto uno studio preliminare di confronto pre e post intervento dei biomarcatori retinici intervento, legati alle alterazioni microvascolari della retina. Il CD è caratterizzato da frequenti alterazioni extraintestinali, alcune delle quali interessano il sistema vascolare della retina. Alcune recenti evidenze hanno infatti dimostrato come la retina sia un modello in vivo estremamente sensibile alle variazioni della densità e conformazione microvascolare in seguito ad insulti infiammatori. La regressione o l'aumento delle alterazioni microvascolari, modulate dai processi fisiopatologici alla base delle IBD, potrebbero essere un pattern essenziale nella distinzione precoce del responder rispetto ai non responder oltre che a definire indicazioni sulla traiettoria della patologia stessa. Confronteremo tutti i valori dei pazienti responder e non responder individuando un massimo di 10 indicatori dal valore predittivo positivo e negativo utilizzando anche algoritmi di classificazione automatica o semi- automatica basati su reti di intelligenza artificiale.

Presso l'ambulatorio IBD vengono ogni anno reclutati 50 nuovi pazienti affetti da CD, tra questi l'85% non risponde a trattamenti farmacologici standard e passa al trattamento con il farmaco biologico Infliximab. La percentuale di non responder a questa prima linea di intervento biologico è del 30%. Questi pazienti rappresentano il campione arruolato per lo studio, che stimiamo si aggiri intorno a n. 15- 20/anno.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Creazione di una biobanca biologica di pazienti CD non-responder al INFLIXIMAB e passati al VEDOLIZUMAB come seconda linea di intervento (Sieri, feci e materiale bioptico).

Obiettivo specifico 2: Valutazione comparativa del materiale raccolto mediante screening dei sieri e delle feci. La creazione dei gruppi responder/non-responder verrà accompagnata dalla valutazione istologica dell'infiltrato e della architettura dei vasi. Dal materiale bioptico, processato immediatamente dopo il prelievo, verrà creata una banca di HIBEC (Human intestinal blood endothelial cells) per valutazioni in vitro della risposta al farmaco o agli insulti infiammatori. L'approccio principale sarà la valutazione comparativa del pathway molecolare mediante RNAseq.

Obiettivo specifico 3: Individuazione dei biomarkers predittivi della risposta clinica alla somministrazione di VEDOLIZUMAB. Individuazione e classificazione tramite pattern recognition analysis in deep-machine learning.

OBIETTIVO 1: Creazione di una biobanca biologica di pazienti CD non-responder all'INFLIXIMAB passati al VEDOLIZUMAB come seconda linea di intervento (Sieri, feci e materiale bioptico)

Presso l'ambulatorio IBD vengono reclutati ogni anno circa 50 nuovi pazienti affetti da CD. Vista la natura del nostro ospedale, la maggior parte di questi pazienti arriva in condizioni di gravità medio alta che richiede l'utilizzo di Infliximab come prima linea di intervento. Una percentuale vicina al 40% non risponde a questa strategia terapeutica; viene quindi utilizzato il Vedolizumab come seconda strategia terapeutica per i non-responder.

A tutti i nuovi pazienti affetti da CD verrà prelevato un campione di siero prima della somministrazione dell'Infliximab. I sieri verranno analizzati presso i laboratori di patologia clinica del nostro IRCCS. Una seconda aliquota verrà anonimizzata e conservata in biobanca. Ai pazienti verrà inoltre richiesto di portare un campione di feci raccolte la mattina prima dell'infusione. Anche questo campione verrà conservato in biobanca. Un campione di sangue circolante verrà utilizzato per analisi citofluorimetriche. Utilizzeremo un kit validato per la clinica in grado di identificare e determinare le percentuali e la conta assoluta di T, B, e NK. Così come CD4 e CD8 nel sangue periferico. Valuteremo inoltre la percentuale di cellule T circolanti polarizzate verso Th1, Th2, Th17 e Treg.

Dopo 22 settimane (5° infusione) i pazienti verranno nuovamente valutati mediante visita endoscopica. Lo score CDAI (Crohn's Disease Activity Index) verrà utilizzato per la valutazione della risposta all'Infliximab insieme alla valutazione del gastroenterologo e a quella dell'anatomopatologo. Un campione di materiale bioptico verrà conservato in RNAlater per 24 ore, successivamente congelato in Trizol® a -80°C per future analisi molecolari, mentre un numero compreso tra 3 e 5 biopsie verrà prelevato per permettere l'isolamento e la coltura delle cellule endoteliali intestinali (Obiettivo 2).

Nel caso di una valutazione negativa, i pazienti entreranno nel gruppo di seconda linea di intervento con Vedolizumab. Prima della somministrazione del Vedolizumab procederemo ad una nuova raccolta di materiale biologico ed analisi laboratoristiche. La somministrazione di Vedolizumab avverrà con la tempistica standard (T0 seguito da Settimana 2, 6, 10, 14).

La valutazione del CDAI avverrà alla 14esima settimana corrispondente alla V infusione.

A questo score verrà associata la valutazione endoscopica ed anatomopatologica effettuata subito dopo la V infusione di Vedolizumab. Un campione di materiale bioptico verrà conservato in RNAlater e successivamente congelato in Trizol® per future analisi molecolari, mentre un numero compreso tra 3 e 5 biopsie verrà prelevato per permettere l'isolamento e la coltura delle cellule endoteliali intestinali (Obiettivo 2).

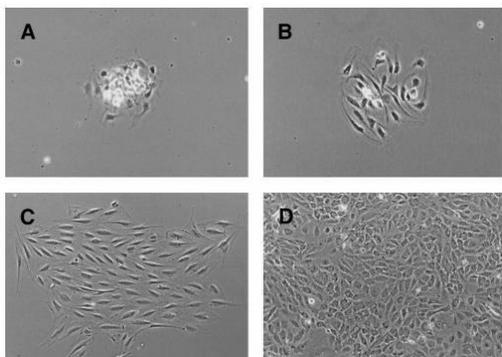
OBIETTIVO 2: Creazione di una banca di cellule endoteliali intestinali per valutazioni in vitro

Sull'intera coorte di pazienti reclutati per lo studio, verranno effettuate valutazioni morfologiche dell'espressione di ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, MMPs e della gut-vascular barrier (GVB). Dalle biopsie prelevate dai pazienti trattati con Vedolizumab (T0 e T5) durante visita endoscopica di controllo, otterremo le HIBEC. In breve, il protocollo prevede la dissezione della biopsia e la sua successiva digestione con collagenasi fino ad ottenere una single cell suspension. Dopo una breve coltura su piastre rivestite al momento con fibronectina, vengono isolate le cellule endoteliali con biglie magnetiche anti-CD31 e rimesse in coltura dopo la purificazione.

Il kit commerciale per tale purificazione è prodotto dalla Miltenyi ed utilizza microbeads per selezionare cellule CD31⁺, CD105⁺, CD146⁺ e CD144 (VE-Cadherin)⁺.

Dopo aver isolato le cellule endoteliali ed averle messe in coltura, potremo procedere ad analisi di sequenziamento molecolare paragonando HIBEC isolate da 10 pazienti

responder con 10 non responder. Prima del sequenziamento, sarà valutato il fenotipo immunologico delle HIBEC, mediante analisi in citofluorimetria. Questo approccio innovativo ci permetterà di integrare i dati sierici e citofluorimetrici che hanno come target le cellule T, con le cellule endoteliali, l'altra faccia della medaglia del meccanismo di azione del Vedolizumab.



OBIETTIVO 3: Individuazione dei biomarker predittivi della risposta clinica alla somministrazione di VEDOLIZUMAB

Mediante analisi statistiche individueremo biomarkers dal valore predittivo e li valideremo su una popolazione più ampia di pazienti. Confronteremo tutti i valori dei pazienti responder e non responder individuando un massimo di 10 indicatori dal valore predittivo positivo e negativo utilizzando anche algoritmi di classificazione automatica o semi-automatica basati su reti di intelligenza artificiale. Punteremo inoltre ad applicare i pattern individuati sull'intera popolazione di pazienti CD afferenti all'ambulatorio, ancor prima del passaggio alla seconda linea di intervento.

Dati Preliminari:

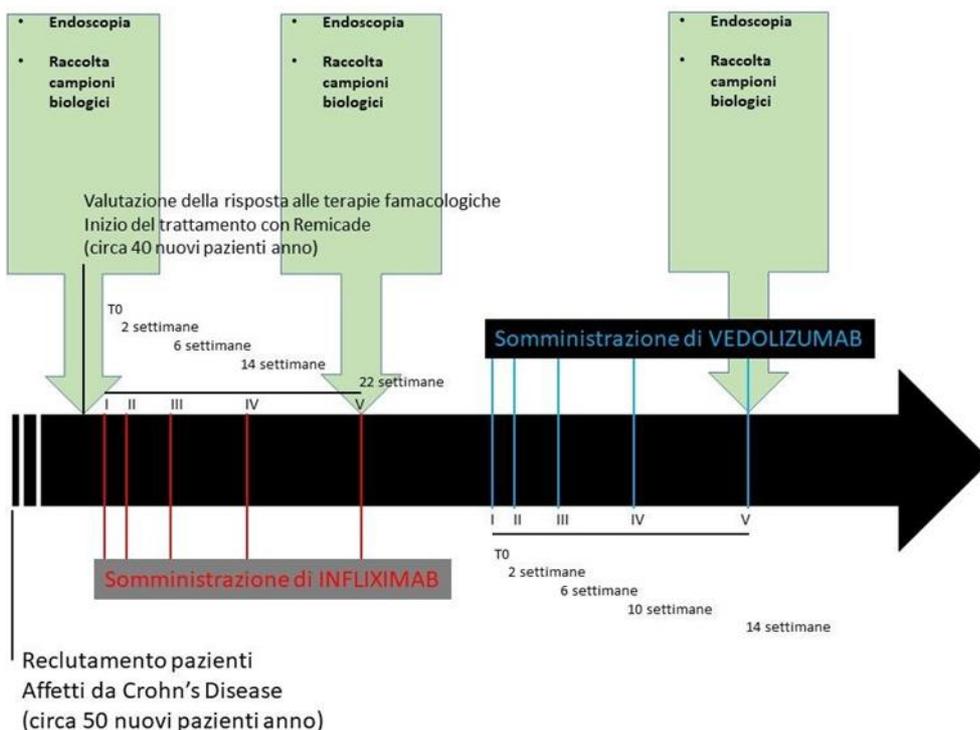
Al momento non abbiamo dati preliminari se non l'osservazione di una netta differenza tra pazienti responder al trattamento con Vedolizumab ed altri non-responder. La percentuale sembrerebbe del 50%, ma non abbiamo dati per discriminare gli uni dagli altri in partenza.

Metodologie e analisi statistiche:

Per le valutazioni delle relazioni tra i pazienti responder e non responder al Vedolizumab (outcome primario) e le variabili raccolte mediante l'approccio multiomico si utilizzerà il test del chi-quadrato o il test esatto di Fisher quando necessario, per le variabili categoriche; mentre per le variabili continue, in riferimento alla loro distribuzione e alla numerosità dei soggetti, si utilizzeranno test parametrici o non parametrici, quando necessario. Per le analisi statistiche sull'associazione tra l'outcome primario e le variabili predittive si utilizzeranno modelli di regressione logistica multivariata con eventuali covariate.

Inoltre, avendo a disposizione un gran numero di variabili derivanti dall'approccio multiomico, unitamente alle variabili cliniche, sarà opportuno l'utilizzo di tecniche di Machine Learning (ML) per la selezione ed individuazione di set di variabili predittive eventualmente associate all'outcome di interesse (Random Forest, Cluster Analisi etc). Il valore soglia per la significatività tra le misure effettuate sarà definito con un p-value inferiore a 0.05 ed un test a due code.

Le analisi verranno eseguite con STATA 16.0 (StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC.)



Risultati attesi:

Con il presente studio contiamo di individuare dei biomarcatori in grado di aiutare la scelta terapeutica discriminando i pazienti responder dai non-responder alla seconda linea di intervento con Vedolizumab. Inoltre, mediante la scrupolosa raccolta di dati potremmo migliorare i processi di selezione e monitoraggio dei pazienti. Come nel caso di precedenti studi traslazionali, ci aspettiamo di poter individuare possibili terapie personalizzate per sottopopolazioni di pazienti caratterizzati da uno specifico pattern infiammatorio.

La selezione dei pazienti rappresenta un enorme vantaggio per il paziente, ma anche per la sanità pubblica che potrà utilizzare le risorse per terapie efficaci anziché procedere per tentativi per mancanza di marcatori specifici.

Innovazioni:

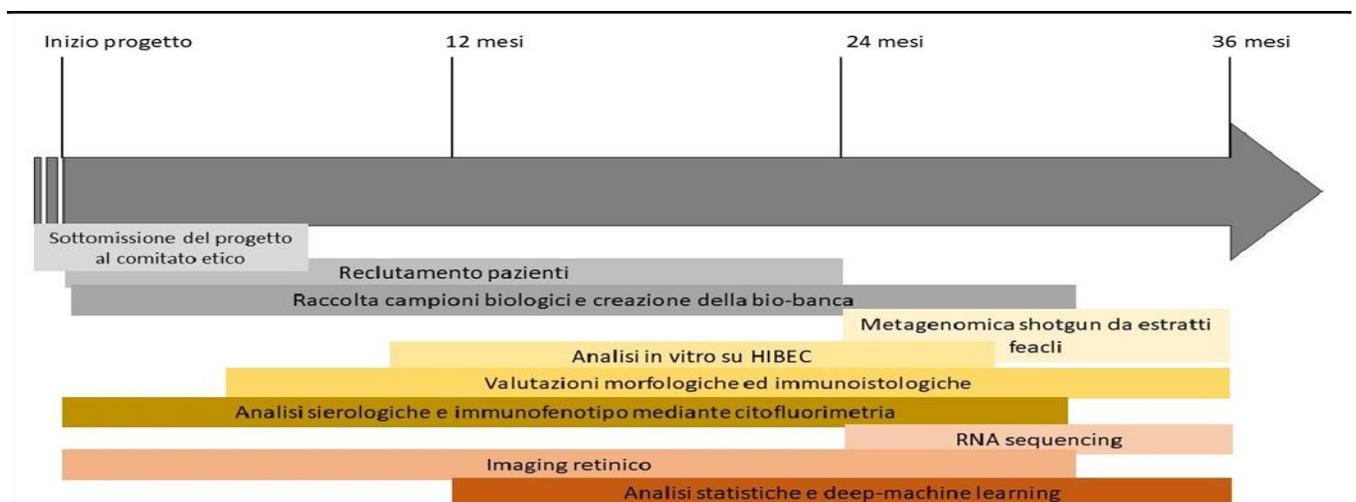
Il presente progetto rappresenta una importante innovazione per il nostro IRCCS in quanto mette in rete numerosi reparti che contribuiranno con pari impegno e responsabilità al successo della ricerca proposta. Questo spirito di collaborazione rappresenta il modello verso il quale vogliamo indirizzare i nostri sforzi.

Dal punto di vista clinico, il continuo affinamento delle analisi immunoistologiche, l'introduzione di immunofenotipo mediante citofluorimetria, l'utilizzo di -omiche complesse associate alle analisi retiniche rappresenta un grande sforzo di coordinamento che potrà ad una profonda conoscenza del paziente e sarà il punto di partenza per studi futuri.

Bibliografia:

1. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S; IBD Section of the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2011 May;60(5):571-607.
2. Novel Pharmacological Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: Beyond Anti-Tumor Necrosis Factor. Pagnini C, Pizarro TT, Cominelli F. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 18;10:671.
3. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):992-1006.
4. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. *J Clin Med*. 2020 Apr 28;9(5):1273.
5. Vedolizumab: A New Opponent in the Battle Against Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Poulakos M, Machin JD, Pauly J, Grace Y. *J Pharm Pract*. 2016 Oct;29(5):503-15.
6. Use of Vedolizumab for the Treatment of Crohn's Disease. Bressler B. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2019 Apr;15(4):204-206.

Timeline (Gantt chart)



Progetto 14/2022: "Utilizzo dei biomarcatori ematici per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma (HCC)"

Responsabile: dott. Endrit Shahini e dott. Raffaele Cozzolongo

Partecipanti: Palma Aurelia Iacovazzi, Vito Giannuzzi, Francesco Losito, Marianna Zappimulso

Introduzione

L'HCC insorge nel 70-95% dei casi in pazienti con un'epatopatia cronica, raramente su un fegato "sano" (1-4). Globalmente circa l'80% degli HCC sono associati all'infezione del virus dell'epatite B (HBV) oppure del virus dell'epatite C (HCV) e la loro distribuzione geografica correla strettamente con la loro epidemiologia (3). Circa 1/3 dei pazienti affetti da cirrosi epatica svilupperà l'HCC nel lungo termine, con un rischio annuale variabile tra l'1%-8% (3).

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il principale tipo di cancro primitivo del fegato (1). L'HCC rappresenta la sesta più frequente causa di cancro e la terza più frequente causa di morte per tumore originante dalla trasformazione neoplastica degli epatociti e la sua incidenza nella popolazione generale è in continuo aumento (2).

L'epatite cronica virale C (CHC) e l'epatite cronica virale B (CHB) assieme alla cirrosi epatica rappresentano rispettivamente nella realtà occidentale ed orientale i più importanti fattori di rischio e pertanto si raccomanda una prolungata sorveglianza e prevenzione in questi pazienti (1-3). Ulteriori fattori di rischio sono rappresentati da aflatossine (in particolare Asia orientale e Africa sub-Sahariana) assunte con l'alimentazione, emocromatosi, deficit di alfa-1-antitripsina, obesità (specie se complicata da presenza di diabete) e steatoepatite non alcolica (NASH).

Anche il fumo di tabacco è stato riconosciuto tra i fattori di rischio. Nei paesi occidentali, circa il 90% dei casi si sviluppa su fegati cirrotici, con picchi di incidenza tra i 40 e 60 anni, nei quali rappresenta la principale causa di mortalità (1). Pertanto la diagnosi precoce dell'HCC è di fondamentale importanza per prolungare la sopravvivenza globale. Oggi solo il 30% circa dei pazienti in Europa viene diagnosticato in fase precoce, in cui sono possibili trattamenti curativi (1).

Incidenza, prevalenza delle epatopatie croniche e cirrosi

L'epidemiologia delle epatopatie croniche (CLD) e della cirrosi epatica sta volgendo al cambiamento, riflettendo l'implementazione della vaccinazione su larga scala dell'epatite B e dei programmi di trattamento dell'epatite C, la crescente prevalenza della sindrome metabolica, l'aumento concomitante dell'uso di droghe iniettabili e l'incremento dell'abuso di alcol (5).

A livello mondiale, 1.5 miliardi di persone hanno avuto CLD in tutto il mondo nel 2017, la cui eziologia è stata rappresentata più comunemente dalla NAFLD (60%), HBV (29%), HCV (9%) e ALD (2%). Sulla base dei dati dello studio *Global Burden of Disease*, il tasso di incidenza standardizzato per età di cirrosi e CLD negli Stati Uniti era di 20.7 per 100.000 nel 2015, con un aumento del 13% dal 2000. Nei paesi europei, la prevalenza media di cirrosi era di 833 su 100.000 (range, 447-1100), ma i dati sulla prevalenza della cirrosi in altre aree, in particolare in contesti con risorse limitate, sono scarsi (5).

L'incidenza stimata della cirrosi in Europa è 26 per 100.000 e l'incidenza in Asia varia da 16.5 per 100.000 nell'Asia orientale a 23.6 per 100.000 nel sud-est asiatico. Ci sono stati piccoli aumenti nell'incidenza della cirrosi in Europa, Asia-Pacifico, Asia orientale, Sud-est asiatico e Asia meridionale dal 2000 al 2015 (5). Secondo uno studio, nel 2015 la prevalenza europea era di 23.710 per 100.000 abitanti (5).

Anche le stime che descrivono in dettaglio l'epidemiologia delle CLD nel Nord America sono limitate dalla scarsità di dati longitudinali basati sulla popolazione. I "baby boomer" (nati nel periodo 1945-1965) comprendono la metà dei casi di cirrosi nel Nord America, con una prevalenza relativamente più alta tra i neri, gli ispanici e quelli con livelli di istruzione inferiori. La prevalenza stimata della cirrosi varia da 300 a 1000 per 100.000 persone, condizionata al rischio variabile di CLD tra le popolazioni (5).

La prevalenza della cirrosi è aumentata da 1.5 a 2 volte negli ultimi 2 decenni. Sebbene i casi di cirrosi più prevalenti siano nella coorte dei "baby boomer", le diagnosi incidentali di cirrosi sono più elevate e aumentano in modo sproporzionato negli americani più giovani. Come si evince da una coorte basata sulla popolazione canadese in cui fattori di rischio come la sindrome metabolica e l'abuso di alcol sono in aumento tra i giovani, l'incidenza della cirrosi specifica per età è aumentata del 22% dal 1997 al 2016 (5).

Incidenza mondiale di Epatocarcinoma (HCC)

L'incidenza mondiale dell'HCC è maggiore nei Paesi asiatici e sub-sahariani, mentre è relativamente meno frequente in Europa e in Nord America essendo legata alla diffusione dei virus dell'epatite (HBV e HCV) (2-4).

Comunque negli ultimi anni si è verificato un incremento di incidenza dell'HCC nei pazienti con eziologia non virale, principalmente di natura metabolica (1,3).

I pazienti con cirrosi di qualsiasi eziologia sono ad alto rischio di HCC, con un'incidenza annuale che varia dall'1% al 4%. Nel 2015, ci sono stati registrati circa 854.000 nuovi casi di cancro al fegato (aumento del 75% dal 1990) e 810.000 decessi correlati al cancro in tutto il mondo. Gli aumenti più significativi della mortalità correlata all'HCC si sono verificati in Nord America, Europa e Australia. Molti paesi, inclusa la Cina, hanno registrato una diminuzione di incidenza di HCC a seguito dei programmi di vaccinazione contro l'HBV e della diminuzione dell'esposizione all'aflatossina.

L'incidenza dell'HCC negli Stati Uniti è aumentata negli ultimi anni, ma il tasso di incremento è rallentato. Sulla base dei dati del registro US Cancer Statistics, l'incidenza dell'HCC corretta per l'età è aumentata dal 4.4 per 100.000 nel 2000 al 6.7 per 100.000 nel 2012 (5). Tuttavia, l'aumento annuo del 4.5% tra il 2000 e il 2009 è rallentato allo 0.7% annuo dal 2010 al 2012, suggerendo un possibile imminente plateau di nuovi casi di HCC. L'incidenza dell'HCC stratificata per categorie di età ha mostrato che gli aumenti dell'incidenza dell'HCC erano più pronunciati nella coorte con un picco di incidenza dell'HCV (nati nel 1945-1965), e sta diminuendo tra gli individui più giovani e gli americani asiatici (5). Tuttavia, i miglioramenti osservati nell'incidenza dell'HCC relativi all'attuazione della vaccinazione e della terapia dell'HBV o dei programmi di trattamento dell'HCV potrebbero essere mitigati o addirittura oscurati in futuro dall'aumento dell'obesità infantile e della NASH ad esordio precoce e dall'aumento dell'incidenza di epatopatia alcolica tra i giovani (5).

Infine, è probabile che la terapia per l'HCV migliori la sopravvivenza nei pazienti con la cirrosi, tuttavia, questi individui rimangono a rischio persistente di sviluppare l'HCC (5).

Ci sono anche diverse tendenze nell'incidenza dell'HCC per sottogruppi razziali e di etnia. I tassi di incidenza aggiustati per età sono più alti tra gli ispanici (6.3 per 100.000) e i neri (5.0 per 100.000) rispetto ai bianchi non ispanici (2.4 per 100.000). Anche l'incidenza dell'HCC sta aumentando in modo sproporzionato negli ispanici (4.7%/anno dal 2000) rispetto ad altri gruppi razziali/etnici (5).

Inoltre, i neri e gli ispanici a cui è stato diagnosticato l'HCC hanno meno probabilità di ricevere una diagnosi precoce.

Incidenza di HCC in Italia

In Europa, i Paesi in cui si registra il maggior numero di casi sono l'Italia e quelli del bacino del Mediterraneo (2-4). Secondo i dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori sono 33.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumori del fegato (maschi = 25.300; femmine = 8.500) (6) Nel 2018 sono state 10.733 le nuove diagnosi all'anno segnalate per l'Italia (prima posizione in Europa) (1).

È stato stimato che nel 2020, sono attese circa 13.000 nuove diagnosi di tumori del fegato (rapporto M/F=2:1), mentre sono stimati 7.800 decessi (maschi=5.400; femmine=2.400) ed una sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi di 21% nei maschi e 20% nelle femmine (6).

La maggior parte degli HCC è causata da infezione cronica da HCV e abuso di alcool, seguita da HBV cronica e altri in Italia (1). Tuttavia si sta assistendo ad un forte incremento dell'HCC correlato a NASH/NAFLD (1,6).

I tumori del fegato, sono più frequenti nel Sud rispetto al Nord o al Centro Italia nelle donne e rispetto al Centro Italia negli uomini. Nelle aree del Nord Italia circa un terzo dei tumori del fegato è attribuibile all'abuso di bevande alcoliche (6).

Un impatto positivo sull'incidenza di questa patologia è riportato all'introduzione della vaccinazione anti epatite B e ai trattamenti antivirali anti epatite C.

Mortalità per cirrosi e HCC nel mondo

Dopo diversi decenni di stabilità dal 1970 al 2008, la mortalità correlata alle CLD è aumentata costantemente, con relativi aumenti sproporzionati tra giovani, donne, non ispanici, bianchi e nativi americani. Uno studio del National Center for Health Statistics ha mostrato un aumento del 65% della mortalità per cirrosi dal 2009 al 2016. I tassi di mortalità aggiustati per età delle CLD e cirrosi hanno continuato ad aumentare, con stime di 14.2 (IC 95%, 14,0-14,3) e 9.2 (IC 95%, 9-1-9,3) per 100.000, rispettivamente, nel 2017 (5).

Le maggiori complicanze della cirrosi-CLD (1,2 milioni di decessi) e del cancro al fegato (790.000 decessi) rappresentano il 3.5% di tutti i decessi nel mondo. La mortalità correlata alla cirrosi è diminuita da 20 per 100.000 anni-persona nel 1980 a 15.8 per 100.000 anni-persona nel 2010 (5).

Ci sono stati circa 150.000 decessi correlati all'HCC (corretti per l'età, 2.3 per 100.000) negli Stati Uniti dal 1999 al 2017. I tassi di mortalità nel 2017 sono stati più alti tra i maschi, gli abitanti delle isole asiatiche/del Pacifico e quelli di età compresa tra 75 e 84 anni. La mortalità per HCC è aumentata complessivamente e in quasi tutti i gruppi, ad eccezione degli abitanti delle isole asiatiche/del Pacifico (5). Sebbene i tassi di mortalità diminuiti siano stati pronunciati in Asia orientale, Nord Africa/Medio Oriente e Asia Pacifico ad alto reddito, aumenti della mortalità sono stati osservati in molte altre parti del mondo, tra cui l'Asia meridionale, l'Asia centrale e l'Europa orientale. Secondo lo studio di Mokdad *ed altri*, nel 2014 la mortalità europea annuale per cirrosi per 100.000 persone è stata di 10.2–20 (5).

I decessi per cirrosi sono aumentati di 2 volte nell'Africa subsahariana tra il 1980 e il 2010, principalmente a causa dell'epatite virale e dell'ALD (5).

Le disparità razziali nella mortalità dell'HCC persistono e gli studi suggeriscono che ciò potrebbe essere correlato in parte ai fallimenti terapeutici, ai tassi più bassi di diagnosi precoce e alle minori probabilità di trattamento curativo, incluso il trapianto di fegato, tra le minoranze razziali/etniche rispetto ai bianchi non ispanici (5).

CLD, cirrosi ed HCC: Costi

L'autore Younossi *ed altri* (2016), hanno riportato che in Germania, Francia, Italia e Regno Unito i costi diretti del CLD e della cirrosi sono stati complessivamente di 35 miliardi (354–1163 euro per paziente). Nel 2018 lo studio di Mellinger *ed altri*, ha analizzato i dati del database Truven Marketscan Commercial Claims and Encounters, riportando che la prevalenza per 100.000 abitanti di cirrosi alcolica negli Stati Uniti era di 100 (2015) mentre i costi erano di 44.835 \$ a persona (cirrosi alcolica) contro 23.319 \$ per-persona (cirrosi non alcolica) (5).

D'altra parte da una recente analisi di costo-efficacia (Parikh ND *et al*, 2020) che ha tenuto conto sia dei benefici che degli costi correlati alla sorveglianza, è risultato che l'ecografia e α -FP sono più convenienti per la sorveglianza dell'HCC rispetto alla sola ecografia o all'assenza di sorveglianza nei pazienti con cirrosi compensata (7).

DIAGNOSI DI HCC

I pazienti con storia di epatopatia cronica sono a rischio di sviluppare un HCC e per tale motivo dovrebbero essere sottoposti ad un programma di screening volto alla diagnosi precoce dell'HCC. I pazienti asintomatici ma con predisposizione familiare su base genetica, secondo le recenti linee guida internazionali, devono essere monitorati periodicamente (3,4).

Imaging (ecografia, TC e RM), biopsia con esame istologico e dosaggio dell'alfa-fetoproteina nel sangue sono utilizzate nella diagnostica e stadiazione (6). Tuttavia gli attuali strumenti di screening/sorveglianza non sono perfetti.

Gli strumenti di screening più diffusi per HCC sono i seguenti e vengono eseguiti a cadenza semestrale:

- **Ecografia addome:** L'eco addome è lo strumento diagnostico di prima scelta, con una sensibilità del 48% (95%IC:34-62%) e una specificità del 97% (95%IC:95-98%) come emerge da una rigorosa revisione sistematica di 14 studi su 2524 casi (8). Pertanto l'ecografia è altamente specifica ma non sufficientemente sensibile per rilevare l'HCC in molti cirrotici o per supportare un programma di sorveglianza efficace. Nello specifico la sensibilità dell'ecografia è limitata, in particolare nelle fasi iniziali del cancro (sensibilità:39-64%; specificità: 76-91%) (9).

Infatti le prestazioni dell'ecografia in modalità B dipendono dall'abilità dell'operatore, dalle condizioni dei pazienti e dalla strumentazione.

- **Marker tumorali:** L'alfa-fetoproteina (α -FP) è un marcatore tumorale specifico. La sua sensibilità diagnostica dell'HCC è del 25-60% mentre la sua specificità è del 76-96% (10). Un livello di α -FP superiore a 400 ng/mL è fortemente diagnostico, ma circa i due terzi dei pazienti con HCC <4 cm ha livelli di α -FP <200 ng/mL e inoltre circa il 20% degli HCC non produce α -FP. La catena di carboidrati dell' α -FP viene modificata dalla fucosiltransferasi durante lo sviluppo dell'HCC per dare origine alla lectin-bound α -FP (α -FP-L3) (sensibilità:40-90%; specificità:>90%). Il rapporto tra α -FP fucosilata e α -FP totale è espresso come α -FP-L3/(10). La des- γ -carbossi-protrombina (DCP o PIVKA-II) è una protrombina immatura, priva di carbosilazione a vari residui di glutammato (sensibilità:48-62%; specificità:81-98%) (10). L' α -FP-L3 e la DCP sono utilizzati di routine da 20 anni in Giappone. L'uso combinato di questi marcatori ha permesso di aumentare la possibilità di rilevare

precocemente i piccoli HCC (10-12). La protrombina si forma dopo la γ -carbossilazione di propeptidi dipendenti da vitamina K. La DCP viene prodotta a causa di un difetto post-translazionale acquisito nella sequenza carbossilasi- vitamina K-dipendente delle cellule maligne (11). La produzione di DCP, quindi, non aumenta nell'epatite cronica o nella cirrosi per cui essa è un potenziale marcatore da utilizzare per la diagnosi dell'HCC (13). Tuttavia, la misurazione della DCP non ha valore prognostico nei casi di carenza di vitamina K o inibizione della funzione vitamina K (per esempio nei soggetti in TAO con dicumarolici) poiché la sua sintesi è indotta anche dall'assenza di vitamina K causando dei valori falsi positivi. Per questo motivo la DCP è conosciuta anche con il nome di PIVKA-II (protein induced in vitamina K absence). Fatto salve queste limitazioni, molti studi hanno dimostrato che PIVKA-II ha un'alta sensibilità e specificità rispetto all' α -FP nel differenziare l'HCC da altre malattie epatiche croniche (14,15). Liebman *et al.* (16) hanno dimostrato che PIVKA-II può essere utilizzato non solo come marker molto specifico per HCC ma anche come fattore prognostico dei pazienti con HCC (17). La sensibilità, la specificità e l'Odds Ratio negli HCC <5 cm è rispettivamente 0,14-0,54, 0,95-0,99, e 6,86- 29,7, con un cut-off di 40 mAU/ml, e di 0,07-0,56, 0,72-1 e 3,56-3 con un cut-off di 100 mAU/ml (18). In un ampio studio su 270 pazienti con HCC che avevano tutti livelli di α -FP sierica inferiore a 20 ng/mL, l'uso combinato dei biomarcatori α -FP-L3 e DCP ha rilevato il 49% di tutti i pazienti con HCC di dimensioni inferiori a 2 cm (19). Inoltre le misurazioni di α -FP-L3 con il metodo altamente sensibile prima del trattamento erano più utili per la diagnosi e la prognosi dell'HCC rispetto al metodo convenzionale (19). Più recentemente, i tre marcatori (α -FP, α -FP-L3 e DCP) hanno mostrato una sensibilità e specificità dell'85% (n=304 pazienti HCC *versus* 403 controlli) nella diagnosi precoce di HCC in una coorte tedesca (20).

- **Indagini di secondo livello sono la TAC e la RM:** Utili nella conferma della diagnosi e nella stadiazione della malattia al fine di impostare il corretto iter terapeutico. La TC con mezzo di contrasto (mdc) identifica il tumore, ne definisce le caratteristiche e i rapporti con le strutture vascolari. La RM con mdc ha un'accuratezza sovrapponibile alla TC. I vantaggi sono legati alla mancata somministrazione di radiazioni ionizzanti, alla possibilità di utilizzare i mezzi di contrasto specifici per il fegato e di studiare con opportune fasi dell'esame l'albero biliare; gli svantaggi, invece, sono rappresentati dai tempi e i costi di esecuzioni ancora molto elevati.
- In rari casi qualora i dati TC e RM non fossero concordanti può essere richiesta una biopsia della lesione sospetta.

SORVEGLIANZA: PRINCIPALI LINEE GUIDA NEL MONDO

La sorveglianza dell'HCC è raccomandata dalle linee guida americane (AASLD), asiatiche-pacifico (APASLD) ed europee (EASL) nei seguenti casi, indipendentemente dall'eziologia (Child-Pugh A-B) (3,4):

- Cirrosi epatica, Child-Pugh C in lista per trapianto di fegato
- Portatori di HBV con storia familiare di HCC
- Maschi asiatici di età >40 anni
- Femmine asiatiche di età >50 anni
- Maschi africani di età >20 anni

La sorveglianza semestrale ha ridotto la mortalità dell'HCC del 37% (21). Inoltre la sorveglianza consente la diagnosi precoce dell'HCC e trattamenti curativi più frequenti come è emerso in un'analisi retrospettiva su 887 casi di HCC diagnosticati tra il 2005 e il 2010 nella National Veterans Administration degli Stati Uniti (22).

Le linee guida Europea Association Study Liver (EASL)/ European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) raccomandano la sorveglianza dell'HCC con ecografia semestrale anche dei pazienti con epatopatie croniche e con fibrosi avanzata (F3) (1,3,4).

Le linee guida American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) raccomandano per i cirrotici e CHB con particolare origine etnica, età e background genetico una sorveglianza con ecografia e α -FP semestrali (23).

Tuttavia esiste un'area di incertezza per la sorveglianza dei pazienti con CHC (fibrosi F3) e con clearance virale (3,4). A tal proposito, le linee guida AASLD per HCV raccomandano la sorveglianza per HCC in questo sottogruppo, mentre le linee guida AASLD per HCC raccomandano la sorveglianza per HCC solo in presenza di cirrosi epatica metabolica (3,4).

Inoltre, le linee guida Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) raccomandano nei cirrotici con HBV e/o HCV una sorveglianza con ecografia e α -FP semestrali (24).

Le linee guida della Japan Society of Hepatology (JSH) raccomandano invece nei cirrotici e CHB/CHC una sorveglianza semestrale con ecografia e α -FP, α -FP-L3 e DCP (25).

Da riportare inoltre che l'HCC insorge anche in pazienti non cirrotici con NAFLD la cui sorveglianza non è raccomandata poiché i tassi di incidenza annui sono inferiori all'1% (4).

La sopravvivenza dopo la diagnosi di HCC nel mondo occidentale varia tra circa 18 mesi in Germania come emerge da un'analisi retrospettiva, che valutava 1066 pazienti con HCC, separati in due periodi di 6 anni (n=385; 1998-2003 e n=681; 2004-2009) (26) e circa 48 mesi in Giappone (27). La sopravvivenza nel mondo occidentale al giorno d'oggi è simile alla situazione in Giappone negli anni '80. In Europa circa il 30% di tutti i pazienti con HCC viene sottoposto a trattamento curativo, mentre in Giappone più del 60% (27).

SCORE DI RISCHIO SPECIFICI PER LA PREDIZIONE DI HCC NEI PAZIENTI CHB

Molti degli score specifici di epatopatia cronica HBV-correlata sono stati sviluppati in pazienti asiatici affetti da CHB per stratificare il rischio di sviluppare l'HCC in corso di sorveglianza (3). Tali score sono stati validati anche in coorti caucasiche riportando performance accettabili, a seguito della necessità di disporre di uno score accurato, preciso e di semplice utilizzo nella pratica clinica, soprattutto nelle aree geografiche dove l'onere dell'infezione da HBV è particolarmente elevato. Tuttavia la maggior parte delle performance degli score di validazione sono risultate più basse rispetto a quelle delle coorti di "training" (3).

Gli studi di validazione includenti pazienti caucasici affetti da CHB hanno mostrato i seguenti intervalli di valori di AUROC per i rispettivi score includenti specifiche variabili:

- **GAG-HCC** (età, genere, HBV-DNA, cirrosi): 0.74-0.86
- **CU-HCC** (età, albumina, bilirubina, HBV-DNA, cirrosi radiologica): 0.62-0.91
- **REACH-B** (età, genere, ALT, stato di HBeAg, livelli di HBV-DNA): 0.54-0.77
- **RWS-HCC** (età, genere, cirrosi, α -FP): 0.85

Questi risultati indicano che vi sono specifiche caratteristiche di popolazione che influiscono significativamente sul rischio di sviluppare l'HCC nei pazienti con CHB.

SCORE DI RISCHIO SPECIFICI PER LA PREDIZIONE DI HCC NEI PAZIENTI CHC

Rispetto alla CHB, vi sono solo pochi studi sui modelli predittivi degli score sul rischio di HCC nei pazienti con CHC, ed il loro maggior limite è costituito dalla assenza di coorti di validazione per molti di essi (3).

Un solo studio europeo del 2016 è stato condotto su una coorte francese di 1323 pazienti affetti da CHC con lo scopo di sviluppare uno score individualizzato per la predizione dell'HCC (età > 50 anni, progresso abuso alcolico, bassa conta piastrinica, GGT>ULN, ed assenza di SVR). Tuttavia anche questo score era privo di una coorte di validazione esterna (3).

Infine l'evidenza che il rischio di HCC, si riduce significativamente nel tempo nei pazienti che hanno ottenuto la SVR, sottolinea la necessità di nuovi algoritmi per personalizzare la sorveglianza dell'HCC nei pazienti con CHC e per ottimizzare il rapporto costo/beneficio (3).

PREVISIONE DEL RISCHIO DI HCC NEI PAZIENTI CON EPATOPATIE CRONICHE O CON ALTRI FATTORI DI RISCHIO

Gli score del rischio di HCC, indipendentemente dall'eziologia della malattia epatica sottostante, identificati in studi che valutavano coorti caucasiche sia nella popolazione di studio che nel gruppo di validazione esterna sono i seguenti (3):

- **THRI**: utilizza 4 variabili (età, genere, eziologia, conta piastrinica) ed è stato sviluppato per prevedere il rischio di HCC a 10 anni; la sua performance è stata studiata in tre coorti di validazione esterna provenienti dai Paesi Bassi, Cina, e Turchia con una precisione simile nella previsione dello sviluppo dell'HCC. I valori AUROC nella identificazione del gruppo ad elevato rischio di HCC variavano da 0.75 a 0.80.
- **aMAP**: Utilizza 4 variabili (età, genere maschile, rapporto albumina-bilirubina e conta piastrinica); è stato ottenuto da una coorte di addestramento di 3,688 pazienti asiatici e convalidato in nove coorti con differenti eziologie ed etnie. Il valore di 50 è stato identificato come il cut-off ottimale per prevedere l'HCC, con una sensibilità dell'85.7%-100% e con un valore predittivo negativo del 99.3%-100%.

BIOMARCATORI DI HCC E LORO SIGNIFICATO CLINICO

Idealmente, l'utilizzo di biomarcatori sierici dotati di una adeguata sensibilità e specificità potrebbero consentire la diagnosi precoce dell'HCC evitando la sorveglianza con l'ultrasonografia. Una serie di biomarcatori sierici, diversi dall' α -fetoproteina (α -FP) sono stati inclusi in alcuni sistemi di score per la predizione dell'HCC (3).

Tuttavia, allo stato attuale, nessuno dei biomarcatori è stato validato in studi clinici di fase III e risulta utilizzato nella pratica clinica, ad eccezione dell' α -FP e DCP (o PIVKAlI), raccomandati dalle linee guida giapponesi sull'HCC (28). Questo può essere spiegato dall'elevata eterogeneità della biologia dell'HCC, dove le alterazioni di diverse "pathway" biochimiche sono coinvolte nel processo di tumorigenesi (29). Infatti, i pazienti con HCC mostrano vari modelli di positività per i biomarcatori di HCC (20).

Combinazione di biomarcatori utilizzando il punteggio GALAD

Il punteggio GALAD (**G**fine, **U**Nge, α -FP-I3, **U**NFP, **D**CP) è un modello sviluppato utilizzando i dati di 331 HCC (eziologie miste) e 339 pazienti di controllo (CLD, eziologie miste) di Birmingham, Regno Unito e validata su una coorte esterna di 63 pazienti HCC (eziologie prevalentemente alcolica/NASH/NAFLD) e 100 controlli (CLD, eziologie prevalentemente alcolica/NASH/NAFLD) dell'Università di Newcastle (30). Si avvale della combinazione di tre biomarcatori (α -FP, α -FP-L3 e DCP) con il genere e l'età consentendo così un miglioramento significativo della diagnosi precoce dell'HCC.

$$\mathbf{Z: - 10.08 + 0.09 \times Et\grave{a} + 1.67 \times Sesso + 2.34 \log (\alpha\text{-FP}) + 0.04 \times \alpha\text{-FP-L3} + 1.33 \times \log (\text{DCP})}$$

Il punteggio GALAD ha mostrato una performance complessiva notevole (valori AUROC di 0.95, sensibilità del 92% e specificità dell'85%) che è rimasta elevata nella diagnosi precoce dell'HCC (AUROC: 0.92, sensibilità 92%, specificità 79%) utilizzando la coorte del regno Unito (30). Il modello, applicato su una popolazione di studio caucasica, in cui il 90% erano affetti da cirrosi, è stato convalidato in coorti indipendenti del Giappone, Germania e Hong Kong (n=6834; 2430 HCC, 4404 CLD) dopo confronto con il set di dati del Regno Unito, con una sensibilità complessiva oscillante tra 80% e 91%, e specificità dall'81% al 90% e valori AUROC da 0.85 a 0.95 (31). In entrambi gli studi originari e di validazione, le eziologie erano miste e consistevano principalmente in malattie epatiche alcol-correlate e CHC.

Il punteggio GALAD ha mostrato curve ROC migliori rispetto ai singoli marcatori indipendentemente dall'origine etnica, dall'eziologia (HCV, HBV e altri), rilevando tumori in fase iniziale in modo altrettanto efficiente quanto quelli in fase avanzata come emerge dall'analisi della coorte tedesca (n=275 HCC, n=900 CLD; HCC unifocale <3cm=AUROC 0.87; unifocale <5cm=AUROC 0.85; unifocale <4cm=AUROC 0.87; unifocale <10cm=AUROC 0.90). La performance dello score GALAD per il rilevamento dell'HCC è stato anche confrontato con l'ecografia epatica e si è dimostrata superiore.

Validazione del punteggio GALAD in Italia

Sono stati determinati i livelli sierici di α -FP, α -FP-L3 e DCP in un totale di 98 pazienti italiani (44 pazienti CLD senza HCC e 54 pazienti con HCC di eziologia mista prevalentemente virale HCV/HBV), utilizzando un autoanalizzatore mTASWako i30 (test altamente sensibile di elettroforesi capillare su microchip e saggio di legame in fase liquida) (32). I livelli sierici di α -FP, α -FP-L3 e DCP erano significativamente elevati nell'HCC rispetto ai pazienti con CLD (P<0,0001). I valori di AUC erano rispettivamente 0.891, 0.867 e 0.870. La combinazione dei tre biomarcatori ha determinato un'AUC di 0.947, mentre il modello GALAD ha mostrato un'AUC di 0,976 con una differenza tra i valori di AUC di 0.029 (P=0,028) (32). In conclusione, da tale studio italiano si è dedotto che la combinazione di α -FP, α -FP-L3 e DCP è superiore a un singolo biomarcatore nel rilevamento dell'HCC. Inoltre, le prestazioni dell'algoritmo GALAD sono significativamente superiori rispetto alla sola combinazione di questi tre biomarcatori.

GALAD nell'HCC correlato alla NASH

Uno studio caso-controllo multicentrico condotto in 8 centri della Germania ha valutato la capacità del punteggio GALAD nel diagnosticare l'HCC nei pazienti con NASH su 125 pazienti con HCC (20% entro i Criteri di Milano, BCLC A) e 231 pazienti senza HCC (controlli NASH). Gli autori hanno anche analizzato i dati in uno studio pilota di coorte in Giappone di 389 pazienti con NASH sotto sorveglianza per HCC per una mediana di 167 mesi (33). Il punteggio GALAD ha identificato pazienti con HCC in qualsiasi stadio con un'AUC di 0.96, significativamente maggiore dei valori per i soli livelli sierici di α -FP (AUC, 0.88), α -FP-L3 (AUC, 0,86) o DCP (AUC, 0.87). I valori di AUC per il punteggio GALAD erano coerenti nei pazienti con cirrosi (AUC, 0.93) e senza cirrosi (AUC, 0.98). Per il rilevamento dell'HCC all'interno dei Criteri di Milano, il punteggio GALAD ha raggiunto un AUC di 0.91, con una sensibilità del 68% e una specificità del 95% a un cutoff di -0.63 (33).

Nello studio pilota di coorte giapponese, il punteggio medio GALAD era più alto nei pazienti con NASH che hanno sviluppato HCC rispetto a quelli che non hanno sviluppato HCC già 1.5 anni prima della diagnosi di HCC. I punteggi GALAD erano superiori a -0,63 circa 200 giorni prima della diagnosi di HCC (33). Pertanto gli autori concludono dicendo che il punteggio GALAD può rilevare l'HCC con elevati livelli di accuratezza nei pazienti con NASH, con e senza cirrosi (prestazione simile a quelle dell'epatite virale). Il punteggio GALAD può rilevare pazienti con HCC in fase iniziale e potrebbe facilitare la sorveglianza dei pazienti con NASH, che sono spesso obesi, condizione che limita la sensibilità di rilevamento ultrasonografica del cancro al fegato (33). In ogni caso, deve essere definito un valore di cut-off ottimale per sviluppare un approccio condiviso ed un algoritmo standardizzato di sorveglianza.

GALADUS nell'HCC

Uno studio recente ha mostrato come le prestazioni del punteggio GALAD sono state superiori all'ecografia per il rilevamento dell'HCC. Il punteggio di un nuovo score definito GALADUS ha ulteriormente migliorato le prestazioni del punteggio GALAD (34). In questo studio è stata analizzata una coorte monocentrica di 111 pazienti con HCC e 180 controlli con cirrosi o CHB e una coorte multicentrica di 233 pazienti con HCC precoce e 412 pazienti con cirrosi dello studio di fase II dell'Early Detection Research Network (EDRN). L'area sotto la curva ROC (AUC) del punteggio GALAD per il rilevamento dell'HCC era 0.95 [IC 95%, 0.93-97], che era superiore all'AUC dell'ecografia (0.82, $P < 0,01$). A un cut-off di -0.76, il punteggio GALAD aveva una sensibilità del 91% e una specificità dell'85% per il rilevamento dell'HCC. L'AUC del punteggio GALAD per il rilevamento dell'HCC in fase iniziale è rimasta elevata a 0.92 (IC 95%, 0.88-0.96; cutoff -1,18, sensibilità 92%, specificità 79%). L'AUC del punteggio GALAD per il rilevamento dell'HCC era 0.88 (IC95%, 0.85-0,91) nella coorte EDRN. La combinazione di GALAD e ultrasuoni (punteggio GALADUS) ha ulteriormente migliorato le prestazioni del punteggio GALAD nella coorte monocentrica, raggiungendo un'AUC di 0.98 (IC95%, 0.96-0.99; cutoff -0,18, sensibilità 95%, specificità 91%) (34).

L'equazione del nuovo modello denominato punteggio GALADUS è la seguente:

$$\text{GALADUS} = -12,79 + 0,09 \times \text{età} + 1,74 \times (\text{1 per i maschi, 0 per le femmine}) + 2,44 \times \log_{10}(\text{AFP}) + 0,04 \times \text{AFPL3} + 1,39 \times \log_{10}(\text{DCP}) + 3,56 \times (\text{1 per ecografia positiva, 0 per ecografia negativa})$$

PREFAZIONE ALLA PRESENTAZIONE DEL SISTEMA - μ TASWako™ i30 - Fujifilm

Dai dati elencati in precedenza sono emersi alcuni elementi clinici e diagnostici sui quali vogliamo focalizzare la nostra attenzione:

1. Per la maggior parte dei pazienti l'HCC è del tutto asintomatico
2. Gli HCC possono essere sintomatici solo se di grandi dimensioni
3. Il marker tumorale dell' α -FP è un marcatore tumorale specifico ma la sua sensibilità diagnostica è ridotta e inoltre circa il 20% degli HCC non produce α -FP.

Appare evidente che, la diagnosi di HCC rimane un obiettivo chiave per il raggiungimento di una prognosi migliore per il paziente, considerati i recenti progressi terapeutici nei confronti delle neoplasie epatiche di piccole dimensioni.

Il ruolo del Laboratorio di Patologia Clinica nella individuazione precoce, in pazienti a rischio di epatocarcinoma, di una neoformazione o di una recidiva, dopo resezione chirurgica di un HCC, è di fondamentale importanza.

Ne consegue che, proprio in relazione ai 3 punti suddetti, l'utilizzo di marcatori tumorali di tipo prognostico e predittivo diventa essenziale come supporto diagnostico nella pratica clinica.

Infatti, le informazioni fornite da una appropriata gestione dei biomarcatori possono rappresentare per l'oncologo uno strumento diagnostico più accurato rispetto ad altre procedure.

Gli HCC sono biologicamente eterogenei. Alcuni esprimono livelli normali di α -FP, ma alti livelli di α -FP-L3 o DCP e viceversa.

I dati suggeriscono che l' α -FP da sola non è sufficiente per la diagnosi sierologica dell'HCC nei pazienti europei, mentre una combinazione di α -FP e DCP può aumentare la sensibilità anche nei pazienti con HCC in fase iniziale (34). Diversi studi hanno dimostrato inoltre che l' α -FP-L3 e DCP sono marcatori complementari per la diagnosi precoce di HCC (3,19,35).

L'uso combinato di questi tre marcatori potrebbe fornire:

- Una maggiore sensibilità clinica
- Un efficace valore prognostico e predittivo per l'identificazione precoce dell'HCC
- Il rilevamento sierico degli HCC nelle prime fasi anche in presenza di valori di α -FP negativi

Pertanto, l'aggiunta di α -FP-L3 e DCP alla sorveglianza dell'HCC potrebbe aumentare le possibilità di rilevare l'HCC in fase precoce.

Le linee guida della Japan Society of Hepatology per la gestione dell'HCC, includono tutti e tre i biomarcatori sierici per la sorveglianza (36). Nello specifico esse raccomandano la misurazione di due o più tumori diversi marcatori (α -FP, DCP, o la frazione AFP-L3) per diagnosi precoce di HCC (grado A) (36).

Un rapporto dell'indagine del 2010 sull'efficacia della sorveglianza in Giappone ha concluso che su tutti i pazienti con HCC, il 33.5% aveva tumori di 2 cm o meno e più del 62% era stato sottoposto a chirurgia o terapia di ablazione locale che rappresentano opzioni di trattamento disponibili solo per HCC in fase iniziale.

SISTEMA - μ TASWako™ i30 (Micro Total Analysis System) – Fujifilm

Caratteristiche

- μ TASWako™ i30 è l'unico sistema diagnostico in vitro (IVD) al mondo per la misurazione automatizzata routinaria dei biomarcatori α -FP-L3 e DCP (37)
- È realizzato in polimetilmetacrilato (PMMA) e consente un dosaggio immunologico altamente sensibile (37)
- Tutti i passaggi sono integrati su un chip microfluidico
- Integra le fasi di Elettroforesi di Affinità con metodica in microfluidica monouso
- I singoli test possono essere eseguiti in soli 9 minuti

Caratteristiche principali dello strumento:

- Principio del dosaggio: EATA
- Rilevamento della fluorescenza ad alta sensibilità con reazione in micro-fluidica
- Precisione inferiore al 3% CV per α -FP-L3
- Rendimento: 25 test/h
- Connessione del sistema all LIS/HOST interno al laboratorio

Funzionamento dello strumento

- Configurazione semplice di reagenti e materiali di consumo
- Compatibile con codice a barre
- Capacità LIMS (o sistema di gestione delle informazioni di laboratorio, è un tipo di software progettato per migliorare la produttività e l'efficienza del laboratorio, tenendo traccia dei dati associati a campioni, esperimenti, flussi di lavoro di laboratorio e strumenti. Un LIMS automatizza i flussi di lavoro e monitora tutte le informazioni importanti sui campioni, i dati, i flussi di lavoro e i risultati QA/QC generati dal proprio laboratorio quotidianamente)

μ TASWako™ α -FP-L3

- Si tratta di un esame in VITRO altamente specifico per la valutazione del rischio di sviluppo dell'HCC
- α -FP-L3 è un isoforma della glicoproteina α -FP che, per mezzo dell'elettroforesi di affinità con la lectina Lens culinaris agglutinin (LCA) è in grado di frazionare α -FP nelle tre varianti L1, L2 ed L3 (α -FP-L1 e α -FP-L3 sono separati in un microcanale mediante elettroforesi capillare a causa del diverso peso molecolare, mobilità condizionata dalla diversa affinità di legame con LCA) (38)
- α -FP-L1 contiene la più bassa affinità per LCA che rappresenta la frazione più diffusa nei pazienti con malattie epatiche non maligne come l'epatite cronica o la cirrosi epatica
- μ TASWako™ α -FP-L3 misura il rapporto tra α -FP-L3 e α -FP totale in percentuale e consente una diagnosi precoce di HCC [α -FP-L3% = α -FP-L3 / (α -FP-L1 + α -FP-L3)]
- Tutti i componenti di prova sono certificati CE ai sensi della direttiva 98/79/CE sui dispositivi medici diagnostici in vitro
- Test diagnostico in vitro marcato CE
- Specificità e sensibilità superiore per la diagnosi precoce di HCC (biomarcatore prognostico)
- Conservazione a 2-10 gradi

μ TASWako™ Test DCP

- Si tratta di un esame in VITRO altamente specifico per la valutazione del rischio dello sviluppo dell'HCC
- La DCP (des-gamma-carbossi protrombina) è una forma immatura della proteina, la protrombina. Nel metabolismo normale il precursore della protrombina subisce una carbossilazione vitamina K dipendente di 10 residui di glutamicacidi all'N-terminale per produrre la protrombina nativa. Nel caso dell'HCC, questa trasformazione è compromessa, il che si traduce in un accumulo di DCP.

- Il DCP è anche noto come proteina indotta dall'assenza di vitamina K o antagonista II (PIVKA-II)
- μ TASWako™ Test DCP consente una diagnosi precoce di HCC in associazione con il test α -FP-L3

Caratteristiche principali:

- Test diagnostico in vitro marcato CE
- Specificità e sensibilità superiore per la diagnosi precoce di HCC (biomarcatore prognostico)
- Conservazione a 2-10 gradi

Sommario:

- Per la maggior parte dei pazienti l'HCC è del tutto asintomatico
- Gli HCC possono essere sintomatici solo se di grandi dimensioni
- Circa i due terzi dei pazienti con HCC < 4 cm ha livelli di α -FP < 200 ng/mL e inoltre circa il 20% degli HCC non produce α -FP
- Pur essendo l' α -FP in fase di diagnosi e screening come marcatore tumorale specifico e ormai ben consolidato, appare pressante la necessità di utilizzare biomarcatori altamente specifici e di nuova generazione per consentire una diagnosi ancora più precoce ed accurata nei pazienti a rischio
- Diversi studi hanno dimostrato che α -FP-L3 e DCP sono marcatori complementari ed essenziali nel rilevamento precoce di HCC
- L'uso combinato di α -FP, α -FP-L3 e DCP alla sorveglianza dell'HCC potrebbe aumentare la possibilità di rilevare l'HCC in fase precoce
- L'uso combinato di questi tre marcatori fornirebbe: Una maggiore sensibilità clinica ed un efficace valore prognostico e predittivo per il riconoscimento precoce dell'HCC
- Il punteggio GALAD (e GALADUS) hanno dimostrato l'efficacia di questi nuovi biomarcatori nei programmi di prevenzione e sorveglianza dell'HCC specialmente nei pazienti con cirrosi epatica quasi indipendentemente dall'eziologia

Obiettivi specifici dello studio:

lo studio si propone di valutare l'utilità clinica della combinazione di tre biomarcatori α -FP, α -FP-L3 e DCP (misurati contemporaneamente mediante sistema diagnostico in vitro automatizzato μ TASWako™ i30) in soggetti ad alto rischio di sviluppare tale neoplasia.

In particolare, ci proponiamo i seguenti obiettivi specifici:

Obiettivo specifico 1:

valutazione dell'utilità clinica dell'uso combinato di α -FP, α -FP-L3 e DCP nel predire l'insorgenza dell'EPATOCARCINOMA (HCC)

Obiettivo specifico 2:

valutazione delle performance dei punteggi GALAD e GALADUS nella diagnosi precoce di HCC.

Obiettivo specifico 3:

correlazione tra i livelli dei tre biomarcatori (singolarmente ed in combinazione tra loro) e lo stadio dell'HCC.

Lo studio prevede un follow-up dei soggetti reclutati e quindi tempi piuttosto lunghi per il suo completamento. Potrebbe quindi accadere che alcuni pazienti vengano persi e che la popolazione iniziale diminuisca. Per questo motivo il reclutamento procederà durante tutto lo studio.

Tuttavia, per una valutazione preliminare vorremmo dosare α -FP, α -FP-L3 e DCP in campioni di HCC eventualmente stoccati a -80°C nella nostra Biobanca ed in campioni di soggetti affetti da NASH conservati per gli studi epidemiologici del nostro Istituto, oltre che nei soggetti con cirrosi epatica arruolati per questo studio. Sempre in questa fase vorremmo effettuare una correlazione preliminare tra i livelli dei biomarcatori e lo stadio dell'HCC, qualora i dati disponibili siano sufficienti.

Metodologia e analisi statistica:

Nello studio verranno arruolati, previo consenso informato:

1. Pazienti alla prima diagnosi di HCC
2. Pazienti in follow-up con cirrosi virale, NASH e/o alcolica che effettuano programmi di prevenzione per HCC presso il reparto di Gastroenterologia I del nostro Istituto.

All'arruolamento e ad ogni accesso al Reparto verrà effettuato un prelievo di sangue.

Il gruppo di controllo sarà composto da pazienti che saranno candidati alla sorveglianza dell'HCC, cioè quelli con cirrosi epatica o epatite cronica di qualsiasi eziologia senza HCC visitati presso il nostro Istituto 1) che saranno testati per α -FP, α -FP-L3% e DCP come parte del loro follow-up regolare, o 2) avevano fornito il consenso a conservare un campione di siero in Biobanca che autorizzava la misurazione di α -FP, α -FP-L3% e DCP. Ai pazienti controllo sarà richiesto di essere sottoposti ad un follow-up di almeno 6 mesi dopo la valutazione del punteggio GALAD per confermare l'assenza di HCC o avere una TC multifasica con mezzo di contrasto, una risonanza magnetica o una biopsia epatica negative al momento della valutazione del punteggio GALAD.

Il gruppo di casi sarà composto da pazienti con HCC di nuova diagnosi nel contesto di cirrosi o di qualsiasi altra eziologia durante lo stesso periodo di studio, 1) i quali saranno testati per α -FP, α -FP-L3% e DCP come parte integrante della loro regolare assistenza clinica, o 2) avevano fornito il consenso a conservare un campione di siero in Biobanca che autorizzava la misurazione di α -FP, α -FP-L3% e DCP al momento della diagnosi del tumore. Eventuali pazienti sottoposti a terapia con warfarin saranno esclusi poiché il warfarin può incrementare i livelli di DCP in assenza di HCC, rischiando di dare falsi positivi.

Saranno utilizzati il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher per confrontare le variabili categoriali e il test T Student o Wilcoxon Rank sum per le variabili continue. Il punteggio GALAD (30) sarà calcolato mediante un calcolatore presente sul web e disponibile all'indirizzo: <http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/model-end-stage-liver-disease/galad>. L'area sotto la curva AUC sarà calcolata per valutare le prestazioni del punteggio GALAD per la diagnosi di HCC. Saranno eseguite analisi di sottogruppi per studiare le prestazioni del punteggio GALAD in sottogruppi di pazienti con diverso genere, età, α -FP, eziologie, BMI, stato di cirrosi, disfunzione epatica e stadio del tumore.

L'indice di Youden sarà utilizzato per trovare i cut-off GALAD ottimali da cui saranno calcolati la sensibilità, la specificità e i corrispondenti intervalli di confidenza (CI) al 95% e confrontati con quelli dell'ecografia (39). Il punteggio GALADUS (34) sarà sviluppato combinando il punteggio GALAD e l'ecografia per la rilevazione dell'HCC mediante analisi di regressione logistica multivariata contenente tutte le variabili nel punteggio GALAD e dell'ecografia epatica.

Poiché GALAD e GALADUS sono costruiti sulla base di test eseguiti sugli stessi individui, l'analisi statistica sulle differenze tra le curve dovrebbe tenere conto della natura correlata dei dati. Pertanto, il confronto degli AUC sarà eseguito utilizzando il test di Delong, che è un test statistico non parametrico che confronta le aree sotto due o più curve ROC (40).

L'analisi statistica sarà effettuata utilizzando SAS 9.4 (SAS Institute, Cary NC) e R versione 3.0.2 (R Foundation, Vienna, Austria).

Innovazioni:

Come auspicabile, se i risultati dimostreranno l'effettivo miglioramento del potere diagnostico e prognostico dell'HCC da parte dei 3 biomarcatori, potremmo offrire uno strumento rapido e valido per migliorare la performance diagnostica dell'HCC in accordo con la "mission" del nostro Istituto.

Bibliografia:

1. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma [published correction appears in J Hepatol. 2019 Apr;70(4):817]. J Hepatol. 2018;69(1):182-236.
2. <https://easl.eu/wp-content/uploads/2021/06/1.-EASL-Open-Letter-on-Liver-Cancer-Care.pdf>3. Demirtas CO, Brunetto MR. Surveillance for hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis: Is it time to personalize it?. World J Gastroenterol. 2021; 27: 5536-5554.

3. European Association For The Study Of The Liver, & European Organisation For Research And Treatment Of Cancer (2012). EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. [published correction appears in J Hepatol. 2012 Jun;56(6):1430]. J Hepatol. 2012;56(4):908-943.
4. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020;18(12):2650-2666.
5. <https://www.registri-tumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2020>.
6. Parikh ND, Singal AG, Hutton DW, Tapper EB. Cost-Effectiveness of Hepatocellular Carcinoma Surveillance: An Assessment of Benefits and Harms. Am J Gastroenterol. 2020;115(10):1642-1649.
7. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. Am J Gastroenterol. 2006;101(3):513-523.
8. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. J Hepatol. 2001;35(3):421-430.
9. Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2010;16(4):418-424.
10. Ikoma J, Kaito M, Ishihara T, Nakagawa N, Kamei A, Fujita N, et al. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-gamma-carboxy prothrombin: a prospective study. Hepatogastroenterology 2002;49:235-238.
11. Ono M, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M. Measurement of immunoreactive prothrombin precursor and vitamin-K-dependent gamma-carboxylation in human Hepatocellular carcinoma tissues: decreased carboxylation of prothrombin precursor as a cause of des-gamma-carboxyprothrombin synthesis. Tumour Biol 1990;11:319-26.
12. H.S. Kim, J.W. Park, J.S. Jang, H.J. Kim, W.G. Shin, K.H. Kim, et al., Prognostic values of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study, J. Clin. Gastroenterol. 43 (2009) 482e488.
13. J.Y. Choi, S.W. Jung, H.Y. Kim, M. Kim, Y. Kim, D.G. Kim, et al., Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP, World J. Gastroenterol.: WJG 19 (2013) 339e346.
14. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. Hepatology 2003;37:1114-21.

Progetto 15/2022: "Effetti del consumo di arance sul metabolismo glucidico e lipidico in soggetti con MAFLD: studio *in vitro* e trial clinico"

Responsabile: dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: Maria Gabriella Caruso, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Tamara Lippolis, Anna Maria Cisternino, Roberta Rinaldi, Raffaele Cozzolongo, Vito Giannuzzi, Palma Aurelia Iacovazzi

Introduzione

La NAFLD è l'acronimo di Non-alcoholic Fatty Liver Disease ed è un termine usato per definire una condizione morbosa causata da un eccessivo accumulo di grasso nel fegato, non derivante dal consumo di alcool. Recentemente nella pratica clinica, è stato introdotto il termine MAFLD per indicare una patologia caratterizzata da una steatosi del parenchima epatico (>5% del tessuto interessato) associata ad alterazioni metaboliche, principalmente diabete di Tipo2 ed obesità (1). Da un punto di vista istologico la MAFLD (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease) si presenta con un moderato grado di infiammazione oppure con una necro- infiammazione associata a rigonfiamento degli epatociti (2). In genere, la prevalenza della MAFLD aumenta con l'età ed è più alta negli uomini o nelle donne in menopausa (2) e viene diagnosticata nel 60% della popolazione con diabete di tipo 2 e nel 80% degli obesi. Pertanto la MAFLD a differenza del termine NAFLD, enfatizza il rischio metabolico e pone l'attenzione sulle alterazioni del metabolismo glucidico (vedi insulino-resistenza) e lipidico (lipotossicità, stress ossidativo, etc.) che si osservano nei soggetti con MAFLD.

Dato l'attuale aumento dell'incidenza delle dislipidemie e di obesità nella popolazione generale, c'è un forte interesse ad individuare fattori dietetici in grado di prevenire l'insorgenza delle patologie metaboliche o quanto meno capaci di ridurre il rischio metabolico. Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che il miglioramento del profilo glucidico e lipidico nei soggetti a rischio può ridurre la mortalità legata alle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e al cancro (3-6).

La dieta si pone, pertanto, come uno strumento di prevenzione efficace nel contrastare le malattie legate al metabolismo, come la MAFLD. In particolare la frutta con il suo alto contenuto di polifenoli ha dimostrato di esercitare un'elevata azione anti-infiammatoria, antitrombotica ed antiproliferativa (7-9). Recentemente, è stato dimostrato *in vitro* su linee cellulari di carcinoma coloretale umano che estratti polifenolici dell'uva da tavola sono in grado di inibire la proliferazione e la crescita cellulare così come influenzare la morfologia della cellula, inibendo la sua capacità di migrazione. Questi dati supportano l'idea che l'uva, in qualità di nutraceutico, possa avere effetti salutistici e prevenire i meccanismi di ossidazione, infiammazione cellulare e di metastatizzazione. Inoltre, un trial clinico su volontari sani (10), ha dimostrato che l'assunzione giornaliera di uva (5g/Kg di peso corporeo) è in grado di down- regolare l'espressione di piccole molecole di RNA non codificanti a singolo filamento, dette miRNAs, metabolicamente associate al "metabolismo del cancro del tratto gastroenterico". Pertanto, la loro inibizione porterebbe a prevenire la trasformazione della cellula in senso neoplastico.

Altri alimenti tipici della Dieta Mediterranea con proprietà nutraceutiche sono gli agrumi ed in particolare le arance, il cui consumo viene incoraggiato per gli effetti benefici sulla sindrome metabolica (11). I polifenoli estratti dalle arance della varietà Tacle hanno dimostrato *in vitro* un'azione inibitoria della sintesi del colesterolo (12). Inoltre, il consumo di succo d'arancia si è dimostrato capace di migliorare il profilo lipidico sierico di soggetti obesi (13), così come l'esperedina, un flavonoide principalmente presente nelle arance è in grado di ridurre l'attività proliferativa di cellule di cancro della mammella MCF-7 (14)

Studi clinici hanno inoltre dimostrato che l'esperedina possiede attività anti-infiammatorie, anti- ipertensive ed anti-diabetiche (15,16).

Alla luce di questi dati, il presente progetto intende studiare sia gli effetti *in vitro* del composto bioattivo delle arance, quale l'esperedina, sia gli effetti del consumo di arance sul profilo lipidico e glucidico di soggetti con MAFLD. Attraverso l'analisi lipidomica si andrà a valutare la composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana delle cellule trattate con esperedina e il profilo lipidomico nel siero dei soggetti arruolati nello studio. Lo studio dei meccanismi molecolari che sottendono gli effetti dei nutraceutici è indispensabile nell'ottica di sviluppare strategie di prevenzione e di intervento sui soggetti con un alto rischio metabolico, come i pazienti con MAFLD.

Obiettivo specifico 1: studiare *in vitro* su cellule epatiche HepG2 gli effetti anti-infiammatori ed anti-proliferativi dell'esperedina, composto bioattivo presente nelle arance. Lo studio "*in vitro*" sulle cellule in coltura consentirà anche di valutare, mediante analisi lipidomica, la possibile variazione del profilo degli acidi grassi della membrana cellulare dopo trattamento con esperedina.

Obiettivo specifico 2: studio della composizione chimica e polifenolica delle arance Navelina, varietà che verrà utilizzata nel trial clinico. La miscela di polifenoli estratti da questa varietà di arance verrà testata *in vitro* su cellule in coltura al fine di valutare gli effetti sulla proliferazione e crescita delle cellule

Obiettivo specifico 3: valutare gli effetti delle arance "Navelina" sulla variazione del profilo lipidomico e sul metabolismo glucidico e lipidico sierico di soggetti con MAFLD.

OBIETTIVO 1:

Le cellule HepG2 saranno trattate con concentrazioni crescenti del composto polifenolico Esperedina (range 100-500 μ M) e si valuteranno la crescita e proliferazione cellulare, nonché l'apoptosi cellulare. Le cellule trattate saranno sottoposte anche ad analisi lipidomica per valutare la composizione degli acidi grassi di membrana. Sulle cellule in coltura si farà anche lo studio dell'espressione di geni e proteine coinvolti nei processi infiammatori e nella proliferazione e crescita cellulare.

OBIETTIVO 2:

Le arance della varietà "Navelina" e il succo derivante dalla loro spremitura verranno caratterizzate da un punto di vista chimico e bromatologico. Inoltre, dal succo di arance "Navelina", verrà estratta una miscela di polifenoli da utilizzare negli esperimenti *in vitro* al fine di caratterizzare le molecole responsabili degli eventuali effetti salutistici delle arance sulla MAFLD.

OBIETTIVO 3:

Verranno reclutati 60 pazienti con MAFLD e assegnati in modo casuale ai due gruppi dello studio (gruppo controllo e gruppo di trattamento). Da ciascun partecipante, a digiuno per almeno 12 ore, verrà prelevato un campione di sangue per le analisi routinarie, per l'analisi lipidomiche e biochimiche (studio degli enzimi deglicanti e dei markers di infiammazione).

Dati Preliminari:

I nutraceutici sono nutrienti o composti bioattivi, spesso di origine vegetale, che vengono assunti regolarmente con la dieta oppure ingeriti attraverso alimenti funzionali/integratori che li contengono. Studi *in vitro* hanno infatti dimostrato che l'idrossitirosolo e l'oleuropeina (17), le due molecole polifenoliche più rappresentative nella composizione dell'olio extravergine d'oliva hanno capacità antiproliferative su cellule di carcinoma coloretale in coltura. Entrambe le molecole sono in grado di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali in maniera significativa, bloccando le cellule nella fase S del loro ciclo cellulare. Gli effetti antiproliferativi dei polifenoli dell'olio d'oliva sono stati anche dimostrati su un modello animale di carcinogenesi colo-rettale (18). Il trattamento dietetico con olio d'oliva e olio di salmone ricco di acidi grassi-omega 3 proteggeva dallo sviluppo dei polipi intestinali in topi APC^{Min+}.

Nel nostro laboratorio sono stati allestiti esperimenti al fine di valutare gli effetti *in vitro* di una miscela di polifenoli estratti da 2 varietà di uva da tavola. Lo studio ha dimostrato la capacità di questi polifenoli dell'uva di inibire la proliferazione e la crescita di cellule di adenocarcinoma coloretale, così come influenzare la morfologia delle stesse cellule, inibendo la loro capacità di migrazione (8). Per traslare i dati ottenuti in vitro, è stato condotto uno studio clinico su soggetti volontari sani che hanno mangiato uva per 21 giorni (10). Il trial clinico ha dimostrato che l'assunzione giornaliera di uva (5g/Kg di peso corporeo) ha effetti antitrombotici ed è in grado di modificare il profilo lipidomico dei soggetti arruolati. L'uva nella dieta, inoltre, ha determinato la down-regolazione dell'espressione sierica dei miRNAs, metabolicamente correlati al "metabolismo del cancro del tratto gastroenterico".

Questi studi di nutrigenomica hanno permesso di identificare alcuni dei meccanismi molecolari che sono alla base degli effetti salutistici dei nutraceutici. In linea con quanto precedentemente dimostrato, lo studio dei componenti bioattivi delle arance e dei loro effetti sulla MAFLD potrebbe aiutare a comprendere in maniera meccanicistica le cause e/o i fattori di rischio delle malattie metaboliche.

Metodologie e analisi statistiche:

Colture cellulari

Le cellule HepG2 saranno coltivate utilizzando un terreno di coltura specifico ed incubate a 37°C e in presenza del 5% di CO₂.

Vitalità cellulare

La citotossicità delle sostanze saggiate negli esperimenti verrà valutata attraverso il test colorimetrico 3-(4,5 dimetiliazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolio bromide (MTT). La soluzione di MTT (5mg/ml) viene aggiunta in ogni piastra ad un volume pari a un decimo del volume della coltura originaria, e incubata per 2 ore a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Alla fine del periodo di incubazione, il medium viene rimosso e i restanti cristalli di blu formazano vengono solubilizzati con isopropanolo acido (0.1N HCl). La conversione dell'MTT in formazano da parte delle cellule metabolicamente attive viene misurata spettrofotometricamente ad una densità ottica di 570 nm.

Trattamento delle cellule

Le cellule in coltura verranno trattate con concentrazioni crescenti di esperidina e di una miscela di polifenoli estratti dalle arance Naveline. Dopo 24 ore e 48 ore di trattamento, le cellule verranno pellettate per le analisi di espressione genica e proteica, nonché per valutare il profilo lipidomico di membrana.

Caratterizzazione chimica

La caratterizzazione chimica verrà effettuata sia sulle arance che sul succo dopo spremitura. L'analisi verrà effettuata in sistema "service" presso un Laboratorio di Analisi Chimiche Industriali.

Preparazione degli estratti di polifenoli dalle arance

Il succo delle arance Naveline sarà sottoposto ad estrazione con solventi organici per preparare gli estratti polifenolici. In particolare, 1 ml di succo viene centrifugato e il pellet verrà estratto con dimetilsolfossido, sonicato e nuovamente centrifugato. La miscela di polifenoli sarà filtrata ed utilizzata per gli esperimenti *in vitro*.

Espressione genica e proteica

L'espressione genica e proteica verranno effettuati sia sulle cellule in coltura che su sangue intero dei soggetti arruolati nello studio. Saranno valutati i livelli di mRNA e proteine delle principali proteine coinvolte nei processi di proliferazione ed apoptosi, usando rispettivamente la PCR quantitativa (qPCR) con SYBR green e l'analisi di Western Blotting.

L'RNA totale cellulare viene estratto usando il Tri-Reagent (Mol. Res. Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA). L'RNA totale estratto sarà retrotrascritto. La trascrizione inversa (RT) viene effettuata in 20 µl di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNASynthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). La real-time PCR viene effettuata in 25 µl di volume finale contenente 2 µl di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green SupermixBio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisenso di ogni gene. Il gene della β-actina verrà utilizzato come controllo interno e come gene di riferimento in quanto housekeeping.

Per quanto riguarda l'analisi di Western Blotting, le cellule saranno raccolte e lisate in ghiaccio in RIPA buffer (Pierce Ripa buffer, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Dopo l'omogenizzazione e la centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C, la concentrazione delle proteine viene misurata tramite dosaggio Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia). Aliquote di 50 µg di proteine totali sono separate in un 4- 12% pre-cast gel di poliacrilammide (Invitrogen, Life Technologies, OR, USA) e trasferite su una membrana PVDF (Bio-Rad, Milano, Italia) mediante il Transblot Turbo (Bio-Rad, Milano, Italia).

L'espressione di tutte le proteine da testare sarà valutata con anticorpi specifici e la loro rilevazione sarà effettuata mediante chemiluminescenza (ECL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA) e mediante il Molecular Imager Chemidoc (Bio-Rad, Milano, Italia).

Trial clinico

Lo studio sarà uno studio randomizzato e controllato: 60 soggetti consecutivi saranno arruolati dall'Ambulatorio di Nutrizione del nostro Istituto e assegnati in modo casuale ai due gruppi dello studio (gruppo controllo e gruppo di trattamento). I criteri di inclusione includono età > 30 anni e <65 anni e con MAFLD che sarà diagnosticata sulla base di parametri clinici, esami ecografici e Fibroscan. I criteri di esclusione includono: malattie oncologiche; gravi

condizioni mediche che possono compromettere la partecipazione al trial; persone che seguono una dieta speciale o incapaci a seguire una dieta per motivi religiosi o di altro genere.

Lo studio inizierà dopo l'approvazione da parte del Comitato Etico del nostro Istituto e tutti i soggetti daranno il loro consenso informato a partecipare. Da ciascun partecipante, a digiuno da almeno 12 ore, verrà prelevato un campione di sangue mediante puntura venosa e raccolto in provette contenenti anticoagulante (K-EDTA). Campioni di sangue intero o siero saranno inviati al laboratorio centrale per analisi di routine, altre aliquote saranno utilizzate per analisi lipidomiche e biochimiche. I prelievi ematici e la raccolta delle caratteristiche antropometriche di tutti i soggetti saranno effettuati al momento dell'arruolamento (T0) e dopo 4 settimane (T1), per entrambi i gruppi dello studio.

Analisi lipidomica

L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane delle cellule in coltura e nel siero dei soggetti reclutati. Gli acidi grassi, estratti mediante il Fatty Acid Extraction Kit della Sigma Aldrich, saranno derivatizzati e analizzati con un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici ottenuti saranno individuati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

Valutazione dello stato antiossidante, infiammatorio e degli enzimi deglicanti

Lo studio del sistema redox, dell'infiammazione e dei livelli sierici degli enzimi deglicanti, quali la Fruttosamina 3-Kinase e la glioxalase, sarà effettuato mediante Kit ELISA

Analisi statistica

I dati saranno presentati come media (SD), salvo diversa indicazione. Le variabili categoriche saranno confrontate con il test di X^2 . I valori di $P < 0.05$ a due code saranno considerati statisticamente significativi. Il metodo Generalized Estimating Equation (GEE) verrà utilizzato per confrontare i dati alla fine del periodo di intervento rispetto al baseline e sarà effettuato considerando solo coloro che hanno completato lo studio. Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software STATA 13.

Calcolo della potenza dello studio

Per pianificare la dimensione del campione, il calcolo di potenza si basa sulla capacità di rilevare una variazione dei lipidi circolanti di almeno 10 punti tra i due gruppi dello studio. Prevedendo l'80% di potenza e un $\alpha = 0.05$ si calcola che dovranno essere reclutati almeno 16 pazienti per ciascun gruppo che abbiano completato lo studio.

Risultati Attesi:

- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari che sono alla base dell'azione dei polifenoli e dei nutraceutici sul metabolismo glucidico e lipidico.
- Individuazione di profili lipidomici utili per elaborare possibili interventi dietetici mirati.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

Innovazioni:

I risultati attesi dallo studio potrebbero essere rilevanti per la salute umana e fornire la base scientifica per attuare misure pubbliche di prevenzione per la MAFLD. Inoltre, l'identificazione dei meccanismi molecolari che sostengono l'azione dei nutraceutici possono portare alla formulazione di protocolli dietetici personalizzati.

Bibliografia:

1. Park H et al. Journal Clin Med 2021;10:4625
2. Ciardullo S et al. Liver Inter 2021;41:1290-1293
3. Hashemi MS et al. Compl Med Res 2021;28:226-233
4. Richard N. Can Fam Phys 2008;54:1529-1533
5. Klupp NL et al. Sci Rep 2016;6:29540
6. Forester SC et al. Mol Nutr Food Res 2011;55:844-854
7. Gigante I et al. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2020;20(10):1740-1750

8. Tutino V et al. *Molecules*. 2020 Jul 23;25(15):3352
9. Ammollo CT et al. *J Nutr Biochem* 2017;50:66-73.
10. Tutino V et al. *Molecular Nutrition & Food Research* 2021, Sep 8;e2100428
11. Simpson EJ et al. *Food Function* 2016;7:1884
12. Grande F et al. *Molecules* 2021;26:5718
13. Yoshitomi R et al. *Scientific Reports* 2021;11:19067
14. Hsu P-H et al. *Life* 2021;11:950
15. Akiyama S et al. *J Clin Biochem Nutr* 2009;46:87-92
16. Yang HL et al. *J Agric Food Chem* 2012;60:522-532
17. Notarnicola M et al. *Genes & Nutrition* 2011;6(1): 63–69
18. Barone M, Notarnicola M et al. *Carcinogenesis*. 2014 Jul;35(7):1613-9.

Timeline (Gantt chart)

Attività	I anno												II anno												III anno											
Studi <i>in vitro</i>	█												█																							
Caratterizzazione chimica delle arance "Navelina" e preparazione della miscela polifenolica	█												█																							
Arruolamento soggetti ed attivazione del TRIAL													█																							
Analisi Lipidomica	█												█																							
Analisi dell'espressione genica e proteica	█												█																							
Analisi biochimiche ed enzimatiche													█																							
Analisi dei dati	█												█												█											
Preparazione lavori scientifici													█												█											

LINEA 3

MEDICINA PARTECIPATIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 3 “Medicina Partecipativa in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell’anno 2022 sono i seguenti:

Progetto 16/2021: “Valutazione di approcci alternativi per il miglioramento del profilo sintomatologico e la qualità della vita in pazienti con Sindrome dell’Intestino Irritabile (Irritable Bowel Syndrome - IBS)”

Responsabile: dott. Francesco Russo

Partecipanti: Giuseppe Riezzo, Michele Linsalata, Antonella Orlando, Laura Prospero, Benedetta D’Attoma, Antonia Ignazzi, Maria Notarnicola, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Alberto Osella, Isabella Franco, Antonella Bianco, Angelo Campanella, Ritanna Curci, Antonella Mirizzi, Catia Bonfiglio, Paolo Sorino, Guglielmina Chimienti, Linda Monaci

Introduzione

La terapia della sindrome del colon irritabile (irritable bowel syndrome - IBS) è tuttora prevalentemente di carattere sintomatico e non potrebbe essere altrimenti, dato che ancora non sono del tutto conosciute le cause scatenanti. Se la terapia è sintomatica, gli obiettivi terapeutici saranno, principalmente, la riduzione della sintomatologia e il miglioramento della qualità di vita dei pazienti. Sulla scelta dei trattamenti adottati incide molto la gravità della condizione. Infatti, nei casi clinici meno gravi, i medici ritengono siano sufficienti: il ricorso a un'efficace terapia antistress, la pratica costante di esercizio fisico, un riposo notturno appropriato e l'adozione di un piano dietetico, che escluda tutti quei cibi sospettati di causare la comparsa dei sintomi tipici del colon irritabile. Nei casi clinici moderati-gravi, invece, diventa indispensabile l'aggiunta ai suddetti rimedi, di una terapia farmacologica ad hoc e, talvolta, di supporto psicoterapeutico [1].

Negli ultimi anni il nostro gruppo di studio si è concentrato sull’approccio dietetico che rappresenta sicuramente quello con maggiore compliance da parte del paziente. L’utilizzo infatti di integratori probiotici e prebiotici non può che prevedere una assunzione limitata nel tempo, solitamente quello necessario affinché la dieta specifica faccia effetto. Una dimostrazione della bontà di tale approccio è stata fornita da un nostro recente studio sugli effetti di una dieta low-FODMAPs (Frutto-Oligosaccaridi, Disaccaridi, Monosaccaridi e Polioli) nella gestione clinica del paziente con IBS variante diarrea (IBS-D) [2].

Al di là della dieta a basso contenuto in FODMAPs, si ritiene che altri approcci dietetici possano essere efficaci, e tra questi sembra dare dei buoni risultati l’impiego di grani alternativi [3]. Il Tritordeum è un grano monococcico caratterizzato dalla bassa immunogenicità della gliadina in esso contenuta. Quindi può trovare una logica collocazione ed impiego in pazienti con IBS caratterizzati da intolleranze al grano [4]. Questi pazienti lamentano soprattutto gonfiore addominale e traggono vantaggio dall’eliminazione del grano, proprio a causa sia del contenuto di glutine sia di fruttani.

Un altro approccio al trattamento dell’IBS può essere rappresentato dal movimento fisico, allo scopo di migliorare la funzionalità del colon agendo, questa volta non a livello del lume intestinale, ma dall’“esterno”, sempre con l’obiettivo di migliorare la funzionalità del grosso intestino. È stato dimostrato che l’attività fisica regolare comporta un netto miglioramento della sintomatologia IBS. Infatti, la mancata attività fisica impedisce una stimolazione adeguata della muscolatura intestinale. La sedentarietà è un fattore determinante che porta, ad esempio, a un indebolimento, a una scarsa funzionalità del diaframma e dei muscoli addominali. Questi muscoli, se allenati, contribuiscono a un miglioramento dei valori pressori con miglioramento della defecazione. Fare quotidianamente esercizio fisico, oltre alla prevenzione delle malattie cardiovascolari, può dare grossi benefici al tratto gastrointestinale (GI), contrastando disturbi comuni come il reflusso gastrico e la sindrome del colon irritabile. È stato dimostrato infatti che il movimento favorisce e/o regolarizza la motilità gastro-intestinale (peristalsi) e il transito intestinale [5].

Stato di Avanzamento del progetto:

I pazienti con IBS-D possono essere intolleranti all'assunzione di prodotti a base di grano. Pertanto sarebbe utile poter disporre di prodotti alternativi che per le loro caratteristiche siano più facilmente digeribili. Il Triticordeum è un cereale ottenuto dalla ibridizzazione di grano e orzo e può sostituire il grano nella preparazione di diversi prodotti (pasta, pane, taralli e biscotti). Nello specifico può essere utile nella dieta dei pazienti IBS-D grazie al suo peculiare contenuto di fruttani e gliadina.

I dati di un progetto di ricerca recentemente concluso hanno permesso di realizzare lo studio pilota relativo agli effetti di alimenti a base di Triticordeum, ed hanno fatto da traino per la elaborazione del progetto attuale. I risultati dello studio pilota sono stati oggetto di una pubblicazione inviata ad una rivista internazionale. Sono evidenti il miglioramento della sintomatologia, del quadro psicologico e della qualità della vita (QoL) nonché il miglioramento del profilo immunologico e la permeabilità intestinale, in un assetto dietetico con una maggiore compliance rispetto a quello a basso contenuto di FODMAPs.

Una regolare attività fisica porta ad un netto miglioramento della motilità gastrointestinale (peristalsi) e del transito intestinale, nonché migliora il profilo psicologico e lo stato di benessere complessivo del soggetto. È quindi necessario comprendere l'efficacia di questo approccio "esterno" ma sicuramente in grado di migliorare i sintomi dell'IBS e la qualità della vita dei pazienti.

Siamo in attesa di approvazione da parte del comitato etico (attualmente parere sospensivo con integrazione del piano di analisi statistica) pertanto l'attività si è concentrata sulla identificazione di pazienti eleggibili per il progetto. Per la parte relativa all'effetto della dieta, abbiamo contattato pazienti con IBS-D per identificare i pazienti eleggibili per partecipare al progetto. Hanno espresso la volontà di partecipare al progetto 22 pazienti con IBS-D, afferenti all'ambulatorio di Celiachia e disturbi funzionali.

Per quanto riguarda lo studio degli effetti dell'attività fisica sul profilo sintomatologico dei pazienti IBS-D abbiamo contattato i componenti del "Gruppo del cammino". Il "Gruppo del cammino" si inserisce in una nuova linea di ricerca del nostro Istituto ed è costituito da gruppi di persone che con cadenza regolare, almeno 2 o 3 volte al mese, camminano insieme lungo un percorso urbano/ extraurbano prestabilito al fine di promuovere concretamente l'attività fisica e migliorare così la propria salute. Tale iniziativa si avvale della collaborazione dell'Atletica Castellana Freedogs ed è patrocinata dal Ministero della Salute. Abbiamo effettuato la profilazione di 60 soggetti, solo 10 pazienti presentano una sintomatologia riferibile a colopatia funzionale.

Il Progetto, denominato per brevità "AF_IBS", è iniziato a Giugno 2021 con il reclutamento di n°57 soggetti. Si Non hanno aderito e/o non hanno terminato il Progetto n°13 soggetti.

Al momento della redazione della presente, i soggetti arruolati in totale sono n° 44: n° 24 femmine e n° 24 maschi. L'età dei soggetti reclutati è: <40 anni n° 2 , 41-49 anni n° 11 soggetti, 50-59 anni n° 25 soggetti e >59 anni n° 6 soggetti.

Il 1° arruolamento è terminato ad Agosto 2021 ed hanno concluso le attività previste nel progetto in n° 28 soggetti.

Il 2° arruolamento è iniziato a Settembre 2021 e si concluderà a Novembre 2021. Sono stati arruolati ad oggi n° 16 soggetti

Progetto Attività Fisica e IBS

Partecipanti

- Reclutati: tot. n° 57 Non Hanno aderito/Ritirati: n° 13 **Arruolati: n° 44**
- Uomini: tot. n° 24
- Donne: tot n° 24
- Età:
 - <40 n° 2
 - 41-49 n° 11
 - 50-59 n° 25
 - >59 n° 6

Protocollo Attività Fisica

L'attività fisica prevista per il progetto AF_IBS è di tipo aerobica, una camminata di circa 60' per tre 3 giorni a settimana di intensità moderata (60/65% FCmax).

Ai soggetti arruolati al T_0 è stato somministrato il questionario sull'attività fisica IPAQ (short form).

Questionario sull'attività fisica quotidiana (IPAQ)

ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE

- Questo questionario misura il tipo e la quantità di attività fisica che lei fa normalmente. Le domande si riferiscono all'attività svolta negli ultimi 7 giorni **al lavoro, per spostarsi** da un posto all'altro e **nel tempo libero**.

-Per attività fisica **MODERATA** si intende un'attività che richiede uno sforzo fisico moderato e che la costringe a **respirare con un ritmo solo moderatamente più elevato del normale** (durante tale attività non riuscirebbe a cantare ma le sarebbe ancora possibile parlare).

-Per attività fisica **INTENSA** si intende un'attività che richiede uno sforzo fisico elevato e che la **costringe a respirare con un ritmo molto elevato del normale** (durante tale attività si suda e non si riesce a parlare).

-Nel rispondere alle domande, tenga conto solo di quelle attività che l'hanno impegnata per **almeno 10 minuti** consecutivi.

Attività intense

1a Negli ultimi 7 giorni, per quante volte ha compiuto attività fisiche **INTENSE**, come ad esempio sollevamento pesi, lavori pesanti in giardino, attività aerobiche come corse o giri in bicicletta a velocità sostenuta?

_____giorni a settimana

Nemmeno uno → _____(vada alla domanda **2a**)

1b Quanto tempo in totale, normalmente, lei ha trascorso compiendo attività fisiche **INTENSE** in **uno** di questi giorni?

_____minuti

Attività moderate

2a Negli ultimi 7 giorni, per quante volte ha compiuto attività fisiche **MODERATE**, come ad esempio trasporto di pesi leggeri, giri in bicicletta ad una velocità regolare, attività in palestra, lavoro in giardino, lavoro fisico prolungato in casa...? **Non consideri le camminate**

_____giorni a settimana

Nemmeno uno → (vada alla domanda **3a**)

2b Quanto tempo in totale, normalmente, lei ha trascorso compiendo attività fisiche **MODERATE** in **uno** di questi giorni?

_____minuti

Cammino

3a Negli ultimi 7 giorni, per quanti giorni ha camminato per **almeno 10 minuti**?

(Consideri le camminate compiute per lavoro e a casa, quelle per spostarsi da un posto ad un altro ed ogni altra camminata che le è capitato di fare per piacere, esercizio o sport)

_____giorni a settimana

Nemmeno uno → (vada alla domanda 4a)

3b Quanto tempo in totale, normalmente, lei ha camminato in **uno** di questi giorni?

_____ minuti

3c A che passo ha camminato prevalentemente?

passo **INTENSO**, che l'ha fatta respirare ad un ritmo molto più elevato del normale

passo **MODERATO**, che l'ha fatta respirare ad un ritmo solo moderatamente più elevato del normale

passo **LENTO**, senza alcun cambiamento sul suo ritmo di respiro

Attività da seduto

4a Negli ultimi 7 giorni, quanto tempo in totale lei ha trascorso rimanendo seduto, durante **un** **giorno** lavorativo?

(includiva attività svolte al lavoro, a casa, mentre si recava al lavoro e durante il tempo libero: es. ad una scrivania, a tavola, mentre stava visitando degli amici, alla TV, leggendo)

_____ minuti

4b Negli ultimi 7 giorni, quanto tempo in totale lei ha trascorso rimanendo seduto, durante **un** **giorno** del fine settimana?

_____ minuti

Interpretazione del questionario

Met attività intense = minuti * giorni * 8 Met	
Met attività moderate = minuti * giorni * 4 Met	
Met attività cammino = minuti * giorni * 3 se moderato, * 3,3 se intenso, * 2,5 se lento	
Totale Met = Met att intense + Met att moderate + Met cammino=	

Se il totale è meno di 700 Met	Sei INATTIVO
Se il totale è tra 700 e 2519 Met	Sei SUFFICIENTEMENTE ATTIVO
Se il totale è più di 2520 Met	Sei ATTIVO o MOLTO ATTIVO

La **valutazione funzionale** è stata eseguita attraverso l'effettuazione di 3 test da campo:

1. **walking test** (Test cardio-respiratorio)
2. **Sit and Reach Test** (Test della flessibilità)
3. **HandGrip Test** (Test della forza)

I test sono stati effettuati in T₀ e in T₁ e i risultati sono stati soddisfacenti ed in linea con le nostre aspettative in quanto in tutti i soggetti lo stato di forma fisica è notevolmente migliorato.

I soggetti arruolati hanno compilato un diario quotidiano per i tre mesi di progetto

DIARIO QUOTIDIANO DELL'ATTIVITA' FISICA

Istruzioni per la compilazione

Questo diario misura il tipo e la quantità di attività fisica che Lei esegue giornalmente. Ogni giorno (la sera prima di andare a dormire) vanno inseriti i seguenti parametri:

1. **n° di passi totali** effettuati durante la giornata
2. **tipo di attività** effettuato durante la giornata (p.e. camminata, bicicletta, ballo, giardinaggio etc.)
3. **tempo di attività** effettuato durante la giornata (p.e. 45' camminata)
4. inserire la **lettera E** il giorno dell'**allenamento** del Progetto (p.e. 60' camminata A)

Cod. _____ Cognome _____ Età _____

ESEMPIO DI COMPILAZIONE

GIUGNO 2021									
	Martedì 1	Mercoledì 2	Giovedì 3	Venerdì 4	Sabato 5	Lunedì 7			
P	7.000	3500	7000	6000	7000	2500			
A	Camminata	Camminata	Camminata		Camminata				
T	60'	30'	60'		60'				
E	E		E		E				

P= N° Passi Giornalieri A= Tipo di Attività T= Durata Attività E= Allenamento con il Gruppo di Cammino

FCmax = _____ % FCmax = 60/75% Bpm = _____ / _____

Protocollo Antropometria e BIA

Abbiamo rilevato, nei soggetti partecipanti le misurazioni antropometriche comunemente utilizzate per la valutazione nutrizionale (peso, altezza, BMI, circonferenze: waist, Hip, braccio, polso, polpaccio) (TAB.1):

TAB. 1

Codice soggetto	data rilevazione	tempo	altezza	peso	<u>waist</u>	fianchi	braccio	polpaccio	polso	collo
4444	30/04/2021	0	162	89,3	93,7	117	34,2	42,7	18	37

Abbiamo inoltre effettuato l'esame bioimpedenziometrico per la valutazione della composizione corporea di ciascun soggetto. Con l'elaborazione dei dati misurati dallo strumento nel software(Bodygram Plus) abbiamo ricavato le stime dei vari compartimenti (TAB. 2)

TAB. 2

Codice	<u>Rz</u>	<u>Xc</u>	FFM	TBW	ECW	BCM	FM	PA	FM <u>DCT</u>	FFM <u>DCT</u>	TBW <u>DCT</u>	ECW <u>DCT</u>	ICW <u>DCT</u>	MM	BMI	BCMI
4444	482,8	50,9	53	38,9	17,8	28,5	40,1	6	43,1	56,9	41,8	45,6	54,4	22,8	36,1	11

Abbiamo inoltre somministrato il questionario relativo alle abitudini del sonno a tutti i soggetti. Il questionario utilizzato è il Reduced Morningness-Eveningness Questionnaire (RMEQ, Natale,1999)

2. Reduced Morningness-Eveningness Questionare (rMEQ Natale 1999)

- 1) Considerando solo i suoi ritmi personali, a che ora si alzerebbe la mattina se fosse completamente libero/a di organizzare la sua giornata?
- Prima dalle 06.30 5punti
 Tra le 06.30 e le 07.45 4punti
 Tra le 07.45 e le 09.45 3punti
 Tra le 09.45 e le 10.45 2punti
 Dopo le 10.45 1punto
- 2) Quanto si sente stanco/a durante la prima mezz'ora dopo il risveglio al mattino?
- Molto stanco 1punto
 Abbastanza stanco 2punti
 Abbastanza riposato/a 3punti
 Molto riposato/a 4punti
- 3) A che ora la sera si sente stanco/a e di conseguenza ha bisogno di andare a dormire?
- Prima delle 21 5punti
 Tra le 21.00 e le 22.15 4punti
 Tra le 22.15 e le 00.30 3punti
 Tra le 00.30 e le 02.15 2punti
 Oltre le 02.15 1punto
- 4) A che ora del giorno pensa di raggiungere la massima forma?
- Tra le 04.00 e le 08.00 5punti
 Tra le 08.00 e le 10.00 4punti
 Tra le 10.00 e le 16.00 3punti
 Tra le 16.00 e le 20.00 2punti
 Dopo le 20.00 1punto
- 5) Si sente parlare di due tipi di persone, uno che è più attivo al mattino e l'altro che è più attivo la sera. Quale di questi tipi si considera?
- Decisamente più attivo al mattino 4punti
 Un po' più attivo/a la mattina rispetto la sera 3punti
 Un po' più attivo/a la sera rispetto alla mattina 2punti
 Decisamente più attivo/a la sera 1punto

Fare la somma dei punti ottenuti ad ogni domanda. **Somma:**

Interpretazione risultati:		
punti 18-25: Mattutino	punti 12-17: Intermedio	punti 5-11: Serotino

Pubblicazioni

Bianco A, Franco I, Osella AR, Giannelli G, Riezzo G, Bonfiglio C, Prospero L, Sorino P, Russo F. Physical Activity Reduction and the Worsening of Gastrointestinal Health Status during the Second COVID-19 Home Confinement in Southern Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Sep 10;18(18):9554. doi: 10.3390/ijerph18189554. PMID: 34574477; PMCID: PMC8464817.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Condurre un trial controllato randomizzato in pazienti ambulatoriali affetti da IBS per confrontare l'effetto di differenti approcci (dieta, consigli dietetici o attività fisica) sui sintomi GI.

Obiettivo specifico 2: E' noto che i pazienti IBS possano presentare alterazioni della barriera intestinale, pertanto, è importante valutare, mediante l'impiego di test non invasivi, la funzionalità e l'integrità dell'epitelio lungo tutto il tratto GI, prima e dopo i vari trattamenti. Oggetto di studio sarà anche l'associazione tra alterazioni della permeabilità intestinale (PI) e livelli circolanti di zonulina e markers di danno epiteliale cellulare [fatty-acid binding protein (I-FABP), claudina-3, diamine oxidase (DAO)]. Infine, si considereranno anche eventuali differenze concernenti la popolazione microbica intestinale (tramite dosaggio urinario di indolo, scatolo, e D-lattato) in relazione alla PI.

Obiettivo specifico 3: Dosare i livelli ematici di somatostatina, motilina, serotonina, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prima e dopo i diversi trattamenti al fine di valutare le eventuali influenze dei differenti approcci sulla secrezione di questi peptidi e la loro correlazione con la sintomatologia IBS.

Obiettivo specifico 4: Valutare gli outcomes dei suddetti approcci anche attraverso lo studio di profili metabolici, mediante analisi lipidomica, individuati al fine di comprendere quali deficit, carenze o componenti nutrizionali possono essere associate alla sindrome IBS. I risultati dello studio potrebbero essere utili a individuare strategie di intervento per riequilibrare i cambiamenti metabolici osservati.

Dati preliminari:

Il progetto di ricerca si basa sulle conoscenze finora acquisite dalle figure professionali dell'istituto, coinvolte in un gruppo di studio multidisciplinare con un notevole know-how nel campo di diagnosi, terapia e di conoscenze dei meccanismi fisiopatologici di quei quadri nosologici caratterizzati da alterazioni della funzionalità di barriera intestinale (nello specifico la malattia celiaca e, più in generale, i disturbi glutine-correlati) nonché nelle patologie funzionali GI quali l'IBS. Tutte queste patologie, a vario titolo, sono caratterizzate da modificazioni della PI e per le stesse un approccio dietetico nonché fisico possono rappresentare una valida strategia. Tali aspetti sono stati già affrontati in parte in precedenti progetti di ricerca, dando vita a pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con I.F.

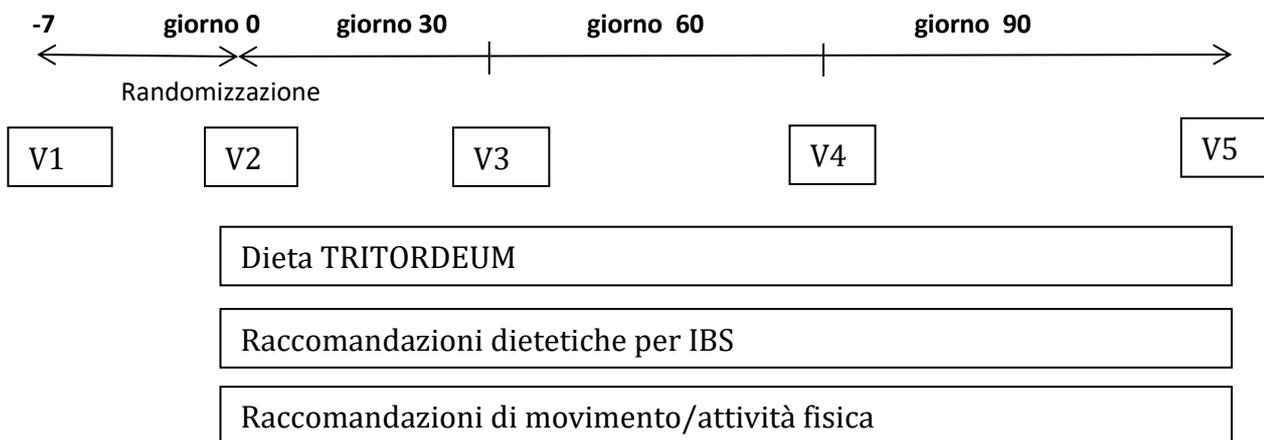
Metodologie e analisi statistiche:

Reclutamento Pazienti: Per questo studio randomizzato, controllato, singolo cieco, si recluteranno pazienti adulti (18-65 anni) afferenti all'“Ambulatorio di Celiachia e disturbi funzionali” che soddisfino i criteri di Roma III-IV per IBS-D.

I criteri di esclusione saranno: la presenza di gravi patologie cardiache, epatiche, neurologiche o psichiatriche o di malattie GI diverse da IBS (ad esempio, malattia infiammatoria intestinale, malattia celiaca) che potrebbero spiegare i sintomi attuali. Inoltre, saranno esclusi quei pazienti che hanno precedentemente seguito una dieta a basso contenuto di particolari sostanze (ad esempio, basso contenuto di FODMAPs, dieta vegana, dieta priva di glutine). Questa ultima categoria di soggetti potrà rientrare nello studio a patto di sospendere la dieta priva di glutine fino alla ricomparsa dei sintomi.

La dieta a ridotto contenuto di lattosio è consentita, purché i pazienti accettino di mantenere costante questa assunzione durante il periodo di studio. I pazienti devono anche essere disposti a modificare la loro dieta attuale per partecipare alla ricerca. L'uso di prodotti probiotici è consentito, e i pazienti che consumano prodotti probiotici devono essere istruiti a continuare ad assumere per tutto il periodo di studio la stessa quantità precedentemente assunta.

I farmaci utilizzati per il trattamento dell'IBS, compresi gli antidepressivi, NON saranno ammessi; nel caso, vanno sospesi 15 giorni prima di entrare nello studio. Tutti i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte specifiche per lo studio prima di dare il loro consenso scritto. Il reclutamento dei pazienti sarà articolato nelle seguenti fasi:



V1. (Screening). Durante la visita, i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte sullo studio e sottoscriveranno il loro consenso informato. I pazienti saranno inoltre informati sull'obiettivo dello studio che è quello di confrontare diversi approcci terapeutici con potenziali benefici per la loro condizione. Tali benefici saranno valutati sulla scorta di un miglioramento dei sintomi dell'IBS. Inoltre, i pazienti saranno informati sul fatto che sinora nessun specifico trattamento si è dimostrato in grado di curare definitivamente l'IBS o di controllare completamente tutti i sintomi. Durante i successivi 7 giorni, i partecipanti completeranno un diario quotidiano sulle caratteristiche delle feci basato sulla scala di Bristol e sulla valutazione delle abitudini intestinali, nonché un diario alimentare.

V2. (Giorno 0). Randomizzazione. Sette giorni dopo la visita di screening, i pazienti torneranno per la visita ambulatoriale. In tale occasione i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS Symptom Severity Scale - IBS-SSS e Gastrointestinal Symptom Rating Scale – GSRS) (vedi allegati).

Per entrare nella fase di randomizzazione sarà necessario che lo score IBS-SSS sia maggiore o uguale a 175 (ovverosia, i sintomi IBS dovranno risultare da moderati a gravi). I criteri di inclusione e di esclusione saranno nuovamente esaminati, incluse le abitudini alimentari. Se i pazienti saranno ritenuti idonei alla randomizzazione, uno specifico programma provvederà all'assegnazione a uno dei bracci dello studio. Nel corso della visita, i pazienti completeranno anche i questionari relativi alla qualità della vita (Quality of Life - QoL) (IBS QoL e i questionari SCL-90 e SF-36) (vedi paragrafo) e riceveranno 4 dispense, una per ogni settimana d'intervento, contenenti i questionari e i diari che i pazienti dovranno completare durante lo studio (Diario sintomatologico, diario alimentare e Bristol Stool Form da compilare ogni giorno - vedi allegato, nonché l'IBS-SSS da compilare ogni 15 giorni).

In occasione di tale visita, sarà eseguito un prelievo ematico e prelievo dei campioni biologici (urine, feci) necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio.

I differenti approcci Dieta/Attività fisica saranno somministrati random e avranno lo scopo di alleviare i sintomi relativi all'IBS.

I pazienti saranno istruiti, con il supporto di personale specializzato in nutrizione ed attività motoria, ad assumere una dieta a base di TRITORDEUM (**approccio A**), oppure una specifica dieta per IBS (consigli dietetici) (**approccio B**) o a partecipare ad uno specifico schema di attività fisica (**approccio C**) nonché a seguire tali regimi durante le successive 12 settimane (controlli nutrizionali intermedi ogni 4 settimane per le diete; controllo dopo 12 settimane per il braccio con attività fisica) prima di tornare alla visita finale prevista dallo studio.

Il paziente sarà sottoposto a un colloquio atto a valutare lo stile di vita, le abitudini alimentari, le condizioni fisiologiche e, eventualmente, quelle patologiche. Sarà, inoltre, effettuata una valutazione antropometrica (peso, altezza, circonferenze) nonché un'analisi bio-impedenziometrica con successiva consegna del diario alimentare, da compilare e consegnare ad ogni visita di controllo, insieme a tutto il materiale informativo necessario alla corretta adesione allo studio.

V3. (giorno 30): Visita intermedia (per pazienti approccio A e B). Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IBS diet adherence Report Scale – IDARS) (vedi allegato). L'adesione alla dieta sarà, inoltre, oggetto dell'incontro con il nutrizionista che effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento.

V4. (giorno 60): Come V3.

V5 (giorno 90): Visita di fine trattamento. Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IDARS). Inoltre, saranno somministrati i questionari relativi alla qualità della vita (QoL) (IBSQoL, SCL-90 e SF-36 – vedi paragrafo). Si effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e un'analisi bioimpedenziometrica, e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento. Saranno, infine, eseguiti prelievi ematici e dei campioni biologici necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio.

Approccio A. La dieta TRITORDEUM è una dieta in cui i prodotti a base di grano sono sostituiti da prodotti a base di Tritordeum. I pazienti che saranno randomizzati in questo braccio di intervento avranno una fornitura di prodotti a base di TRITORDEUM tale da garantire la dieta per 90 gg. Nello specifico, i pazienti saranno istruiti ad evitare altri cereali come il frumento, la segale, l'orzo, ecc. Sono consentite le fibre, ma distribuite uniformemente durante il giorno.

Approccio B. La dieta specifica per IBS implica una maggiore attenzione su come e quando mangiare, piuttosto che su quali alimenti assumere. La dieta è basata sulle raccomandazioni alimentari dell'AIGO. In particolare, i partecipanti saranno istruiti a: mangiare regolarmente 3 pasti e 3 spuntini al giorno, mai troppo o troppo poco ogni volta, non avere mai fame o sentirsi troppo pieni; mangiare con calma e in silenzio e masticare accuratamente; ridurre l'assunzione di alimenti grassi o piccanti, caffè, alcool, cipolle, cavoli e fagioli. Evitare bevande analcoliche e bevande gassate, gomme da masticare e dolcificanti. Sono consentite le fibre, ma distribuite uniformemente durante il giorno.

Approccio C. L'attività fisica sarà organizzata in "Gruppi di Cammino" e utilizzerà il Fitwalking come strumento di intervento relativo all'attività fisica [6]. Il Fitwalking è una modalità di cammino con determinati accorgimenti tecnici che permettono di camminare correttamente, per poi procedere più efficacemente, anche più velocemente, in modo tale da poter produrre effetti metabolici e di miglioramento dell'efficienza fisica. Il Fitwalking è un'attività aerobica di intensità moderata in cui il carico di lavoro produce adattamenti progressivi e permette nel tempo un miglioramento del recupero e l'incremento del carico stesso. L'intensità del lavoro, attraverso la metodologia di allenamento, assume molta importanza perché solo attraverso un graduale adattamento agli stimoli allenanti, i miglioramenti saranno duraturi. Anche il Fitwalking, come tutti i gesti motorio-sportivi, ha bisogno di allenare, seppur con intensità e tempi diversi: la resistenza, la forza, la velocità, la flessibilità e la coordinazione. I carichi di lavoro e l'intensità devono essere equilibrati e inseriti in progressione in modo da permettere l'adattamento fisico. Il Fitwalking, offre una vasta gamma di benefici fisici e mentali, come dimostrato da numerosi studi scientifici [7]:

- Riduce lo stress, migliora l'umore, migliora l'autostima, migliora la qualità del sonno;
- Ottimizza la funzionalità cardio-vascolare, polmonare e la pressione sanguigna;
- Mantiene efficienti ossa e muscoli;
- Riduce i fattori di rischio per infarto, ictus e osteoporosi e alcuni tipi di displasie;
- Previene e cura il diabete di tipo II;
- Aiuta a controllare il peso e ridurre il sovrappeso;
- Aumenta l'aspettativa di vita.

Protocollo Intervento approccio C

Frequenza. L'attività fisica (camminata) sarà effettuata all'aperto, con un percorso urbano per 3 volte a settimana, in giorni non consecutivi, per 12 settimane.

Intensità. L'intensità dell'attività fisica (50/75% della Fc max) sarà monitorata attraverso l'uso del cardiofrequenzimetro e sarà personalizzata attraverso la formula di Tanaka [8]. Inoltre, per misurare il ritmo useremo il TALK TEST [9] e per misurare la percezione della fatica useremo la scala di BORG [10].

Tipo. Il tipo di attività fisica è aerobico moderato con una velocità che varia dai 5 ai 10 km/h. La singola uscita della durata di 60' sarà così strutturata:

- Riscaldamento: 5'
- Camminata normale: 10'
- Camminata sostenuta: 30'
- Camminata veloce: 10'
- Defaticamento: 5'

Tempo. Ogni Camminata avrà la durata di 60' per un totale di 180' settimanali, così come consigliato dall'ACSM (The American College of Sports Medicine) in materia di prevenzione sanitaria [11].

Tutta l'attività sarà supervisionata da personale con Laurea Magistrale in Scienze Motorie.

Prima di iniziare il protocollo d'intervento, saranno effettuati dei test da campo per valutare lo stato di forma fisico dei soggetti:

- Walking test: per valutare la capacità cardio-respiratoria [12];
- Hand Gripp Test: per valutare la forza isometrica massima dei muscoli dell'avambraccio [13];
- Sit and Reach Test: per valutare la flessibilità [14].

I Test da campo verranno ripetuti al termine delle 12 settimane.

Valutazione dei sintomi: Per valutare l'effetto degli interventi dietetici, tutti i pazienti compileranno gli stessi questionari durante il periodo di intervento. IBS-SSS è specifico per valutare la gravità dei sintomi dell'IBS. Il questionario deve essere completato nei giorni 0, 30, 60 e 90 per le diete e 0 e 90 per il gruppo attività fisica [15]. I pazienti devono registrare l'alvo in un diario utilizzando la scala di Bristol durante il periodo di intervento, nonché durante il periodo di screening di 7 giorni [16].

Valutazione antropometrica: utile per misurare le caratteristiche fisiche del soggetto (peso corporeo, altezza, circonferenze) [17].

Valutazione bioimpedenziometrica: è un esame di facile esecuzione, rapido, non invasivo, che trova indicazione elettiva per la misurazione dello stato nutrizionale (massa magra, grassa, massa cellulare e muscolare), dello stato di idratazione (ritenzione idrica, gonfiore, iper-idratazione, infiammazione), del metabolismo basale e del "peso ideale" [18].

Valutazione psicologica: Il profilo psicologico viene valutato attraverso una serie di questionari validati [19]. Innanzitutto, viene somministrata una scheda anamnestica volta ad individuare la presenza di disturbi

psicopatologici pregressi o familiarità degli stessi. Inoltre, vengono individuati i fattori di stress di 1° e 2° livello, strettamente connessi alla sintomatologia GI. Nelle stesse visite (tempo 0 e 90), i soggetti compilano una serie di questionari psicologici somministrati ex ante ed ex post che valutano diversi aspetti. Nello specifico vengono utilizzati:

- Eating Attitude Test (EAT)- 26 (somministrato una sola volta), volto a valutare la presenza di rischio di contrarre disturbi dell'alimentazione;
- Scheda 6 del Cognitive Behavioural Assessment (CBA), volta a valutare i livelli di stress e la presenza di disturbi psico-fisiologici;
- Scala di autovalutazione dell'ansia (Zung);
- Scala di autovalutazione della depressione (Zung);
- QoL Short Form (36) Health Survey SF-36, volto a valutare la qualità della vita correlata alla salute;
- Symptom Checklist (SCL)-90, per valutare presenza e gravità dei sintomi di disagio psichico;
- IBS-QoL, volto a valutare l'impatto dell'IBS sulla qualità della vita.

Valutazione della permeabilità gastrointestinale: La permeabilità GI sarà valutata al tempo 0 e 90, somministrando una miscela di saccarosio-lattulosio-mannitolo-sucralosio e misurando il loro assorbimento GI per mezzo dell'escrezione urinaria di tali zuccheri. Dopo il digiuno notturno e la raccolta di un campione di urina basale, i soggetti berranno 100 ml di una soluzione contenente 40 gr di saccarosio, 10 g di lattulosio, 5 g di mannitolo, 1g di sucralosio. Le urine saranno raccolte nel corso delle successive 5 ore, in contenitori in cui è aggiunto clorexidina (500 µL) come conservante. Il volume totale delle urine sarà misurato, e campioni da 10 ml saranno conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei diversi zuccheri nelle urine sarà effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri saranno separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati saranno espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata [20].

Dosaggio peptidi di barriera: I dosaggi di Zonulina, I-FABP, DAO e D-lattato saranno effettuati al tempo 0 e 90 utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio [20].

Dosaggio della Claudina-3: La valutazione dei livelli urinari della proteina Claudina-3 sarà effettuata mediante Western Blotting al tempo 0 e 90. Ciascun campione di urine verrà opportunamente diluito sulla base dei livelli di creatinina, considerata un indice specifico del grado di diluizione urinaria. Le urine così diluite verranno sottoposte a SDS-PAGE gel elettroforesi e successivo trasferimento su un filtro di polyvinylidifluoride (PVDF). La membrana sarà poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario specifico (Rabbit policlonal anti-Claudina-3). Il dosaggio dell'espressione proteica sarà effettuato con l'utilizzo di anticorpi secondari e lettura in chemiluminescenza [21].

Analisi del Microbiota Intestinale: La valutazione di eventuali differenze nella popolazione microbica intestinale nei diversi quadri patologici considerati, sarà effettuata su campioni di feci prelevati al tempo 0 e 90, mediante appropriate indagini genetiche e molecolari (Illumina/Solexa Genetic Analyzer HiSeq) [22].

Dosaggio Indolo e Scatolo: L'indolo è dosato con una metodica analitica colorimetrica, mentre lo scatolo è determinato con una raffinata metodica cromatografica con rivelazione fluorimetrica. Valori urinari di indolo e scatolo normali sono inferiori a 20mg/l e 20 µg/l, rispettivamente. Quando superano questa soglia esprimono un'anomala attività intestinale di tipo fermentativo o putrefattivo [23]. Tale indagine sarà effettuata al tempo 0 e 90.

Valutazione ormonale: I peptidi (somatostatina, motilina, serotonina, BDNF,) saranno dosati su campioni ematici prelevati al tempo 0 e 90, mediante metodiche Elisa/Eia utilizzando Kit commerciali [24].

Determinazione del profilo lipidico di membrana: L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane dei globuli rossi che, avendo una emivita di 4 mesi, sono lo specchio dello stile di vita alimentare di un soggetto. Tutti i pazienti arruolati nello studio saranno sottoposti a prelievo ematico al tempo 0 e dopo 3 mesi di trattamento. Il campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA sarà sottoposto ad un estrattore automatizzato di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi-metil esteri, usati come standards [2].

End-point primario: Variazione dello score del questionario IBS-SSS alla fine del periodo di trattamento rispetto allo score basale, ovvero la proporzione di pazienti che otterranno un miglioramento dello score sintomatologico dopo dieta relativo a IBS-SSS ≥ 50 , valore che è considerato come miglioramento clinicamente significativo.

End point secondario: Effetti del trattamento sui singoli item dell'IBS-SSS e del GSRS, così come sulle caratteristiche dell'alvo valutate attraverso la somministrazione dei diari. L'adesione alla dieta/consigli dietetici sarà valutata tramite apposito questionario (IDARS). Potenziali predittori di efficacia (riduzione IBS-SSS alla fine del periodo di intervento) saranno valutati confrontando le variabili di base tra i pazienti che hanno risposto con una riduzione dei sintomi e i non-responders. Per quanto riguarda l'attività fisica l'adesione ai protocolli di attività è controllata attraverso supervisione e registrazione delle presenze, nonché compilazione di diario giornaliero a verifica mensile da parte dei chinesiologi.

Analisi statistica. I dati saranno presentati come media (SD), salvo diversa indicazione. Le variabili categoriche saranno confrontate con il test di X^2 . I valori di $P < 0.05$ a due code saranno considerati statisticamente significativi. Tutti i pazienti che saranno randomizzati e che riceveranno istruzioni dietetiche, saranno inclusi nell'analisi statistica di confronto dei dati alla fine del periodo di trattamento e i drop-out catalogati come non-responders (*analisi Intention To Treat*).

Il confronto tra i dati alla fine del periodo di intervento rispetto al basale sarà effettuato considerando solo coloro che hanno completato l'intervento (*analisi per-protocol*). Tutte le analisi statistiche saranno eseguite utilizzando il pacchetto statistico SPSS, versione 19.0 (2010, IBM Corp, Armonk, NY). I dati dei questionari e quelli relativi ai diari degli alimenti, saranno inseriti in un database da una persona non coinvolta nello studio.

Calcolo della potenza dello studio: Per pianificare la dimensione del campione, il calcolo di potenza si basa sulla capacità di rilevare una riduzione di IBS-SSS di almeno 50 punti score tra le due diete. Prevedendo l'80% di potenza e un $\alpha = 0.05$, e assumendo una SD di 70, si calcola che dovranno essere reclutati almeno 31 pazienti per ciascun gruppo che abbiano completato lo studio.

Risultati attesi:

- Informazioni circa i meccanismi di regolazione della barriera intestinale.
- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari alla base di una patologia funzionale GI quale l'IBS e utili per elaborare un possibile intervento non farmacologico mirato.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

Innovazioni:

- Formulazione di protocolli dietetici personalizzabili per pazienti con disturbi funzionali GI.

Bibliografia:

1. Simrén M, Tack J. New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15:589-605.
2. Orlando A, Tutino V, Notarnicola M, Riezzo G, Linsalata M, Clemente C, Prospero L, Martulli M, D'Attoma B, De Nunzio V, Russo F. Improved Symptom Profiles and Minimal Inflammation in IBS-D Patients Undergoing a Long-Term Low-FODMAP Diet: A Lipidomic Perspective. *Nutrients.* 2020;12:1652.
3. Vaquero L, et al. Tritordeum: a novel cereal for food processing with good acceptability and significant reduction in gluten immunogenic peptides in comparison with wheat. *J Sci Food Agric.* 2018;98:2201-2209.
4. Cozma-Petruț A, et al. Diet in irritable bowel syndrome: What to recommend, not what to forbid to patients! *World J Gastroenterol.* 2017;23:3771-3783.
5. Johannesson E, et al. Experiences of the effects of physical activity in persons with irritable bowel syndrome (IBS): a qualitative content analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53:1194-1200.
6. Riezzo G, Orlando Antonella, Tutino Valeria, Clemente Caterina, Linsalata Michele, Prospero Laura, D'Attoma Benedetta, Martulli Manuela, Russo Francesco. Profile of intestinal barrier functional markers in Italian patients with diarrhea-predominant IBS: preliminary data from a low-FODMAPS diet trial. *Arch Clin Biomed Res.* 2020;4:017-032.
7. Prospero L, Riezzo G, Linsalata M, Orlando A, D'Attoma B, Russo F. Psychological and Gastrointestinal Symptoms of Patients with Irritable Bowel Syndrome Undergoing a Low-FODMAP Diet: The Role of the Intestinal Barrier. *Nutrients.* 2021;13:2469.

8. Linsalata M, Riezzo G, Orlando A, D'Attoma B, Prospero L, Tutino V, Notarnicola M, Russo F. The Relationship between Low Serum Vitamin D Levels and Altered Intestinal Barrier Function in Patients with IBS Diarrhoea Undergoing a Long-Term Low-FODMAP Diet: Novel Observations from a Clinical Trial. *Nutrients*. 2021;13:1011.
9. Lee PH, Macfarlane DJ, Lam TH, Stewart SM. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): A systematic review. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2011; 21;8:115.
10. Parodi G, De Luca R, Levetto M "Progetto fitwalking": dalla promozione dell'attività fisica all'esercizio-terapia. *Trapianti* 2011;15:112-117.

Timeline (Gantt chart)

	I anno												II anno												III anno											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Reclutamento pazienti	█												█																							
Raccolta campioni biologici	█												█																							
Valutazione dei questionari sintomatologici/psicologici	█												█																							
Valutazione Permeabilità intestinale													█												█											
Dosaggio peptidi GI													█												█											
Determinazione profilo lipidomico													█												█											
Analisi del Microbiota intestinale																									█											
Analisi dei dati																									█											
Preparazione dei lavori scientifici													█												█											

Progetto 17/2020: "Valutazione dell'indice glicemico ed insulinemico di varie tipologie di pasta con diversi formati e con diverse tipologie di farina, utili nella prevenzione e nella terapia della sindrome metabolica."

Responsabile: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: Anna Maria Cisternino, Anna Margherita Mastrosimini, Elsa Lanzilotta, Donghia Rossella

Introduzione

L'indice glicemico è un indice della risposta glicemica indotta, nello stesso soggetto, da una quantità specifica di carboidrati in rapporto ad un'equivalente quantità di carboidrati proveniente da un alimento standard (in questo caso glucosio).

La determinazione dell'indice glicemico permette una classificazione dei carboidrati alimentari più accurata perché basata sull'effetto fisiologico degli stessi e non semplicemente sulla loro struttura chimica.

Numerosi studi dimostrano come il consumo regolare di pasti a basso indice glicemico riduca il rischio di sviluppare diabete, insulino-resistenza, malattie cardiovascolari e neoplastiche. Il concetto di indice glicemico è stato originariamente sviluppato per rispondere all'esigenze di soggetti con insulino-resistenza.

Una maggiore stabilità dei livelli di zucchero nel sangue è fondamentale per le persone con diabete e pre-diabete, ma la ricerca ha ripetutamente dimostrato che mantenere i livelli di zucchero stabili nel sangue è utile anche per la popolazione generale. Diete basate su alimenti a basso IG hanno dimostrato di:

- stabilizzare i livelli di zucchero nel sangue;
- migliorare il peso corporeo;
- controllare meglio l'appetito;
- migliorare la memoria;
- ridurre il rischio di malattie cardiovascolari;
- ridurre il rischio di alcune forme di tumore.

Secondo Walter Willet, nutrizionista e ricercatore dell'Università di Harvard "Un eccesso di zuccheri e amidi raffinati, ad alta densità calorica, stimola l'ipersecrezione dell'insulina, gli attacchi di fame, e ciò contribuisce a rallentare il metabolismo lipidico e glucidico e a rendere l'individuo fisicamente meno attivo".

Determinazione dell'Indice Glicemico

L'indice glicemico è una misura delle variazioni della glicemia che si verificano dopo l'ingestione di cibi che contengono carboidrati. Esso si determina misurando l'andamento della glicemia nelle 2 ore che seguono l'assunzione del cibo oggetto di studio e di un alimento di riferimento (glucosio o pane bianco) in misura tale da contenere la stessa quantità di carboidrati. Tale indice è definito come il rapporto percentuale tra l'area sotto la curva di glicemia (IAUC, incremental Area Under Curve indicata in *Figura 1*) dovuta all'assunzione di 50 g di carboidrati da testare (Pasta) (A) e l'area sotto la curva per 50 g di glucosio (B)

$$IG = [A/B] * 100$$

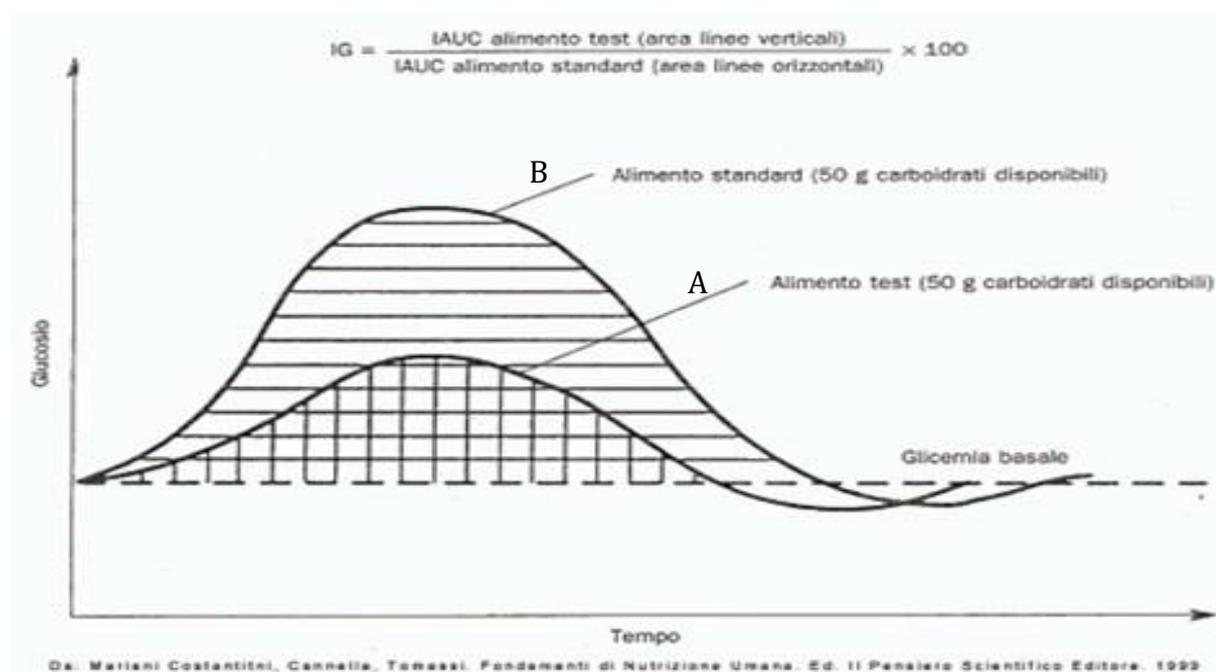


Figura 1 Curva di risposta glicemica

Le aree sotto ciascuna curva vengono calcolate utilizzando il software statistico "STATA" che con opportuni algoritmi di calcolo consente di misurare con precisione l'area sottostante ciascuna curva, ottenuta definendo le procedure di calcolo per le coordinate dei punti (glicemia, tempo), date dalle differenze tra i valori ottenuti ai vari tempi e i valori al tempo 0, misura molto importante dato che, per definire l'indice glicemico, è necessario rapportare l'area sotto la curva per l'alimento test contenente 50 g di carboidrati e l'area sotto la curva per 50 g di glucosio.

Nel calcolo delle aree sottese dalle singole curve, nel caso in cui la glicemia assuma valori negativi, occorre far in modo che nel calcolo dell'area totale venga esclusa la parte dell'area in cui la funzione risulta essere negativa.

Tutti gli algoritmi di calcolo sono stati implementati per essere in linea da quanto suggerito da Thomas Wolever (*The American Journal of Clinical Nutrition* 43: January 1986, pp. 167-172)

Il protocollo standardizzato (WHO-FAO), cui facciamo riferimento in ogni fase esecutiva, prevede il reclutamento di soggetti sani, in buona salute. I soggetti, organizzati in gruppi di due o tre persone, dopo digiuno notturno di 10-12 ore, si sono recati presso l'Ambulatorio di Nutrizione Clinica dell'IRCCS "S. de Bellis", per sottoporsi alla somministrazione dell'alimento standard e del test (Pasta Sabatelli).

Ciascuna somministrazione ha luogo in una giornata diversa. L'alimento standard consiste in 50 g di glucosio, l'alimento test consiste in una porzione di pasta contenente 50 g di carboidrati disponibili. Campioni ematici per

la determinazione della glicemia e dell'insulinemia sono prelevati al tempo 0, e poi a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti dall'inizio dell'assunzione dello standard o dell'alimento.

Su ogni soggetto sono state eseguite tre curve di risposta al glucosio (ciò consente di avere un valore medio della risposta al glucosio nel tempo per singolo soggetto), ed un'unica prova con l'alimento da testare. Nella fattispecie è stata testata la pasta denominata successivamente nella relazione come "Sabatelli 1", formato Busiate. I campioni di sangue sono stati analizzati presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ente Ospedaliero "S. De Bellis". I valori risultanti di glucosio sono stati utilizzati per calcolare l'indice glicemico.

Obiettivi specifici dello studio:

Il progetto si propone di valutare l'indice glicemico di diversi tipi di pasta con diversi formati e con diverse tipologie di farina. In particolare, si vuole conoscere l'effetto del formato e della diversa tipologia di farina sulla risposta glicemica ed insulinemica.

Obiettivo specifico 1: determinazione dell'indice glicemico del prodotto in esame.

Obiettivo specifico 2: determinazione dell'indice insulinemico del prodotto in esame.

Obiettivo specifico 3: determinazione del formato di pasta e della tipologia di farina con minore indice glicemico e insulinemico.

Reclutamento soggetti

Da aprile a luglio 2021, ventisei volontari sani, dipendenti del nostro IRCCS, che avevano risposto ad una evidenza interna di richiesta di partecipazione al progetto, sono stati reclutati per lo studio.

I soggetti erano 12 maschi e 14 femmine di età compresa tra 32 e 66 anni, senza storia di diabete, epatite, malattie croniche o terapie farmacologiche in grado di influenzare il metabolismo glucidico.

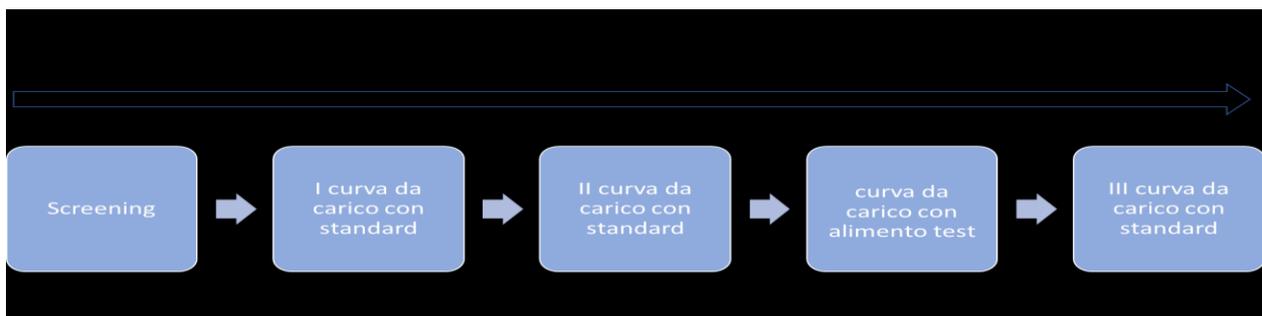
I soggetti sono stati sottoposti preventivamente a prelievo ematico per esami di routine quali: glicemia, Hb-glicata, colesterolo totale, trigliceridi, HDL-colesterolo, emocromo totale, acido urico, GPT, GOT, γGT, FA, TSH, insulina, creatinina, urea e PCR.

Dopo valutazione dei suddetti esami, sono risultati eleggibili per lo studio 21 soggetti dei 26 iniziali. Cinque di essi sono stati esclusi perché presentavano valori basali di glicemia ≥ 110 mg/dl. Soltanto 21 soggetti sono entrati nella fase successiva dello studio.

Ogni soggetto nel giorno antecedente il test seguiva alcune norme dietetiche indicate dalla dietista, in accordo con il gruppo di lavoro, di seguito elencate:

- non svolgere attività fisica;
- non superare le 3 tazzine di caffè durante l'arco della giornata;
- consumare il pasto serale entro le 20.30, evitando il consumo dei seguenti alimenti: latte, latticini, fritti, pizze, dolci, cioccolata, bevande zuccherine e/o alcoliche.

Dopo un digiuno notturno di 10-12 ore, i soggetti sono stati osservati tra le 7:00 e le 11:00 del mattino recandosi in ambulatorio senza poter assumere caffè e/o fumare, ed hanno ingerito, l'alimento standard (glucosio), ripetendo la prova tre volte, e la pasta da testare, in 4 giornate differenti e distanziate così come riportato nello schema:



Ogni partecipante all'arrivo in ambulatorio è stato sottoposto al reperimento della pressione arteriosa e delle misure antropometriche di base (peso, altezza).

L'alimento standard, costituito da 50 g di glucosio, è stato somministrato come soluzione al 50% (SCLAVO), in ragione di 100 ml di soluzione in 200 ml di acqua oligominerale.

La Pasta "Sabatelli 1", è stata somministrata nella quantità di 67 g contenenti 50 g di carboidrati disponibili (in base all'analisi chimica fornita dalla stessa azienda) assieme a 200 ml di acqua oligominerale. La pasta viene cotta in abbondante acqua (1,5 lt per 67 g), senza sale, raggiunto il bollore dopo 1' e 45" al cronometro, per 7 minuti.

Sia la soluzione di glucosio che la pasta sono stati assunti dai volontari in un tempo non superiore a 15 minuti; per tutta la durata dell'esecuzione della prova, pari a due ore, i soggetti erano seduti in ambiente tranquillo, in una sala ampia e bene areata appositamente dedicata all'interno dell'Ambulatorio di Nutrizione Clinica.

I campioni di sangue necessari per la determinazione della glicemia e dell'insulina (prelevati con ago Butterfly dalla vena mediana cefalica nella piega antecubitale dell'arto superiore, attraverso provette Vacutainer) sono reperiti ai tempi 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti, per tutte e 4 le prove. La glicemia è stata dosata con tecniche standard nel laboratorio di Patologia Clinica dell'IRCCS "S. de Bellis", sotto stretto controllo di qualità.

La Tabella 1 riporta la composizione della pasta "Sabatelli" (valori per 100 g di prodotto)

Informazioni nutrizionali (100 gr.)	
Valore energetico	365 kcal o 1546 kJ
Umidità	10,25
Proteine	11,8
Amido + zuccheri + fibra	74
Amido + zuccheri	68,1
Grassi	2,3
Fibra	5,9

Durante la fase di somministrazione dello standard (50 g di glucosio) e/o dell'alimento (Pasta), 7 ulteriori soggetti hanno presentato risposte glicemiche molto irregolari e non in linea con quanto atteso in termini di risposta sia agli standard che al test, pertanto si è ritenuto opportuno escluderli per non condizionare i risultati finali.

Il valore dell'indice glicemico della Pasta "Sabatelli 1" è stato calcolato su 14 soggetti, applicando la tecnica di Jenkins – Wolever (WHO-FAO "Carbohydrates in human nutrition", FAO, Rome, 1998).

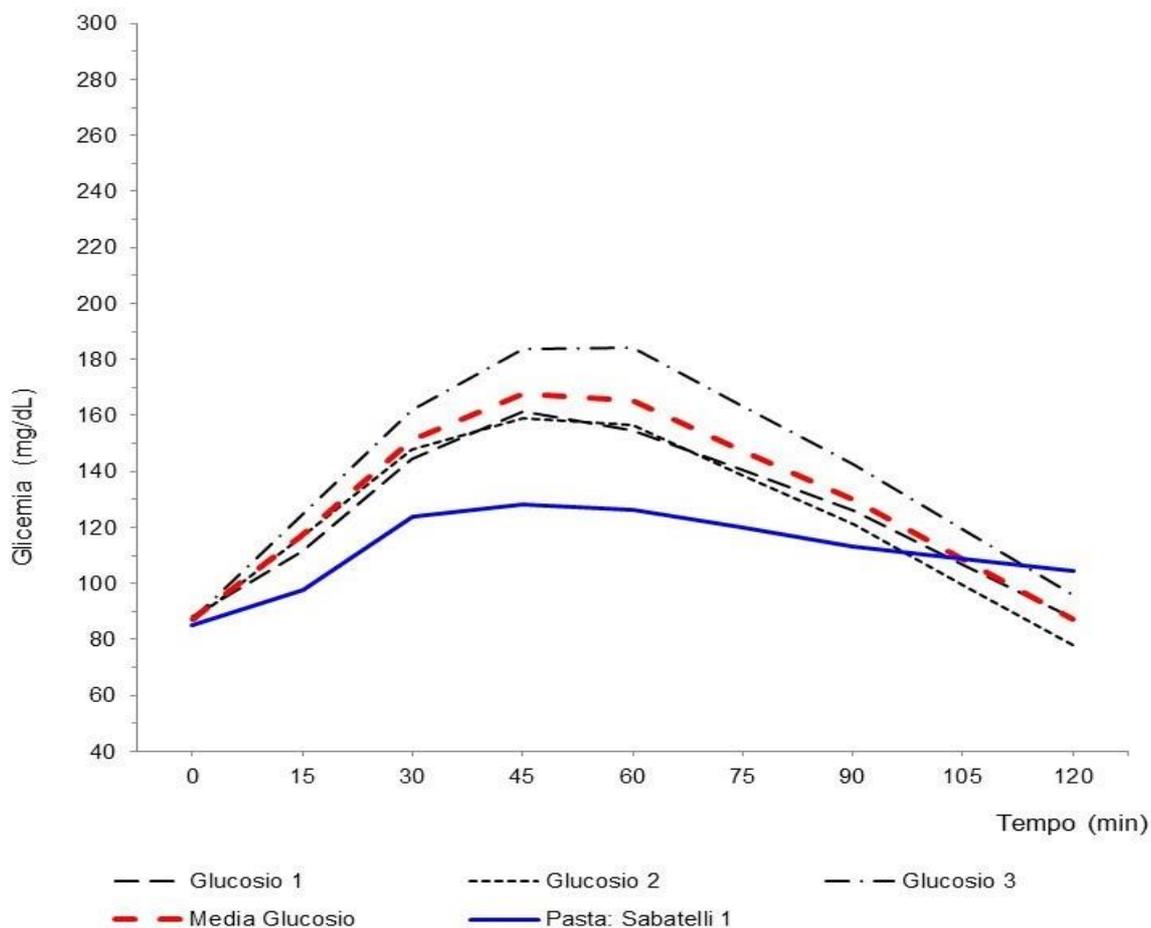
La Tabella 2 mostra le caratteristiche antropometriche, l'età e il genere dei 14 soggetti.

ID	Età'	Genere	Peso (kg)	Altezza (m)	IMC (kg/m ²)
1	45	M	67,5	1,65	24,79
4	49	M	75,2	1,79	23,30
5	41	M	79,5	1,65	29,00
7	58	M	87,5	1,78	27,60
10	61	M	89,5	1,79	27,90
11	39	F	63,5	1,62	24,10
12	45	F	63,0	1,54	26,30
17	32	F	57,5	1,57	23,32
18	35	F	64,7	1,64	23,90
19	51	M	79,0	1,80	24,38
20	56	M	77,6	1,68	27,60
22	35	M	85,5	1,82	25,80
24	40	M	79,0	1,76	25,50
26	45	F	78,0	1,61	30,00
Media	45,14	9M/5F	74,78	1,69	25,96

RISULTATI

Obiettivo 1

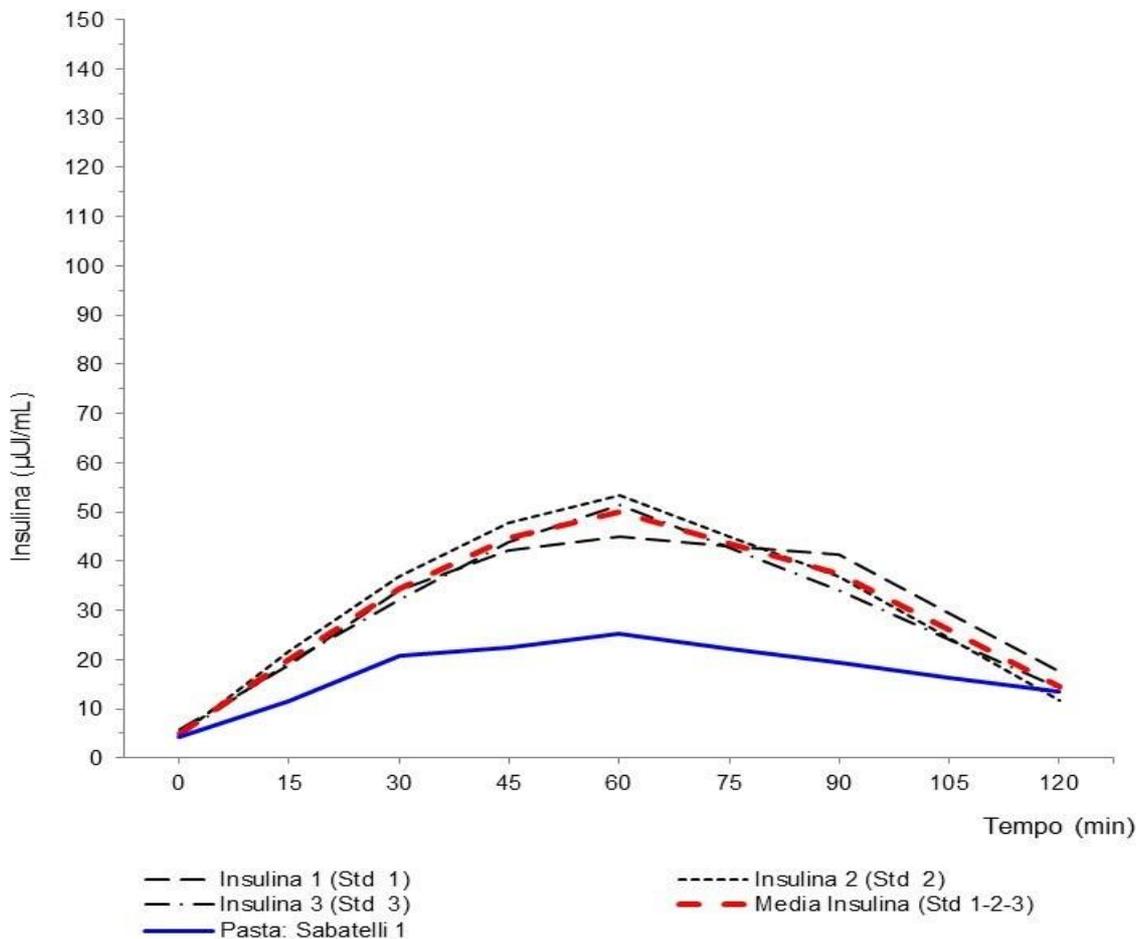
Il valore dell'Indice Glicemico (IG) della Pasta "Sabatelli 1" ottenuto è pari a $60,98 \pm 5,21$ (media \pm errore standard della media), calcolato sulla media dei tre Standard (Glucosio 1,2,3).



Dai grafici è possibile evidenziare come i valori glicemici dopo assunzione della pasta siano decisamente inferiori rispetto a quelli dopo l'assunzione di glucosio, con una curva più piatta, ad incremento iniziale più lento e con un plateau che si posiziona sui livelli di glicemia a digiuno di poco più elevati rispetto al valore iniziale, dopo circa 90 minuti dall'ingerimento della Pasta, anche se continua a diminuire con un leggero decremento.

Obiettivo 2

L'Indice Insulinico (II) della Pasta "Sabatelli 1" ottenuto è pari a **52,19±4,96** (media ± errore standard della media), calcolato sulla media dei tre Standard (Glucosio 1,2,3).



La risposta insulinica in seguito all'assunzione di pasta è lenta e progressiva sino ad un picco dopo 60 minuti dalla sua assunzione e si posiziona sempre su livelli insulinici decisamente più bassi da quelli evocati dal carico di glucosio continuando ad assumere un andamento decrescente dopo il picco precedentemente raggiunto.

Per la tipologia di pasta testata denominata Sabatelli 1 è stata redatta una relazione dettagliata, completa di grafici relativi alla risposta glicemica per ciascun soggetto risultato eleggibile.

Dati preliminari

La Pasta "Sabatelli 1" ha un Indice Glicemico di **60,98±5,21** (media ± errore standard della media) ed un Indice Insulinico di **52,19±4,96** (media ± errore standard della media), in conformità ad altre tipologie di pasta affini, come dalle evidenze scientifiche dei due lavori indicati di seguito:

- 1) Brand Miller J, Foster Powell K, Colagiuri S. The new glucose revolution- (Hodder Headline Australia, 2002 terza edizione tradotta in italiano da RCS libri 2005)
- 2) Pandolfo A., Messina B., Russo G. Evaluation of glycaemic index of six different samples of commercial and experimental pasta differing in wheat varieties and production processes. Foods 2021, 10:2221-2233

Progetto 18/2020: "Trattamenti dietetici personalizzati ed attività fisica adattata per giovani adulti in sovrappeso: effetti sul profilo lipidomico, stato infiammatorio, sistema immunitario e permeabilità intestinale"

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Maria Notarnicola, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Francesco Russo, Giuseppe Riezzo, Michele Linsalata, Caterina Clemente, Antonella Orlando, Laura Prospero, Benedetta D'Attoma, Manuela Martulli, Maria Gabriella Caruso, Anna Maria Cisternino, Maria Principia Scavo, Mirizzi Antonella, Procino Filippo, Campanella Angelo, Bonfiglio Caterina, Franco Isabella, Bianco Antonella, Sorino Paolo, Cavalcanti Elisabetta, Palmitessa Valeria

Introduzione

L'infiammazione è una componente centrale dell'immunità innata (aspecifica) e quindi un meccanismo essenziale nella preservazione dello stato di salute. Al contrario, uno stato di infiammazione cronica di basso grado è una caratteristica patologica comune a molte condizioni croniche come sindrome metabolica, epatosteatosi non alcolica (NAFLD), diabete tipo 2 e patologie cardiovascolari.

Numerosi studi hanno osservato un'associazione tra stato di infiammazione cronica di basso grado, obesità e sovrappeso, disbiosi intestinale ed alterata permeabilità intestinale.

Il sovrappeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 30 \text{ Kg/m}^2$) è una condizione di eccesso ponderale molto comune e preoccupante in quanto rappresenta un fattore di rischio rilevante per diverse malattie croniche e risulta correlato ad una riduzione dell'aspettativa di vita e ad un sostanziale peggioramento della sua qualità. I dati del Sistema di Sorveglianza PASSI hanno rilevato che il 31.6% della popolazione italiana risulta essere in sovrappeso. La Puglia risulta tra le regioni a più alto tasso di sovrappeso (33.3%) superata solamente dalla Calabria (34%) dalla Campania (36.7% e dalla Basilicata (36.9%). La condizione di eccesso ponderale è una caratteristica maggiormente presente negli uomini rispetto alle donne e più frequente al crescere dell'età. Ciononostante, anche nella popolazione di giovani adulti (18-35 anni) si registra un'alta percentuale di soggetti in sovrappeso (19.5% Italia e 21.6% Puglia). Per quanto riguarda la popolazione di Castellana Grotte la prevalenza del sovrappeso è 55% mentre quella dell'obesità è del 16%.

Alle condizioni di eccesso ponderale spesso è associato uno stato infiammatorio cronico di basso grado, un'alterata permeabilità intestinale, disequilibri a carico del microbiota intestinale ed alterazione dell'equilibrio Th1/Th2/Th17

Lo stile di vita e l'alimentazione in particolare sono in grado di esercitare un ruolo importante nella modulazione di questi squilibri. L'influenza di alcuni modelli dietetici sullo stato di infiammazione cronica è stata oggetto di numerosi lavori scientifici che hanno illustrato il ruolo che alcuni nutrienti, come gli acidi grassi, hanno nel sostenere o modulare l'infiammazione cronica di basso grado. È noto che una dieta ricca in grassi saturi (SFA) e acidi grassi trans (TRANS) risulti essere pro-infiammatoria, così come una dieta ricca in alcuni acidi grassi polinsaturi della serie omega 6, come l'acido Linoleico (LA, C18:2n6) e l'acido Arachidonico (ARA, C20:4n6). Al contrario, una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA), come l'acido Palmitoleico (C16:1n7), l'acido Vaccenico (C18:1n7) e l'acido Oleico (C18:1n9), e una dieta ricca in acidi grassi della serie omega 3, come l'acido α -linolenico (ALA, C18:3n3), l'acido Eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C20:6n3), risulterebbe avere un ruolo anti-infiammatorio. Tra le varie indagini biochimiche disponibili, l'analisi lipidomica effettuata sulle membrane dei globuli rossi, si è rivelata utile nell'individuare il legame tra squilibri nutrizionali e stato infiammatorio. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico.

Tra le varie indagini biochimiche disponibili, le analisi di lipidomica (sangue o membrana dei globuli rossi) si sono rivelate utili nell'individuare il legame tra squilibri nutrizionali e l'infiammazione di basso grado. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico. In questi ultimi anni, sono stati effettuati studi mediante l'utilizzo di vescicole extracellulari che trasportando DNA, RNA, proteine e lipidi, sembrano essere coinvolte nell'infiammazione piuttosto che nella carcinogenesi dei tessuti del tratto gastroenterico. Alla famiglia delle vescicole extracellulari appartengono anche gli esosomi, vescicole di grandezza variabile dai 50 ai 150 nm; mediante indagini preliminari effettuate proprio sugli esosomi, è stato evidenziato come anche per le membrane di queste vescicole extracellulari possa variare la

composizione in termini di acidi grassi, in base alla gravità della patologia epatica, con un incremento degli acidi grassi pro-infiammatori in presenza di steatosi moderata o grave rispetto ai soggetti controllo. Inoltre, sempre mediante indagini biochimiche preliminari di comparazione fra esosomi estratti da plasma di pazienti affetti da NAFLD con steatosi moderata o grave ed esosomi estratti da soggetti controllo, si è potuto osservare una diversa espressione delle proteine coinvolte nel WNT pathway, in particolare i recettori di membrana Frizzled-7 e Frizzled-9 (rispettivamente FZD-7 e FZD-9), non che la loro presenza che in condizioni normali è quasi trascurabile a livello esosomiale. Le proteine FZD, infatti, sono coinvolte nell'infiammazione e nella carcinogenesi di diversi organi in condizioni patologiche, mentre in condizioni normali sono coinvolte nell'embriogenesi e nella regolazione della cascata apoptotica.

Le proteine FZD, infatti, sono coinvolte nell'infiammazione e nella carcinogenesi di diversi organi in condizioni patologiche, mentre in condizioni normali sono coinvolte nell'embriogenesi e nella regolazione della cascata apoptotica. E' stato ampiamente dimostrato che nell'ambito della carcinogenesi coloretale e gastrica ad esempio, la FZD-10 ha un ruolo preponderante nel differenziamento cellulare in senso neoplastico e nella proliferazione incontrollata, con conseguente incremento della carcinogenesi

Un aspetto non ancora ben chiaro è se la somministrazione di una dieta specifica sia in grado di migliorare, in maniera selettiva, un profilo lipidomico inizialmente alterato o una condizione di alterata permeabilità pregressa e quindi per questa via uno stato di infiammazione cronica di basso grado.

Un altro aspetto da valutare è la stretta connessione tra l'alimentazione ed il sistema immunitario: da un lato la fame e la malnutrizione proteica sopprimono le funzioni immunitarie e aumentano la suscettibilità alle infezioni, dall'altro l'ipernutrizione e l'obesità determinano un'attività immunitaria aberrante che favorisce la comparsa di malattie infiammatorie croniche come il diabete, l'aterosclerosi, le broncopneumopatie croniche, la steatosi epatica non alcolica, e vari tumori. La differenziazione dei linfociti T helper in Th1 o Th2 è fortemente influenzata da fattori genetici, tra cui la differenza di sesso, ma anche fattori ambientali, terapeutici e nutrizionali è stato visto infatti uno stretto legame tra variazioni dello stato Th1/Th2, dieta o stato ormonale. In ogni individuo può verificarsi pertanto, un'eccessiva polarizzazione su un tipo di risposta piuttosto che sull'altra, sebbene ciò sembri, in determinate circostanze modificabile. Ulteriore diretta conseguenza di questo disequilibrio della sorveglianza immunitaria è sempre l'instaurarsi di uno stato infiammatorio. Lo sbilanciamento Th1/Th2 pone infatti il sistema immunitario in una situazione di allerta continua e innesca una risposta infiammatoria cronica, costante e silente, conseguente all'allerta immunitaria. Le cellule Immunitarie dipendono dai nutrienti assunti, e possono venire danneggiate dall'esposizione ai radicali liberi. Un apporto adeguato di alimenti antiossidanti può aiutare a prevenire questi danni e regolare la funzione delle cellule immunitarie. Pertanto, lo studio dello stato immunitario cellulare mediante analisi delle sottopopolazioni linfocitarie dei pazienti con infiammazione cronica di basso grado può essere di aiuto nel follow-up dei trattamenti dietetici personalizzati a cui questi pazienti sono sottoposti.

Altro aspetto importante da considerare è rappresentato dalla permeabilità intestinale (PI) e dai parametri biochimici e molecolari preposti al suo funzionamento in risposta ai nutrienti. L'integrità dell'epitelio GI è essenziale per il mantenimento dello stato di salute e la prevenzione di numerose patologie e, recentemente, una particolare attenzione è stata proprio rivolta alle alterazioni della PI in relazione anche alla flogosi cronica. La PI si riferisce alla proprietà dell'epitelio di lasciare passare molecole di diversa grandezza, forma e carica mediante diffusione non mediata attraverso lo spazio transcellulare (endocitosi) e paracellulare (tight junctions, TJs). Una PI più pronunciata e associata ad una ipermotilità ed ipersensibilità viscerale, lascia ipotizzare che alterazioni della barriera epiteliale possano rappresentare un evento precoce nella promozione di infiammazioni mucosali di basso grado Sicuramente un qualsiasi approccio dietetico, seppur su una base di suscettibilità genetica dell'ospite, può condizionare la funzione di barriera intestinale attraverso diversi meccanismi (ad es. modulazione del microbiota, rilascio di peptidi GI, attivazione dei mediatori di flogosi, alterazione del "brain-gut axis"). In tale ottica, un aspetto non completamente chiarito è se la somministrazione di una dieta specifica sia in grado di migliorare non solo un profilo lipidomico inizialmente alterato, ma anche eventuali alterazioni pregresse della PI, entrambe condizioni legate ad uno stato di flogosi di basso grado.

Obiettivi specifici dello studio:

Lo studio prevede l'arruolamento di una popolazione di giovani adulti (18-35 anni) sani, in sovrappeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 30 \text{ Kg/m}^2$), caratterizzati da squilibrio nel profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi.

Verranno create diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 1: Creare diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 2: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sul profilo lipidomico di soggetti con squilibrio della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi, rispetto ad una dieta di controllo. Stimare gli stessi effetti sul profilo lipidomico e proteico degli esosomi estratti dal plasma dei soggetti inclusi nello studio rispetto ai controlli, sottoposti o meno a dieta di controllo.

Obiettivo specifico 3: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla permeabilità intestinale e microbiota intestinale, rispetto alla dieta di controllo.

Obiettivo specifico 4: Stimare gli effetti dell'intervento dietetico sulla differenziazione dei linfociti T helper in Th1, Th2 o TH17 mediante caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie secondo analisi dei "cluster of differentiation" (CD).

Obiettivo specifico 5: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, sul Dispendio Energetico a Riposo (REE) sul metabolismo basale e sul Dietary Inflammatory Index (DII) prima e dopo l'intervento dietetico in tutti i soggetti arruolati

Obiettivo specifico 6: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, rispetto alla dieta di controllo.

Metodologie e analisi statistiche:

1 – popolazione di studio

La popolazione di studio sarà composta da soggetti in sovrappeso con squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi, selezionata per i seguenti criteri di inclusione ed esclusione, randomizzata e distribuita in un gruppo di intervento ed un gruppo di controllo.

Criteri di inclusione:

- Età: 18-35 anni
- BMI compreso tra 25 e 29.9 Kg/m²
- Apparente stato di buona salute
- Squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi

Criteri di esclusione:

- Patologie infiammatorie croniche e/o autoimmuni
- Patologie acute
- Diabete in trattamento farmacologico
- Dislipidemia in trattamento farmacologico (compresi nutraceutici a base di Monacolina K)
- Patologie cardiovascolari in atto
- Terapie interferenti con lo stato infiammatorio (cortisonici, FANS ecc.)

Tutti i soggetti arruolati al baseline saranno sottoposti ad anamnesi medica, nutrizionale e di attività fisica. Sarà effettuata la valutazione antropometrica e bioimpedenziometrica mediante analisi BIA (AKERN) al baseline e a 30, 60, 90 e 120 giorni dall'inizio del trattamento dietetico. La Calorimetria indiretta sarà effettuata al baseline e al 120° giorno. Sarà anche raccolto un campione d'urine al momento dell'effettuazione della Calorimetria al baseline per la determinazione dell'azoto urinario.

2 - Valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi plasmatici

La valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi verrà effettuata con le seguenti metodiche e tempistica:

Composizione Lipidica della Membrana dei Globuli Rossi:

- preliminarmente, prima del reclutamento, al fine di individuare i soggetti da includere nella popolazione di studio;
- dopo 120gg di intervento, nei soggetti reclutati.

Valutazione semi-quantitativa delle proteine FZD-7 e FZD-9 degli esosomi plasmatici

- La quantificazione delle proteine presenti negli esosomi plasmatici verrà effettuata dopo isolamento degli esosomi mediante ultracentrifugazione ed estrazione delle proteine totali con RIPA buffer. Le proteine di interesse verranno individuate e valutate mediante western-blotting.
- preliminarmente, prima del reclutamento, al fine di individuare i soggetti da includere nella popolazione di studio;
- dopo 120gg di intervento, nei soggetti reclutati.

3 – Analisi della permeabilità intestinale

La valutazione della permeabilità intestinale verrà effettuata con test allo xilitolo-mannitolo in tutti i soggetti reclutati, al reclutamento e dopo 120gg dall'inizio dell'intervento.

4 – Analisi della condizione di eubiosi/disbiosi intestinale

La valutazione della condizione di eubiosi/disbiosi intestinale verrà effettuata con dosaggio di indolo e scatolo urinari in tutti i soggetti reclutati, al reclutamento e dopo 120gg dall'inizio dell'intervento.

5 – attività fisica

I soggetti assegnati ad entrambi i gruppi, intervento e controllo, verranno avviati ad un'attività fisica adattata (Fitwalking), omogenea per entrambi i gruppi istruita e sorvegliata da laureati esperti in chinesiologia e scienze motorie, per l'intero periodo dello studio (4 mesi).

6 – intervento dietetico

L'intervento dietetico sarà caratterizzato dalla durata di 120gg con una o più diete indirizzate al dimagrimento dei soggetti in studio.

L'apporto calorico in entrambi i gruppi sarà omogeneo, determinato sulla base delle caratteristiche antropometriche dei soggetti in studio, dei risultati della Calorimetria indiretta, ed adattato alle esigenze energetiche derivanti dall'attività fisica programmata.

Tutti i pazienti verranno monitorati da un dietista o altro operatore sanitario, esperto nella gestione di protocolli dimagranti:

- ogni 15gg (solo valutazioni antropometriche, valutazione dell'aderenza alla dieta mediante diario alimentare)
- ogni 30gg (valutazioni antropometriche, valutazione dell'aderenza alla dieta mediante diario alimentare, indagini biochimiche anche per le proteine esosomiali e lo stato immunitario).

6.1 – dieta intervento

Si provvederà alla creazione di una o più diete (basate su evidenze scientifiche) ricche o povere in nutrienti capaci di modulare selettivamente lo stato di infiammazione cronica di basso grado.

Caratteristiche nutrizionali delle diete-intervento:

- a. **basso tenore di**
 - i. ac. grassi saturi (**SFA**)
 - ii. ac. grassi trans (**TRANS**)
 - iii. ac. Linoleico (LA, C18:2n6) e acido Arachidonico (ARA, C20:4n6) (**PUFA Ω6 pro- infiammatori**).
- b. **alto tenore di:**
 - iv. ac. Palmitoleico (C16:1n7), ac. Vaccenico (C18:1n7) e ac. Oleico (C18:1n9) (**MUFA anti-infiammatori**)
 - v. ac. α-linolenico (ALA, C18:3n3), ac. Eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) e ac. docosaesaenoico (DHA, C20:6n3) (**PUFA Ω3 anti-infiammatori**)
 - vi. nutrienti capaci di incrementare i livelli circolanti/di membrana di questi ac. grassi

Integreremo queste diete con alimenti ricchi o poveri di nutrienti capaci potenzialmente di migliorare lo stato disbiosi e di permeabilità intestinale.

6.2 – dieta di controllo

La dieta di controllo sarà una dieta “prudente” standard (INRAN).

Analisi lipidomica

L’analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane dei globuli rossi che, avendo una emivita di 4 mesi, sono lo specchio dello stile di vita alimentare di un soggetto. Tutti i soggetti arruolati nello studio saranno sottoposti a prelievo ematico al baseline (tempo 0) e dopo 4 settimane di trattamento. Il campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA sarà sottoposto ad un estrattore automatizzato di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

L’analisi lipidomica sugli esosomi plasmatici verrà effettuata in concomitanza dell’analisi lipidomica delle membrane eritrocitarie, con la stessa tempistica. Da un campione di sangue periferico, si isolerà prima il plasma e dal plasma per ultracentrifugazione gli esosomi che verranno in parte immediatamente trattati per l’estrazione automatizzata degli di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

Analisi delle proteine esosomiali

Da un campione di sangue periferico, procederemo all’estrazione del plasma e successivamente per ultracentrifugazione all’isolamento degli esosomi. Gli esosomi estratti verranno risospesi in acqua ultrapura e sottoposti ad estrazione delle proteine totali. Le proteine verranno quantificate e valutate mediante analisi di Western Blotting, per la presenza delle proteine FZD-7 e FZD-9 oltre che per le proteine Housekeeping tipiche degli esosomi, HSP-70, ALIX e CD-63, ed i profili proteici dei singoli soggetti verranno comparati ai soggetti sani controllo.

Valutazione dello stato immunitario

Lo stato immunitario di base sarà valutato mediante analisi citofluorimetrica. su sangue intero con EDTA di pazienti al baseline (tempo 0) ed ogni 4 settimane di trattamento fino alla fine dello stesso. I risultati ottenuti in ciascun timing saranno comparati con gruppi controllo. Nello specifico si procederà all’analisi dei profili indicati in tabella:

Stato immunitario di base	Cellule T CD3, CD4 e CD8, quoziente CD4/CD8, cellule B CD19, NK CD56/16, cellule T attivate da HLA-DR.
Equilibrio TH1-TH2- TH17	Sottopopolazioni CD4: TH1 (CD183/CXCR3+; CD196/CCR6-) TH2 (CD183/CXCR3-; CD194/CCR4+; CD196/CCR6-) Quoziente TH1/TH2 TH17(CD183/CXCR3-; CD194/CCR4+; CD196/CCR6+) TH17-1 (CD183/CXCR3+; CD196/CCR6+)
Immunocompetenza infiammazione cellule T naive/memory	Cellule T memory/naive CD45RA+/-, cellule T CD38 CD8

Valutazione della permeabilità intestinale.

L’integrità dell’epitelio GI è essenziale per il mantenimento dello stato di salute e la prevenzione di numerose patologie^{Errore. Il segnalibro non è definito.} e, recentemente, una particolare attenzione è stata proprio rivolta alle alterazioni della permeabilità intestinale (PI). La PI si riferisce alla proprietà dell’epitelio di lasciare passare molecole di diversa grandezza, forma e carica mediante diffusione non mediata attraverso lo spazio transcellulare (endocitosi) e paracellulare (tight junctions, TJs). Una permeabilità intestinale più pronunciata e associata ad una ipermotilità ed ipersensibilità viscerale, lascia ipotizzare che alterazioni della barriera epiteliale possano rappresentare un evento precoce nella sua patogenesi, promuovendo lo sviluppo di infiammazioni mucosali di basso grado. La PI può essere valutata “in vivo”, con metodi non invasivi, attraverso la misura dell’escrezione urinaria di “sostanze-test” incapaci, in condizioni d’integrità, di superare la barriera intestinale, e somministrate al

paziente per via orale. Gli zuccheri saccarosio, mannitolo, lattulosio e sucralosio sono le molecole più utilizzate per tali test.

La barriera intestinale può essere considerata un sistema dinamico che risponde anche a segnali umorali e una pletora di differenti molecole è stata, a vario titolo, chiamata in causa. La zonulina è un peptide GI in grado di modulare la funzionalità delle TJs. E' stato dimostrato che i livelli di zonulina sierica correlano con l'entità della compromissione della barriera mucosale. Il danno cellulare e/o delle TJs può avere un notevole impatto sulla corretta funzione della PI. Le I-FABP (intestinal-fatty acid binding proteins) sono proteine citosoliche presenti nelle cellule epiteliali deputate al trasporto degli acidi grassi. Possono essere rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana e sono rapidamente eliminate con le urine; pertanto, rappresentano markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell'epitelio intestinaleⁱ Allo stesso modo, la diaminina ossidasi (DAO), un enzima intracellulare con un elevato livello di attività nello strato superiore dei villi intestinali, è considerata un marker sierico di integrità dell'epitelio intestinaleⁱⁱ Le claudine sono una famiglia di proteine che costituiscono le TJs e pertanto possono essere impiegate come markers non invasivi di danno a carico delle TJsⁱⁱⁱ. Insieme a tali biomarkers che valutano la funzione e l'integrità della barriera intestinale, è anche possibile una valutazione indiretta attraverso il dosaggio di composti intraluminali che giungono nel circolo ematico in situazioni di alterata PI. Tra tali sostanze si annovera il D-lattato, un prodotto di fermentazione di diversi batteri, compresi quelli presenti nel tratto GI, che negli ultimi anni ha assunto un ruolo come marcatore indiretto di alterazione della barriera intestinale.

Test di permeabilità intestinale a tre zuccheri: La permeabilità GI sarà valutata, somministrando una miscela di saccarosio-lattulosio-mannitolo e misurando il loro assorbimento gastrointestinale per mezzo dell'escrezione urinaria di tali zuccheri. Dopo il digiuno notturno e la raccolta di un campione di urina basale, i soggetti berranno 100 ml di una soluzione contenente 40 gr di saccarosio, 10 g di lattulosio, 5 g di mannitolo, 1g di sucralosio. Le urine saranno raccolte nel corso delle successive 5 ore, in contenitori in cui è aggiunto clorexidina (500 microlitri) come conservante. Il volume totale delle urine sarà misurato, e campioni da 10 ml saranno conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei diversi zuccheri nelle urine sarà effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri saranno separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati saranno espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata

Dosaggio peptidi di barriera: I dosaggi della Zonulina, delle I-FABP, della DAO e del D-lattato saranno effettuati utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio.

Dosaggio della Claudina-3: La valutazione dei livelli urinari della proteina Claudina-3 sarà effettuata mediante Western Blotting. Ciascun campione di urine verrà opportunamente diluito sulla base dei livelli di creatinina, considerata un indice specifico del grado di diluizione urinaria. Le urine così diluite verranno sottoposte a SDS-PAGE gel elettroforesi e successivo trasferimento su un filtro di polyvinylidifluoride (PVDF). La membrana sarà poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario specifico (Rabbit policlonal anti-Claudina-3). Il dosaggio dell'espressione proteica sarà effettuato con l'utilizzo di anticorpi secondari e lettura in chemiluminescenza.

Dosaggio Indolo e Scatolo: L'indolo è dosato con una metodica analitica colorimetrica, mentre lo scatolo è determinato con una più elaborata metodica cromatografica con rivelazione fluorimetrica. Valori urinari normali sono inferiori a 20mg/dl, quando superano questa soglia esprimono un'anomala putrefazione intestinale. Valori elevati di indolo sono indicativi di una disbiosi fermentativa del piccolo intestino. Alti livelli di scatolo suggeriscono una disbiosi putrefattiva del grosso intestino.

Valutazione Composizione Corporea e DII

La composizione corporea sarà valutata mediante Analisi Bioimpedenziometrica utilizzando il software Body Gram dell'Akern, mentre la valutazione del Dispendio Energetico a Riposo (REE) sarà valutata mediante Calorimetria Indiretta utilizzando Vmax Encore. L'assunzione dietetica sarà valutata utilizzando il questionario di frequenza alimentare (FFQ) al baseline, adattato per l'uso nella popolazione italiana. FFQ include settanta, tra cibi e bevande, assunti dall'individuo nell'ultimo anno. La frequenza di consumo sarà distribuita su nove livelli di assunzione da "mai" a "ogni giorno". Questo questionario è stato già stato validato nella popolazione italiana e i dati per il calcolo Dietary Inflammatory Index (DII) sono stati estratti utilizzando il database di composizione alimentare per gli studi epidemiologici in Italia. I dettagli dello sviluppo del DII sono descritti.

Quarantacinque parametri alimentari, compresi alimenti, nutrienti e altri composti bioattivi, sono stati identificati in base al loro effetto infiammatorio su sei marcatori infiammatori specifici, tra cui hs-CRP, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, fibrinogeno, omocisteina, TNF α , etc etc.

Aggiornamento:

Da giugno 2021) si è cominciato a lavorare sul progetto in questione. È stato necessario rivedere tutto lo studio del background e ridimensionare gli obiettivi dopo i cambiamenti legati all'organico del laboratorio di epidemiologia e dopo gli ultimi aggiornamenti in letteratura. L'intento è creare approcci dietetici a composizione lipidica adattata potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Sono state le analisi più recenti del gruppo GBD (Global Burden of Diseases) a inquadrare il ruolo di un'assunzione eccessiva o, specularmente, non adeguata, di gruppi di alimenti e/o nutrienti nella determinazione del rischio cardiovascolare e metabolico.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) rientrano bene in questo quadro: la necessità di mantenere un adeguato apporto, con la dieta, sia di omega-3 e sia di omega-6, viene sollecitata da tutte le linee guida e confermata da numerosissime ricerche in ambito nutrizionale.

Per la salute di cuore e vasi, il rispetto della quota di PUFA sembrerebbe inoltre decisivo più di uno stretto controllo sui grassi saturi (SFA).

La ricerca sui PUFA si è per decenni focalizzata sui benefici degli omega-3 di origine vegetale (ALA, acido alfa-linolenico) e marina (acido eicosapentaenoico o EPA e acido docosaesaenoico o DHA), ma non ha riservato altrettanta attenzione agli omega-6, rappresentati principalmente dall'acido linoleico e dall'acido arachidonico, che pure costituiscono la quota predominante dei polinsaturi forniti dalla dieta.

Anzi: per molto tempo, l'accento è stato posto sui possibili effetti pro-infiammatori di alcuni metaboliti dell'acido arachidonico e sulla competizione biochimica tra acido linoleico e acido alfa-linolenico, che, in risposta a livelli elevati di assunzione del primo comporterebbe la riduzione delle concentrazioni del secondo in organi e tessuti.

Finora poca evidenza è invece stata data sia alle ricerche epidemiologiche e agli studi di intervento, che hanno dimostrato l'associazione tra apporto di acido linoleico con la dieta e riduzione della concentrazione plasmatica di colesterolo LDL e hanno chiarito come la sostituzione di una quota di grassi saturi pari al 5% dell'energia con una quantità isocalorica di PUFA omega-6 riduca le LDL fino al 10%, con un evidente beneficio per la protezione cardiovascolare. Questo effetto, inoltre, è stato riconosciuto a livello europeo: EFSA (European Food and Safety Authority) ha infatti approvato un claim di salute (ex art. 13.5 Regolamento 1924/2006) per l'acido linoleico, riconoscendo che "aiuta a mantenere normali livelli di colesterolo nel sangue".

A corroborare questi dati, va citata anche la dimostrazione di un'associazione inversa tra livelli circolanti di acido linoleico e rischio di eventi coronarici, oltre che tra gli stessi livelli di acido linoleico e l'incidenza di diabete di tipo 2. Un aggiornamento dei dati, focalizzando il rapporto tra omega-6 e salute cardiometabolica viene dalla revisione, in forma narrativa, della letteratura disponibile fino al maggio 2019. L'articolo, co-firmato da 14 esperti italiani di diverse specialità, coordinati da Nutrition Foundation of Italy, è stato pubblicato su *Atherosclerosis*.

Alcune conclusioni pratiche

Quando noi mangiamo qualcosa, non stiamo mangiando qualcos'altro. Invece di guardare ai singoli nutrienti o alimenti, l'analisi dei modelli dietetici che approfondiremo nei prossimi mesi è emersa come un approccio promettente per esaminare la relazione tra dieta e risultati sulla salute. Nonostante i modelli dietetici siano compositivi (di solito un'assunzione maggiore di alcuni alimenti implica che si consuma meno di altri alimenti), l'analisi dei dati compositivi non è stata ancora applicata in questo contesto.

Pubblicazioni

[The effect of the Mediterranean Diet on lifespan: a treatment-effect survival analysis of a population-based prospective cohort study in Southern Italy.](#) Campanella A, Misciagna G, Mirizzi A, Caruso MG, Bonfiglio C, Aballay LR, Vas de Arruda Silveira L, Bianco A, Franco I, Sorino P, Buongiorno C, Cisternino AM, Notarnicola M, Guerra VMB, Osella AR. *Int J Epidemiol.* 2021 Mar 3;50(1):245-255. doi: 10.1093/ije/dyaa222.

[Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on New Biomarkers and Lifestyle Interventions.](#) Notarnicola M, Osella AR, Caruso MG, Pesole PL, Lippolis A, Tutino V, Bonfiglio C, De Nunzio V, Scavo MP, Mirizzi A, Franco I, Lippolis T, D'Alessandro R, Refolo MG, Messa C. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 9;22(8):3899. doi: 10.3390/ijms22083899.

Effects of weight change on all causes, digestive system and other causes mortality in Southern Italy: a competing risk approach. Campanella A, Sorino P, Bonfiglio C, Mirizzi A, Franco I, Bianco A, Misciagna G, Caruso MG, Cisternino AM, Notarnicola M, Tutino V, D'Attoma B, Osella AR. *Int J Obes (Lond)*. 2021 Sep 14. doi: 10.1038/s41366-021-00954-

8. Online ahead of print.

Physical Activity Reduction and the Worsening of Gastrointestinal Health Status during the Second COVID-19 Home Confinement in Southern Italy. Bianco A, Franco I, Osella AR, Giannelli G, Riezzo G, Bonfiglio C, Prospero L, Sorino P, Russo F. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Sep 10;18(18):9554. doi: 10.3390/ijerph18189554.

Development and validation of a neural network for NAFLD diagnosis. Sorino P, Campanella A, Bonfiglio C, Mirizzi A, Franco I, Bianco A, Caruso MG, Misciagna G, Aballay LR, Buongiorno C, Liuzzi R, Cisternino AM, Notarnicola M, Chiloiri M, Fallucchi F, Pascoschi G, Osella AR. *Sci Rep*. 2021 Oct 12;11(1):20240. doi: 10.1038/s41598-021-99400

Progetto 19/2022: “Valutazione della permeabilità intestinale nel paziente con obesità e NAFLD: impatto della dieta chetogenica sui marcatori diagnostici e prognostici di epatopatia”

Responsabile: dott. Giovanni De Pergola

Partecipanti: Francesco Russo, Giuseppe Riezzo, Laura Prospero, Michele Linsalata, Benedetta D’Attoma, Sara De Nucci, Raffaele Cozzolongo, Vito Giannuzzi

Introduzione

La barriera intestinale è un sistema complesso multistrato, composto da una barriera fisica esterna e una barriera immunologica interna. L'interazione di queste due componenti consente di mantenere una equilibrata funzione di barriera intestinale. Questa previene la perdita di acqua ed elettroliti e l'ingresso di antigeni e microrganismi, consente lo scambio di molecole tra ospite e ambiente e l'assorbimento di sostanze nutritive dalla dieta. Molti fattori possono alterare la funzione di barriera intestinale come le modifiche del microbiota intestinale, le alterazioni dello strato mucoso e i danni a carico dell'epitelio, con conseguente traslocazione del contenuto luminale negli strati interni delle cellule epiteliali intestinali. Il microbiota intestinale interagisce strettamente con l'epitelio intestinale, con il sistema immunitario e nervoso, formando l'asse batteri-intestino-cervello. La rottura dell'equilibrio finemente sintonizzato tra microbiota e ospite è chiamato disbiosi e può contribuire alla perdita di integrità epiteliale, all'aumento della permeabilità intestinale (PI) e all'indebolimento dei meccanismi di difesa. A seguito di aumento dell'PI indotto da disbiosi, batteri, prodotti e metaboliti, come LPS, possono permeare la barriera epiteliale innescando una risposta infiammatoria [1]. I difetti della barriera intestinale, che includono l'aumento della permeabilità epiteliale, promuovono il trasferimento di antigeni degli alimenti o batterici attraverso la mucosa intestinale, alterando le risposte delle cellule immuni della mucosa stessa ed inducendo infiammazione locale e sistemica. Le citochine pro-infiammatorie prodotte localmente possono anche indurre disregolazione delle *tight junctions*, coinvolte nel controllo del flusso paracellulare, inducendo un circolo vizioso locale pro-infiammatorio.

La sindrome da alterata permeabilità intestinale (*leaky gut*) che ne deriva non concerne soltanto le patologie gastrointestinali, ma si estende anche a patologie metaboliche, come per esempio la obesità. Un recente studio di Genser et al. ha dimostrato che i pazienti obesi manifestano alterazioni delle “tight junctions” a carico dell'epitelio del digiuno, che si associano ad aumento dei livelli circolanti di sostanze quali la zonulina e la LPS-binding globulin, tipico delle alterazioni della barriera intestinale, e simultanea riduzione delle concentrazioni ematiche di sostanze quali la occludina e tricellulina [2]. Non vi sono dati chiari circa la relazione tra permeabilità intestinale e composizione corporea nei soggetti obesi. Alcuni studi hanno dimostrato un'associazione tra aumentata PI e lo stato d'insulino-resistenza e le alterazioni metaboliche e cardiovascolari proprie della sindrome metabolica [3]. È interessante il dato che la resistenza all'azione dell'insulina è associata ad alterata permeabilità intestinale, anche indipendentemente dall'effetto della obesità sullo sviluppo della insulino-resistenza [4]. Per

completezza, merita di essere riferito che non tutti gli studi condotti in pazienti obesi hanno osservato alterazioni della funzione della barriera intestinale ed aumento delle endotossine circolanti. Per quanto attiene agli effetti della restrizione calorica in tale ambito, uno studio ha esaminato gli effetti di un mese di trattamento con la *very low calorie diet* (800 kcal/die), dimostrando che questa ha indotto una riduzione della PI e dello stato infiammatorio generalizzato [5].

Non vi sono invece dati disponibili circa i possibili effetti della dieta chetogenica, modello caratterizzato da una quantità di carboidrati inferiore a 50 grammi al giorno e che induce un incremento della sensibilità insulinica epatica, indipendentemente dall'effetto della dieta ipocalorica e della perdita di peso [6].

La funzione e l'integrità della barriera intestinale possono essere misurate in modi diversi. Le tecniche utilizzate per queste valutazioni variano a seconda dell'ambiente (misurazioni *in vitro* vs *in vivo*), la specie (umani o animali), le molecole marker utilizzate (ioni, carboidrati di diverse dimensioni, macromolecole e antigeni, prodotti batterici), e i compartimenti utilizzati per la misurazione delle molecole marker (sangue o urina) [7]. Ciascuno metodo è specifico per una determinata sezione del tratto gastrointestinale e misura diversi aspetti funzionali e di integrità epiteliale dell'intestino. Valutazioni *in vivo* relative alla permeabilità e alla integrità della barriera intestinale nell'uomo sono attualmente possibili utilizzando differenti biomarcatori. Uno dei dosaggi più utilizzati è il test di permeabilità Lattulosio/Mannitolo, un test quantitativo non invasivo che misura direttamente la capacità di due molecole di zucchero non metabolizzate, lattulosio e mannitolo, di permeare la mucosa intestinale. Il lattulosio, un disaccaride, è assorbito attraverso le giunzioni cellulari, mentre il mannitolo, un monosaccaride, è assorbito maggiormente attraverso le membrane delle cellule epiteliali. Una volta assorbiti, questi zuccheri vengono escreti non metabolizzati nelle urine, e la loro percentuale di escrezione è determinata mediante una metodica cromatografica. Il rapporto elevato Lattulosio/Mannitolo è un indicatore di disfunzione della permeabilità dell'intestino tenue. Altri zuccheri utilizzati per valutare la funzione di barriera intestinale includono il sucralosio e il saccarosio ed anche questi sono misurati nelle urine dopo somministrazione di una dose orale. Il grado di assorbimento del saccarosio e la sua successiva escrezione correla con la permeabilità gastroduodenale. Il sucralosio è resistente al metabolismo batterico nel colon e quindi è stato utilizzato per misurare la permeabilità del colon [8].

La barriera intestinale può essere considerata un sistema dinamico che risponde anche a segnali umorali e una pletera di differenti molecole è stata, a vario titolo, chiamata in causa. La zonulina è un peptide GI in grado di modulare la funzionalità delle tight junctions (TJs). È stato dimostrato che i livelli di zonulina sierica correlano con l'entità della compromissione della barriera mucosale. Il danno cellulare e/o delle TJs può avere un notevole impatto sulla corretta funzione della PI. Le I-FABPs (intestinal-fatty acid binding proteins) sono proteine citosoliche presenti nelle cellule epiteliali deputate al trasporto degli acidi grassi. Possono essere rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana e sono rapidamente eliminate con le urine; pertanto, esse rappresentano markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell'epitelio intestinale. Allo stesso modo, la diamina ossidasi (DAO), un enzima intracellulare con elevato livello di attività nello strato superiore dei villi intestinali, è considerata un marker sierico di integrità dell'epitelio intestinale [9].

Le alterazioni della funzione di barriera possono favorire l'ingresso dei batteri e dei loro prodotti. Il lipopolisaccaride (LPS), componente predominante nella parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è risultato in grado di influenzare la funzione di barriera. In condizioni fisiologiche, LPS non è in grado di attraversare l'epitelio integro, ma, in presenza di una ridotta integrità epiteliale, riesce a attraversare la barriera GI. [10]. Il triptofano è un aminoacido essenziale, in quanto non è sintetizzato dall'uomo, ed i batteri commensali lo catabolizzano in diversi derivati, che vengono assorbiti dall'intestino ed eliminati con le urine. Due di questi composti, indossil solfato (altrimenti noto come indicano) e 3-metil-indolo (scatolo), sono attualmente utilizzati per formulare la diagnosi di disbiosi del piccolo intestino e del colon, rispettivamente [11].

È stato suggerito che un'alterazione della barriera intestinale possa contribuire alla patogenesi della steatosi epatica non alcolica (NAFLD), patologia fortemente correlata alla obesità [3]. In particolare, la maggiore esposizione epatica ai LPS batterici, derivati dalla eccessiva crescita di batteri gram-negativi e traslocati a seguito della maggiore permeabilità intestinale, favorirebbe la NAFLD dei pazienti con obesità [12]. Non sono disponibili chiare informazioni circa la relazione tra permeabilità intestinale e sia il grado di steatosi e sia il grado di una eventuale fibrosi nei soggetti con obesità. Infine, per quanto attiene ai modelli di dieta, studi recenti suggeriscono che gli individui che hanno una minore aderenza alla dieta mediterranea presentano una maggiore permeabilità intestinale.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1:

Analizzare la influenza della obesità sulla permeabilità intestinale e sui diversi fenotipi di epatopatia (NAFLD, NASH), in termini di prevalenza e di *effect size*, in una popolazione di soggetti sani in eccesso ponderale.

Obiettivo specifico 2:

Valutare l'impatto di un intervento dietetico di tipo ipocalorico e chetogenico, della durata di 6 settimane, sulle *pathways* coinvolte nella comparsa e nella progressione delle condizioni sopracitate (alterata permeabilità intestinale e fenotipi di epatopatia) nonché sui fattori di rischio ad esse associati.

OBIETTIVO 1:

Il primo obiettivo è quello di esaminare la influenza della obesità sulla prevalenza e sulla gravità dell'alterata permeabilità intestinale e dei diversi fenotipi di malattia cronica epatica (NAFLD, NASH) in una popolazione di soggetti obesi che non assumono abitualmente alcun tipo di farmaco, al fine di escludere l'interferenza di patologie associate alla obesità sullo stato di salute della barriera intestinale e del fegato. In particolare, l'integrità della barriera intestinale e la presenza ed il grado di steatosi e fibrosi epatica saranno esaminati in relazione a parametri di tipo clinico-laboratoristico-strumentale, inclusi variabili antropometriche, la composizione corporea (mediante densitometria), parametri energetici (mediante calorimetria indiretta), la insulino-resistenza, parametri ematochimici propri della sindrome metabolica e fattori circolanti pro-infiammatori, pro-fibrotici ed antifibrotici.

OBIETTIVO 2:

Il secondo obiettivo è quello di valutare se un intervento dietetico di tipo ipocalorico e chetogenico, della durata di 6 settimane, possa influenzare le *pathways* coinvolte nella comparsa e nella progressione delle condizioni sopracitate (alterata permeabilità intestinale e fenotipi di malattia cronica epatica) nonché sui fattori di rischio secondari associati a tali esiti. Anche in questo caso saranno presi in considerazione gli stessi parametri antropometrici, della composizione corporea, energetici, ematochimici propri della sindrome metabolica e fattori circolanti pro-infiammatori, pro-fibrotici ed antifibrotici.

Metodologie e analisi statistiche:

Per quanto attiene al reclutamento dei pazienti, sono qui specificati i criteri di inclusione ed esclusione

Criteri di Inclusione:

- Eccesso ponderale, con o senza le caratteristiche che connotano la sindrome metabolica
- Steatosi epatica, con diagnosi formulata sulla base di criteri riconosciuti (fibroscan, FLI, FIB-4, NFS)
- Range di età tra i 18 e i 60 anni, ambosessi

Criteri di esclusione:

- Soggetti normopeso e sottopeso
- Presenza di qualunque patologia che possa influenzare la presenza di alterata permeabilità intestinale o steatosi, a parte le patologie che rappresentano criteri di inclusione
- Trattamento con qualsiasi presidio, farmacologico o meno, che possa influenzare la permeabilità intestinale ed il metabolismo epatico e, quindi, la presenza di steatosi
- Gravidanza o allattamento

Dati antropometrici, ematochimici, strumentali e relativi ad indagine alimentare verranno inclusi nel database. Quali **dati antropometrici** saranno esaminati il body mass index (BMI), la circonferenza addominale (waist circumference) e la circonferenza del collo (neck circumference).

Quali **parametri ematochimici** saranno determinati glicemia, insulina, emoglobina glicata, trigliceridi, colesterolo totale, HDL e LDL, uricemia, transaminasi, γ GT, creatininemia, vitamina D, proteina c-reattiva sensibile, TSH, FT3, FT4, emocromo ed i comuni parametri di routine. Sulla base di questi variabili sarà calcolato il grado di insulino-resistenza (HOMA) ed il grado di steatosi epatica (FLI) e fibrosi epatica (FIB- 4).

Aderenza alla dieta mediterranea: questo parametro e le specifiche caratteristiche della dieta mediterranea saranno valutati mediante il test PREDIMED. Inoltre, prima dell'inizio dello studio, ogni soggetto completerà un diario alimentare al fine di conoscere le sue abitudini alimentari in termini di numero di calorie, distribuzione percentuale dei macronutrienti e quantità di micronutrienti.

Valutazione della composizione corporea: la composizione corporea sarà esaminata mediante BIA e/o densitometria (DEXA)

Valutazione della steatosi e della fibrosi epatica: La presenza ed il grado di steatosi e fibrosi epatica saranno valutati mediante Fibroscan

Valutazione della integrità e permeabilità intestinale: La permeabilità GI sarà valutata somministrando una miscela di saccarosio-lattulosio-mannitolo e sucralosio, misurando il loro assorbimento gastrointestinale per mezzo dell'escrezione urinaria di tali zuccheri. Dopo il digiuno notturno e la raccolta di un campione di urina basale, i soggetti berranno 100 ml di una soluzione contenente 40 gr di saccarosio, 10 g di lattulosio, 5 g di mannitolo, 1g di sucralosio. Le urine saranno raccolte nel corso delle successive 5 ore, in contenitori in cui è aggiunto clorexidina (500 microlitri) come conservante. Il volume totale delle urine sarà misurato, e campioni da 1 ml saranno conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei diversi zuccheri nelle urine sarà effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri saranno separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati saranno espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata (Linsalata M et al. Clin Chem Lab Med. ;52(4):e61-4, 2014)

Dosaggio dei peptidi di barriera: I dosaggi della Zonulina fecale e sierica, delle I-FABP, della DAO e dell'LPS saranno effettuati utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio.

Dosaggio delle citochine infiammatorie: Saranno dosati livelli circolanti di IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio

Dosaggio di Indolo e Scatolo in urine: L'indolo è dosato con una metodica analitica colorimetrica (valori normali sono inferiori a 20mg/l) mentre lo scatolo è determinato con una metodica cromatografica con rivelazione fluorimetrica. (valori normali sono inferiori a 20ug/l) Quando i valori urinari di indolo e scatolo superano la soglia di normalità esprimono una disbiosi fermentativa (a livello del tenue) e putrefattiva (a livello del colon) rispettivamente.

Dosaggio di fattori proinfiammatori e profibrotici: a parte le citochine già citate, saranno dosati i livelli circolanti di proteina c reattiva sensibile (PCRs), IL-4 (citochina ad azione antinfiammatoria), IL1- β (citochina ad azione infiammatoria), adipochine (adiponectina, leptina, retinol binding protein-4) e fattori di crescita profibrotici (FGF-21, citocheratina-18, TGF- β) e antifibrotici (SIRT1) coinvolti nei meccanismi di infiammazione, ossidazione e fibrosi epatica.

Dieta chetogenica: Ai soggetti in studio sarà proposta una dieta ipocalorica (600-800 kcal/die) chetogenica per 6 settimane, che prevede tre fasi e pasti sostitutivi, in accordo alle Linee Guida Europee per il Management della Obesità mediante VLCKD (very low calorie ketogenic diet) [6]. Dopo tale periodo che concerne il protocollo di ricerca, la gestione dei pazienti prevede un percorso educativo dal punto di vista dello stile di vita (aderenza alla dieta mediterranea e progressivo incremento del livello di attività fisica).

Per quanto attiene alla **analisi statistica**, la ricerca si avvarrà del supporto statistico, con l'obiettivo di descrivere e comparare il set di parametri valutati prima (baseline) e dopo l'intervento dietoterapico (follow-up 6 settimane) all'interno dello stesso gruppo di soggetti reclutati. Le analisi verranno effettuate utilizzando il software statistico R (versione 3.6.0.). In un primo momento si adotteranno tecniche di analisi univariata al fine di individuare anomalie, distorsioni ed asimmetrie nei dati. Per quanto attiene alla determinazione della numerosità del campione in fase di design dello studio pilota si precisa quanto di seguito riportato: non esiste un metodo unicamente accettato di determinazione del campione in uno studio pilota. Ad esempio, secondo Connelly (2008), uno studio pilota dovrebbe avere un campione pari al 10% del campione che si intenderebbe valutare in uno studio estensivo.

Le variabili cliniche saranno riportate con media e deviazione standard o range interquartile per le variabili continue e come frequenze assolute e percentuali per le variabili categoriali. L'ipotesi di distribuzione normale per le variabili continue sarà verificata mediante tests di Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilks e QQ plot. Si procederà con lo studio delle relazioni tra variabili o confronti tra campioni appaiati (baseline versus follow-up). Per le variabili cliniche eventuali controlli saranno effettuati utilizzando il t test di Student o il test Wilcoxon in modo appropriato. Per confronti tra più di due gruppi, nelle variabili continue, si applicherà l'analisi della varianza o il t test di Kruskal-Wallis e ANOVA, come opportuno. Per le variabili categoriali i confronti verranno effettuati

utilizzando il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher. In ultima analisi, verranno elaborati dei modelli di regressione multipla o regressione logistica secondo il tipo di variabile dipendente considerata e modelli di analisi longitudinale al fine di studiare globalmente le variazioni dei parametri di interesse e le differenze fra tempi diversi. A tutti gli approcci si affiancheranno metodi di analisi grafica. Tutte le analisi saranno considerate significative per valori di $p < 0.05$.

Risultati attesi:

- 1) L'aumento del grado di obesità e del grasso addominale si associa ad un incremento della prevalenza e della gravità dell'aumento della permeabilità intestinale.
- 2) L'incremento del grado di obesità e del grasso addominale si associa ad un aumento della prevalenza e della gravità della steatosi e della fibrosi
- 3) L'incremento della permeabilità intestinale si associa ad un aumento della prevalenza e della gravità della steatosi e della fibrosi
- 4) L'aumento dei livelli circolanti dei fattori proinfiammatori e delle adipochine si associa ad una maggiore prevalenza e gravità dell'incremento della permeabilità e della steatosi epatica
- 5) L'aumento dei livelli circolanti dei fattori profibrotici si associa ad una maggiore prevalenza e gravità della fibrosi epatica
- 6) L'aumento dell'aderenza alla dieta mediterranea si associa ad una minore prevalenza e gravità sia dell'alterata permeabilità intestinale sia di steatosi e fibrosi epatica
- 7) La dieta chetogenica riduce il grado di alterazione sia della permeabilità intestinale sia della steatosi e fibrosi epatica

Innovazioni:

- 1) nessuno studio è stato sinora realizzato in soggetti obesi sani, ossia che non assumono alcun farmaco in maniera cronica, al fine di esaminare simultaneamente permeabilità intestinale e steatosi e fibrosi epatica (mediante fibroscan)
- 2) nessuno studio è stato sinora realizzato in soggetti obesi sani al fine di esaminare la relazione tra permeabilità intestinale o steatosi e fibrosi epatica (mediante fibroscan) e variabili antropometriche, composizione corporea, parametri metabolici, marcatori d'infiammazione, adipochine, fattori profibrotici ed antifibrotici
- 3) nessuno studio ha sinora esaminato gli effetti della dieta chetogenica sulla permeabilità intestinale o sulla steatosi o fibrosi epatica in soggetti obesi

Bibliografia:

- 1) Scaldaferri F et al. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2012;46:S12-17, 2012
- 2) Genser L et al. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J Pathol*, 246: 217-230, 2018
- 3) Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr*, 105: 127- 135, 2017
- 4) Mkumbuzi Li, Mfengu MMO, Engwa GA, et al. Insulin resistance is associated with gut permeability without the direct influence of obesity in young adults. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 13: 2997-3008, 2020
- 5) Ott B, Skurk T, Hastreite L, et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Reports*, 7: 11955, DOI:10.1038/s41598-017-12109-9, 2017
- 6) Muscogiuri G et al. European Guidelines for Obesity Management in adults with a very low-calorie ketogenic diet: a systematic review and meta-analysis. *Obes Facts* 2021; 14: 222-245
- 7) Galipeau HJ et al. *Neurogastroenterol. Motil*, 28:957-965, 2016
- 8) Camilleri M, *Gut*, 68:1516-1526, 2019
- 9) Schoultz I et al. *Cells* 2020, 9,1909
- 10) Linsalata M et al. *Nutrients* 2021;13,1011
- 11) Linsalata M et al. *Disease Markers* 2020; ID 2886268
- 12) Ferro D, Baratta F, Pastori D, et al. New insights into the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: gut-derived lipopolysaccharides and oxidative stress. *Nutrients*, 12, 2762; doi:10.3390/nu12092762,2020

Timeline (Gantt chart)

Work plane task	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Disegno e progettazione di studio	■	■											
Parere comitato etico		■	■										
Arruollamento		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Raccolta dati		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Inserimento dati ottenuti nel database elettronico		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Coordinamento, update e comunicazioni		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Analisi dati				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Monitoraggio, valutazione e implementazione							■	■	■	■	■	■	■
Scrittura lavori scientifici											■	■	■
Pubblicazione lavori scientifici												■	■

Progetto 20/2022: "Diet-MAP: Dieta e determinanti Metabolici nella conversione da psoriasi ad Artrite Psoriasica"

Responsabile: dott.ssa Gaetana Laselva e dott. Rodolfo Sardone

Partecipanti: Luisa Lampignano, Fabio Castellana, Roberta Zupo, Giovanni De Pergola, Maria Gabriella Caruso, Anna Maria Cisternino, Roberta Rinaldi

Introduzione:

Sintesi delle premesse teoriche dello Studio Clinico

La psoriasi è una malattia infiammatoria immunomediata e una delle malattie croniche della pelle più diffuse (0,1-12%) nel mondo. È caratterizzata da lesioni cutanee rosse, squamose e ispessite che possono verificarsi in qualsiasi sito del corpo. È una malattia multifattoriale con un'intima interazione tra suscettibilità genetica, stile di vita e ambiente. Numerose comorbidità sono riportate in letteratura, suggerendo che la psoriasi è una malattia sistemica piuttosto che una semplice malattia della pelle [1]. Le persone con psoriasi hanno un rischio aumentato di sviluppare malattie croniche intestinali e malattia celiaca. Il meccanismo esatto non è del tutto compreso, e anche se molte citochine pro- infiammatorie giocano ruoli simili nelle malattie infiammatorie immunomediate, le risposte ai trattamenti possono essere completamente diverse. I problemi di integrità nella psoriasi si trovano non solo nella pelle ma anche a livello intestinale [1]. L'aberrazione strutturale sotto forma di diminuzione della superficie nel digiuno è stata riportata nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani. Sono state segnalate anche altre aberrazioni, tra cui l'infiltrazione intestinale di linfociti. L'intolleranza al lattosio è significativamente più presente nella psoriasi ed è anche associata alla gravità psoriasica. La alterata permeabilità intestinale è stata segnalata nella psoriasi sulla base di un test di assorbimento dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) marcato con 51Cr e più recentemente attraverso un aumento dei livelli di proteine legate alla barriera come la

claudina-3 e la proteina intestinale legante gli acidi grassi (I-FABP) nel siero [1]. Sono stati riscontrati livelli più alti di calprotectina fecale, correlati alla gravità della malattia, ed erano particolarmente aumentati quando era coinvolta l'infiammazione articolare. Un certo numero di studi ha indagato il microbioma intestinale dei pazienti con psoriasi. Due studi hanno riportato un'abbondanza relativa più bassa di Bacteroidetes e più alta di Firmicutes nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani. Questi risultati suggeriscono un legame tra la psoriasi e la salute intestinale [1].

L'artrite psoriasica (AP) è una forma specifica di artrite infiammatoria associata alla psoriasi, solitamente caratterizzata dalla sieronegatività per il fattore reumatoide e da dolore, gonfiore, calore, rigidità articolare e a volte arrossamento. Questa condizione colpisce nella stessa misura uomini e donne, ma è stata rilevata sia per la prevalenza che per l'incidenza di AP una consistente variabilità geografica [2]. I dati più recenti sulla prevalenza della AP in Italia la attestano al 0.42% della popolazione adulta [3]. Circa 1 paziente su 4 con psoriasi sviluppa l'artrite psoriasica nel corso della sua vita. I pazienti con artrite psoriasica sono considerati più gravemente colpiti di quelli con psoriasi e spesso richiedono un trattamento sistemico [4]. La massima priorità per questi pazienti è quella di dare sollievo dal dolore, ma di fronteggiare le difficoltà date dalla fatigue, dal disagio psicologico. L'impatto della AP sembra essere infatti molto ampio, coprendo tutti gli aspetti della vita, ad es. sociali, fisici ed emotivi [5].

Lo stile di vita ha importanti implicazioni nella psoriasi (e quindi nella AP): il fumo e l'alcol, infatti, sono stati associati all'esacerbazione delle lesioni cutanee e anche a risposte non ottimali ai trattamenti, mentre l'obesità è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo della psoriasi. Inoltre, un'alimentazione ricca in grassi saturi e alimenti processati è stata associata alla riacutizzazione della psoriasi, mentre la riduzione del peso ha avuto un esito positivo sulla gravità della stessa [1].

Una migliore comprensione degli stili di vita e della qualità della stessa affrontati dai pazienti con AP potrebbe migliorare le traiettorie della conversione tra forma psoriasica non-artritica e artrite psoriasica [5].

Obiettivo: Indagare i pattern dietetici ed i marcatori nutrizionali ed antropometrici che influenzano la conversione in artrite psoriasica in una popolazione di pazienti con psoriasi dai 35 ai 65 anni afferenti agli ambulatori di nutrizione clinica, medicina interna dell'IRCCS e dei MMG della Casa Della Salute.

Obiettivi specifici dello studio:

1. Indagare l'influenza della dieta (assunzione di differenti quantità di specifici nutrienti) sul livello ematico di differenti biomarcatori di infiammazione e sulla composizione corporea dei pazienti con artrite psoriasica
2. Definire un pattern dietetico peculiare, in grado di modificare la sintomatologia e le traiettorie di salute della popolazione in esame
3. Creare un modello clinico multidimensionale e multi parametrico di fragilità legata agli stili di vita (nutrizione, attività fisica etc.) che riesca a predire con accuratezza la traiettoria del paziente con psoriasi ed artrite psoriasica, per definire percorsi di intervento preventivi efficaci.
4. Descrivere correlati di imaging avanzato basato su tecnologia di densitometria ossea a bassissimo potere radiogeno, per la predizione di fenomeni degenerativi della massa muscolare e tessuto osseo associata al declino funzionale nei soggetti con psoriasi ed artrite psoriasica.
5. Indagare l'interplay tra fattori nutrizionali e metabolici e fenomeni microvascolari nei modelli coroidali tramite scansioni OCT-a e misura della soglia cocleare periferica, nella degenerazione artrosica della psoriasi.
6. Valutare la permeabilità intestinale e analizzare il microbioma intestinale dei pazienti in esame.

Dati preliminari:

È stato condotto uno studio osservazionale trasversale in una coorte di 211 pazienti con AP afferenti a 5 diverse Unità di Reumatologia: Università di Napoli Federico II, Università de L'Aquila, Università Campus Bio-Medico di Roma, Università di Roma Tor Vergata e Ospedale Sant'Andrea di Roma [6]. E' stata valutata l'attività della AP tramite l'indice di attività della malattia per l'artrite psoriasica (DAPSA) e l'indice composito di attività della malattia psoriasica (CPDAI). I criteri NCEP-ACT III sono stati utilizzati per identificare i soggetti con sindrome metabolica. Un questionario validato per la valutazione dell'aderenza alla dieta mediterranea (PREDIMED) è stato somministrato tutti i soggetti arruolati. I pazienti avevano un'età mediana di 55 (48-62) anni e la durata della malattia era di 76 (36- 120) mesi. Il 27,01%

dei pazienti è stato classificato come affetto da sindrome metabolica. Un'aderenza moderata alla dieta mediterranea è stata riscontrata nel 66,35% dell'intera coorte; il 15,64% e il 18,01% dei pazienti ha mostrato un'aderenza bassa e alta al modello alimentare, rispettivamente. E' stata evidenziata un'associazione negativa tra DAPSA e aderenza alla dieta mediterranea ($B = -3,291$; 95% CI $-5,884$ a $-0,698$). DAPSA era positivamente associato con BMI ($B = 0,332$; 95% CI $0,047$ - $0,618$). I risultati di questo studio hanno evidenziato che nei pazienti con AP, livelli più alti di attività della malattia misurati dal DAPSA sono correlati a una bassa aderenza alla dieta mediterranea, suggerendo un potenziale beneficio delle proprietà antinfiammatorie di questo modello alimentare [6].

Metodologie e analisi statistiche:

Study Design e campionamento:

Il reclutamento dal sampling frame generale (popolazione tra i 35 e 65 anni del bacino di utenza IRCCS-DSS 14) verrà operato dai 9 medici di medicina generale, presenti negli ambulatori della Casa della Salute di Castellana Grotte e contestualmente negli Ambulatori di Nutrizione Clinica e Medicina interna dell'IRCCS "S.De Bellis".

I pazienti con sospetta psoriasi e sintomi algici riconducibili a forme pre-cliniche di artrite psoriasica (selezionati tramite questionario validato) verranno inviati a visita presso l'ambulatorio di reumatologia dell'IRCCS "S.de Bellis". I soggetti saranno stratificati per classi di età e sesso, con dei rapporti interclasse congrui rispetto alla popolazione generale pugliese di over 40.

La direzione dello studio verrà gestita dalla Direzione Scientifica dell'ente scrivente ed afferirà per continuità di tematiche ed obiettivi scientifici all'interno dell'ambulatorio di Reumatologia, Nutrizione Clinica, Medicina Interna e Fragilità e Multimorbilità.

Successivamente alla fase diagnostica reumatologica di primo livello tutti i soggetti inclusi verranno fisicamente valutati all'interno dei Laboratori della Fragilità e Multi-morbilità della "Casa della Salute", sita in via Valente 27, Castellana Grotte (BA), e presso il Poliambulatorio, sito presso l'IRCCS "Saverio de Bellis" ai sensi della convenzione approvata dal Direttore Generale ASL Bari con giusta delibera n. 2191 del 2019. All'interno degli stessi laboratori verrà effettuato il prelievo di sangue venoso e tutte le altre indagini strumentali.

Criteri di Inclusione: pazienti dai 35 ai 65 anni con sospetto clinico di psoriasi e sintomatologia pre-clinica di AP (confermata tramite indice DAS28) .

Criteri di Esclusione: negata volontà o incapacità funzionale e cognitiva che ne determini l'impossibilità di partecipare allo studio, lesioni neoplastiche maggiori negli ultimi 5 anni, patologie del sangue o del tessuto ematopoietico, diagnosi di AP conclamata, altra patologia autoimmune con quadro di infiammazione generale, altro dolore cronico di NDD.

Reclutamento: I pazienti verranno reclutati tramite i medici di medicina generale di Castellana Grotte e i medici degli ambulatori di Nutrizione Clinica e di Geriatria-Medicina Interna siti presso l'IRCCS Saverio de Bellis.

I soggetti verranno valutati con una singola prima visita a fini del campionamento dei campioni biologici (sangue e urine). Ogni soggetto verrà registrato e pseudo-anonimizzato all'interno di un dataset basato su tecnologia compliant a GDPR e NIST-2.

Data Inizio Arruolamento Baseline: 08/01/2022

Data termine Arruolamento Baseline: 08/01/2022

Follow up: i pazienti reclutati verranno calendarizzati con tre follow up dal baseline a 3, 6 e 12 mesi dal reclutamento

Metodi e materiali:

I pazienti che acconsentiranno a partecipare allo studio saranno sottoposti a:

- 1) Anamnesi (familiare, fisiologica, patologica remota e prossima) attraverso l'utilizzo di specifici questionari strutturati;
- 2) Indagine di Farmacoutilizzazione mediante un questionario studiato ad hoc ed integrazione dei dati di prescrizione medica attraverso il coinvolgimento dei medici di medicina generale;
- 3) Prelievo ematico per dosaggio di biomarcatori di infiammazione e di biomarcatori nutrizionali (routine ematochimica, metabolica ed ormonale). I campioni ematici prelevati saranno centrifugati ed aliquotati (se necessario) e congelati a -80° C fino al momento dell'analisi.
- 4) Tipizzazione tissutale specifica per la psoriasi (HLA CW6 e HLA B27) su campione di sangue venoso, calcolo dell'indice DAS28 (Disease Activity Score) e individuazione della sintomatologia tipica della lombalgia infiammatoria.

- 5) Valutazione della composizione corporea e della densità ossea tramite dexa, valutazione della forza muscolare attraverso hand-grip e della performance fisica attraverso test validati e sensori del movimento. Queste valutazioni sono mirate alla diagnosi di sarcopenia e osteoporosi oltre che alla creazione di un modello interattivo biomeccanico ed antropometrico della patologia;
 - 6) Valutazione nutrizionale con rilevazione di misure antropometriche ed attraverso la somministrazione di un questionario relativo alle abitudini dietetiche del soggetto (food frequency questionnaire e recall 24-h mediante software FOODCONS sviluppato dal CREA), analisi del metabolismo basale attraverso calorimetria indiretta.
 - 7) Valutazione della permeabilità intestinale e analisi del microbioma intestinale;
 - 8) Valutazione dell'arterial stiffness e della pressione arteriosa centrale per definizione dei marcatori legati alla rigidità arteriosa della AP e il loro interplay con i patterns metabolico-nutrizionali.
 - 9) Valutazione oftalmologica con esecuzione di esami strumentali standardizzati (lampada a fessura ed oftalmoscopia) e speciali per l'individuazione precoce di alterazioni retiniche e maculari (retinoscopia computerizzata e Angio-OCT) legate alla neurodegenerazione e ai disturbi del microcircolo;
- Visita Audiologica in cui i soggetti saranno sottoposti ad esame otoscopico, audiometrico ed impedenziometrico e ad un test che studia le vie e i nuclei bulbo-pontini, per valutare la presenza di un eventuale deficit uditivo sia centrale che periferico; verrà valutata anche la percezione olfattiva e gustativa tramite test soggettivi validati.
- 10) Valutazione neuropsicologica ad ampio spettro costituita da una batteria standardizzata di test, che mira ad esplorare l'aspetto neuro-cognitivo e visita psichiatrica, mirata ad indagare la presenza di alterazioni del tono dell'umore, psicosi, o altre patologie psichiatriche; particolare interesse sarà la valutazione dell'isolamento sociale; tali componenti saranno dirimenti per la definizione di un modello bio-psico sociale dell'interazione tra alterazioni dietetiche e insorgenza di sintomi della AP.

Analisi statistiche:

Le informazioni acquisite saranno quindi processate ed elaborate da personale esperto nel campo della modellazione statistica avanzata.

Il sample size è di 203 soggetti ed è stato determinato sulla base dei più recenti dati epidemiologici che attestano la prevalenza di artrite psoriasica nei pazienti con psoriasi al 25% [3] (Estimated true proportion 0.25; Desired precision 0.05; Confidence level 0.9).

I partecipanti reclutati verranno separati in due gruppi (AP si vs AP no) e verranno confrontate le loro caratteristiche sociodemografiche tramite test non parametrici o parametrici a seconda della distribuzione delle variabili in oggetto.

Successivamente verranno strutturati dei modelli di classificazione in machine learning per definire il ranking dei determinanti associati all'insorgenza di AP nei soggetti con psoriasi con particolare attenzione ai pattern dietetici. I patterns verranno strutturati con tecniche oggettive di data reduction a posteriori, con particolare riferimento a tecniche basati su reti neurali convoluzionali come il Treelet e le EPCA e EFA.

Lo scopo finale sarà quello di strutturare diete personalizzate basate sui determinanti nutrizionali protettivi per l'insorgenza della AP, e un percorso di training della performance fisico strutturato sui modelli biomeccanici personalizzati. I trattamenti verranno somministrati successivamente al termine del primo round di reclutamento (12 mesi) ad un gruppo selezionato di soggetti candidabili in funzione dei modelli patologici di conversione dedotti dall'osservazione in un periodo pilota di ulteriori 6 mesi.

I soggetti con malattie reumatiche ed un campione di soggetti di controllo verranno osservati per 3 anni, al fine di osservare la differenza di traiettoria degli outcome principali. Tali analisi saranno gestite tramite modelli regressivi tempo-evento come la regressione di Cox.

Risultati attesi:

- Arruolamento di 203 soggetti di età dai 35 ai 65 anni, appartenenti ad un'area geografica ben definita (Comune di Castellana Grotte e comuni limitrofi) in un arco temporale di 36 mesi, secondo la metodologia descritta.
- Valutazione multidisciplinare dei soggetti arruolati attraverso visite specialistiche, esami strumentali e questionari ad hoc standardizzati, secondo la metodologia descritta.
- Inserimento delle informazioni acquisite su un database dedicato, disponibile in rete.

- Analisi preliminare dei dati ed identificazione di differenti “classi di rischio” per sviluppo di comorbidità con focus su malattie metaboliche e vascolari, patologie neurodegenerative e psichiatriche, deficit di udito e vista e fragilità.
- Indagine farmaco-epidemiologica di questa peculiare coorte di pazienti.

Criteri ed indicatori per la verifica dei risultati raggiunti:

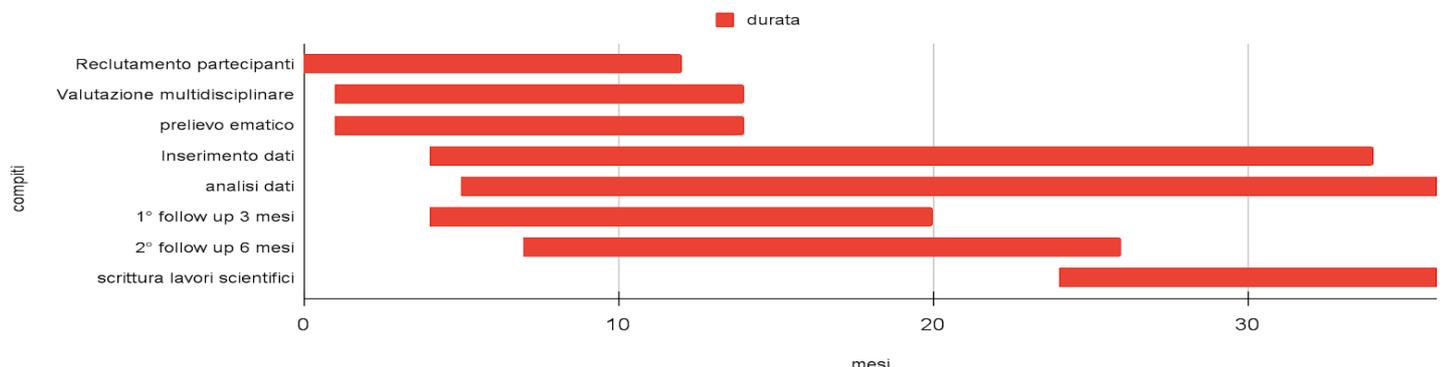
- Numero di soggetti arruolati a intervalli trimestrali con response rate non inferiore al 80% al t0 e 75% al t1 e 70% al t2 e t3 (Attrition rate minore del 20% medio).
- Report semestrali da parte dei responsabili del progetto;
- Database delle valutazioni effettuate nel progetto;
- Pubblicazioni scientifiche.

Bibliografia:

1. De Pessemier, B.; Grine, L.; Debaere, M.; Maes, A.; Paetzold, B.; Callewaert, C. Gut-Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. *Microorganisms* 2021, 9, doi:10.3390/microorganisms9020353.
2. Hanna, N.; Silverberg, O.M.; Reaume, M.; Gladman, D.; Davis, M.D.P.; Piguet, V.; Alavi, A. Incidence, Prevalence, and Predictors of Inflammatory Arthritis in Patients with Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Dermatol.* 2021, doi:10.1111/ijd.15860.
3. Salaffi, F.; De Angelis, R.; Grassi, W.; MARche Pain Prevalence; INvestigation Group (MAPPING) study Prevalence of Musculoskeletal Conditions in an Italian Population Sample: Results of a Regional Community-Based Study. I. The MAPPING Study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2005, 23, 819–828.
4. Vaengebjer, S.; Skov, L.; Egeberg, A.; Loft, N.D. Prevalence, Incidence, and Risk of Cancer in Patients With Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Dermatol.* 2020, 156, 421–429, doi:10.1001/jamadermatol.2020.0024.
5. Gudu, T.; Gossec, L. Quality of Life in Psoriatic Arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2018, 14, 405–417, doi:10.1080/1744666X.2018.1468252.
6. Caso, F.; Navarini, L.; Carubbi, F.; Picchianti-Diamanti, A.; Chimenti, M.S.; Tasso, M.; Currado, D.; Ruscitti, P.; Ciccozzi, M.; Annarumma, A.; et al. Mediterranean Diet and Psoriatic Arthritis Activity: A Multicenter Cross-Sectional Study. *Rheumatology International* 2020, 40, 951–958.

Timeline (Gantt chart)

Gantt chart



Castellana Grotte, 31/05/2023

Il Direttore Scientifico
IRCCS “Saverio de Bellis”
Prof. Gianluigi Giannelli