

RELAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE

ANNO 2024

Direzione Scientifica

*istituto nazionale
di gastroenterologia*

de Bellis - Castellana Grotte



IRCCS



SOMMARIO

LINEA DI RICERCA 1	4
1. VALIDAZIONE IN PAZIENTI DI TARGET TERAPEUTICI RESPONSABILI DELLA CHEMIO-RESISTENZA NEI TUMORI GASTROINTESTINALI.....	5
2. UP-REGOLAZIONE DELLE PROTEINA GASDERMINA E MEDIANTE INIBIZIONE DEL RILASCIO ESOSOMIALE COME NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NELL'AMBITO DELLE PATOLOGIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO.....	13
3. CARATTERIZZAZIONE DI ACIDI NUCLEICI PER IDENTIFICARE MARCATORI PROGNOSTICI E TARGET TERAPEUTICI NEI TUMORI GASTROINTESTINALI.....	24
4. RUOLO DI SMYD3 NELLA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEL CANCRO DEL COLON RETTO.....	30
5. IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POTENZIALI TARGET MOLECOLARI PER CONTRASTARE LA FARMACORESISTENZA NEL TRATTAMENTO DEI CARCINOMI DEL TRATTO GASTROENTERICO.....	56
6. DISBIOSI INTESTINALE E CANCRO DEL COLON-RETTO: IL POLIFOSFATO INORGANICO COME NUOVA ED INASPETTATA MOLECOLA CARDINE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE. STUDIO IN VITRO E IN VIVO.....	70
7. MECCANISMI DI PROGRESSIONE DELLE METASTASI AL FEGATO DERIVANTI DA TUMORE AL COLON-RETTO.....	80
8. NANOPARTICELLE BIOMIMETICHE COME NUOVA STRATEGIA PER IL TRASPORTO DI FARMACI NELLE TERAPIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO.....	91
9. NOTCH ED INFLAMMASOMA NELLA PATOGENESI DEL.....	105
COLANGIOCARCINOMA.....	105
11. LA CLAUDINA 18.2: POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO PER ZOLBETUXIMAB NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO DUTTALE.....	122
12. RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA A TERAPIE SISTEMICHE NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA GASTRICO.....	125
13. STUDIO DEL NOTCH SIGNALING PATHWAY NELLA POLARIZZAZIONE E FUNZIONE DEI MACROFAGI ASSOCIATI AL TUMORE (TAM).....	151
16. AZIONE PROTETTIVA DI UN MIX COMPLESSO DI PROBIOTICI SUL DANNO INTESTINALE INDOTTO DA MICROPLASTICHE E NANOPLASTICHE.....	161
LINEA DI RICERCA 2	169
10. STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI MEDIATI DAI MIRNAS PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE PATOLOGIE DEL TRATTO GASTROENTERICO	170
14. UTILIZZO DEI BIOMARCATORI EMATICI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELL'EPATOCARCINOMA (HCC).....	181
15. EFFETTI DEL CONSUMO DI ARANCE SUL METABOLISMO GLUCIDICO E LIPIDICO IN SOGGETTI CON MAFLD: STUDIO IN VITRO E TRIAL CLINICO.....	189
17. I CANALI IONICI E LE ACQUAPORINE (AQP) COME TARGET DIAGNOSTICI E	



TERAPEUTICI NEI DISTURBI FUNZIONALI GASTROINTESTINALI (FGID) E NELL'INFIAMMAZIONE DI BASSO GRADO.....	198
20. ANALISI DI FARMACO-UTILIZZAZIONE DEI FARMACI BIOLOGICI PER LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI FINALIZZATO ALL'INDIVIDUAZIONE DELLE CLASSI DI PAZIENTI DA SOTTOPORRE A MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEL FARMACO (TDM).....	208
22. EFFETTI DELL'ATTIVITÀ INDOOR SULL'INTEGRITÀ E FUNZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE DI PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E FIBROMIALGIA.....	215
LINEA DI RICERCA 3.....	224
18. EFFICACIA DELL'ESERCIZIO FISICO ABBINATO ALLA DIETA MEDITERRANEA NELLE PATOLOGIE GASTROINTESTINALI E OBESITÀ E RIPERCUSSIONI SULLA BARRIERA INTESTINALE E LO STATO DI FLOGOSI: IDENTIFICAZIONE DELL'ESERCIZIO OTTIMALE.....	225
19. STUDIO PRECLINICO E CLINICO SULLA VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE NEL PAZIENTE CON OBESITÀ E MASLD. IMPATTO DELLA DIETA CHETOGENICA SUI MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI VEICOLATI DALLE VESICOLE EXTRACELLULARI NELLE EPATOPATIE LEGATE ALLA MASLD.....	233
21. CONFRONTO TRA DIGIUNO INTERMITTENTE 14/10 E DIETA MEDITERRANEA DEL SUD ITALIA NELLA VARIAZIONE DELLO SCORE DI NAFLD, DEGLI INDICI INFIAMMATORI E DEL MICROBIOTA INTESTINALE.....	240
23. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI AGENTI SENOLITICI NATURALI IN MODELLI SPERIMENTALI DI TUMORI GASTROENTEROLOGICI.....	253
24. CAMBIAMENTI NEL PROFILO LIPIDOMICO, IMMUNOLOGICO E DEI MICRORNA CIRCOLANTI IN PAZIENTI CON PATOLOGIA EPATO-BILIARE, AFFETTI DA OBESITÀ PATOLOGICA SOTTOPOSTI AD UN INTERVENTO DIETETICO E/O AD INTERVENTO DI CHIRURGIA BARIATRICA.....	261



LINEA DI RICERCA 1

INNOVAZIONE IN DIAGNOSTICA E TERAPIA DELLE NEOPLASIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

Responsabile Scientifico: Gianluigi Giannelli

Descrizione

Individuare un processo neoplastico il più precocemente possibile è una esigenza sia del medico quanto del paziente al fine di poter sempre avvantaggiarsi della terapia più efficace. In un IRCCS, questo approccio sposa perfettamente l'anima assistenziale e quella della ricerca al fine di migliorare la qualità del servizio erogato. Al tempo stesso, lo studio di nuovi approcci terapeutici mediante l'impiego di vari modelli sperimentali preclinici, rappresenta un'altra grande frontiera nel campo delle malattie neoplastiche.

Obiettivi

Ingegnerizzare e validare clinicamente un percorso diagnostico e terapeutico più accurato e performante di quello attualmente disponibile utilizzato come "gold standard". L'ottimizzazione della accuratezza diagnostica per la diagnosi precoce ma anche per guidare il governo clinico del paziente con neoplasia dell'apparato gastroenterico rappresenta uno degli obiettivi, al pari dell'identificazione di nuovi bersagli molecolari che possano essere usati come biomarcatori o come bersagli molecolari per disegnare nuovi approcci terapeutici.



TITOLO DEL PROGETTO

1. VALIDAZIONE IN PAZIENTI DI TARGET TERAPEUTICI RESPONSABILI DELLA CHEMIO-RESISTENZA NEI TUMORI GASTROINTESTINALI

2786667

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Tumor Microenvironment - TME

Responsabile: Valentina Grossi

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: SMYD3, chemioresistenza, danno al DNA, modelli 3D

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

INTRODUZIONE

In Italia i tumori del colon-retto (CCR) sono in assoluto i più frequenti (13% dei nuovi tumori diagnosticati all'anno in entrambi i sessi); in particolare, rappresentano la terza neoplasia più frequente negli uomini (dopo i tumori della prostata e del polmone) e la seconda nelle donne (dopo il tumore della mammella). Inoltre, il 25% dei pazienti va incontro a recidiva anche dopo resezione del tratto interessato dalla neoplasia. Attualmente, il principale trattamento terapeutico è la chemioterapia, capace di distruggere le cellule in attiva replicazione mediante il danneggiamento del DNA. Durante la fase S/G2, le rotture a doppio filamento (Double strand breaks: DSBs) vengono riparate per Ricombinazione Omologa (Homologous Recombination: HR). 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 [1-5]. Tant'è vero che oggi alcuni trials clinici prevedono



la caratterizzazione delle mutazioni dei geni dell'HR e dello status dell'HRD (homologous recombination deficiency) score per valutare la resistenza alle terapie a base di derivati del platino.

In particolare, quindi, inibire i modificatori epigenetici può portare alla ri-sensibilizzazione dei tumori alla chemioterapia, data la reversibilità delle alterazioni epigenetiche.

SMYD3 è una proteina altamente espressa in circa un terzo dei pazienti con CCR [6-10]. Nonostante sia un'istone H3K4 metil-transferasi, vari studi suggeriscono che la sua attività oncogenica possa anche essere mediata da interazioni funzionali con proteine non istoniche. Quindi, al fine di comprendere al meglio il ruolo di SMYD3 nella chemioresistenza è di fondamentale importanza l'identificazione di nuovi interattori.

Recentemente è stato dimostrato come SMYD3 abbia un ruolo fondamentale nel riparo del DSB con la formazione dei complessi dell'HR, in esperimenti con neocarziostatina (che induce DSB) e inibitore di SMYD3 [11, 12], confermando che alti livelli proteici di SMYD3 nelle cellule tumorali siano richiesti per la riparazione del DNA e siano responsabili della chemioresistenza. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato un lavoro, i cui dati dimostrano 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 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 [13].

Interessante è proprio il fatto che il suo ruolo nel complesso dell'HR rende SMYD3 un valido bersaglio terapeutico. Questa proposta progettuale è volta a valutare in una coorte di pazienti che beneficiano della chemioterapia (neo-adiuvante e adjuvante) l'espressione di SMYD3 e il suo coinvolgimento nei meccanismi di resistenza. Verranno utilizzati anche modelli preclinici 3D derivanti da pazienti per valutare l'efficacia degli inibitori di SMYD3, combinati con chemioterapici attualmente in uso nelle terapie del CRC.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1

Studio dell'espressione tissutale di SMYD3 nei tumori gastroenterologici di pazienti sottoposti a terapia neo-adiuvante (tumori del retto localmente avanzati, carcinomi



gastrici avanzati) e recidivati dopo terapia adiuvante. I campioni saranno sottoposti ad analisi dell'espressione genica a livello tissutale (trascrittomica spaziale) su tessuti fissati in formalina (FFPE) e sottoposti a sequenziamento NGS.

Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica valuteremo per prima cosa l'espressione tissutale di SMYD3 in una coorte di pazienti sottoposti a terapia neo-adiuvante (tumori del retto localmente avanzati, carcinomi gastrici avanzati) e recidivati dopo terapia adiuvante classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati che mostreranno elevati livelli di espressione di SMYD3 verranno avviati ad analisi di trascrittomica spaziale (10x Genomics) e sequenziamento NGS (in service). Attraverso la trascrittomica spaziale si potrà riuscire ad individuare centinaia o migliaia di trascritti su un singolo tessuto, andando a localizzarli in modo preciso in base al loro contesto biologico. Grazie a questa tecnologia sarà possibile studiare l'eterogeneità dell'espressione genica di diverse regioni di uno stesso tessuto, o di specifiche popolazioni cellulari presenti, o ancora di distinguere i profili di espressione di zone di tessuto interessate da processi patologici (tumori) rispetto a zone che appaiono normali o rispetto a tessuti di controllo.

Questo ci permetterà di individuare realmente i pazienti eligibili per una terapia chemio-sensibilizzante con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale.

Obiettivo specifico 2

Validazione dell'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti affetti dai tumori sopraindicati con lo scopo di sensibilizzare i tumori chemio resistenti con gli inibitori di SMYD3.

L'importanza del dato di espressione tissutale nel contesto tumorale in risposta e/o resistenza alla terapia ci permetterà di traslare l'idea sperimentale che vede SMYD3 come uno degli attori responsabili della chemioresistenza delle cellule tumorali e validare l'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti sottoposti a terapia neo-adiuvante (tumori del retto localmente avanzati, carcinomi gastrici avanzati) e recidivati dopo terapia adiuvante.

Pezzi operatori freschi di pazienti affetti da neoplasie gastrointestinali sopraelencate, verranno processati per la coltura in vitro al fine di ottenere organoidi che ricapitolino le caratteristiche funzionali e strutturali del tessuto d'origine.

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. Sulla base delle analisi del profilo trascrittomico dei campioni a



livello tissutale, gli organoidi tumorali verranno trattati secondo protocolli personalizzati con inibitori di SMYD3 in combinazione con CHT convenzionale. Testeremo l'efficacia di un nuovo inibitore EM127 recentemente pubblicato (PMID: 36116234) e brevettato (n. 102022000021138). Il nuovo inibitore covalente di SMYD3, può agire con maggiore potenza e selettività rispetto agli inibitori SMYD3 di prima generazione e può esercitare effetti anti-tumorali di lunga durata a causa dell'inattivazione completa e irreversibile dell'attività enzimatica. I risultati in vitro hanno mostrato che il nuovo composto EM127 ha indotto una significativa riduzione della crescita delle cellule tumorali del CCR in modo molto più efficiente degli inibitori commercialmente disponibili, BCI-121 e EPZ031686.

La validazione dell'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti affetti dai tumori sopraindicati ha lo scopo di sensibilizzare i tumori chemio-resistenti con gli inibitori di SMYD3.

Obiettivo specifico 3

Caratterizzazione molecolare degli effetti della manipolazione di SMYD3 sui modelli 3D ottenuti dai pazienti che sono stati criopreservati in OCT e/o fissati in formalina (FFPE) prima e dopo trattamento farmacologico (chemioterapia+inibitore di SMYD3). I campioni verranno sottoposti ad analisi dell'espressione genica a livello tissutale (trascrittomica spaziale) e sequenziamento NGS.

Una parte degli organoidi tumorali ottenuti da pazienti indicati sopra e sottoposti a trattamenti secondo protocolli personalizzati con inibitori di SMYD3 in combinazione con CHT convenzionale (obiettivo 2) verranno criopreservati in OCT e/o fissati in formalina (FFPE). Questi campioni verranno sottoposti ad analisi dell'espressione genica a livello tissutale (trascrittomica spaziale, 10x Genomics) e sequenziamento NGS (in service). Verrà inoltre valutato il profilo proteomico in termini di RPPA (reverse phase protein array) e la localizzazione tissutale di biomarcatori di resistenza ai chemioterapici. La tecnologia RPPA è una piattaforma di analisi molecolare basata sull'utilizzo di anticorpi specifici e sfrutta i principi dell'amplificazione del segnale utilizzati nella diagnostica clinica, per misurare i livelli di centinaia di proteine e le loro modificazioni post-traduzionali (e.g. fosfo proteine). Questo ci permetterà di studiare l'effetto dell'inibizione di SMYD3 e della combinazione con i chemioterapici sulla rete di trasduzione del segnale intracellulare.

DATI PRELIMINARI

Dato che SMYD3 ha un ruolo fondamentale nel riparo del DSB con la formazione dei complessi dell' HR, come dimostrato da esperimenti con neocarzinostatina (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.

In collaborazione con l'unità di Chirurgia che ha seguito i pazienti nel decorso clinico abbiamo selezionato quelli che possiedono i requisiti richiesti secondo la proposta progettuale (pazienti con tumori del retto localmente avanzati e carcinomi gastrici avanzati sottoposti a terapia neo-adiuvante).

Abbiamo poi valutato l'espressione tissutale di SMYD3 nei tessuti di 10 pazienti, classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati mostrano elevati livelli di espressione di SMYD3 nelle area neoplastiche proliferativamente attive residue post terapia neo adjuvante (figura 1). Il risultato ottenuto ha un significato maggiore dal punto di vista clinico/traslazionale, visto che il target farmacologico è rappresentato proprio dalla proteina SMYD3. 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).

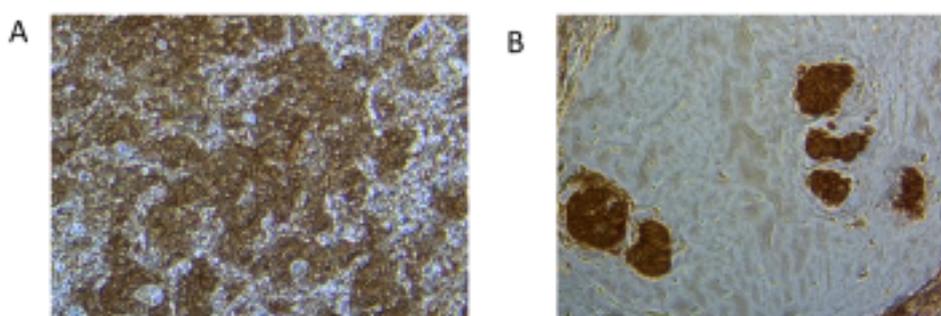


Figura 1. Analisi rappresentativa immunoistochimica di SMYD3 in metastasi epatica metacrona del carcinoma del retto (A) e residui di cellule neoplastiche in un carcinoma del retto medio dopo neo adjuvante (B).

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Obiettivo 1. La valutazione dell'espressione di SMYD3 sarà effettuata con metodica immunoistochimica. 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.



Trascrittomica spaziale, tecnologia VISIUM. Basata su una tecnologia brevettata di deposizione di oligo nucleotidi su vetrini di microscopia, permette l'analisi del profilo trascrittomico di un campione a livello tissutale (kit 10x Genomics). La caratterizzazione molecolare dei tessuti tumorali, verrà effettuata mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) (service Illumina).

Obiettivo 2. Per generare organoidi normali e cancerosi derivanti da pazienti i tessuti disgregati saranno processati con un protocollo specifico (stemcell technologies Organoids kit) che permette l'isolamento e la preservazione delle cellule staminali.

Verranno testati in vitro gli inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale 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. Una parte degli organoidi dei pazienti ottenuti da pezzi operatori freschi dei tumori sopracitati e trattati con le varie combinazioni farmacologiche verranno inclusi in OCT e/o paraffina per le analisi di Trascrittomica spaziale, tecnologia VISIUM (kit 10x Genomics) e sequenziamento NGS (service Illumina). L'analisi di RPPA (reverse phase protein array) verrà condotta in service per gli stessi campioni presso il Servizio Tecnico Scientifico Grandi Strumentazioni e Core Facilities dell'Istituto Superiore di Sanità.

RISULTATI ATTESI

SMYD3 può essere considerata il “guardiano del genoma” delle cellule tumorali, in grado di preservarne l'integrità mediante la regolazione del ciclo cellulare e della risposta al danno al DNA a doppio filamento da parte dei chemioterapici. L'attivazione dei sistemi di riparo del DNA a doppio filamento è uno dei principali meccanismi che promuovono la chemioresistenza, pertanto terapie mirate che agiscono su di essa risultano essere una potenziale strategia terapeutica. La nostra ipotesi è che SMYD3 possa fungere da bersaglio molecolare al fine di contrastare la resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia tradizionale.

Il nostro piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione del coinvolgimento di SMYD3 nella chemio-resistenza. Quindi, ci permetterà di valutare come attraverso l'inibizione di SMYD3 sarà possibile migliorare gli effetti della chemioterapia.



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 il ruolo di SMYD3 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, 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 (di cui uno, EM127 è già oggetto di brevettazione), 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Husain A, et al. BRCA1 Up-Regulation Is Associated with Repair-mediated Resistance to m Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 1998;58:1120-1123.
2. Hine CM, et al. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:20810-20815.
3. Ohnishi T, et al. In Vitro and in Vivo Potentiation of Radiosensitivity of Malignant Gliomas by Antisense Inhibition of the RAD51 Gene *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:319-324.
4. Carreira A, et al. The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell.* 2009;136:1032-43.
5. Venkitaraman AR, et al. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 2002; 108(2):171-82.
6. Cock-Rada AM, et al. SMYD3 Promotes Cancer Invasion by Epigenetic Upregulation of the Metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res* 2012;72:810–20.
7. Luo XG, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters.* 2014;344:129–37.
8. Peserico A, et al., A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol.* 2015. 230(10):2447-2460.



9. Kim H, et al. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:19867–77.
10. Mitchell LH, Boriack-Sjodin PA, Smith S, Thomenius M, Rioux N, Munchhof M, et al. Novel Oxindole Sulfonamides and Sulfamides: EPZ031686, the First Orally Bioavailable Small Molecule SMYD3 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Aug 27;7(2):134-8.
11. Chen YJ, et al. SMYD3 Promotes Homologous Recombination via Regulation of H3K4- mediated Gene Expression. *Scientific Reports*. 2017; 7: 3842.
12. Sanese P, et al. Targeting SMYD3 to Sensitize Homologous Recombination-Proficient Tumors to PARP-Mediated Synthetic Lethality. *Science*. 2020; 23,101604.
13. Telly ML and Ford JM. PARP inhibitors in breast cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol*. 2010; 8, 629-635.

TIMELINE

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

Obiettivo 2: questi esperimenti inizieranno nel secondo semestre del primo anno e verranno completati nel secondo anno del progetto

Obiettivo 3: questi esperimenti verranno condotti nel terzo anno del progetto.



TITOLO DEL PROGETTO

2. UP-REGOLAZIONE DELLE PROTEINA GASDERMINA E MEDIANTE INIBIZIONE DEL RILASCIO ESOSOMIALE COME NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NELL'AMBITO DELLE PATOLOGIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO

2786673

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Basic Mechanisms of Cancer Therapeutics - BMCT

Responsabile: Roberto Negro

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: Ricerca preclinica traslazionale / cancerologia sperimentale

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma più comune di tumore al fegato. L'infezione da virus dell'epatite B e dell'epatite C sono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di HCC (1), nonostante la steatoepatite non alcolica associata alla sindrome metabolica o al diabete mellito costituisca un fattore di rischio abbastanza frequente nei Paesi Occidentali (2).

Nell'ultimo decennio c'è stato un miglioramento nella comprensione della patogenesi molecolare di HCC; le analisi genomiche hanno fornito informazioni riguardo i principali responsabili dell'iniziazione e della progressione di HCC. Ogni HCC ha una media di 40 aberrazioni genomiche e di queste alcune sono considerate driver (3). L'alterazione del microambiente è una caratteristica chiave del cancro ed è noto per essere coinvolto in tutte le fasi di progressione del tumore: dalla trasformazione iniziale fino alle fasi di



invasione e metastasi (4,5). Poiché il carcinoma epatocellulare è strettamente associato a un fenomeno infiammatorio, il microambiente immunitario ha un ruolo fondamentale nella patogenesi di questa malattia (6).

Il microambiente dell'HCC, come quello di altri tumori solidi, è un ambiente complesso, popolato da diversi tipi di cellule, diverse da quelle tumorali, che interagiscono tra loro in diversi modi (contatto diretto cellula-cellula, fattori di crescita secreti, citochine e chemochine) (7).

Tra le molecole maggiormente studiate facenti parte del microambiente del carcinoma epatocellulare, c'è il TGF β , ossia una citochina multifunzionale che ha guadagnato un enorme interesse negli ultimi decenni, a causa del suo coinvolgimento in numerosi processi fisiologici e patologici (8,9).

In particolar modo, il TGF β mostra una forte e diffusa over-espressione nel fegato fibrotico e nell'HCC, rispetto al fegato normale, dove la sua presenza è praticamente impercettibile (10,11). Inoltre, ha un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione di numerosi geni in cellule normali e tumorali (12).

La piroptosi, un tipo di morte cellulare programmata indotta dalla gasdermina svolge un ruolo importante in molte malattie ereditarie, (auto)infiammatorie e nel cancro.

Le gasdermine sono una famiglia di proteine effettrici formanti pori recentemente identificate che causano la permeabilizzazione della membrana e la piroptosi. Le gasdermine sono costituite da un dominio citotossico N-terminale e un dominio repressore C-terminale, collegati da un linker flessibile. Il taglio proteolitico tra questi due domini, libera il dominio citotossico, consentendogli di inserirsi nelle membrane cellulari e di formare grandi pori oligomerici con conseguente alterazione dell'omeostasi ionica e morte cellulare (13). Una serie di studi ha evidenziato che l'espressione della GSDME, una proteina facente parte della famiglia delle gasdermine, è più bassa nelle cellule cancerose di diversi tumori gastroenterici (ad esempio, carcinoma gastrico e carcinoma coloretale), rispetto alle cellule normali, a causa dell'inattivazione epigenetica causata dalla metilazione del promotore di questa proteina, ricco di CpG Island (14). La metilazione silenzia il gene della GSDME, fornendo vantaggi per la crescita delle cellule tumorali (15). Per questa ragione abbiamo posto come obiettivi:

1. valutare l'espressione della GSDME in cellule e tessuti di epatocarcinoma rispetto alla controparte normale, per valutare una possibile strategia terapeutica che ne permetta l'espressione, a svantaggio delle cellule tumorali.



2. valutare se la sua eventuale mancata espressione nella controparte tumorale, è dovuta all'azione regolatrice esercitata dal TGF β , presente abbondantemente nel microambiente tumorale di HCC, attraverso metilazione del promotore o altri meccanismi, seguito da uno studio sul meccanismo molecolare, al fine di realizzare nuove potenziali strategie terapeutiche.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

L'obiettivo principale di questo studio consiste dapprima nella conversione fenotipica e genotipica, partendo da una condizione di totale, o quasi totale, assenza intracellulare della proteina pro-apoptotica GSDME, caratteristica questa, di cellule neoplastiche del tratto gastro-enterico, ad una condizione di elevata espressione citoplasmatica. Questo studio proseguirà con quello per la caratterizzazione del pathway coinvolto al fine di attivare le proprietà citotossiche e pro-apoptotiche della GSDME con conseguente eradicazione delle cellule tumorali.

La nostra ipotesi di lavoro è schematicamente riassunta nei seguenti obiettivi specifici:

1. Screening trascrizionale e proteico per la GSDME di linee cellulari tumorali, fibroblasti associati al tumore e cellule primarie di HCC in rapporto alla loro controparte wild-type (linee cellulari) e peri-tumorali (fibroblasti non tumorali, e cellule primarie).
2. Studio del meccanismo molecolare attraverso il quale le cellule tumorali riescono a ridurre i livelli citosolici della GSDME; in dettaglio, dati preliminari dimostrano come le stesse cellule tumorali (linee cellulari e primary cells) secernano GSDME attraverso la fuoriuscita di esosomi, la quale, a sua volta, è drasticamente inibita da TGF β . Pertanto, l'inibizione della biogenesi/rilascio esosomiale, da parte di farmaci già conosciuti (GW4869 o Manumicina), che mimino l'azione del TGF β , consentirebbe una strategia di accumulo di GSDME all'interno della cellula. Tali esperimenti verranno condotti in vitro su linee cellulari e cellule primarie (fibroblasti e HCC).
3. Attivazione del pathway della GSDME con conseguente morte cellulare in vitro ed in vivo. Gli esperimenti in vitro verranno effettuati su cellule di HCC (linee cellulari e cellule primarie), utilizzando i classici inibitori della biogenesi/secrezione degli esosomi, affiancati all'utilizzo dell'attivatore della caspasi-3, raptinal, che a sua volta interviene sulla GSDME attivandone le sue funzioni pro-apoptotiche. La parte in vivo prevede l'utilizzo di modelli murini di HCC, in particolare topi con tumori ectopici di HCC (mediante injection sottocute di cellule tumorali quali HLC19 e PLC/PRF/5) ai quali

verrà somministrata la combinazione dei due farmaci in questione (GW4859 + raptinal), e per i quali verrà studiato l'andamento del tumore dal punto di vista morfologico.

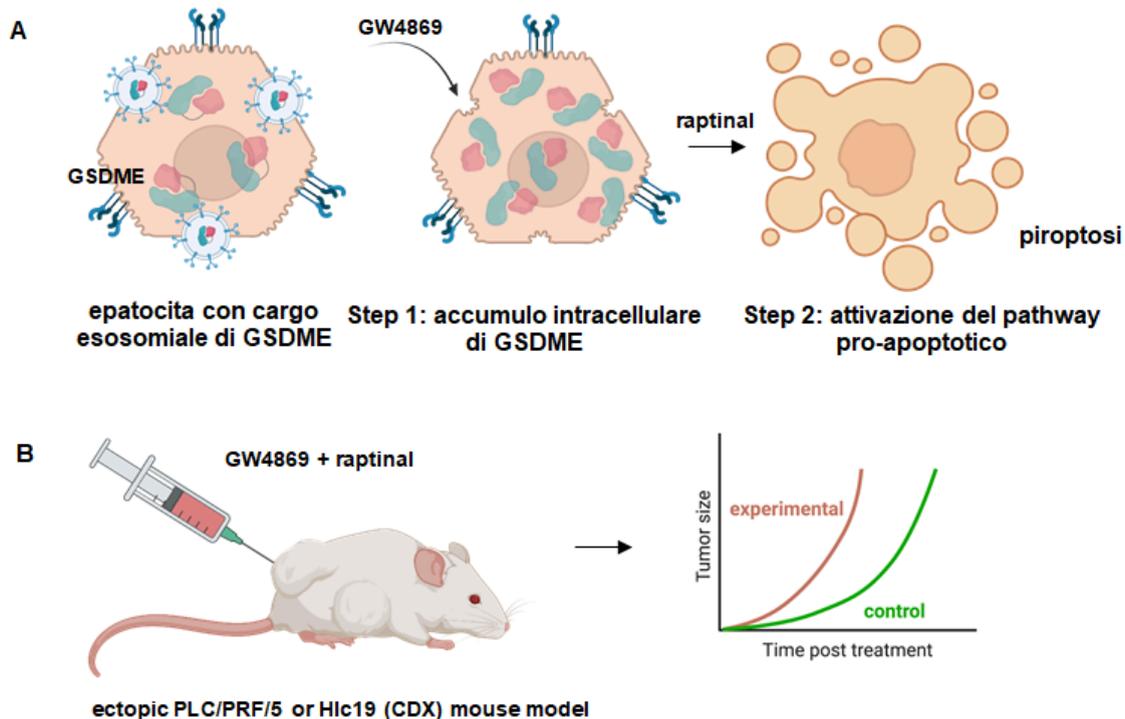


Figura 1: Rappresentazione schematica degli obiettivi specifici in vitro (A) ed in vivo (B).

DATI PRELIMINARI

Sono stati eseguiti studi di screening preliminari dai quali si evince che cellule tumorali di HCC e altri tumori del tratto gastro-enterico (linee cellulari, nonché cellule primarie) possiedono bassi livelli citoplasmatici di GSDME rispetto alla loro controparte normale. Essendo GSDME una proteina altamente pro-apoptotica, è plausibile ritenere che le stesse cellule tumorali utilizzino come strategia di sopravvivenza un abbassamento, totale o quasi totale, dei livelli citosolici della proteina.

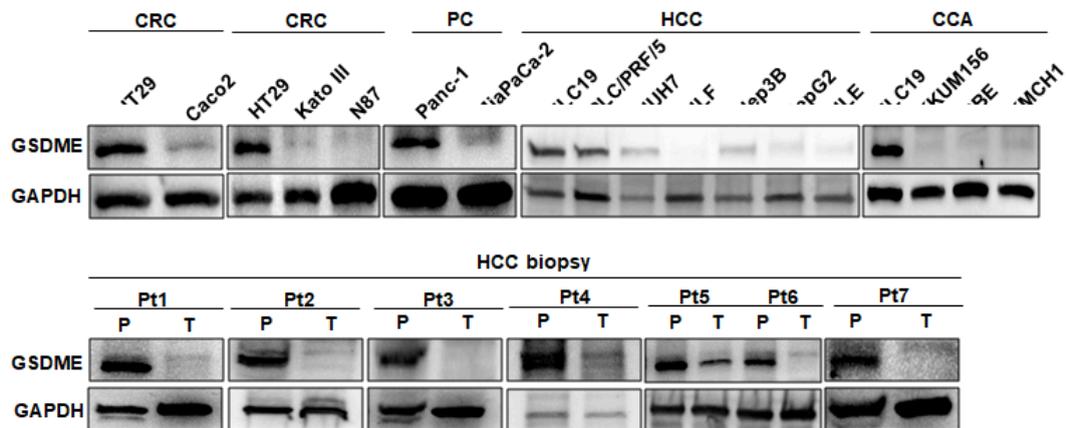


Figura 2: Analisi di Western Blot per valutare l'espressione di GSDME in line cellule tumorali di vari tumori del tratto gastro-enterico (in alto) e in cellule primarie provenienti da campioni biotici di HCC (in basso). CRC = colorectal cancer, PC = pancreatic cancer, HCC = hepatocarcinoma, CCA = cholangiocarcinoma.

Si è passati quindi al ruolo del TGFβ sulla frazione citosolica ed esosomiale di GSDME.

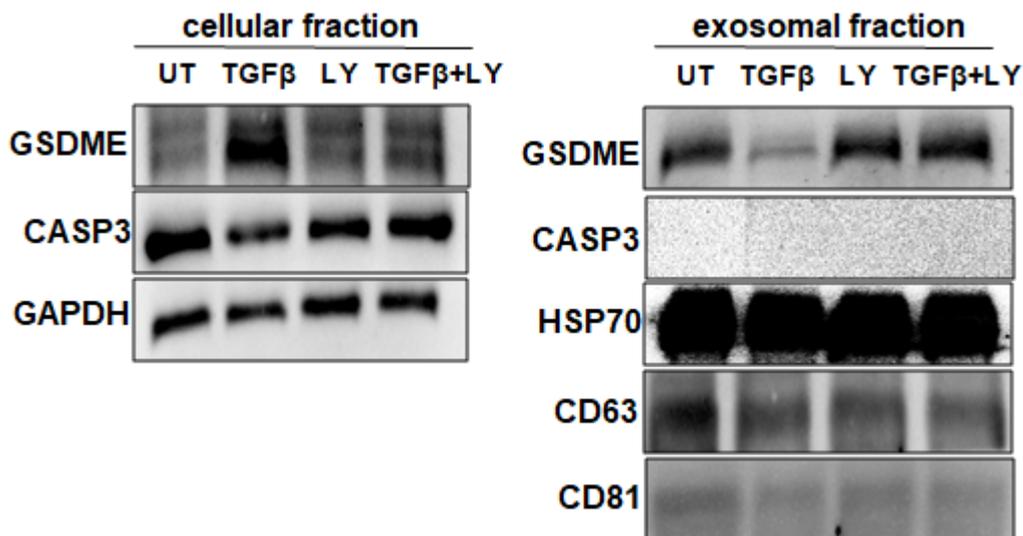


Figura 3: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con TGF. Gli estratti proteici derivano da cellule e da esosomi derivanti dalle stesse.

Tali risultati confermano un coinvolgimento diretto del TGFβ sui livelli di GSDME; in dettaglio si vede come il trattamento con TGFβ aumenti i livelli di GSDME intracitoplasmatici riducendo la sua concentrazione negli esosomi, risultando pertanto fungere da agente pro-apoptotico. Tuttavia, poiché a causa della sua pleiotropicità non è plausibile prevedere un suo utilizzo in terapia anti-tumorale, abbiamo effettuato

esperimenti successivi utilizzando inibitori della biogenesi/rilascio esosomiale, quali GW4869 e Manumicina.

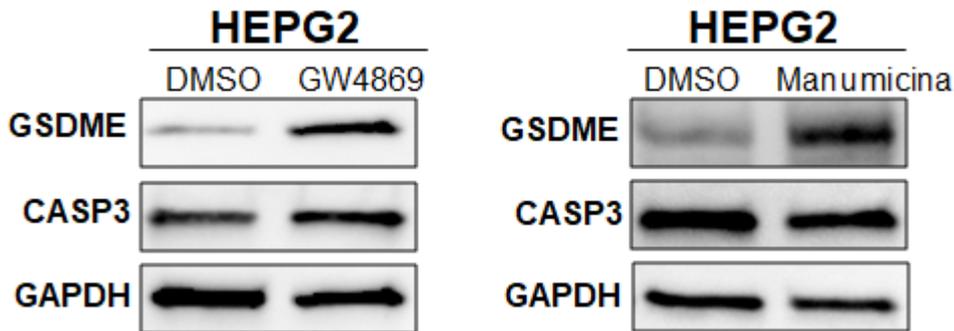


Figura 4: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con due diversi inibitori della biogenesi degli esosomi: GW4869 e Manumicina.

In tal modo riusciamo a mimare l'azione del TGFβ bloccando la GSDME all'interno delle cellule. Il passo successivo consiste nell'attivare la GSDME al fine di promuovere la piroptosi delle cellule tumorali.

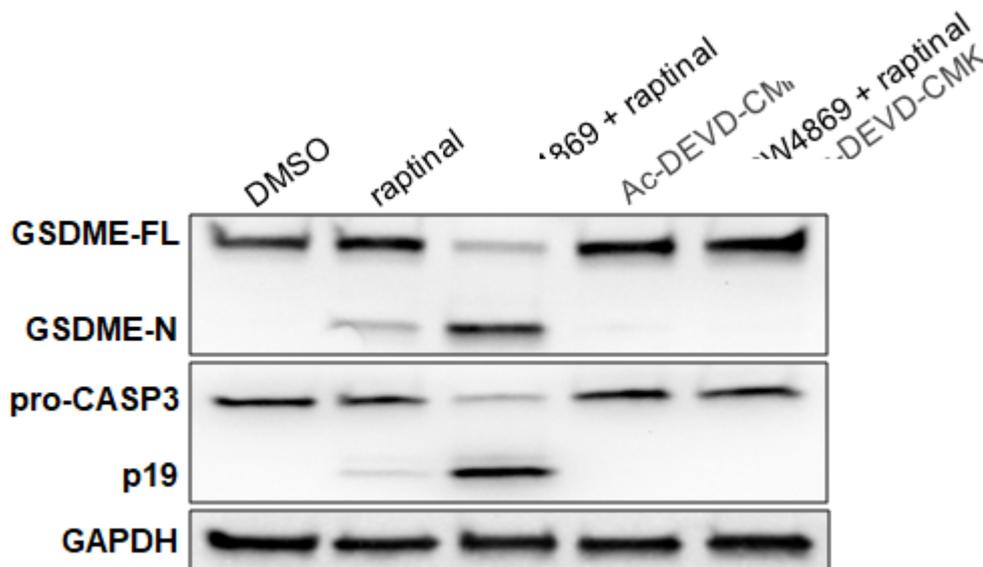


Figura 5: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con GW4869 + raptinal (lane 3), che mostra come la combinazione dei due farmaci sia più efficiente sull'attivazione della caspase-3 e della GSDME, rispettivamente. Ac-DEVD-CMK = inibitore della caspase-3; GSDME-FL = GSDME full-length protein, frammento inattivo; GSDME-N = frammento N-terminale, porzione attiva, della GSDME; pro-caspasi-3 = caspase-3 full-length, frammento inattivo; p19 = frammento attivo della caspase-3.



Come si evince da questi dati preliminari, la combinazione dei due farmaci (GW4869 + raptinal) comporta una maggiore attivazione della GSDME che si traduce in piroptosi delle stesse cellule tumorali. Questi dati verranno riproposti in tutte le altre linee di HCC a nostra disposizione, nonché sui CAFs e cellule primarie di HCC. Inoltre, verranno utilizzate altre metodologie per corroborare tali risultati. Una volta confermati tutti i dati in vitro (sia in 2D che in 3D), la sperimentazione si sposterà sui modelli animali, dove verrà proposta la stessa suddetta strategia.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Lo studio proposto verrà condotto con metodiche standard di biologia cellulare e molecolare, di biochimica e tecniche di clonaggio genico. Si procederà dapprima alla preparazione dei lisati proteici di tutte le linee cellulari in questione, fibroblasti normali ed associato al tumore (CAFs) e di cellule primarie, seguita da un'analisi qualitativa e quantitativa di Western Blot. Una volta appurata la differenza di espressione di GSDME tra le cellule tumorali e la loro controparte normale passeremo allo studio del ruolo del TGF come regolatore dei livelli citosolici di GSDME, tramite trattamento di colture cellulari per un range di tempo di una settimana, da espletare con saggi di Western Blot. Poiché: 1. dati preliminari in nostro possesso indicano un ruolo del TGF non a livello trascrizionale, bensì meccanicistico, con un accumulo citosolico di GSDME rispetto alla frazione esosomiale, attribuendo quindi una tendenza della citochina ad assumere un ruolo pro-apoptotico e 2. non potendo sfruttare tale proprietà pro-apoptotica del TGF a causa dei suoi effetti pleiotropici, tratteremo le cellule con due inibitori della biogenesi/rilascio esosomiale, GW4869 e Manumicina, per una deplezione farmacologica degli esosomi in combinazione con una deplezione proteica non farmacologica, attraverso il sistema di knock-out proteico chiamato TRIM-away (16). Questa recente metodologia di knock-out prevede dapprima la generazione di cellule esprimenti in maniera stabile la proteina TRIM21, una proteina E3 ubiquitinasi. A tal fine, le cellule sono state infettate con lentivirus contenenti il cDNA di TRIM21 umana e successivamente i cloni di cellule positivi sono stati selezionati con trattamento antibiotico (puromicina). Una volta ottenute cellule target, nella fattispecie Hlc19 e PLC/PRF/5, overesprimenti TRIM21, verranno elettroporate con l'anticorpo anti-ALIX (costituente cardine degli esosomi), per ottenere un knock-out non farmacologico di ALIX e di conseguenza degli esosomi secreti. Le suddette cellule saranno sottoposte ad analisi di Western Blot e di immunofluorescenza per valutare i livelli intracellulari di GSDME. Il secondo step prevede l'utilizzo del raptinal per l'attivazione della caspasi-3, immediatamente a monte di GSMDE, che provvederà alla sua completa attivazione, provocando morte cellulare piroptosi-mediata. L'attivazione



della caspasi-3 sarà testata tramite tecniche di immunofluorescenza, per mezzo dell'utilizzo del caspase-3 glo, un fluoroforo che ne riconosce esclusivamente la sua forma attiva, nonché tramite Western Blot, così anche l'attivazione della GSDME. L'avvenuta piroptosi verrà valutata tramite analisi citofluorimetriche (attraverso staining di Annexina V/PI) e microscopiche (visualizzazione in campo chiaro e in fluorescenza con il marker di morte cellulare Sytox green). In questo contesto si prevede la generazione di organoidi di Hlc19 e PLC/PRF/5, trattati con GW4869 + raptinal, per effettuare un esperimento di time-lapse (in campo chiaro e con Sytox green) in modo da seguirne la morte cellulare.

Gli esperimenti in vivo prevedono l'utilizzo di 90 Foxn1 female nude mice. Per ogni animale verranno somministrate 5-8 x10⁶ cellule PLC/PRF/5 sotto cute. Inoltre, in ogni animale saranno somministrati i seguenti composti nel modo seguente: GW4869 a 1.5 mg/kg, intraperitonealmente, ogni giorno per 6 giorni (partendo dal giorno1) e con 20 mg/kg di raptinal intraperitonealmente a giorni alterni per 27 giorni (o fino al termine del trattamento), partendo dal giorno 3. Entrambi i reagenti saranno solubilizzati in 12.5% Cremophor, 12.5% ethanol, in 75% di soluzione salina sterile. Tutte le diluizioni successive saranno effettuate in PBS 1X.

Ogni gruppo sarà formato da 10/12 animali così distribuiti.

Gruppi:

- 1) Vehicle
- 2) Raptinal
- 3) GW4869
- 4) Raptinal + GW4869
- 5) Raptinal (two days a week) + GW4869
- 6) Raptinal (two days a week)

L'eventuale riduzione della massa tumorale sarà misurata con Caliper e il peso di ciascun animale verrà misurato due volte a settimana.

Al termine del trattamento verrà preso il plasma da ciascun animale per ulteriori eventuali analisi.



RISULTATI ATTESI

Gli esperimenti condotti prevedono la validazione della strategia proposta, sia con un approccio in vitro (utilizzando cellule in piattaforma 2D e 3D), che con uno in vivo (utilizzando modelli murini come piattaforma sperimentale), che, nello specifico, consiste nell'utilizzo combinato e sinergico di due farmaci, GW4869 (o Manumicina) in cooperazione con il raptinal. I risultati attesi da tali esperimenti si riassumono:

1. Conferma in vitro dei dati preliminari su proposti. Nella fattispecie, verifica dei due steps, accumulo e attivazione, attraverso quantificazione dei livelli proteici intracellulari di GSDME (tramite Western Blot ed immunofluorescenza) della forma matura e della forma clivata, suo indice di attivazione e marker di morte cellulare (riscontrabile con analisi citofluorimetriche). Tali risultati in vitro, verranno inseriti in un contesto più ampio di esperimenti che prevedono l'utilizzo di modelli murini.
2. A seguito della crescita tumorale ectopica, gli animali verranno trattati con i due farmaci e ne verrà seguita la morfologia della massa tumorale nel tempo. Da tali esperimenti si auspica una significativa riduzione del tumore nell'arco di poche settimane.

INNOVAZIONI

Tale ricerca ha come obiettivo quello di elucidare i meccanismi sottostanti la downregolazione della proteina pro-apoptotica, GSDME, nelle cellule tumorali del tratto gastro-enterico, al fine ultimo di impedire alle stesse di evadere i meccanismi di morte cellulare. Questo studio rappresenta il primo approccio, in tal senso, verso una reversibilità fenotipica da cellula tumorale a cellula wild-type, in termini di regolazione ed espressione di proteine coinvolte nella morte cellulare. Ne deriva, come logica conseguenza, che, qualora confermati i suddetti dati preliminari, si otterrebbe un ampio spettro di possibili interventi, che auspicano a bypassare i meccanismi molecolari della downregolazione di GSDME portando all'eradicazione di cellule tumorali. L'innovazione del progetto presentato consiste, quindi, nell'aver identificato un nuovo pathway, rappresentato dal rilascio di GSDME per mezzo di esosomi tumorali, che può essere oggetto di studi ulteriori volti alla generazione di nuovi interventi terapeutici, i quali, potrebbero rappresentare alternative terapeutiche alla chemioterapia convenzionale ed ai protocolli standard, traducendosi in benefici a lungo termine e migliorando l'assistenza sanitaria, la vita dei pazienti con un impatto sociale significativo.



BIBLIOGRAFIA

1. Akinyemiju, T. et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level. *JAMA Oncol.* 3, 1683 (2017).
2. Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. & Sanyal, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133 (2018).
3. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C. & Llovet, J. M. The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 5, 1226–1239 (2015).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
5. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899 (2010).
6. Hernandez-Gea, V., Toffanin, S., Friedman, S. L. & Llovet, J. M. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 144, 512–527 (2013).
7. Nagy, P., Schaff, Z., Lapis, K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- β 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology*, 14, 269–273 (1991).
8. Larson, C., Oronsky, B., Carter, C. A., Oronsky, A., Knox, S. J., Sher, D., Reid, T. R. TGF-beta: A master immune regulator. *Expert Opin. Ther. Targets*, 24, 427–438 (2020).
9. 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, 53–69 (2019).
10. Nagy, P., Schaff, Z., Lapis, K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- β 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology*, 14, 269–273 (1991).
11. Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B. Franco, D. Poynard, T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology*, 21, 760–766 (1995).



12. Ranganathan, P., Agrawal, A., Bhushan R., Chavalmane, A. K., Kiran, R., Kalathur, R., Takahashi, T., Kondaiah, P. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: Differential regulation in normal and tumour cells (2007).
13. Broz P; Pelegrín P. and Feng Shao. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation (2020).
14. Akino, K., Toyota, M., Suzuki, H., Imai, T., Maruyama, R., Kusano, M., et al. (2007). Identification of DFNA5 as a Target of Epigenetic Inactivation in Gastric Cancer. *Cancer Sci.* 98, 88–95. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00351.
15. Kim, M. S., Chang, X., Yamashita, K., Nagpal, J. K., Baek, J. H., Wu, G., et al. (2008). Aberrant Promoter Methylation and Tumor Suppressive Activity of the DFNA5 Gene in Colorectal Carcinoma. *Oncogene* 27, 3624–3634. doi:10.038/sj.onc.1211021.
16. Clift, D., So, C., McEvan, W.A., James, L.C., Schuh, M. (2018). Acute and rapid degradation of endogenous proteins by Trim-Away. *Nat Protocols.* 13(10):2149-2175. doi: 10.1038/s41596-018-0028-3.

TIMELINE

Event/Name	Start	End	Length
Screening of all available HCC cell lines, CAFs and primary cells; role of TGFb on GSDME expression level in vitro	0	6	6
In vitro studies of exosome inhibition and phenotype overturning	6	12	6
In vitro assessment of the molecular pro-apoptotic pathway activation	12	24	12
In vivo assessment of therapeutic efficacy of drug combination on tumor size	18	36	12
Management, Scientific, Technological, Economic impact.	1	36	36



TITOLO DEL PROGETTO

**3. CARATTERIZZAZIONE DI ACIDI NUCLEICI PER IDENTIFICARE MARCATORI
PROGNOSTICI E TARGET TERAPEUTICI NEI TUMORI GASTROINTESTINALI**

2790442

IRG: Genes, Genomes and Genetics

SS: Molecular Genetics - MGA

Responsabile: Cristiano Simone

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: acidi nucleici, NGS, tecniche "omiche", tumori gastrointestinali

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

I tumori del tratto gastrointestinale (GI) rappresentano la forma più comune di cancro, che colpisce sia uomini che donne [1]. Il cancro è una malattia multifattoriale, causata dall'accumulo di alterazioni genetiche e di modificazioni epigenetiche a carico di geni che controllano la proliferazione, il differenziamento e il riparo del DNA. La maggior parte di queste alterazioni genetiche ed epigenetiche sono di tipo somatico e sono responsabili dei cosiddetti tumori sporadici. Tuttavia, una piccola percentuale di questi tumori (tumori da predisposizione ereditaria) è determinata da mutazioni germinali [2]. In questo contesto, l'utilizzo di tecnologie omiche, mediante il sequenziamento di nuova generazione (NGS) consente la scansione degli acidi nucleici al fine di caratterizzare l'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS), la sua porzione codificante (Whole Exome Sequencing, WES), RNA messaggero e RNA non codificante (RNA-Sequencing), le modifiche epigenetiche che partecipano al controllo dell'espressione genica (epigenoma, ChIP-Seq, Methylation seq, ATAC-Seq). Inoltre,



un'ulteriore tecnologia omica, quale Single Nucleotide Polymorphism array (SNP-array) consente la caratterizzazione di varianti intersperse in tutto il genoma. L'utilizzo combinato di tali tecnologie per la caratterizzazione degli acidi nucleici permette di studiare lo stato, la distribuzione, le alterazioni genetiche ed epigenetiche a livello germinale e somatico. Inoltre, l'utilizzo di tali tecnologie permette l'analisi di acidi nucleici liberi rilasciati dal tumore e circolanti (ctDNA, ctRNA) nel sangue periferico o in altri liquidi corporei. L'analisi "omica" degli acidi nucleici dei tumori GI apre la via a diversi approcci nello studio della malattia per:

- (a) l'identificazione delle sindromi eredo-familiari gastrointestinali;
- (b) la diagnosi precoce dei tumori gastrointestinali;
- (c) l'oncologia di precisione.

Lo studio dello stato mutazionale di un paziente, mediante l'analisi contemporanea dei principali geni predisponenti alle sindromi tumorali GI permette una più rapida diagnosi di tali sindromi. Nell'ottica di una medicina personalizzata, l'identificazione di mutazioni germinali predisponenti a sindromi ereditarie dei tumori GI, consente una migliore e più specifica sorveglianza clinica nei pazienti. In tale contesto l'utilizzo di pannelli multigenici così come un'analisi approfondita dell'intero esoma/genoma potrebbe portare all'identificazione di nuovi geni associati a sindromi predisponenti ai tumori GI. Allo stesso tempo, l'analisi del ctDNA/ctRNA, consente di:

- i) effettuare una diagnosi precoce dei tumori, che siano essi sporadici o determinati da predisposizione genetica;
- ii) definire la prognosi del paziente;
- iii) valutare la risposta alla terapia;
- iv) 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.

Per i pazienti la diagnosi e il trattamento (chemioterapico e/o chirurgico) di cancro in stadio iniziale, rappresenta una risoluzione sicuramente più efficace [3].

Diversi studi, hanno inoltre dimostrato come la presenza di specifiche alterazioni somatiche genetiche ed epigenetiche degli acidi nucleici, possa influenzare la risposta ai più comuni trattamenti antitumorali. L'oncologia di precisione è nata dall'idea che la



comprensione delle basi molecolari del tumore di un paziente crea l'opportunità di utilizzare farmaci per colpire selettivamente le cellule tumorali che ospitano questi cambiamenti genetici [4]. La caratterizzazione degli acidi nucleici per la caratterizzazione delle alterazioni genetiche e dello stato epigenetico rappresenta una interessante strategia per decifrare i processi di cancerogenesi e progressione dei tumori GI e fornire dati interessanti per sviluppare approcci terapeutici innovativi.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

La presenza di una Biobanca nel nostro Istituto, favorisce la possibilità di caratterizzare gli acidi nucleici a partire da diversi tipi di campioni biologici.

Il materiale biologico di partenza è costituito da:

- acidi nucleici estratti da materiale biologico (sangue, saliva, tessuto normale e tumorale) di pazienti, già presenti in Biobanca;
- acidi nucleici ottenuti a partire dalle linee cellulari continue di tumori gastrointestinale e sferoidi da esse derivate;
- acidi nucleici ottenuti da linee staminali e organoidi tumorali e normali derivati da pazienti con tumori gastrointestinali;
- acidi nucleici ottenuti da tessuti tumorali e normali derivati da pazienti con tumori gastrointestinali;
- acidi liberi nucleici (ctDNA/ctRNA) estratti da sangue periferico o altri liquidi biologici.

L'analisi di acidi nucleici mediante tecnologie "omiche" e di biologia molecolare (WES, WGS, SNP- array, Chip-Seq, ATAC-Seq, RNA-Seq) consente di caratterizzare con altissima risoluzione il genoma, l'epigenoma e il trascrittoma dei pazienti con tumori GI.

Nell'ambito delle sindromi eredo-familiari dei tumori gastrointestinali, l'utilizzo della tecnologia di NGS consente di analizzare pannelli multigenici per l'identificazione di alterazioni genetiche germinali in geni notoriamente predisponenti alle sindromi tumorali gastrointestinali. Inoltre mediante tale tecnologia, è possibile analizzare regioni codificanti e regioni non codificanti del genoma (Pannelli multigenici, WES, SNP-array) per l'identificazione di nuovi geni/varianti genomiche responsabili alle sindromi eredo-familiari dei tumori GI. Inoltre, la caratterizzazione di varianti genomiche intersperse nell'intero genoma (SNP-array) consente di caratterizzare aplotipi genetici



e di decifrare come la combinazione di più varianti genetiche può contribuire ad un aumentato rischio (rischio poligenico) di sviluppare tumori (familiari e/o sporadici) gastrointestinali. In tale contesto, l'integrazione di dati "omici" derivanti da sequenziamento della cromatina (ChIP-Seq) e dell'RNA (RNA-seq) rappresenta un'importante strategia per la valutazione degli effetti delle varianti genomiche sullo stato dei meccanismi di regolazione dello stato epigenetico e dell'espressione genica.

Inoltre, l'analisi di acidi nucleici estratti da tessuto normale e tumorale di pazienti che hanno sviluppato tumori GI consente di caratterizzare il profilo genomico/epigenomico/trascrittomico dei tumori. Tale caratterizzazione è utile per classificare dal punto di vista molecolare i tumori di tali pazienti e valutare possibili bersagli molecolari target di terapia.

La possibilità di accedere ad una estesa piattaforma di materiale biologico, come ad esempio linee cellulari staminali e gli organoidi provenienti da tessuto tumorale e normale di pazienti, rappresenta un'importante risorsa per la valutazione e lo studio del trattamento farmacologico con diversi composti al fine di bloccare specifici bersagli molecolari. L'analisi degli acidi nucleici mediante le tecnologie "omiche" consente di caratterizzare i profili genomici, epigenomici e trascrittomici al fine di identificare possibili strategie di trattamento farmacologico.

RISULTATI ATTESI

Il nostro piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione degli acidi nucleici provenienti da pazienti con tumori del tratto gastrointestinale. Grazie al piano sperimentale presentato, sarà possibile identificare nuove varianti genomiche e nuovi geni che conferiscono predisposizione e/o suscettibilità a tumori eredo familiari. Mediante la caratterizzazione degli acidi nucleici in pazienti con tumori GI, sarà possibile caratterizzare dal punto di vista molecolare e funzionale varianti geniche di significato clinico incerto delle sindromi note o nuove, con lo scopo di accrescere il numero di marcatori genetici per la prevenzione e la sorveglianza clinica. Inoltre sarà possibile identificare nuove sindromi, attraverso la caratterizzazione di nuove caratteristiche cliniche e fenotipiche, associate a geni nuovi o precedentemente identificati che conferiscono predisposizione e/o suscettibilità all'insorgenza della patologia. Mediante l'utilizzo di tecnologie omiche per la caratterizzazione degli acidi nucleici sarà inoltre possibile decifrare le alterazioni genomiche/epigenomiche/trascrittomiche dei tumori GI. Tale caratterizzazione molecolare ci permetterà di individuare nuove strategie terapeutiche per il trattamento dei tumori GI.



BIBLIOGRAFIA

1. Bordry N, et al. Recent advances in gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol* 2021 July
2. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005;23:276-292. doi: 10.1200/JCO.2005.10.042.
3. Citron ML. Dose-dense chemotherapy: principles, clinical results and future perspectives. *Breast Care (Basel)* 2008;3(4):251-255. doi: 10.1159/000148914.
4. Dalton WB, et al. Personalized medicine in the oncology clinic: implementation and outcomes of the Johns Hopkins Molecular Tumor Board. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017(1):119.
5. Pantaleo A, et al. Tumor testing and genetic analysis to identify Lynch syndrome patients in an Italian colorectal cancer cohort. *Cancers* 2023
6. Forte G, et al. A novel STK11 gene mutation (c.388dupG, p.Glu130Glyfs33) in a Peutz-Jeghers family and evidence of higher gastric cancer susceptibility associated with alterations in STK11 region aa 107-170. *Genes Dis*. 2023 Aug 2;11(2):1082-1083. doi: 10.1016/j.gendis.2023.08.001
7. Forte G, et al. Coinheritance of germline mutations in APC and MUTYH genes defines the clinical outcome of adenomatous polyposis syndromes. *Genes Dis*. 2023 Aug 2;11(2):1084. doi: 10.1016/j.gendis.2023.08.002
8. Disciglio V, et al. Gastric polyposis and desmoid tumours as a new familial adenomatous polyposis clinical variant associated with APC mutation at the extreme 3'-end. *J Med Genet*. 2020 May;57(5):356-360. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106299 doi: 10.3390/genes13040644.
9. Disciglio V, et al. APC Splicing Mutations Leading to In-Frame Exon 12 or Exon 13 Skipping Are Rare Events in FAP Pathogenesis and Define the Clinical Outcome. *Genes (Basel)* 2021 Feb 28;12(3):353. doi: 10.3390/genes12030353
10. Disciglio V, et al. Identification and Somatic Characterization of the Germline PTEN Promoter Variant rs34149102 in a Family with Gastrointestinal and Breast Tumors. *Genes (Basel)*. 2022 Apr 5;13(4):644. doi: 10.3390/genes13040644.
11. Lepore Signorile M, et al. Pharmacological targeting of the novel β -catenin chromatin-associated kinase p38 in colorectal cancer stem cell tumorspheres and organoids. *Cell Death Dis*. 2021 Mar 25;12(4):316. doi: 10.1038/s41419-021-03572-4



12. Sanese P, et al. Targeting SMYD3 to Sensitize Homologous Recombination-Proficient Tumors to PARP-Mediated Synthetic Lethality. *iScience*. 2020 Oct 7;23(10):101604. doi: 10.1016/j.isci.2020.101604. eCollection 2020 Oct 23.

TIMELINE

Anni 1-3

Tutte le attività di ricerca indicate nel presente progetto saranno portate avanti per tutta la durata dello stesso al fine di caratterizzare dal punto di vista clinico e molecolare il maggior numero possibile di campioni conservati nella Biobanca dell'Ente. Quindi, procederemo con l' estrazione degli acidi nucleici e l'analisi degli stessi mediante pannelli NGS, studi funzionali su colture di cellule staminali, sferoidi e organoidi derivati da pazienti affetti da tumori del tratto gastrointestinale. I dati ottenuti saranno elaborati mediante specifici software per l'analisi di dati molecolari.



TITOLO DEL PROGETTO

4. RUOLO DI SMYD3 NELLA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEL CANCRO DEL COLON RETTO

2786669

IRG: Genes, Genomes and Genetics

SS: Genetics of Health and Disease - GHD

Responsabile: Fasano Candida

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: SMYD3; Epigenetica; Metilazione proteica, Next Generation Sequencing (NGS); Chip-Seq; screening tripeptidico del proteoma umano; Cancro del Colon Retto

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

Le alterazioni epigenetiche presentano cambiamenti dinamici e reversibili che non sono causati da cambiamenti nella sequenza nucleotidica del DNA, ma sono causati da cambiamenti nei livelli di metilazione del DNA, modifiche post-traduzionali delle proteine istoniche, rimodellamento cromatinico o interferenze nei meccanismi mediati da molecole di RNA non codificanti, che alterano la regolazione dell'espressione genica in maniera spazio temporale [1].

La complessità dei meccanismi di rimodellamento della struttura tridimensionale della cromatina è responsabile dei principali processi di regolazione dell'espressione genica. Gli enzimi epigenetici modificano gli istoni che fungono da marchi epigenetici, rendendola più o meno accessibile al macchinario trascrizionale [2].



L'introduzione di tecnologie ad alta processività, come il sequenziamento di nuova generazione (NGS), ha permesso lo studio dello stato, della distribuzione e delle modifiche dei marchi epigenetici nei tessuti normali e tumorali. Questi studi hanno dimostrato che cambiamenti a carico dello stato di metilazione e del rimodellamento della cromatina, nonché cambiamenti coinvolgenti geni che codificano per le proteine complessate a livello della cromatina [3].

La metilazione delle proteine istoniche è uno dei principali meccanismi di regolazione epigenetica che regola la trascrizione sia durante lo sviluppo normale che patologico. Le proteine epigenetiche cruciali note come metiltrasferasi (PMTs) e lisine metiltrasferasi (PKMTs) [4]. La metilazione istonica delle lisine si verifica tipicamente a livelli di residui istonici specifici come H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H4K5 e H4K20. L'attivazione o la repressione dell'accessibilità cromatinica è determinata dalla metilazione di questi marchi istonici, che varia in base al tipo di istone e al residuo aminoacidico sottoposto alla 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].

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 [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 vivo, la sovraespressione di SMYD3 promuove la progressione del cancro del pancreas [9], del polmone [10], del fegato, del colon-retto (CCR) [11], del seno [12], dell'esofago [13] e dell'ovaio [14]. 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.



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) [15,16], della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) (ad esempio, SLUG, MMP2, Vim, Met) [11,12,17–19], nonché oncogeni (es. c-MYC, JAK/STAT, CTNNB1) [11] e geni regolatori del ciclo cellulare (es. CCNA2, CCND1, CCNE1, PCNA, CDK2) [7]. 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 [7,10,20]. 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 [21].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Caratterizzazione del ruolo epigenetico di SMYD3 e dei suoi nuovi interattori nella cancerogenesi e nella progressione del cancro del colon-retto.

Il nostro 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 cancerogenesi del cancro coloretale. Inoltre, con la presente proposta progettuale approfondiremo il ruolo oncogenico di SMYD3 identificando i suoi nuovi interattori coinvolti nella regolazione epigenetica del cancro del colon retto.

Mediante l'utilizzo di tecnologie ad alta processività per il sequenziamento genomico (NGS) e proteomico (MS) sarà possibile costruire una mappatura epigenetica e proteomica al fine di decifrare il ruolo molecolare svolto da SMYD3 e la sua rete di nuovi interattori che modulano l'epigenoma.

Come modelli per la validazione delle nuove interazioni di SMYD3 e relativo ruolo epigenetico utilizzeremo linee cellulari continue di cancro del colon retto (HCT116, HT29, SW480, CaCo2) wild-type per SMYD3 e ingegnerizzate ai fini dell'ablazione genetica per la rimozione del gene SMYD3.



DATI PRELIMINARI

Caratterizzazione della mappatura epigenetica mediata da SMYD3 in modelli cellulari del cancro del colon-retto

Abbiamo recentemente validato la metodologia utile alla caratterizzazione della mappatura epigenetica coinvolta nei meccanismi di cancerogenesi modulati dalla proteina SMYD3. A tale scopo abbiamo valutato nel nostro modello cellulare le regioni genomiche sulle quali viene reclutata la proteina SMYD3. Abbiamo quindi effettuato saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con anticorpo specifico per SMYD3 utilizzando DNA della linea cellulare tumorale HCT116.

Per valutare l'attività epigenetica di SMYD3 abbiamo geneticamente ingegnerizzato, mediante la tecnologia CRISPR/Cas9, la linea cellulare HCT116 al fine di rimuovere il gene SMYD3 e di generare la linea cellulare HCT116-SMYD3-KO.

La linea cellulare tumorale HCT116 è stata inoltre sottoposta a trattamento farmacologico con EM127, un nuovo composto in grado di inibire la proteina SMYD3 mediante la formazione di un legame covalente con il sito attivo della proteina. Tale trattamento farmacologico ha il vantaggio di inibire la proteina SMYD3 con un'efficacia maggiore rispetto agli inibitori finora utilizzati e presenti in commercio. Tale condizione sperimentale ci permette di valutare in che modo l'inibizione dell'attività enzimatica di SMYD3 possa modularne il suo reclutamento in specifiche regioni genomiche.

Pertanto le cellule ingegnerizzate per l'ablazione genetica di SMYD3 (HCT116-SMYD3-KO) e le cellule trattate farmacologicamente con EM127 (HCT116-EM127), sono state processate per esperimenti di ChIP-Seq. In breve, tali cellule sono state inizialmente trattate con formaldeide al fine di stabilizzare i legami cromatinici nativi proteina-DNA e successivamente sono state lisate al fine di estrarre la cromatina che è stata successivamente sottoposta a sonicazione per generare frammenti di DNA di circa 100-300 paia di basi, condizione importante per la costruzione successiva delle librerie e l'analisi mediante sequenziamento. Abbiamo quindi eseguito il protocollo di sonicazione valutando la grandezza delle dimensioni dei frammenti di DNA sonicati mediante lo strumento di elettroforesi automatica (TapeStation, Agilent).

Il DNA frammentato è stato successivamente sottoposto ad immunoprecipitazione con l'anticorpo anti- SMYD3, seguendo la procedura descritta nel protocollo del kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFisher Scientific).



Successivamente i campioni di DNA associati alle proteine di interesse (ChIP-DNA) sono stati sottoposti a preparazione di librerie genomiche applicando modifiche tecniche al protocollo di librerie genomiche "Ion ChIP-Seq Library Preparation (Manual Publication Number 4473623, ThermoFisher Scientific). Nel dettaglio, per la preparazione della libreria sono stati impiegati circa 10 ng di ChIP- DNA frammentato a doppia elica, purificato al termine dell'immunoprecipitazione. Inizialmente i frammenti di ChIP-DNA sono stati sottoposti a riparo delle estremità mediante reazione enzimatica e purificazione mediante biglie magnetiche (Ampure, Agencourt, Beckman Coulter). I campioni di ChIP- DNA purificati sono stati sottoposti ad una reazione di ligazione degli adattatori e successivamente a purificazione con biglie magnetiche (Ampure, Agencourt, Beckman Coulter). Successivamente è stato ottimizzato il protocollo di arricchimento delle regioni immunoprecipitate mediante PCR. Le librerie di ChIP-DNA ottenute sono state successivamente sottoposte a purificazione e selezione di frammenti con dimensioni specifiche (160-340 paia di basi) mediante l'utilizzo di biglie magnetiche (Ampure, Agencourt, Beckman Coulter). La dimensione dei frammenti delle librerie di ChIP-DNA ottenute è stata valutata mediante lo strumento di elettroforesi automatica (TapeStation, Agilent). Inoltre il dosaggio delle librerie di ChIP-DNA ottenute è stato effettuato mediante il fluorimetro Qubit (kit dsDNA HS Assay, ThermoFisher Scientific). Successivamente le librerie di ChIP-DNA ottenute sono state diluite ad una concentrazione pari a 50pM e sottoposte a preparazione ad elevata efficienza del template e successivo caricamento su supporto specifico rappresentato da un ChIP per sequenziamento (Ion 550 Kit-Chef, ThermoFisher Scientific) mediante lo strumento IonChef (ThermoFisher Scientific). Su ciascun Chip di sequenziamento 550 sono stati caricati 2 campioni di ChIP-DNA. Nello specifico, sono stati sequenziati i seguenti campioni i) HCT116 Input, campione non sottoposto ad immunoprecipitazione con le proteine oggetto di studio; ii) HCT116 SMYD3, campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3; iii) HCT116 H3K4me3, campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per il marchio istonico H3K4me3; iv) HCT116-SMYD3-KO Input, campione non sottoposto ad immunoprecipitazione con le proteine oggetto di studio; v) HCT116-SMYD3-KO-IPSMYD3 (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3; vi) HCT116-EM127 Input, campione non sottoposto ad immunoprecipitazione con le proteine oggetto di studio; vii) HCT116-EM127-IPSMYD3 (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3. Ciascuna corsa di sequenziamento è stata programmata per includere 550 flussi nucleotidici. Le librerie sono state successivamente sequenziate mediante l'utilizzo del sequenziatore IonGene Studio S5 Prime System (ThermoFisher).



I frammenti di ChIP-DNA sequenziati (reads, formato file FASTQ) sono stati successivamente processati mediante algoritmi di allineamento e sono stati sottoposti a procedure di controllo di qualità seguendo le linee guida pubblicate dal consorzio ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements; <https://www.encodeproject.org>). Il consorzio internazionale ENCODE ha l'obiettivo di determinare gli elementi funzionali del genoma umano mediante la caratterizzazione della struttura cromatinica, attività trascrizionale e stato di metilazione del DNA in differenti campioni biologici (cellule e circa 350 tessuti differenti) umani. Il consorzio ENCODE ha depositato oltre 80.000 file FASTQ relativi a più di 17.000 esperimenti di genomica funzionale, la maggior parte dei quali sono ChIP-Seq, RNA-Seq o DNase-Seq. Le pipelines uniformi, una serie di algoritmi bioinformatici che elaborano i dati di sequenziamento grezzi e generano files di dati omici, sono importanti per la riproducibilità scientifica. Tali pipelines pubblicamente accessibili consentono ai ricercatori che conducono esperimenti simili di condividere direttamente le pipelines, rendendo i risultati uniformi e comparabili. Per molti saggi esistono più pipelines di analisi che spesso si differiscono per algoritmi, per i parametri di analisi o per l'analisi statistica utilizzata per determinare la significatività dei risultati. I risultati di diverse pipelines per una determinata metodica sperimentale, quale ad esempio ChIP-Seq, non possono essere sempre confrontati in modo appropriato. Pertanto, per un'analisi di confronto è utile che i risultati siano stati generati utilizzando algoritmi bioinformatici standardizzati. La pipeline ChIP-seq funziona sia su fattori di trascrizione tradizionali con picchi di dimensioni ridotte, sia su esperimenti ChIP di marcatori istonici con picchi più ampi. La descrizione della pipeline ENCODE utilizzata per l'analisi dei nostri dati di ChIP-Seq è riportata sul portale: <https://www.encodeproject.org/pages/pipelines>.

Al fine di uniformare l'analisi su tutti i dati di ChIP-Seq generati nel nostro laboratorio, gli algoritmi di analisi rilasciati dal consorzio ENCODE sono stati utilizzati per tutti i campioni di linee cellulari sequenziati durante il primo e secondo anno del presente progetto.

Nello specifico, i frammenti di ChIP-DNA sequenziati (reads, formato file FASTQ) sono stati allineati sul genoma umano mediante l'algoritmo di allineamento "Bowtie2" (reads allineate, formato file BAM). Le reads che includevano duplicati di PCR sono state caratterizzate ed eliminate mediante il tool bioinformatico "SAMtools". Il numero totale di reads, ottenute in seguito ai filtri di qualità (Total Mapped Reads), è riportato nella Tabella 1 per ciascun campione analizzato.



Tabella 1. Metriche di Qualità del sequenziamento

	HCT116 WT IP_SMYD3	HCT116 WT Input	HCT116 WT IP_HK3K4	HCT116 SMYD3KO IP_SMYD3	HCT116 SMYD3KO Input	HCT116 EM127 IP_SMYD3	HCT116 EM127_Input
Total Reads	44148822	61408084	41050994	48220478	40914209	59058549	63837655
Mapped Reads	40724483	56950479	37657407	44143702	37453237	54307339	58717541
Unpaired Reads	23212252	33623420	21125561	26049448	22533700	31651321	34597800
Unpaired Duplicate Reads	9400652	9183132	5095340	6301595	3926825	17304356	8006812
Total Mapped Reads	13811600	24440288	16030221	19747853	18606875	14346965	26590988

Dopo aver definito la qualità del sequenziamento, è stata eseguita la ricerca delle regioni significative relative ai frammenti isolati con l'immunoprecipitazione e sequenziati. Nello specifico sono state eseguite operazioni mediante il software peak-callers MACS2 per definire, una volta note le regioni genomiche delle reads allineate, le zone del genoma realmente associate alla proteina in esame.

Tale ricerca è stata effettuata attraverso la valutazione i) del profilo di segnale (coverage function) lungo ogni cromosoma; ii) delle regioni di picco attraverso il confronto tra campione e modello di background; iii) dell'ordinamento dei picchi in base al livello di significatività della loro definizione. Poiché la struttura della cromatina non è omogenea su tutta la lunghezza del DNA e alcune regioni possono essere selezionate dall'immunoprecipitazione anche se non significative per la proteina in esame, le regioni di picco sono state definite confrontando il campione con la controparte background (campione Input ossia campione sonicato ma non sottoposto a immunoprecipitazione). Dall'analisi di confronto tra il campione HCT116-WT-IP SMYD3 (immunoprecipitato con anticorpo specifico per la proteina SMYD3) e il campione HCT116-WT (campione sonicato non sottoposto a immunoprecipitazione) sono state identificate 7735 regioni codificanti e non codificanti del genoma arricchite a seguito dell'immunoprecipitazione. Dall'analisi di confronto tra il campione HCT116-SMYD3-KO-IPSMYD3 (immunoprecipitato con anticorpo specifico per la proteina SMYD3) e il campione HCT116-SMYD3-KO (campione sonicato non sottoposto a immunoprecipitazione) sono state identificate 7719 regioni codificanti e non codificanti del genoma arricchite a seguito dell'immunoprecipitazione. Dall'analisi di confronto tra il campione HCT116-EM127-IPSMYD3 (immunoprecipitato con anticorpo specifico per la proteina SMYD3) e il campione HCT116-EM127 (campione sonicato non sottoposto a immunoprecipitazione) sono state identificate 5227 regioni codificanti e non

codificanti del genoma arricchite a seguito dell'immunoprecipitazione (Figura 1, Tabella 2).

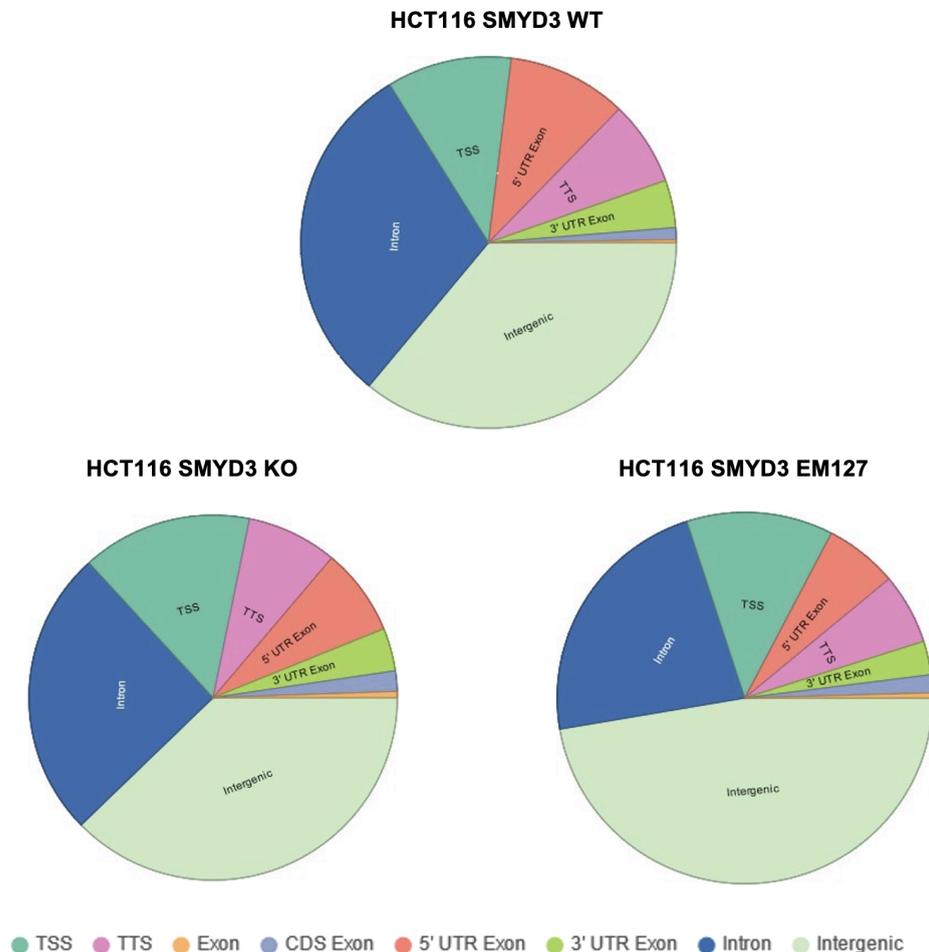


Figura 1. Distribuzione genomica delle regioni di legame della proteina SMYD3.

Abbiamo inoltre determinato la bontà dell'immunoprecipitazione in base ai valori FRiP (fraction of reads in peaks - frazione di reads nei picchi) per individuare artefatti tecnici o fallimenti del sequenziamento. In genere, una buona percentuale di reads negli esperimenti ChIP-seq si verifica in regioni genomiche significativamente arricchite definite dai picchi, il resto delle letture rappresenta il background. La frazione di reads che cadono all'interno di regioni di picco è quindi una metrica per valutare la bontà dell'immunoprecipitazione. In generale, i valori di FRiP sono correlati positivamente e linearmente con il numero di regioni chiamate. Il Consorzio ENCODE esamina gli esperimenti in cui il valore FRiP è inferiore all'1%. L'analisi di FRiP score nei nostri campioni è risultata avere valori inferiori all'1%, dimostrando la buona qualità



dell'immunoprecipitazione. Successivamente, abbiamo valutato i valori di cross-correlazione normalizzata e relativa dei filamenti (Normalized Strand Coefficient, NSC e Relative Strand Correlation, RSC) suggeriti dal consorzio ENCODE. Il rapporto normalizzato tra la grandezza del frammento e background e il rapporto tra lunghezza del frammento del picco (NSC) e lunghezza delle reads all'interno del picco (RSC) rappresentano delle importanti metriche per valutare la qualità degli esperimenti di ChIP-Seq. Il Consorzio ENCODE esamina gli esperimenti con valori di NSC superiori all'1,05 e valori di RSC superiori allo 0,8. L'analisi dei nostri dati ha messo in evidenza valori di NSC > 1.05 e RSC > 0.8, dimostrando la buona qualità dei dati generati (Tabella 2).

Tabella 2. Qualità arricchimento dei picchi

	HCT116 WT IP_SMYD3	HCT116 WT IP_HK3K4	HCT116 SMYD3KO IP_SMYD3	HCT116 EM127 IP_SMYD3
Total Peaks	7735	7265	7719	5227
FRiP	0.009060065	0.19011509	0.09340602	0.07929593
NSC	1.052281	1.345883	1.055301	1.057929
RSC	1.027688	1.045827	1.020953	1.028726

Al fine di identificare in maniera specifica le regioni genomiche sulle quali la proteina SMYD3 è reclutata, abbiamo inoltre eseguito un'analisi di confronto tra i campioni HCT116-WT e HCT116- SMYD3-KO (campioni sottoposti ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3). Tale analisi ha permesso di identificare 179 regioni altamente specifiche in cui è stata osservata l'occupazione di SMYD3. Al fine di meglio comprendere i meccanismi epigenetici regolatori mediati da SMYD3, abbiamo analizzato nel dettaglio i diversi geni identificati nelle regioni occupate da SMYD3, esaminando i pathway molecolari in cui sono coinvolti. Tale analisi è stata eseguita utilizzando il Database "KEGG PATHWAY", una delle più importanti banche dati bioinformatiche che contiene informazioni sui pathway molecolari della cellula. Tale analisi ha mostrato che la proteina SMYD3 viene reclutata a livello di geni coinvolti in diverse vie molecolari cancro-specifiche. Precisamente,



importanti geni (ATM, BAX, BRCA2, CTNNB1, KMT2C, MAPK14, MAP3K2, RUNX1) sono risultati essere regioni genomiche significativamente arricchite, siti di legame della proteina SMYD3. Tali geni svolgono un ruolo principale nei pathway molecolari cancro-relati: breast cancer, endometrial cancer, pancreatic cancer, homologous recombination pathway, p53 signaling pathway, platinum drug resistance, transcriptional misregulation in cancer (Figura 2A).

Tra i geni identificati essere target di SMYD3 siamo andati ad analizzare in particolare, i geni ATM e BRCA2 coinvolti nei meccanismi di riparo del DNA, i quali hanno mostrato una significativa occupanza della proteina SMYD3 (Figura 2B, 2C). In particolare l'analisi ha permesso di osservare come tali regioni risultino altamente specifiche per il legame della proteina SMYD3, come anche dimostrato dall'assenza di segnale nella linea cellulare HCT116-SMYD3-KO.

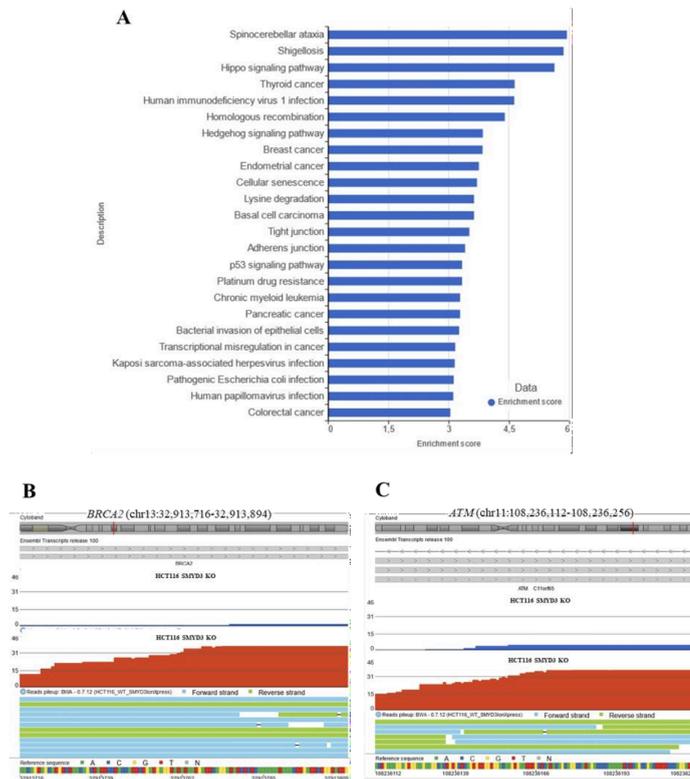


Figura 2. (A) Pathway molecolari identificati essere arricchiti nel campione HCT116-WT (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3) rispetto al campione HCT116-SMYD3-KO (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3). **(B)** Profili di SMYD3 in una regione del gene *BRCA2* **(C)** Profili di SMYD3 in una regione del gene *ATM*.



Successivamente abbiamo valutato l'effetto dell'inibizione di SMYD3, mediante il trattamento farmacologico con l'inibitore EM127, sul suo reclutamento a livello di specifiche regioni genomiche. Abbiamo pertanto eseguito un'analisi di confronto tra i campioni HCT116-WT e HCT116-EM127 entrambi sottoposti ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3. Tale analisi ha permesso di identificare 2257 regioni di legame del DNA relative alla proteina SMYD3. L'analisi di pathway molecolari mediante il Database "KEGG PATHWAY" ha mostrato come l'inibizione farmacologica di SMYD3 mostri un assetto differente dei pathway molecolari (Wnt signaling pathway, cell cycle, MAPK signaling pathway, proteoglycans in cancer) identificati essere arricchiti dopo immunoprecipitazione di SMYD3 (Figura 3A).

È interessante notare che il trattamento con EM127 impedisce il reclutamento dell'enzima a livello di regioni genomiche che includono geni come ATM, BRCA2, CTNNB1, MAPK14, MAPK3K2, dimostrando che l'inibizione dell'attività enzimatica di SMYD3 regola la sua occupanza a livello cromatinico. Un esempio importante di tale osservazione è data dall'analisi dei geni ATM e BRCA2, che hanno nuovamente mostrato una significativa occupanza della proteina SMYD3 nelle corrispettive regioni genomiche nella linea HCT116 WT in seguito a confronto con la stessa linea cellulare sottoposta a trattamento (Figura 3B, 3C).

I risultati di tale analisi sono promettenti in quanto suggeriscono che l'effetto inibitorio della proteina SMYD3 mediante trattamento con EM127 possa essere paragonabile all'effetto dell'ablazione genetica del gene SMYD3. Questa ipotesi verrà successivamente confermata andando a valutare l'occupanza delle proteine coinvolte nei meccanismi di cancerogenesi, così come dei marchi istonici correlati ad essi.

Complessivamente, i risultati ottenuti possono essere considerati promettenti per il proseguo del presente progetto di ricerca. Procederemo infatti alle caratterizzazioni, nelle stesse linee cellulari, dell'arricchimento dei marchi istonici e di altre proteine di interesse, così come della loro co-occupanza con SMYD3, analizzando inoltre l'effetto dell'ablazione genetica e dell'inibizione farmacologica di SMYD3 al fine di caratterizzare la mappatura epigenetica coinvolta nei meccanismi di cancerogenesi mediati da SMYD3.

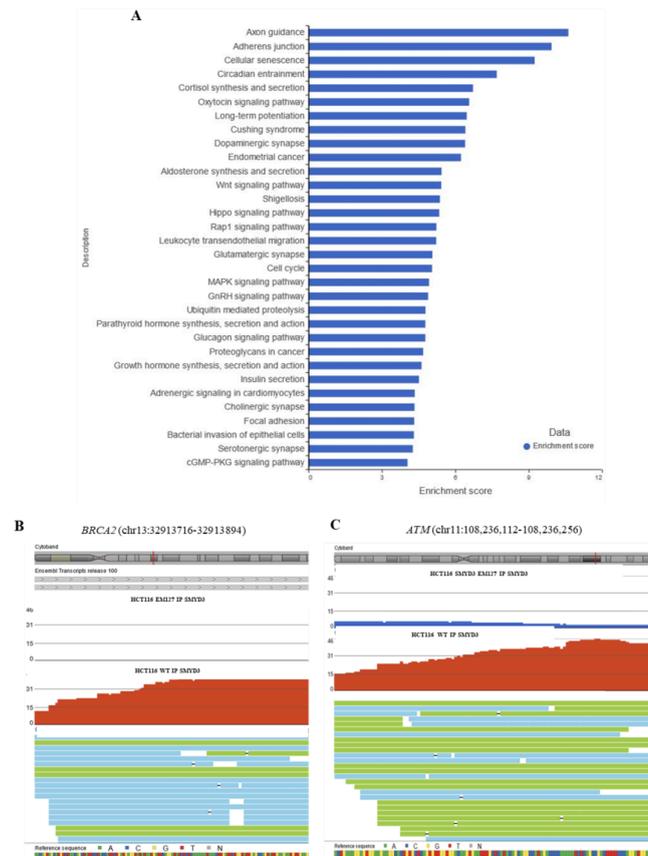


Figura 3. (A) Pathway molecolari identificati essere arricchiti nel campione HCT116 WT (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3) rispetto al campione HCT116 SMYD3 EM127 (campione sottoposto ad immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo specifico per la proteina SMYD3). **(B)** Profili di SMYD3 in una regione gene *BRCA2* **(C)** Profili di SMYD3 in una regione del gene *ATM*.

Caratterizzazione in silico ed in cellulo degli interattori di SMYD3 coinvolti nella regolazione epigenetica del cancro del colon-retto

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 [22]. 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 elegibili come nuovi potenziali interattori di SMYD3 [22]. 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 [22].

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 omnicomprendivo per essere certi di includere nell'analisi il maggior numero di proteine possibile.

Tra le 8.650 P-proteine iniziali, ricavate dallo screening tripeptidico, abbiamo identificato in silico 361 possibili interattori di SMYD3 con funzioni epigenetiche. Il ruolo nella riprogrammazione epigenetica del cancro di ciascuna di queste 361 proteine P è stato caratterizzato sulla base delle informazioni funzionali annotate nei database



UniProt, Reactome ed EpiFactors al momento dell'analisi. In particolare, abbiamo esaminato tutte le 117 proteine registrate nel cluster Reactome "regolazione epigenetica dell'espressione genica" (Reactome Id: R-HSA-212165), di cui 45 sono particolarmente arricchiti in P-tripeptidi. Per essere certi di includere nell'analisi tutte le proteine P con funzione epigenetica abbiamo incluso nell'analisi tutte le proteine P (contenenti i nostri tripeptidi) registrate nel database EpiFactors. In totale, abbiamo clusterizzato in silico 361 proteine P associate a vie di segnalazione correlate al segno distintivo del cancro noto come „riprogrammazione epigenetica non mutazionale“. Quindi, abbiamo eseguito un'analisi quantitativa della distribuzione del tripeptidi P1-P19 in queste 361 proteine P con ruolo epigenetico. Per ottenere questo risultato, li abbiamo suddivisi in sottogruppi in base alla frequenza delle occorrenze dei tripeptidi (Tabella 3).

Tabella 3: Analisi quantitativa della distribuzione dei P-tripeptidi nelle proteine P del cluster epigenetico.

Frequenza del P-tripeptide nel cluster della „riprogrammazione epigenetica“	Numero di P-proteine	% relativa di proteine con tripeptidi P
N° tot di proteine umane con tripeptidi P (proteine P)	8,650	100%
N° tot di proteine P totali coinvolte nei segni distintivi del cancro precedentemente stabiliti (obiettivo 1 del progetto)	2,108	24.4%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico	361	4.17%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 1 tripeptide P	187	2.16%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 2 tripeptidi P	99	1.14%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 3 tripeptidi P	40	0.46%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 4 tripeptidi P	18	0.21%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 5 tripeptidi P	12	0.14%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 6 tripeptidi P	4	0.05%
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 7 tripeptidi P	0	0
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 8 tripeptidi P	0	0
N° tot di proteine P totali nel cluster epigenetico con 9 tripeptidi P	1	0.01%

Quest'analisi quantitativa ha dimostrato che la frequenza dei P-tripeptidi è inversamente proporzionale al n. di proteine che li contiene, come previsto. Inoltre, questa analisi ha dimostrato che, in accordo con la teoria degli amminoacidi rari e come precedentemente osservato, il numero di codoni con cui sono codificati i P-tripeptidi determina la loro distribuzione nelle proteine umane (Figura 4, (Fasano et al. 2023, Appendice Tabella S1) [28–31]).

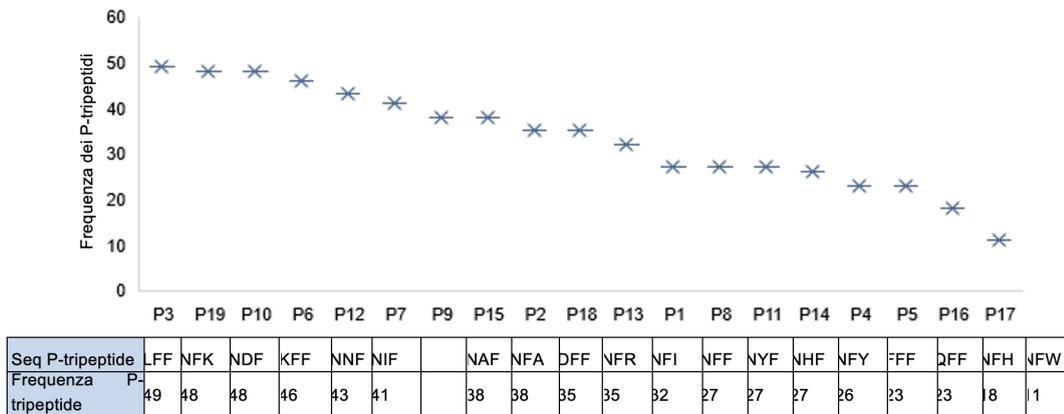


Figura 4: Grafico della frequenza di ciascun tripeptide P nel cluster/hallmark della "riprogrammazione epigenetica non mutazionale".

Successivamente, abbiamo eseguito un'analisi qualitativa per selezionare nel cluster epigenetico i migliori candidati interattori di SMYD3 con un ruolo epigenetico cruciale nella tumorigenesi gastrointestinale. A tal fine, tra le 361 proteine P coinvolte nella caratteristica del cancro della "riprogrammazione epigenetica non mutazionale" abbiamo innanzitutto esaminato quelle proteine ricche di P-tripeptidi. Curiosamente, abbiamo scoperto che 35 proteine in questo gruppo avevano un'arricchimento significativo di tripeptidi P (con almeno 4 corrispondenze di tripeptidi P) e 25 proteine contenevano almeno 4 diversi tripeptidi P (Fasano et al. 2023, Appendice Tabella S1). Complessivamente, il numero totale di proteine P coinvolte nei processi della "riprogrammazione epigenetica non mutazionale" (361) e ai dieci segni distintivi del cancro precedentemente stabiliti (2.108) [31] era 2.469 (Figura 5). In particolare, sono state trovate 155 proteine P, tutte con almeno 4 tripeptidi P distinti, associate funzionalmente agli 11 segni distintivi del cancro (Fig. 12) [10].

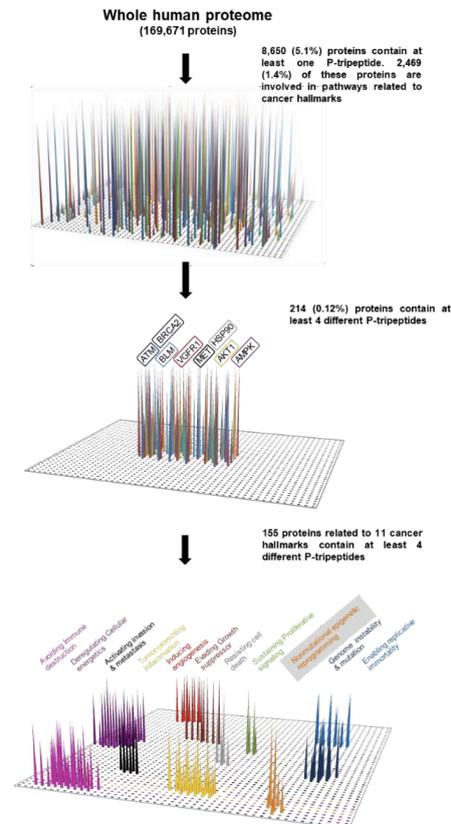


Figura 5: Schema procedurale dell'analisi *in silico* della distribuzione del tripeptide P nelle proteine coinvolte negli 11 segni distintivi del cancro.

Sulla base di questa metodologia *in silico*, abbiamo identificato EP300 e TRRAP come potenziali nuove proteine che interagiscono con SMYD3. Questi potenziali interattori di SMYD3 contenenti P- tripeptidi sono stati selezionati in base al loro ruolo prominente nella regolazione epigenetica. Infatti, EP300 e TRRAP sono componenti di grandi complessi HAT multisubunità che regolano la trascrizione dei principali oncogeni attraverso il rimodellamento della cromatina.

Validazione delle nuove interazioni di SMYD3 in linee cellulari di tumori gastrointestinali.

Sulla base della nostra analisi *in silico*, EP300 contiene un P-tripeptide (P10 in corrispondenza dell'amminoacido (aa) 1307) situato nel dominio HAT di tipo CBP/P300, suggerendo che questo dominio potrebbe essere coinvolto nell'interazione SMYD3-EP300 (Figura 6a, pannello superiore). Per convalidare questa interazione in cellulo, abbiamo eseguito un saggio di co-immunoprecipitazione in 3 linee cellulari di tumori gastrointestinali (HGC-27, HT-29 e HCT-116). È importante sottolineare che le cellule HCT-116 presentano due diverse mutazioni frameshift (c.4408del e c.5099del)



nel gene EP300, che si traducono in prodotti proteici troncati ovvero privi della regione C-terminale [32]. L'immunoprecipitazione di lisati cellulari interi con un antisiero contro SMYD3 o EP300, seguita da immunoblotting, ha rivelato che SMYD3 interagisce con EP300 in tutte le linee cellulari testate, incluso HCT-116, indicando che questa interazione probabilmente si verifica nella regione N-terminale di EP300 (Figura 6a, pannello inferiore). Questa ipotesi è ulteriormente supportata dal fatto che anche P10 si trova in questa regione.

TRRAP contiene sette diversi tripeptidi P, ovvero P3 nelle posizioni aa 1752 e 3567, P6 nelle posizioni aa 2457 e 3457, P7 nella posizione aa 3165, P8 nella posizione aa 755, P11 nella posizione aa 2488, P13 nella posizione aa 2345, e P19 nella posizione aa 3763 (Figura 6b, pannello superiore). È interessante notare che alcuni di questi P-tripeptidi si trovano nei domini FAT e FATC e nei domini di interazione TP53 e PI3K-PI4K, suggerendo che queste regioni potrebbero anche mediare l'interazione con SMYD3. L'interazione fisica tra SMYD3 endogeno e TRRAP è stata convalidata mediante test di co-immunoprecipitazione nelle linee cellulari di cancro gastrointestinale HGC-27, HT-29 e HCT-116. I nostri risultati hanno rivelato che SMYD3 è un partner molecolare di TRRAP in queste cellule (Figura 6b, pannello inferiore).

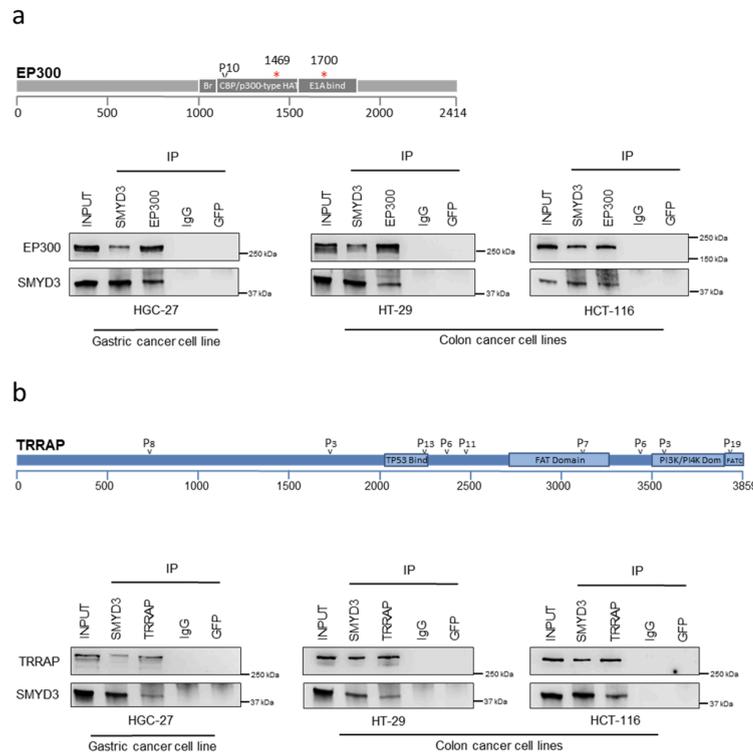


Figura 6: (a) Localizzazione del tripeptide P nel dominio HAT di tipo CBP/P300 di EP300. Gli asterischi indicano le mutazioni troncanti trovate nelle cellule HCT-116. Pannello inferiore: co-immunoprecipitazione di SMYD3 ed EP300 endogeni nelle linee cellulari di cancro gastrico HGC-27 e di cancro al colon HT-29 e HCT-116. (b) Pannello superiore: localizzazione del tripeptide P in domini specifici di TRRAP. Pannello inferiore: co-immunoprecipitazione di SMYD3 e TRRAP endogeni nel cancro gastrico HGC-27 e nelle linee cellulari di cancro del colon HT-29 e HCT-116.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Caratterizzazione della mappatura epigenetica mediata da SMYD3 in modelli cellulari del cancro del colon-retto

La caratterizzazione molecolare ed epigenetica 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.

Monitoreremo il reclutamento di SMYD3 e delle proteine interrattive nei complessi di riprogrammazione epigenetica specifici della tumorigenesi coloretale mediante ChIP-seq. Tale metodica 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 (per es. H3K4me2/3, H4K5me).

Nello specifico le linee cellulari 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 algoritmi bioinformatici specifici. L'identificazione dei siti di legame delle proteine al DNA e l'annotazione dei picchi a livello del genoma verranno eseguite mediante l'utilizzo di algoritmi bioinformatici.



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

Caratterizzazione in silico ed in cellulo degli interattori di SMYD3 coinvolti nella regolazione epigenetica del cancro del colon-retto

-Analisi in silico del numero e del tipo di P-proteine che rientrano nel cluster della riprogrammazione epigenetica del cancro del colon-retto. Calcolo del numero complessivo di P-proteine che rientrano nel cluster della riprogrammazione epigenetica del cancro del colon-retto. Parallelamente andremo a calcolare la frequenza (n. matches) dei P-tripeptidi contenuti nelle proteine di questo cluster.

-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 coloretali. Interogheremo 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 coloretali 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-streptomicina (#15140-122, Gibco). Le cellule HCEC-1CT saranno



coltivate in terreno COLO-UP (Evercyte) integrato con 100 UI/ml penicillina-streptomicina (#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 [33]. 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.

Co-immunoprecipitazioni

Le cellule saranno 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 saranno utilizzate come controllo negativo. In aggiunta tali interazioni saranno validate per IP-Massa.

RISULTATI ATTESI

Il nostro piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione del ruolo di SMYD3 e dei suoi interattori nella regolazione dello stato epigenetico e del rimodellamento della cromatina in relazione ai processi di cancerogenesi coloretale.

Tale caratterizzazione molecolare ci permetterà di individuare nuove strategie terapeutiche basate sull'uso di inibitori "small molecules" di SMYD3 che aiutino a superare la resistenza tumorale ai farmaci esistenti, così da permettere non solo di ridurre la dose e gli effetti collaterali degli stessi, 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 nei nostri recentissimi studi ([31], Fasano et al. 2023), 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 (ri)sensibilizzazione delle cellule tumorali alla terapia.

INNOVAZIONI

Con questo progetto, ci aspettiamo di decifrare il pattern epigenetico mediato da SMYD3 in associazione con le principali proteine coinvolte nella cancerogenesi coloretale.

Una piena comprensione del ruolo di SMYD3 nella regolazione epigenetica del cancro del colon-retto 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 basati su trattamenti combinati, che prevedono la combinata inibizione di SMYD3 e dei suoi interattori coinvolti nei meccanismi di cancerogenesi del cancro del colon-retto.

BIBLIOGRAFIA

1. Allis, C.D.; Jenuwein, T. The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control. *Nat Rev Genet* 2016, 17, 487–500, doi:10.1038/nrg.2016.59.
2. Misteli, T.; Finn, E.H. Chromatin Architecture Is a Flexible Foundation for Gene Expression. *Nat Genet* 2021, 53, 426–427, doi:10.1038/s41588-021-00813-2.
3. Pfister, S.X.; Ashworth, A. Marked for Death: Targeting Epigenetic Changes in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 241–263, doi:10.1038/nrd.2016.256.
4. Kouzarides, T. Histone Methylation in Transcriptional Control. *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12, 198–209, doi:10.1016/s0959-437x(02)00287-3.
5. Wang, H.; Cao, R.; Xia, L.; Erdjument-Bromage, H.; Borchers, C.; Tempst, P.; Zhang, Y. Purification and Functional Characterization of a Histone H3-Lysine 4-Specific Methyltransferase. *Mol Cell* 2001, 8, 1207–1217, doi:10.1016/s1097-2765(01)00405-1.



6. Santos-Rosa, H.; Schneider, R.; Bannister, A.J.; Sherriff, J.; Bernstein, B.E.; Emre, N.C.T.; Schreiber, S.L.; Mellor, J.; Kouzarides, T. Active Genes Are Tri-Methylated at K4 of Histone H3. *Nature* 2002, 419, 407–411, doi:10.1038/nature01080.
7. Bottino, C.; Peserico, A.; Simone, C.; Caretti, G. SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 2020, 12, doi:10.3390/cancers12010142.
8. Begley, D.A.; Krupke, D.M.; Sundberg, J.P.; Jocoy, E.L.; Richardson, J.E.; Neuhauser, S.B.; Bult, C.J. The Mouse Models of Human Cancer Database (MMHCdb). *Dis Model Mech* 2023, 16, dmm050001, doi:10.1242/dmm.050001.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.



15. 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.

16. Liu, C.; Fang, X.; Ge, Z.; Jalink, M.; Kyo, S.; Björkholm, M.; Gruber, A.; Sjöberg, J.; Xu, D. The Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) 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. 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* 2019, 38, 18, doi:10.1186/s13046-018-1011-0.

18. 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.

19. 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.

20. Sanese, P.; Fasano, C.; Simone, C. Playing on the Dark Side: SMYD3 Acts as a Cancer Genome Keeper in Gastrointestinal Malignancies. *Cancers (Basel)* 2021, 13, 4427, doi:10.3390/cancers13174427.

21. 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.

22. 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.

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.

24. Ortel, I.; Keller, U. Combinatorial Assembly of Simple and Complex D-Lysergic Acid Alkaloid Peptide Classes in the Ergot Fungus *Claviceps Purpurea*. *J Biol Chem* 2009, 284, 6650–6660, doi:10.1074/jbc.M807168200.

25. McInnes, C.; Estes, K.; Baxter, M.; Yang, Z.; Farag, D.B.; Johnston, P.; Lazo, J.S.; Wang, J.; Wyatt, M.D. Targeting Subcellular Localization through the Polo-Box Domain: Non-ATP Competitive Inhibitors Recapitulate a PLK1 Phenotype. *Mol Cancer Ther* 2012, 11, 1683–1692, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0006-T.

26. Robinson, C.W.; Rye, C.S.; Chessum, N.E.A.; Jones, K. A Model β -Sheet Interaction and Thermodynamic Analysis of β -Strand Mimetics. *Org Biomol Chem* 2015, 13, 7402–7407, doi:10.1039/c5ob00886g.

27. Vello, T.P.; da Silva, L.M.B.; Silva, G.O.; de Camargo, D.H.S.; Corrêa, C.C.; Bof Bufon, C.C. Hybrid Organic/Inorganic Interfaces as Reversible Label-Free Platform for Direct Monitoring of Biochemical Interactions. *Biosens Bioelectron* 2017, 87, 209–215, doi:10.1016/j.bios.2016.08.050.

28. Kanduc, D. Protein Information Content Resides in Rare Peptide Segments. *Peptides* 2010, 31, 983–988, doi:10.1016/j.peptides.2010.02.003.

29. Trost, B.; Kanduc, D.; Kusalik, A. Rare Peptide Segments Are Found Significantly More Often in Proto-Oncoproteins than Control Proteins: Implications for Immunology and Oncology. *J R Soc Interface* 2009, 6, 123–127, doi:10.1098/rsif.2008.0320.

30. Kusalik, A.; Trost, B.; Bickis, M.; Fasano, C.; Capone, G.; Kanduc, D. Codon Number Shapes Peptide Redundancy in the Universal Proteome Composition. *Peptides* 2009, 30, 1940–1944, doi:10.1016/j.peptides.2009.06.035.

31. Fasano, C.; Lepore Signorile, M.; De Marco, K.; Forte, G.; Sanese, P.; Grossi, V.; Simone, C. Identifying Novel SMYD3 Interactors on the Trail of Cancer Hallmarks. *Comput Struct Biotechnol J* 2022, 20, 1860–1875, doi:10.1016/j.csbj.2022.03.037.

32. Bryan, E.J.; Jokubaitis, V.J.; Chamberlain, N.L.; Baxter, S.W.; Dawson, E.; Choong, D.Y.H.; Campbell, I.G. Mutation Analysis of EP300 in Colon, Breast and Ovarian Carcinomas. *Int J Cancer* 2002, 102, 137–141, doi:10.1002/ijc.10682.

33. Todaro, M.; Alea, M.P.; Di Stefano, A.B.; Cammareri, P.; Vermeulen, L.; Iovino, F.; Tripodo, C.; Russo, A.; Gulotta, G.; Medema, J.P.; et al. Colon Cancer Stem Cells



Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007, 1, 389–402, doi:10.1016/j.stem.2007.08.001.

TIMELINE

Anni 1-3

Tutte le attività di ricerca indicate nel presente progetto saranno portate avanti per tutta la durata dello stesso al fine di caratterizzare dal punto di vista molecolare il maggior numero possibile di interattori di SMYD3 coinvolti nella regolazione epigenetica del cancro coloretale. Quindi, procederemo con la caratterizzazione della mappatura epigenetica di SMYD3 mediante analisi NGS e in parallelo caratterizzeremo i nuovi interattori epigenetici di SMYD3 attraverso analisi di co-IP in cellulo e validazione per IP-Massa. I dati ottenuti saranno elaborati mediante specifici software per l'analisi di dati molecolari.



TITOLO DEL PROGETTO

**5. IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POTENZIALI TARGET MOLECOLARI PER
CONTRASTARE LA FARMACORESISTENZA NEL TRATTAMENTO DEI CARCINOMI
DEL TRATTO GASTROENTERICO**

2786668

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Basic Mechanisms of Cancer Therapeutics - BMCT

Responsabile: Dituri Francesco

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: Carcinoma, HCC, sorafenib, regorafenib, target farmacologici, farmacoresistenza, staminalità cancerosa

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una delle neoplasie epatiche più aggressive e letali, e rappresenta la seconda causa di morte legata a cancro globalmente, con una incidenza tendenzialmente in crescita. L'HCC generalmente insorge in un quadro di epatopatia cronica (correlata a eziologia virale, metabolica, o da abuso di alcool), spesso progredita in uno stadio di cirrosi (1,2). Sebbene vi sia stato negli anni un incremento quantitativo e qualitativo delle opzioni terapeutiche di tipo farmacologico, il loro impiego tuttavia non determina complessivamente un esito prognostico soddisfacente. Le terapie chirurgiche (che includono resezione, termoablazione, chemoembolizzazione e trapianto epatico), per quanto efficaci nella rimozione delle masse tumorali macroscopicamente osservabili, non portano alla eradicazione



definitiva della neoplasia, data l'elevata frequenza di recidive causata dalla disseminazione di cellule metastatiche (3).

Le terapie farmacologiche attualmente in uso o in sperimentazione comprendono farmaci basati su piccole molecole con azione inibitoria di molteplici bersagli molecolari (come sorafenib, regorafenib, cabozantinib, levatinib), e anticorpi monoclonali umanizzati che bloccano recettori di fattori di crescita (come il bevacizumab), o "checkpoint" immunologici (includendo durvalumab, tremelimumab, atezolizumab, pembrolizumab), frequentemente in combinazione (4,5).

La parziale efficacia di molti farmaci nel contesto del trattamento dell'HCC, così come in generale di tutte le neoplasie solide, si può attribuire a molteplici fattori di carattere farmacocinetico o farmacodinamico, inclusa la limitata biodisponibilità e/o stabilità del farmaco nel sito di interesse, nonché la notevole capacità delle cellule cancerose di sviluppare farmacoresistenza. Quest'ultimo fenomeno è di grande interesse nella ricerca cancerologica, dato che rappresenta uno dei maggiori ostacoli alla eradicazione definitiva della malattia. Il riadattamento dinamico a livello genotipico, epigenetico e metabolico delle cellule tumorali in risposta e stress di diversa natura è alla base della loro capacità di "de-sensibilizzarsi" all'azione di molecole disegnate per bersagliare e inibire interruttori molecolari di segnalazione intracellulare, e spesso comporta l'attivazione di pathway compensatori alternativi nel tentativo di ripristinare i processi interrotti (6,7).

Approcci recenti per ovviare alla farmacoresistenza puntano a identificare gli intermedi di segnalazione chiave di questi pathway di risposta e inibirli nella prospettiva di elaborare strategie di combinazioni di farmaci.

L'esistenza di cellule staminali cancerose è stato postulato essere alla base della resistenza farmacologica delle cellule tumorali ai trattamenti farmacologici. Queste cellule sarebbero dotate di una particolare plasticità che le rende capaci di non rispondere ad agenti terapeutici come gli inibitori di pathway di signaling intracellulare, e rappresentano quindi una riserva di cellule maligne atte ad espandersi per rimpiazzare gli elementi cellulari sensibili eliminati con i trattamenti (8). Una intensa attività di ricerca è in corso per identificare marcatori chiave di cellule tumorali staminali che possano essere impiegati per una selettiva eliminazione di questi elementi (9). I markers cancerosi staminali finora associati all'HCC includono CD13, CD24, CD44, CD133 ed EpCAM (10). Per quanto promettente, la prospettiva di bersagliare le cellule che esprimono questi marker trova alcuni limiti, essendo questi markers non unicamente espressi dalle cellule tumorali, ma anche da cellule normali come fibroblasti e leucociti (11,12). Ciò pone potenziali limitazioni all'impiego di terapie





mirate, che potrebbero quindi comportare effetti indesiderati off-target su cellule di tessuti normali. Inoltre, la più alta espressione di questi marker di staminalità cancerosa in soggetti con HCC non è sempre direttamente correlata con un minore tasso di sopravvivenza degli stessi, lasciando intravedere un significato funzionale degli stessi non univocamente pro-tumorale. Considerando la complessità dei processi biologici, ciò suggerisce che un marker catalogato come di staminalità tumorale possa funzionare attivando geni pro- o anti-tumoralmente simultaneamente e/o in modo contesto-dipendente. Ne consegue che l'efficacia di terapie basate sull'inibizione di marker di staminalità o di multiple chinasi (con farmaci come sorafenib o regorafenib) potrebbe essere potenziata in maniera significativa associandola all'inibizione funzionale di geni pro-tumoralmente attivati per effetto dell'inibizione dei marker staminali cancerosi stessi o della farmaco-resistenza indotta dai farmaci.

Il presente progetto si prefigge di individuare geni up-regolati in cellule HCC in risposta all'inibizione del marker di staminalità cancerosa CD44, o del trattamento con sorafenib e regorafenib. I geni tra questi che abbiano un potenziale coinvolgimento nella progressione neoplastica, data la correlazione tra la loro più alta espressione nei tessuti HCC e la prognosi sfavorevole della malattia, sono potenziali nuovi target farmacologici, la cui inibizione in combinazione con quella di CD44 o con l'impiego di sorafenib e regorafenib potrebbe tradursi in una sinergica azione anti-tumorale.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1:

(1) Identificazione di potenziali geni mediatori di risposta pro-neoplastica o di farmacoresistenza up-regolati in cellule HCC a seguito del silenziamento del marker di staminalità cancerosa CD44, o del trattamento con i farmaci anti-proliferativi sorafenib o regorafenib: validazione dei dati preliminari di trascrittomiche tramite real time PCR quantitativa (qPCR) e western blot. (2) Valutazione del potenziale effetto sinergico anti-tumorale dell'inibizione di CD44 accoppiata con il blocco funzionale dei geni associati a progressione dell'HCC up-regolati per effetto dell'inibizione di CD44, in saggi di proliferazione/vitalità cellulare in HCC in vitro. (3) Valutazione del potenziale effetto sinergico anti-tumorale del trattamento con sorafenib o regorafenib, accoppiato con il blocco funzionale dei geni associati a progressione dell'HCC up-regolati da sorafenib o regorafenib, in saggi di proliferazione/vitalità cellulare in HCC in vitro.

Obiettivo specifico 2:



Valutazione dell'azione anti-tumorale sinergica derivante dall'inibizione dell'attività dei geni di risposta pro-neoplastica/farmacoresistenza in associazione all'inibizione di CD44 o sorafenib/regorafenib in modelli di tumorigenesi sperimentale di HCC in vivo.

Obiettivo specifico 3:

Analisi dei pathway molecolari coinvolti nella sinergia farmacologica stabilita negli obiettivi precedenti in cellule in vitro e in modelli in vivo. Ricerca di marcatori di risposta al sinergismo farmacologico.

OBIETTIVO 1

Sarà eseguita una validazione tramite qPCR dei dati di espressione dei geni di interesse emersi dall'analisi trascrittomiche di cellule di HCC (HLE e HLF) controllo (scramble) e silenziate per CD44, trattate con veicolo (dimetil solfossido, DMSO), o con sorafenib o regorafenib. Nello specifico, tali geni sono ritenuti di interesse se rispondono ai 2 seguenti requisiti: 1) sono up-regolati di un fattore ≥ 2 per effetto dei trattamenti con i farmaci o silenziamento di CD44; 2) la loro maggiore espressione nei tessuti HCC è associata a prognosi sfavorevole (Dati preliminari, Figure 1-4).

Per conseguire maggior robustezza statistica della validazione, tale analisi sarà estesa ad una ulteriore linea HCC (HLC19), ed eseguita su cellule trattate con dosaggi dei farmaci e tempi di trattamento addizionali, rispetto a quelli impiegati nell'analisi trascrittomiche preliminare. I geni di interesse la cui variazione di espressione a seguito del silenziamento del CD44 o dei trattamenti farmacologici risulterà confermata dall'analisi tramite qPCR e western blot saranno oggetto di ulteriori investigazioni. Verranno quindi disegnate specifiche sequenze di RNA antisense per il targeting transiente o stabile (tramite strategia RNA-interference) di questi mRNA. Le cellule verranno quindi impiegate in saggi di proliferazione in presenza/assenza di silenziamento dell'espressione dei mRNA di interesse validati, in combinazione con gain/loss-of function di CD44, o presenza/assenza di sorafenib o regorafenib. I geni per i quali il silenziamento, insieme al blocco di CD44 o il trattamento con sorafenib o regorafenib, risultassero in un rinforzo sinergico dell'azione antiproliferativa/pro-apoptotica dei farmaci in vitro saranno candidati come potenziali nuovi target farmacologici da investigare nelle fasi pre-cliniche successive.



OBIETTIVO 2

I geni individuati nell'obiettivo 1 come candidati per il targeting farmacologico combinato con il blocco di CD44 o i farmaci sorafenib e regorafenib saranno oggetto di investigazione in modelli murini di tumorigenesi di HCC. Questa sessione sperimentale avrà lo scopo di validare in vivo la sinergia ipotizzata nei dati preliminari (Figure 1-4). I modelli impiegati saranno basati su CDX (cell line-derived xenograft, con impianto sottocutaneo o ortotopico intraepatico), PDX (patient-derived xenograft), o sull'uso di carcinogeni chimici (come N-nitroso-dietilammina). Un modello basato sull'inoculo ortotopico di cellule di epatoma, H129, in fegati di topi singenici potrà essere utile per il consolidamento dei dati.

Nell'esecuzione di questi modelli, si testeranno:

1. L'inibizione di CD44 (tramite silenziamento stabile) o con inibitori (come l'anticorpo monoclonale umanizzato RG7356) in combinazione con inibitori chimici (se disponibili) o sequenze polinucleotidiche RNA antisense incapsulate in vescicole liposomali per il targeting dei mRNA di risposta al silenziamento di CD44 validati nell'obiettivo 1.
2. I farmaci sorafenib o regorafenib in combinazione con inibitori chimici (se disponibili) o sequenze polinucleotidiche RNA antisense incapsulate in vescicole liposomali per il targeting dei mRNA di risposta agli stessi farmaci validati nell'obiettivo 1.

I farmaci saranno somministrati agli animali per via orale in dosaggi tra 10 e 50 mg/kg, in accordo con piani di somministrazione descritti in letteratura (13–16).

Laddove il silenziamento transiente dei geni di interesse non dovesse risultare efficiente si provvederà ad un silenziamento stabile nel tempo (shRNA) tramite infezione di cellule HCC con vettori lentivirali o retrovirali. Questa strategia sarà applicabile limitatamente ai modelli CDX, che sono basati su cellule HCC immortalizzate e non ai modelli PDX (basati su tessuti tumorali di pazienti) o di carcinogenesi chimica.

L'accrescimento dei tumori verrà monitorato nel tempo per la valutazione eventuale risposta degli stessi ai trattamenti. Il volume delle masse tumorali nei gruppi di controllo e dei trattati verrà misurato per stimare qualitativamente e quantitativamente gli effetti della sinergia farmacologica prevista. Agli end-point stabiliti gli animali saranno sacrificati e le masse espantate per indagini immunoistochimiche e molecolari. Tali analisi consentiranno di individuare markers tissutali di risposta farmacologica, come descritto nell'obiettivo 3.



OBIETTIVO 3

Una volta confermata l'ipotesi di sinergia farmacologica ipotizzata nella parte preliminare del progetto (Figure 1-4) verrà condotta un'indagine biochimica, molecolare e istologica ad ampio spettro sui pathway del segnale coinvolti in questa sinergia valutando l'espressione/attivazione di marker ed effettori di proliferazione (come Ki67, MYK, MAP chinasi), di stress (p38), di autofagia (p62, LC3B), di apoptosi (caspasi) in modelli in vitro e in vivo. L'analisi riguarderà sia cellule HCC trattate in vitro come previsto dalla parte progettuale attinente all'obiettivo 1, sia tumori generati nei modelli murini di HCC come descritto nell'obiettivo 2. Oltre alla quantificazione e localizzazione tissutale dei marcatori, le indagini istologiche quantificheranno parametri neoplastici come il grado di differenziamento cellulare, di vascolarizzazione, la componente stromale e l'infiltrazione immunologica nei tumori sperimentali in relazione ai trattamenti.

DATI PRELIMINARI

I dati in nostro possesso, ottenuti da analisi trascrittomiche, rivelano che, a seguito del silenziamento stabile dell'espressione del marker di staminalità cancerosa, CD44, in cellule HCC (HLE e HLF), risulta up-regolata l'espressione del mRNA di 123 geni, e down-regolata quella di 754 geni (fold change ≥ 2 e ≤ 0.5 , rispettivamente) (Figura 1). Tramite interrogazione del database pubblico di dati clinici Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) abbiamo selezionato i geni up-regolati il cui maggior livello di espressione intratumorale risulti significativamente ($p \leq 0.05$) associato a prognosi sfavorevole dei pazienti HCC. Questi geni (N = 10) sono da considerarsi potenzialmente coinvolti nella progressione maligna della neoplasia, e quindi possibili target farmacologici. Nello specifico, come ipotizzato nella sezione introduttiva, il blocco funzionale di questi geni, combinato con quello di CD44, potrebbe tradursi in una sinergica azione anti-tumorale.

Gli stessi dati di trascrittomiche hanno rivelato che, per effetto del trattamento delle stesse cellule HCC con i farmaci sorafenib e regorafenib alla concentrazione di 2.5 μM per 16 ore, gruppi di geni risultano up- o down-regolati a livello di mRNA (fold change ≥ 2 e ≤ 0.5 , rispettivamente). Specificamente, dopo trattamento con sorafenib 153 geni risultano up-regolati e 231 geni down-regolati, mentre dopo trattamento con regorafenib 169 geni risultano up-regolati e 238 geni down-regolati. Come per CD44, tra i geni up-regolati a seguito del trattamento con i 2 farmaci, sono stati selezionati esclusivamente quelli per i quali risulti una associazione statisticamente significativa tra up-regolazione e prognosi sfavorevole in pazienti HCC (N = 9 per sorafenib e N = 7 per



regorafenib, figure 2 e 3). I prodotti di questi geni rappresentano potenziali mediatori di farmacoresistenza, e il blocco funzionale della loro attività, associato al trattamento con i farmaci che ne inducono l'up-regolazione, potrebbe tradursi in un potenziamento sinergico dell'azione anti-tumorale dei farmaci stessi.

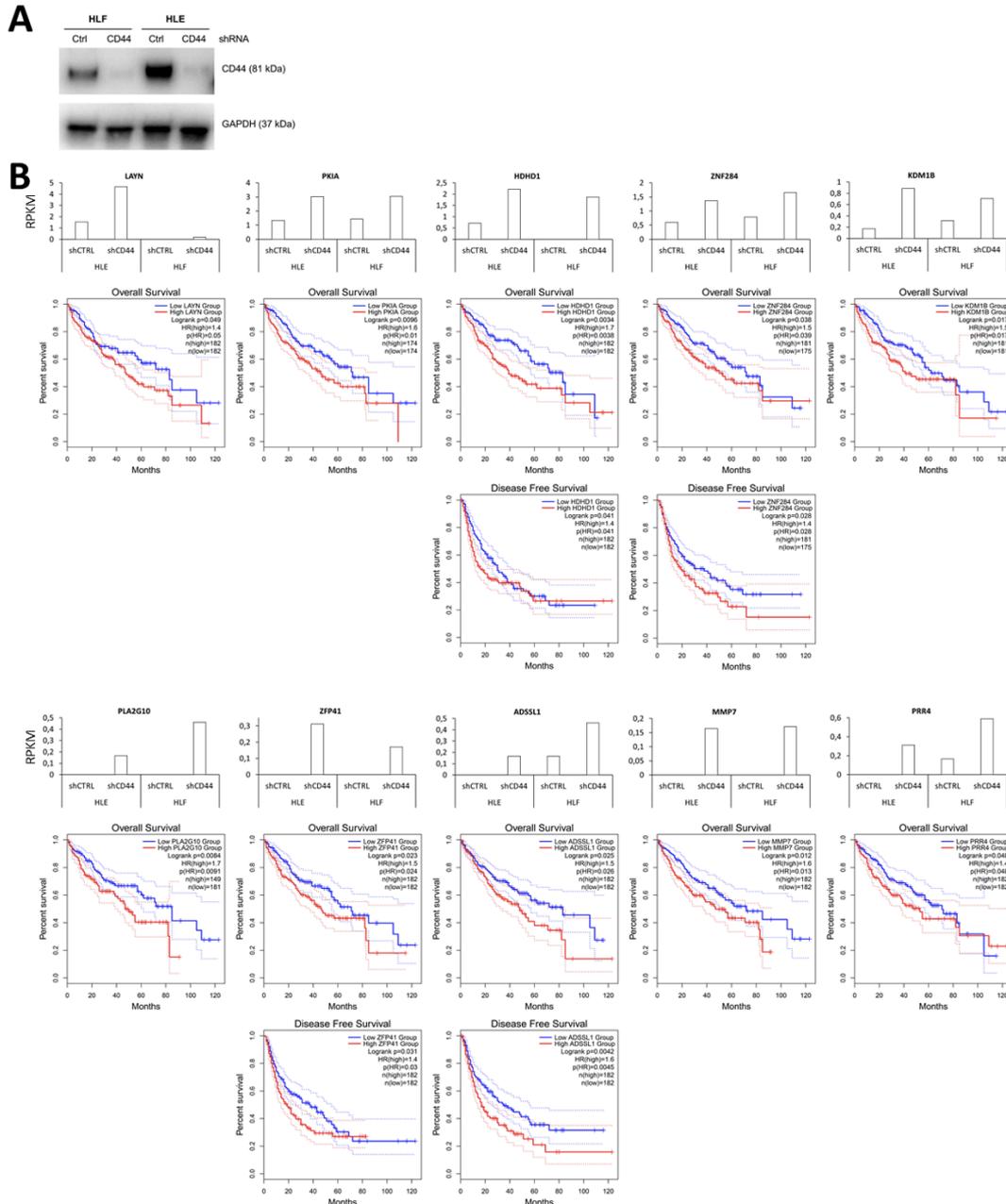




Figura 1. (A) Western blot per l'efficienza di silenziamento di CD44 in linee cellulari di HCC, HLE e HLF; GAPDH è usato come housekeeping gene per il controllo di caricamento (riadattato da Dituri et al, 2020 (17)). (B) Analisi trascrittomiche di cellule HCC, HLE e HLF, trasfettate con vettore per l'espressione stabile di short hairpin RNA controllo (Ctrl-shRNA, non-targeting), o per il silenziamento di CD44 (CD44-shRNA). Sono riportati esclusivamente i geni per i quali il fold change è ≥ 2 per effetto del silenziamento, e per i quali esiste una correlazione statisticamente significativa tra maggior espressione nei tessuti tumorali di pazienti HCC e prognosi sfavorevole (overall e disease free survival, mostrate nelle curve di sopravvivenza Kaplan-Meier). RPKM = Reads Per Kilobase Million

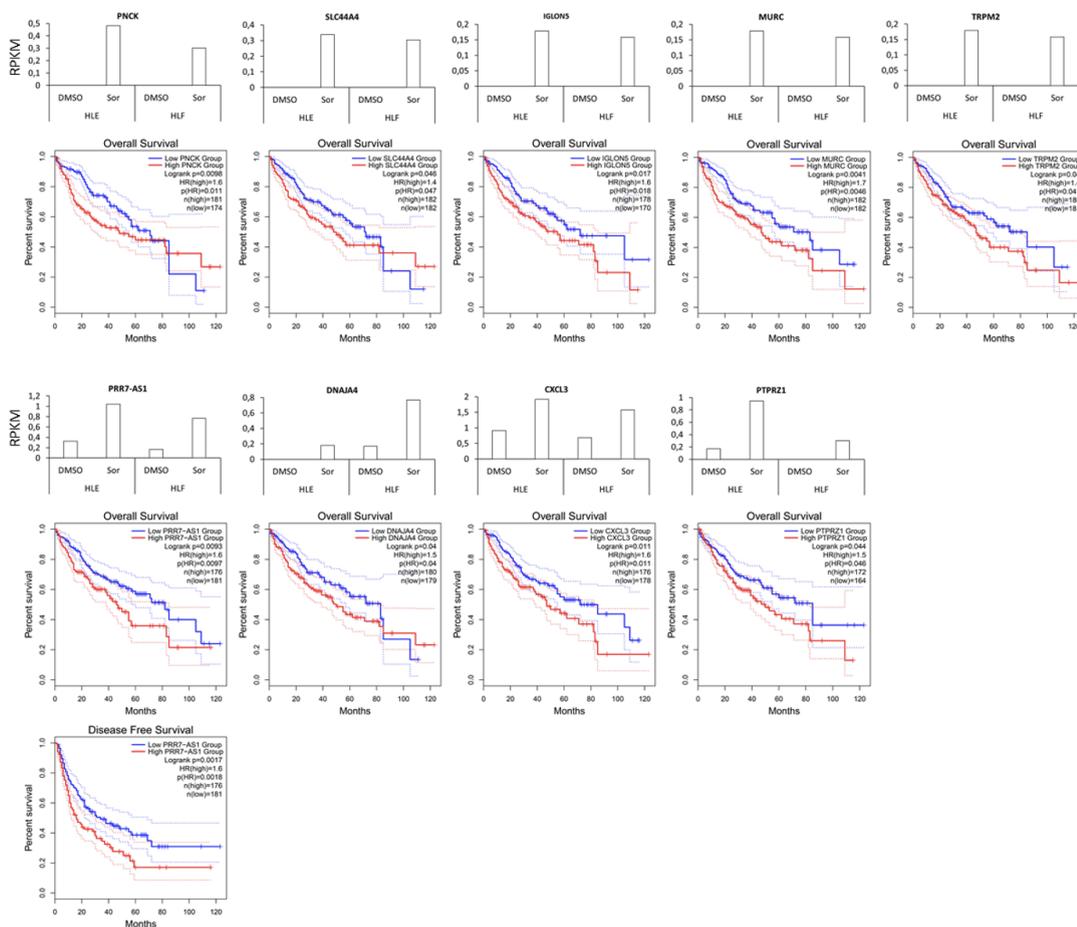


Figura 2. Analisi trascrittomiche di cellule HCC, HLE e HLF trattate per 16 ore con veicolo (DMSO), o con sorafenib (Sor) alla concentrazione di 2.5 μM . Sono riportati esclusivamente i geni per i quali il fold change è ≥ 2 per effetto del trattamento, e per i quali esiste una correlazione statisticamente significativa tra maggior espressione nei



tessuti tumorali di pazienti HCC e prognosi sfavorevole (overall e disease free survival, mostrate nelle curve di sopravvivenza Kaplan-Meier). RPKM = Reads Per Kilobase Million

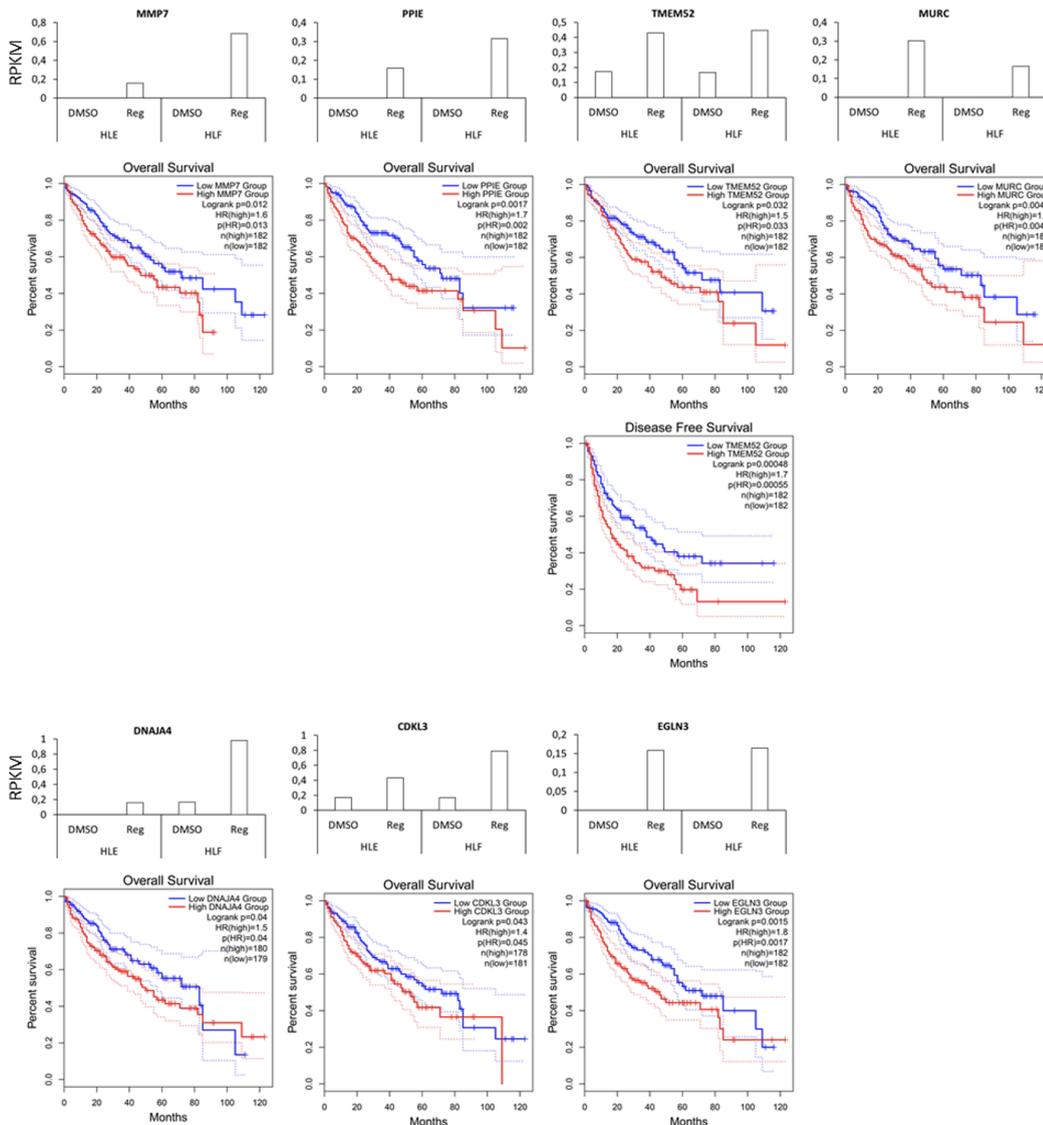


Figura 3. Analisi trascrittomiche di cellule HCC, HLE e HLF trattate per 16 ore con veicolo (DMSO), o con regorafenib (Reg) alla concentrazione di 2.5 μ M. Sono riportati esclusivamente i geni per i quali il fold change è ≥ 2 per effetto del trattamento, e per i quali esiste una correlazione statisticamente significativa tra maggior espressione nei tessuti tumorali di pazienti HCC e prognosi sfavorevole (overall e disease free survival,



mostrate nelle curve di sopravvivenza Kaplan-Meier). RPKM = Reads Per Kilobase Million

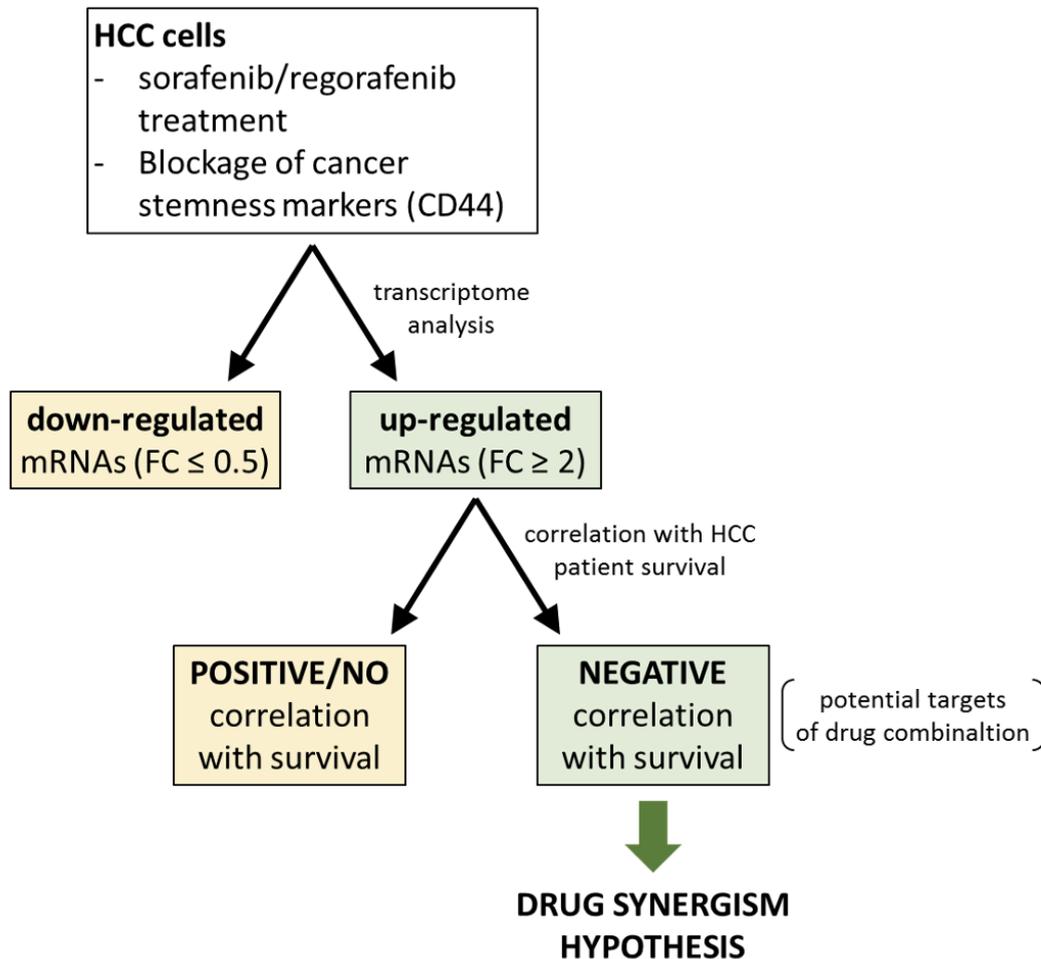


Figura 4. Diagramma descrittivo dell'ipotesi di partenza del progetto. FC = Fold Change.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Per l'ottenimento dei dati preliminari, sono state usate linee cellulari di HCC, HLE e HLF, controllo e silenziate stabilmente per CD44. Queste cellule sono state trattate con DMSO o sorafenib, o regorafenib alla concentrazione 2.5 µM per 16 ore. L'RNA totale è stato quindi estratto, dosato, controllato per l'integrità, e sottoposto ad analisi trascrittomica.



Per il conseguimento degli obiettivi annuali si condurranno esperimenti in vitro (colture cellulari, real-time PCR, western blot) e in vivo. Questi ultimi consisteranno in modelli animali sperimentali di HCC, basati su xenotrapianti (sottocutanei o ortotopici) di cellule HCC (CDX), o innesti sottocutanei di tessuti tumorali da pazienti (PDX). I modelli PDX saranno generati a partire da frammenti tumorali di HCC ottenuti da chirurgia tramite resezione.

I test statistici utilizzati saranno di tipo parametrico o non sulla base del tipo di distribuzione dei dati (normale o non). Nelle analisi di sopravvivenza con lo stimatore di Kaplan-Meier il cutoff che divide i gruppi in high e low è rappresentato dalla mediana.

RISULTATI ATTESI

(1) Validazione dei dati di espressione dei geni di interesse individuati nell'analisi trascrittomico preliminare (Figure 1-4) attraverso quantificazione dei livelli di mRNA (tramite qPCR) e di prodotto proteico (tramite western blot) degli stessi geni. Si prevede un ragionevole accordo sperimentale tra risultati dell'analisi trascrittomico e della validazione successiva.

(2) Dimostrazione dell'efficacia sinergica in senso anti-proliferativo/pro-apoptotico dell'inibizione combinata di CD44 e della funzione dei geni potenziali tumor-supporter up-regolati in risposta all'inibizione di CD44 (Figura 1) in modelli in vitro e in vivo di HCC.

(3) Dimostrazione della sinergia anti-proliferativa/pro-apoptotica dell'azione di sorafenib o regorafenib combinata con l'inibizione dell'attività dei geni potenziali di farmaco-resistenza up-regolati in risposta al trattamento con gli stessi farmaci (Figure 2, 3) in modelli in vitro e in vivo di HCC.

INNOVAZIONI

La ricerca sul cancro è incessantemente impegnata nell'identificazione di nuovi target molecolari coinvolti nella progressione maligna da aggredire farmacologicamente per migliorare il decorso clinico della patologia. In particolare, di grande interesse è l'individuazione di target (già noti o di nuova scoperta) la cui inibizione farmacologica combinata possa tradursi in effetti anti-tumorali sinergici, dato il vantaggio derivante dalla maggior efficacia della combinazione di molecole rispetto alla somma degli effetti delle molecole somministrate singolarmente. Il carattere innovativo del nostro progetto



risiede nell'aver rivelato una inattesa iper-attivazione, in cellule HCC, di geni associati a progressione di questa neoplasia, in risposta all'inibizione di marcatori di staminalità cancerosa o all'azione di farmaci in uso nella pratica clinica (sorafenib/regorafenib). Il blocco funzionale di questi geni, in associazione all'inibizione di marcatori di staminalità cancerosa, o all'impiego di quei farmaci potrebbe tradursi in una amplificazione su base sinergica dell'efficacia anti-tumorale. I risultati attesi nello svolgimento del progetto puntano alla rilevante finalità di by-passare le resistenze farmacologiche indotte dalle molecole usate nel trattamento dell'HCC e pongono le basi per il raggiungimento di un reale beneficio in termini prognostici per questa neoplasia.

BIBLIOGRAFIA

1. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* (2021) doi: 10.1038/s41572-020-00240-3
2. Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2011) doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.006
3. Yu J jing, Xiao W, Dong S lin, Liang H fang, Zhang Z wei, Zhang B xiang, Huang Z yong, Chen Y fa, Zhang W guang, Luo H ping, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* (2018) doi: 10.1186/s12885-018-4744-4
4. Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, Maini MK, Mazzaferro V, Pinato DJ, Pikarsky E, Zhu AX, Finn RS. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* (2022) doi: 10.1038/s41571-021-00573-2
5. Kudo M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Latest advances. *Cancers (Basel)* (2018) 10: doi: 10.3390/cancers10110412
6. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, Wang Q, Wang S, Rong D, Reiter FP, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther* (2020) doi: 10.1038/s41392-020-0187-x
7. Bao MHR, Wong CCL. Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer. *Cells* (2021) doi: 10.3390/cells10071715

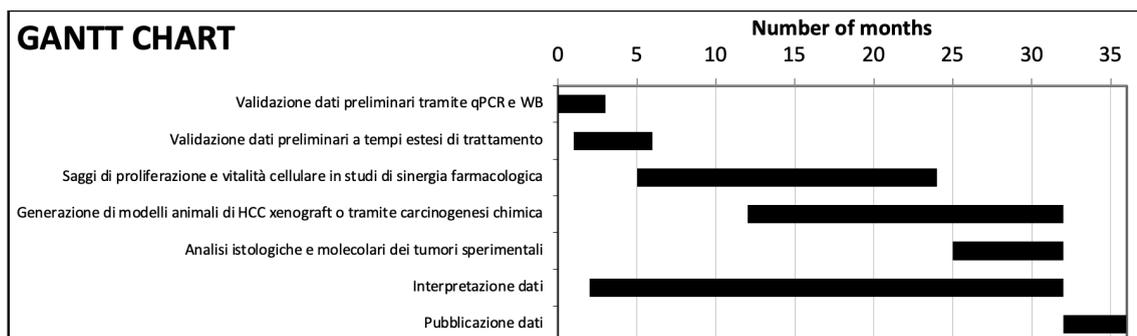


8. Wang N, Wang S, Li MY, Hu BG, Liu LP, Yang SL, Yang S, Gong Z, Lai PBS, Chen GG. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* (2018) doi: 10.1177/1758835918816287
9. Gramantieri L, Giovannini C, Suzzi F, Leoni I, Fornari F. Hepatic cancer stem cells: Molecular mechanisms, therapeutic implications, and circulating biomarkers. *Cancers (Basel)* (2021) doi: 10.3390/cancers13184550
10. Tsui YM, Chan LK, Ng IOL. Cancer stemness in hepatocellular carcinoma: mechanisms and translational potential. *Br J Cancer* (2020) doi: 10.1038/s41416-020-0823-9
11. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* (2009) doi: 10.1007/s10616-009-9190-3
12. McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. *Front Immunol* (2015) doi: 10.3389/fimmu.2015.00068
13. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* (2006) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377
14. Tai WT, Chu PY, Shiau CW, Chen YL, Li YS, Hung MH, Chen LJ, Chen PL, Su JC, Lin PY, et al. STAT3 mediates regorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* (2014) doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0725
15. Liu S, Du Y, Ma H, Liang Q, Zhu X, Tian J. Preclinical comparison of regorafenib and sorafenib efficacy for hepatocellular carcinoma using multimodality molecular imaging. *Cancer Lett* (2019) doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.037
16. Kissel M, Berndt S, Fiebig L, Kling S, Ji Q, Gu Q, Lang T, Hafner FT, Teufel M, Zopf D. Antitumor effects of regorafenib and sorafenib in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* (2017) doi: 10.18632/oncotarget.22334
17. Dituri F, Scialpi R, Schmidt TA, Frusciante M, Mancarella S, Lupo LG, Villa E, Giannelli G. Proteoglycan-4 is correlated with longer survival in HCC patients and enhances sorafenib and regorafenib effectiveness via CD44 in vitro. *Cell Death Dis* (2020) 11: doi: 10.1038/s41419-020-03180-8



TIMELINE

Procedure	Inizio	Termine	Durata
Validazione dati preliminari tramite qPCR e WB	0	3	3
Validazione dati preliminari a tempi estesi di trattamento	1	6	5
Saggi di proliferazione e vitalità cellulare in studi di sinergia farmacologica	5	24	19
Generazione di modelli animali di HCC xenograft o tramite carcinogenesi chimica	12	32	20
Analisi istologiche e molecolari dei tumori sperimentali	25	32	7
Interpretazione dati	2	32	30
Pubblicazione dati	32	36	4





TITOLO DEL PROGETTO

6. DISBIOSI INTESTINALE E CANCRO DEL COLON-RETTO: IL POLIFOSFATO INORGANICO COME NUOVA ED INASPETTATA MOLECOLA CARDINE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE. STUDIO IN VITRO E IN VIVO.

2786665

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Tumor Microenvironment - TME

Responsabile: Arre' Valentina

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: CRC, iPolyP, TRPM8, biomarcatore, proliferazione, infiammazione

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

Il carcinoma del colon retto è la terza neoplasia più comunemente diagnosticata e la seconda causa di morte per cancro a livello globale.

Gli adenocarcinomi, che si sviluppano dalle cellule epiteliali ghiandolari del colon e del retto, costituiscono i tumori del colon-retto maggiormente individuati (>90%) (1).

Esistono tre tipi principali di CRC: sporadici, ereditari e associati a colite.

Circa il 60/65% dei casi di CRC insorgono sporadicamente, cioè in individui senza una storia familiare di CRC o mutazioni genetiche ereditarie che ne aumentano il rischio di insorgenza.



Il CRC sporadico, sopraggiunge a seguito di aberrazioni genetiche ed epigenetiche somatiche acquisite, attribuibili per la maggior parte a fattori di rischio potenzialmente modificabili.

Circa il 25% dei casi di CRC ha una storia familiare senza alcuna evidente sindrome tumorale ereditaria. Solo il 5% è attribuito a sindromi tumorali ereditarie come il cancro coloretale non poliposico ereditario (HNPCC, noto anche come sindrome di Lynch) o la poliposi adenomatosa familiare (FAP), causate da mutazioni germinali ereditate in geni rari ma ad alta penetranza (ad esempio, MLH1 e APC, rispettivamente) (2).

La storia naturale del CRC può essere suddivisa in quattro fasi principali: iniziazione, promozione, progressione e metastasi (3).

Il CRC si sviluppa quando le cellule epiteliali acquisiscono una serie di alterazioni genetiche o epigenetiche che le rendono iperproliferative. Queste cellule in rapido sviluppo formano un adenoma benigno, che può evolvere in cancro e metastatizzare (4).

Lo sviluppo del CRC è correlato a fattori di rischio non modificabili e modificabili. I fattori di rischio non modificabili, detti così perchè non possono essere controllati dal paziente, sono sesso, età, razza, storia familiare, presenza di polipi adenomatosi o diagnosi di malattie infiammatorie intestinali (IBD).

I fattori modificabili, invece, sono legati alle abitudini o agli stili di vita individuali. Modificando o alterando tali fattori, il rischio di CRC può essere ridotto (5).

Tra i fattori ambientali, modificabili, il ruolo dei microrganismi nella biologia del cancro è sempre più riconosciuto (6).

Ospitando circa 3×10^{13} batteri, il colon-retto interagisce con un gran numero di microrganismi, con i quali l'epitelio intestinale è in costante dialogo (7).

Questi microrganismi sono importanti per la fisiologia gastrointestinale e, cambiamenti nella loro abbondanza relativa, possono alterare l'equilibrio, l'immunità e il metaboloma portando a malattie intestinali ed extraintestinali. Secondo evidenze sperimentali, il microbioma intestinale è coinvolto nell'insorgenza, nella progressione e nella risposta al trattamento del CRC. Nei pazienti con CRC, infatti, si possono osservare cambiamenti sostanziali nell'abbondanza di batteri specifici e di molecole prodotte da essi (8).

Il polifosfato inorganico (iPolyP), molecola altamente pro-infiammatoria, è prodotta dalle piastrine, da alcuni batteri del tratto gastrointestinale ed è abbondante in molte

cellule tumorali. Si è visto che alcuni fattori come lo stress ossidativo e una limitazione dei nutrienti, possono upregolare la sintesi batterica del polifosfato inorganico; nell'adenocarcinoma dell'intestino tenue, infatti, sono stati trovati elevati livelli di polifosfato inorganico, che agisce come fonte di energia per le cellule tumorali (9).

Il polifosfato, inoltre, regola l'attività di mTOR, un'importante chinasi coinvolta nella proliferazione cellulare, il cui signaling è comunemente attivato nei tumori (10).

Per tutte le suddette ragioni e poiché, nel microambiente tumorale del CRC, sono determinanti le molecole prodotte dal microbioma, il nostro obiettivo è quello di valutare se il polifosfato inorganico svolge un ruolo importante nella progressione e crescita tumorale.

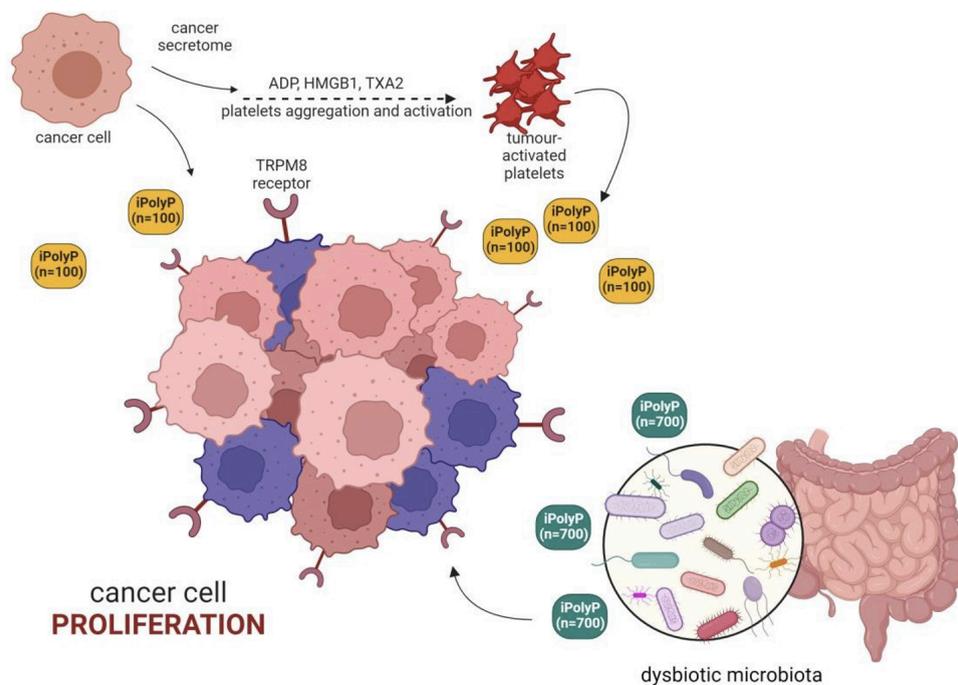


Figura 1: Graphical Abstract dello studio proposto.

Il polifosfato inorganico derivante dal microbiota intestinale, da piastrine e da cellule neoplastiche, promuove la crescita tumorale del carcinoma del colon-retto.



OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: Dosaggio del polifosfato inorganico in linee cellulari tumorali, tessuti biotipici umani e murini di carcinoma del colon retto, rispetto alla controparte wild-type. Screening proteico per il recettore TRPM8 in linee cellulari tumorali e tessuti biotipici umani e murini di carcinoma del colon- retto rispetto alla controparte wild-type.

Obiettivo specifico 2: Determinare attraverso saggi funzionali se l'abbondanza di polifosfato nei tessuti tumorali, ha un ruolo nella proliferazione e migrazione delle cellule tumorali di CRC.

Obiettivo specifico 3: Attribuire una nuova funzione al polifosfato inorganico, come eventuale biomarker diagnostico rilevabile mediante metodiche meno invasive.

Obiettivo specifico 4: Mettere a punto una nuova strategia terapeutica e testarla in vitro e in vivo, che possa contrastare l'eventuale azione pro-tumorale e pro-infiammatoria del polifosfato inorganico.

Obiettivo 1

Il primo obiettivo di questo studio prevede il dosaggio del polifosfato inorganico, mediante l'utilizzo di un apposito kit fluorimetrico, in linee cellulari e in tessuti biotipici umani e murini tumorali e della controparte non tumorale. Le linee cellulari tumorali di CRC utilizzate saranno le CACO-2, le SW620 e le SW480 e i livelli di polifosfato di esse saranno comparati con i livelli delle rispettive linee cellulari wild-type denominate HCEC-1CT.

Il segnale intracellulare responsabile dell'attività proliferativa innescata dal polifosfato inorganico, è regolato dal Transient Receptor Potential Melastatin Subtype 8 (TRPM8), un canale ionico, non selettivo e multimodale, con una preferenza per lo ione Ca^{2+} (11).

Per questa ragione, si prevede di valutare l'espressione proteica di tale recettore, mediante analisi di Western Blot sia nelle linee cellulari che nei tessuti biotipici tumorali e non tumorali umani e murini, sopra-menzionati.

Obiettivo 2

Qualora ci sia un'abbondanza di polifosfato inorganico e una over-espressione del recettore TRPM8 nelle cellule tumorali rispetto alla controparte normale, stabiliamo il secondo obiettivo.



Esso consiste nella determinazione, attraverso saggi funzionali, del ruolo che il polifosfato inorganico e il suo recettore svolgono nell'ambito del carcinoma del colon-retto. I saggi funzionali prevedono test di proliferazione e di migrazione, post-trattamento delle linee cellulari già menzionate, con polifosfato inorganico e con AMTB hydrochloride, già noto inibitore del recettore TRPM8. I saggi funzionali saranno seguiti dalla valutazione dell'espressione proteica e genetica di proteine/geni coinvolti nella proliferazione e nella migrazione mediante saggi di Western Blot, Real-time PCR e Immunofluorescenza.

Obiettivo 3

A seguito del ritrovamento di una eccessiva concentrazione di polifosfato inorganico, nel terzo obiettivo si prevede di mettere a punto studi che identifichino questa molecola come un eventuale biomarcatore diagnostico rilevabile mediante metodiche meno invasive, diverse dalla biopsia.

Per tale ragione, il terzo obiettivo, consisterebbe nel dosare questa molecola nelle feci di modelli murini sani, affetti da colite e da CRC. Inoltre, qualora venissero riscontrate differenze significative, si passerebbe all'analisi su campioni di feci umane derivanti da donatori sani, con coliti e affetti da CRC, rispettivamente.

Obiettivo 4

Il quarto obiettivo consisterebbe nel mettere a punto una nuova strategia terapeutica che vedrebbe l'utilizzo dell'inibitore del recettore TRPM8, AMTB hydrochloride, qualora, i test in vitro mostrassero una riduzione della progressione e proliferazione delle cellule tumorali. Il trattamento con l'inibitore di TRPM8, verrebbe successivamente testato in vivo su modelli murini di CRC e infiammazione, come farmaco libero. Successivamente, verrà studiato l'andamento del tumore dal punto di vista morfologico e l'eventuale effetto anti-infiammatorio dello stesso.

DATI PRELIMINARI

I dati preliminari che abbiamo a disposizione, relativi ad esperimenti condotti su tessuti biotipici tumorali e peritumorali, di pazienti con carcinoma del colon-retto, mostrano una differenza nella concentrazione del polifosfato inorganico.

Nel grafico sottostante, di fatti, si osserva come la concentrazione di polifosfato inorganico sia significativamente maggiore nel tessuto tumorale rispetto alla controparte peritumorale.

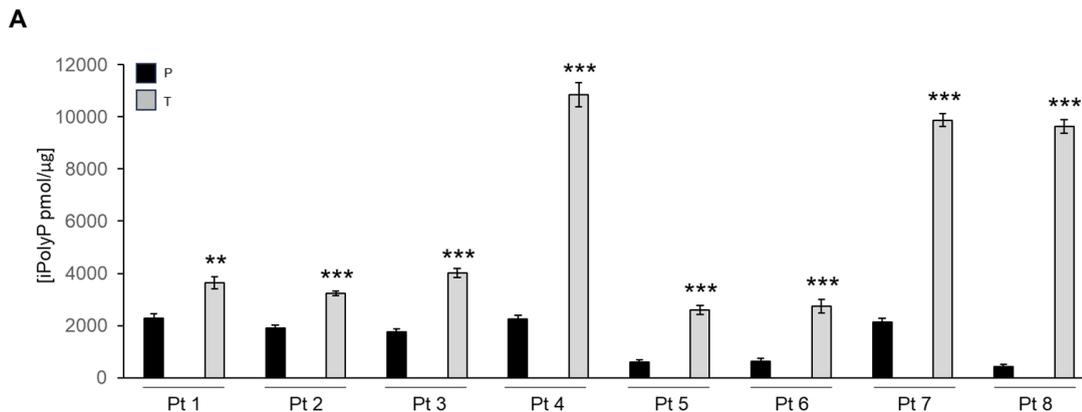


Figura 2: Analisi fluorimetrica e quantificazione dei livelli di iPolyP nei tessuti tumorali e peritumorali di 8 pazienti affetti da CRC. La concentrazione di iPolyP tende ad aumentare nel tessuto tumorale rispetto alla controparte peritumorale. P = tessuto peritumorale; T = tessuto tumorale; Pt= paziente; [iPolyP] = concentrazione polifosfato inorganico.

Per tale ragione, abbiamo eseguito analisi di screening mediante Western Blot, sui tessuti biotipici dei medesimi pazienti, valutando l'espressione del TRPM8, il canale per il polifosfato inorganico. Dai risultati ottenuti si evince che la controparte tumorale esprime elevati livelli di TRPM8, rispetto al corrispettivo peritumorale. Questi dati supportano i precedenti dimostrando che, laddove si osserva un aumento della concentrazione del polifosfato inorganico nelle cellule tumorali, si osserva anche un concomitante aumento dell'espressione del suo canale TRPM8.

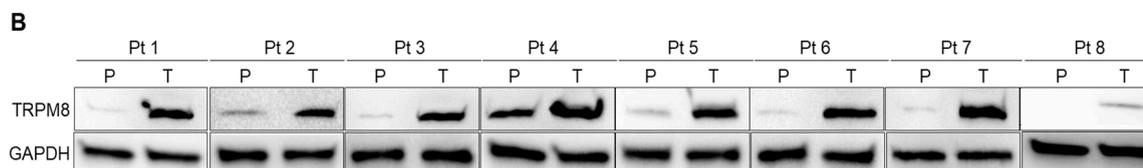


Figura 3: Analisi di Western Blot per valutare l'espressione di TRPM8 in tessuti biotipici tumorali e peritumorali derivanti da 8 pazienti. P = tessuto peritumorale; T = tessuto tumorale; Pt= paziente.

Siamo passati successivamente allo studio del ruolo del polifosfato inorganico nelle cellule tumorali e nel microambiente tumorale del carcinoma del colon-retto. Il primo test funzionale, realizzato su linee cellulari di CRC denominate CACO-2, è un test di proliferazione effettuato mediante il Crystal Violet Assay. Dai risultati ottenuti si osserva che le CACO-2, trattate con il polifosfato inorganico, mostrano un significativo aumento della proliferazione; al contrario l'inibitore di TRPM8, AMTB hydrochloride, blocca l'azione del polifosfato inorganico e, di conseguenza, l'aumento proliferativo.

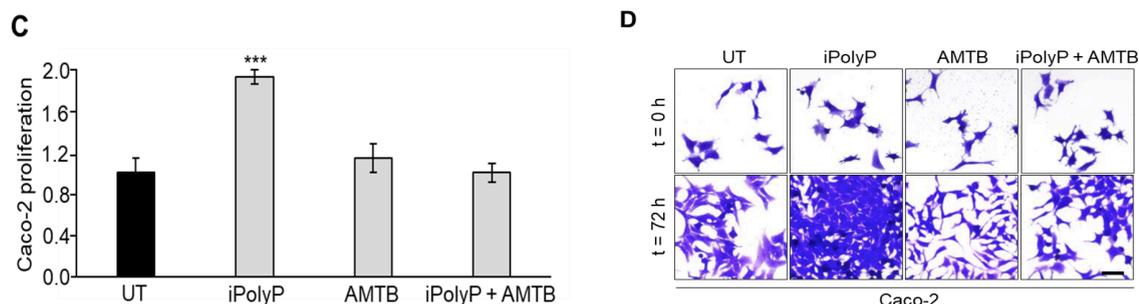


Figura 4: Crystal Violet Assay utilizzato per determinare la proliferazione delle Caco-2 trattate con iPolyP e TRPMB inhibitor AMTB hydrochloride. iPolyP (500 nM) aumenta la proliferazione delle cellule di CRC dopo 6 giorni di trattamento. AMTB hydrochloride (30 μ M), blocca l'effetto del polifosfato inorganico.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE:

Lo studio proposto verrà condotto con metodiche standard di biologia cellulare e molecolare e di biochimica. Si procederà dapprima all'estrazione del polifosfato inorganico dalle linee cellulari in questione (HCEC-1CT, CACO-2, SW480, SW620) mediante utilizzo del iPolyP Extraction Buffer. Successivamente, mediante omogenizzazione e, con l'utilizzo dello stesso buffer, si procederà all'estrazione della molecola di interesse anche da tessuti biotipici peritumorali e tumorali derivanti da pazienti e da modelli murini di CRC. Post-estrazione, il dosaggio del iPolyP verrà effettuato con un apposito Kit fluorimetrico.

Per valutare l'espressione del canale per il polifosfato, nelle cellule tumorali e nella controparte peritumorale o sana, si procederà alla preparazione dei lisati proteici sia nelle linee cellulari sopra- menzionate che nei tessuti biotipici corrispondenti ai pazienti e ai modelli murini utilizzati precedentemente. L'analisi qualitativa e quantitativa verrà effettuata mediante saggi di Western Blot.

Una volta accertato l'aumento di concentrazione del polifosfato inorganico nelle cellule tumorali e l'aumento dell'espressione di TRPM8, si passerà al secondo obiettivo del nostro studio. Esso prevede la messa a punto di saggi funzionali di proliferazione e migrazione in transwell mediante Crystal Violet Assay, post-trattamento delle linee cellulari in questione con iPolyP e AMTB hydrochloride. Si procederà con la valutazione dell'espressione di proteine/geni come Ki67 e PCNA, coinvolte nella proliferazione cellulare e di proteine come E-caderina, N-caderina, vimentina, fibronectina, metalloproteasi-2 e metalloproteasi-9 tipicamente coinvolte nella migrazione cellulare. Per tale scopo, verranno messi a punto saggi di Immunofluorescenza, Western Blot e Real-Time PCR.



In concomitanza con gli esperimenti appena menzionati, si prevedono analisi citofluorimetriche (mediante staining con Annexina V/Propidium Iodide (PI)) al fine di stabilire se il farmaco proposto abbia un ruolo determinante nell'inibizione della proliferazione nonché nella morte cellulare.

Il terzo obiettivo vedrebbe il polifosfato inorganico come nuovo biomarcatore diagnostico per il carcinoma del colon-retto. Per tale scopo, si procederà alla raccolta delle feci di modelli murini affetti da colite e da CRC e all'estrazione del polifosfato inorganico da esse con successivo dosaggio mediante l'utilizzo del kit fluorimetrico di cui sopra. Inoltre, a diverse tempistiche, durante il processo infiammatorio e la crescita tumorale, saranno effettuate colonscopie con prelievi biotici impiegati per la valutazione del iPolyP.

Qualora vengano riscontrate delle differenze, si procederà nello stesso modo, previa raccolta delle feci umane di donatori sani e pazienti affetti da colite e CRC.

Il polifosfato inorganico potrebbe essere sia un marker quantitativo che qualitativo; mentre i biomarker quantitativi forniscono valori distribuiti su una scala continua, i biomarker di natura qualitativa forniscono un risultato binario (presento o assente). La distinzione tra individui positivi ai biomarker e negativi ai biomarker sarà effettuata sulla base di un valore soglia (cut-off) applicato alle misurazioni quantitative.

Il quarto obiettivo verrà condotto mediante sperimentazione in vivo su modelli murini affetti da CRC e colite ai quali verrà somministrato via gavage e intraperitoneale l'inibitore AMTB hydrochloride, per seguirne successivamente sia l'aspetto infiammatorio che il volume e la morfologia della massa tumorale. Per valutare l'aspetto infiammatorio, verranno dosate le citochine pro-infiammatorie nel sangue mediante l'utilizzo di kit Elisa e verranno effettuati saggi di immunoistochimica.

RISULTATI ATTESI

Gli esperimenti condotti prevedono:

1. La conferma in vitro dei dati preliminari proposti e la comprensione del ruolo svolto dal polifosfato inorganico nel microambiente tumorale, il quale potrebbe essere coinvolto nella proliferazione e migrazione delle cellule tumorali di carcinoma del colon-retto e nel processo infiammatorio sottostante.
2. Individuare un nuovo biomarcatore che abbia molteplici funzioni nella diagnosi precoce e nel monitoraggio del paziente con CRC e colite.



3. I risultati in vitro proposti, verranno inseriti in un contesto di esperimenti in vivo che prevedono l'utilizzo di modelli murini affetti da colite e CRC. Questo potrebbe sfociare in una nuova strategia terapeutica che, con l'utilizzo dell'inibitore del TRPM8, avrebbe tre possibili effetti:

- arresto della crescita tumorale;
- riduzione delle dimensioni della massa tumorale, qualora la privazione di energia derivante dal segnale innescato dal pathway del polifosfato inorganico induca la morte cellulare;
- riduzione del processo infiammatorio caratteristico della colite in vivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3): 153-173.
2. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2044-2058.
3. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993; 72(3 Suppl): 962-970.
4. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel).* 2018; 6(2): 31.
5. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel).* 2022; 14(7): 1732.
6. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2016; 4(9): e609- e616.
7. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464(7285): 59-65.



8. Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019; 16(11): 690-704.
9. Kus F, Smolenski RT, Tomczyk M. Inorganic Polyphosphate-Regulator of Cellular Metabolism in Homeostasis and Disease. *Biomedicines.* 2022; 10(4): 913.
10. Wang L, Fraley CD, Faridi J, Kornberg A, Roth RA. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(20): 11249-11254.
11. Zakharian E, Thyagarajan B, French RJ, Pavlov E, Rohacs T. Inorganic polyphosphate modulates TRPM8 channels. *PLoS One.* 2009; 4(4): e5404.

TIMELINE

<i>Event/Name</i>	<i>Start</i>	<i>End</i>	<i>Length</i>
<i>Screening delle linee cellulari di CRC, di campioni bioptici peritumorali e tumorali per TRPM8 e iPolyP in vitro.</i>	0	6	6
<i>Test funzionali in vitro su linee cellulari trattate con iPolyP e AMTB (inibitore di TRPM8) e valutazione dell'espressione di protein coinvolte in proliferazione e migrazione sui suddetti campioni</i>	6	12	6
<i>Dosaggio del iPolyP in feci di modelli murini sani, affetti da colite e da CRC, nonché in feci collezionate da donatori sani e pazienti affetti dalle patologie sopramenzionate.</i>	12	24	12
<i>Esperimenti in vivo per la messa a punto di una strategia terapeutica che contrasti l'azione pro-tumorale del iPolyP</i>	18	36	12
<i>Interpretazione dei dati e pubblicazione</i>	1	36	36



TITOLO DEL PROGETTO

7. MECCANISMI DI PROGRESSIONE DELLE METASTASI AL FEGATO DERIVANTI DA TUMORE AL COLON-RETTO.

2790443

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Basic Mechanisms of Cancer Therapeutics - BMCT

Responsabile: Ballarò Costanza

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: p63-TME-metastasi derivanti da tumore al colon-retto- citochine

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

p63 è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia di p53, che include p53 stesso e p73. Attraverso due distinti promotori, P1 e P2, il gene TPp63 genera due isoforme, la proteina con dominio transattivante (TAp63) e la proteina deleta dell'estremità N-terminale (Δ Np63), mancante del suddetto dominio. Entrambe sono soggette inoltre a splicing alternativo all'estremità C-terminale per produrre le isoforme α , β e γ , portando così all'esistenza di almeno 6 isoforme [1]. A causa della mancanza del dominio canonico di transattivazione, le isoforme Δ Np63 sono state inizialmente descritte come fattori dominanti negativi delle funzioni di TAp63 e di p53. Tuttavia, successivamente è stato dimostrato che Δ Np63 può funzionare come attivatore o repressore della trascrizione di diversi geni, grazie alla presenza di un secondo dominio di transattivazione presente nella sua struttura e ad una residua attività di transattivazione presente all'estremità N-terminale [2]. Infine, è noto che ulteriori isoforme vengono prodotte in seguito a splicing degli introni presenti nel trascritto di



TP63. Δ Np63 è la forma più abbondante espressa nello strato basale degli epitelii pluristratificati, dove ne mantiene il potenziale proliferativo. L'importanza di p63 durante la morfogenesi epiteliale è stata dimostrata in diversi modelli animali: la delezione genica di p63 inibisce lo sviluppo di diversi tessuti di derivazione ectodermica, come timo e pelle, portando anche a morte prematura. Negli uomini, mutazioni eterozigoti nel gene TP63 provocano difetti nello sviluppo che ricordano quelli osservati in topi knockout per p63 [3]. Sebbene p63 sia stato inizialmente identificato e studiato per il suo ruolo negli epitelii pluristratificati, diversi studi hanno dimostrato la sua presenza anche in altri organi quali muscoli scheletrici, linfociti, prostata e seno, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, quali i tumori [4]. Ciò che emerge da questi studi è che TAp63 si comporta da soppressore di tumori, mentre le isoforme Δ Np63 promuovono la crescita tumorale [5,6]. Tuttavia, questa è solo una semplificazione, ed i risultati variano a seconda del modello utilizzato. Inoltre, non tutte le isoforme di p63 sono state caratterizzate, pertanto è importante identificare quali sono le isoforme espresse nei differenti contesti in modo da capire le loro funzioni in tessuti normali e neoplastici e valutarne una potenziale interazione.

Il tumore al colon-retto (CRC) è la terza causa di mortalità nel mondo, soprattutto per lo sviluppo di metastasi, localizzate principalmente al fegato [7]. Nonostante le numerose terapie attualmente disponibili, i pazienti con metastasi al fegato derivanti da tumore al colon-retto (CRLM) sono soggetti a prognosi peggiore, con un tasso di sopravvivenza pari al 14% [8]. I principali trattamenti utilizzati per pazienti con CRLM sono la chirurgia e la chemioterapia, ma al momento della diagnosi il 10% dei casi risulta inoperabile. Attualmente, una strategia promettente utilizzata con successo nel trattamento di diversi tipi di tumori è l'immunoterapia. Nondimeno, questo approccio non risulta sempre efficace in pazienti con CRC e CRLM, a motivo del contesto genetico [9], per cui è essenziale sviluppare nuove terapie in modo da aumentare la durata della sopravvivenza dei pazienti con CRLM.

Il ruolo di p63 nel tratto gastrointestinale non è stato ancora ben caratterizzato e ad oggi è controverso. In particolare, da uno studio condotto su 66 pazienti con CRC è emerso che l'espressione di p63 è alta nel 47% dei casi e bassa nel 35% [10]. In questo contesto è emerso che solo l'isoforma TAp63 è espressa sia in colon normale che neoplastico. Inoltre, studi condotti su un modello murino hanno evidenziato che inibendo p63 aumentano sia la proliferazione delle cellule di CRC che il volume del tumore [11]. Questo effetto è revertito esprimendo TAp63 ma non Δ Np63. Infine, è stato osservato che CRC più invasivi e metastatici esprimono livelli più bassi di p63, suggerendo che p63 possa inibire la tumorigenesi ed il processo di metastatizzazione [10]. Alla luce del suo ruolo nel modulare l'invasività tumorale, e le poche informazioni



attualmente disponibili circa il coinvolgimento di p63 nello sviluppo del CRLM, è d'obbligo valutare l'interazione tra p63 ed il microambiente tumorale (TME), in particolare nelle lesioni epatiche metastatiche. Ad oggi, poco è noto circa la modulazione del sistema immunitario nel contesto delle metastasi al fegato. Uno dei concetti più importanti a carico del TME è l'interazione che si instaura tra il tumore e le cellule del sistema immunitario [12]. Sono state identificate diverse citochine che operano in questo contesto, e diversi studi hanno valutato il coinvolgimento di p63.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: Identificare le isoforme di p63 espresse in linee cellulari derivate da tumori al colon-retto e metastatiche e validarne la funzione nel modello tumorale scelto.

Obiettivo specifico 2: Mimare nelle colture cellulari bidimensionali di cui al punto 1.1 le differenti fasi tumorigeniche e valutare l'espressione di p63 sia in termini trascrizionali che traduzionali. Identificare le condizioni per la formazione di organoidi derivati da linee di CRC e CRLM.

Obiettivo specifico 3: Valutare l'interazione tra TME e p63.

Obiettivo 1:

All'interno di questa sezione valuteremo l'espressione delle diverse isoforme di p63 a livello trascrizionale e traduzionale e definiremo il contesto cellulare più appropriato.

1. Saranno misurati i livelli di espressione dell'RNA, delle proteine e la vita media ubiquitina- dipendente delle isoforme di p63 (Δ Np63- $\alpha/\beta/\gamma$ e TAp63- $\alpha/\beta/\gamma$) in linee cellulari tumorali derivate da colon, come le SW480 e le SW620 [13], HT-29, HCT-116, Caco2 e la linea di colon normale HCEC.

2. Tutte le linee cellulari menzionate nel punto 1.1 saranno manipolate alterando i livelli di espressione di p63 usando i lentivirus per indurne una loro stabile espressione o silenziamento (RNAi). Ciò che andremo ad analizzare sarà l'attivazione o la repressione della trascrizione dei geni notoriamente a valle di p63, le proprietà di crescita cellulare (proliferazione/apoptosi), l'induzione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e la migrazione.



Obiettivo 2:

In questa fase studieremo come i livelli di espressione di p63, analizzati per mezzo di anticorpi isoforma- specifici, variano durante la tumorigenesi.

1. Saranno riprodotte in vitro, in colture bidimensionali, le diverse fasi che portano alla formazione di metastasi, come ad esempio l'EMT, la migrazione, la proliferazione. Per ogni fase saranno valutati i livelli di espressione di p63, in particolare per valutare eventuali modificazioni nell'espressione delle isoforme di p63 durante le diverse fasi.
2. Saranno sviluppati modelli cellulari 3D con cellule SW480 che mimeranno il tumore al colon primario, e cellule SW620 che mimeranno il tumore al colon metastatico. Gli organoidi saranno coltivati in Matrigel. Durante la maturazione degli organoidi sarà valutata l'espressione di p63 così come l'espressione di marcatori specifici di proliferazione, staminalità, invasione ed adesione. In base ai risultati ottenuti, si silenzierà o sovraesprimerà una specifica isoforma di p63 e si valuteranno gli effetti biologici per mezzo dei saggi biologici sopra descritti. A questo scopo, si produrranno ed utilizzeranno inoltre costrutti inducibili di p63 in modo da determinare se la sua espressione sia necessaria per il progredire delle diverse fasi durante il processo di metastatizzazione.
3. Si procederà a valutare l'interazione tra i diversi membri della famiglia di p63. Pertanto si silenzierà e sovraesprimerà in modo alternativo e combinato le diverse isoforme e se ne valuterà l'effetto biologico utilizzando i saggi più appropriati.

Obiettivo 3:

In questa fase sarà valutata l'interazione tra p63 ed il microambiente tumorale. Diversi studi hanno dimostrato l'importanza del TME nel processo di metastatizzazione [12]. Inoltre, il TME è noto per essere coinvolto nel regolare la risposta all'immunoterapia [14]. Il TME del CRC, come di tutti gli altri tumori solidi, comprende non solo le cellule tumorali ma anche altri tipi cellulari come i fibroblasti associati al tumore (CAF), cellule del sistema immunitario (ad esempio linfociti B, linfociti T, macrofagi, cellule natural killer) e cellule dello stroma. La comunicazione tra i diversi tipi cellulari determina il destino del tumore ed è mediata da fattori di crescita, citochine, esosomi e componenti della matrice extracellulare [15]. Studi recenti hanno dimostrato come alcune fasi tumorigeniche indotte da citochine siano mediate da p63. In particolare è emerso che il TGF β induce la degradazione di p63 al fine di promuovere la migrazione delle cellule



tumorali pancreatiche [16]. Altri studi condotti in tumori al seno dimostrano come le vie di segnalazione del TGF β agiscono a monte o a valle di p63 per favorire la metastatizzazione, in particolare è stato dimostrato che Δ Np63 promuove la formazione di metastasi mediata da TGF β , mentre TAp63 la sopprime [17].

I macrofagi associati al tumore (TAM) rappresentano una delle maggiori classi di cellule immunitarie presenti nel TME di diversi tipi di tumore, incluso il CRC. Sono cellule plastiche che possono acquisire due distinti fenotipi, definiti M1 ed M2 [18]. Il tipo M1 possiede proprietà anti-tumorali che gli consentono di limitare la crescita tumorale e la migrazione delle cellule tumorali verso organi secondari. Il fenotipo M2 invece possiede proprietà pro-tumorali e immunosoppressive che stimolano l'angiogenesi e facilitano la migrazione delle cellule tumorali [19]. Nel TME, l'interazione tra macrofagi e cellule tumorali può influenzare la loro polarizzazione verso un fenotipo anti-tumorale o verso un fenotipo pro-tumorale. CCL2 è una delle chemochine coinvolte nel reclutamento dei macrofagi sia verso il tumore primario che secondario, dove promuove l'angiogenesi e la formazione di metastasi. Attualmente sono poche le informazioni in merito ad un eventuale ruolo di p63 nel mediare l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel tumore. Solo recentemente è stato dimostrato nel tumore al seno che TAp73 inibisce il reclutamento dei macrofagi perché riduce l'espressione di CCL2 [20]. Inoltre, è stato evidenziato che p63 media il reclutamento verso la sede tumorale sia di neutrofili e macrofagi, regolando l'espressione di interleuchina-6 ed interleuchina -8 [21], che di cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC), attivando le chemochine CXCL2 e CCL22 [22] in modelli murini di carcinomi squamo-cellulari. Infine, Kubo e colleghi hanno dimostrato che p63 aumenta i livelli di espressione della chemochina CCL17 in diverse linee cellulari, mediando il reclutamento e l'attivazione di linfociti T CD4+ [23].

Allo scopo di valutare se il TME influenza la funzione di p63 e viceversa si procederà a:

1. Valutare l'espressione delle isoforme di p63 in linee tumorali di colon identificate nell'Obiettivo 1 in presenza di elementi che caratterizzano il TME, come macrofagi M1 ed M2, linfociti T attivati ed i CAF. A questo scopo i macrofagi saranno ottenuti differenziando la linea monocitaria THP-1 e polarizzandola verso i due fenotipi. I linfociti T CD4+ saranno ottenuti a partire da linfociti T naive trasformati e attivati con beads coniugate agli attivatori CD3/CD28 e stimolati con specifiche citochine. Dopodichè, si utilizzeranno co-culture in transwell di linee tumorali di colon e THP-1 polarizzate, linfociti T o CAF e tramite western blot e qPCR si valuterà l'espressione delle isoforme di p63.
2. In base ai risultati ottenuti, le linee tumorali di cui al punto 1 saranno stimolate con il terreno condizionato di colture di macrofagi, di linfociti T CD4+ e CD8+ o di CAF e

saranno valutati la trascrizione di noti geni target di p63, la proliferazione/apoptosi cellulare, l'induzione di EMT e la migrazione. Contestualmente si silenzierà o sovraesprimerà stabilmente p63 per verificare la specificità degli effetti biologici ottenuti.

3. Valutare l'induzione ed il rilascio di specifiche citochine (TGF β , TNF α , IL6, IL-8 e altre) dalle linee tumorali indicate al punto 1.1 in cui p63 è stato silenziato o sovraespresso stabilmente. A questo scopo si useranno saggi ELISA. In base ai risultati ottenuti si procederà a valutare anche eventuali modificazioni dell'espressione e della funzione di p63 in seguito a stimolazione delle linee tumorali con le suddette citochine.

4. Valutare l'effetto di p63 sulla polarizzazione dei macrofagi. A questo scopo le linee tumorali identificate nei punti 1.1 e 2.1 saranno manipolate in modo da ridurre o aumentare l'espressione di p63 e messe in co-coltura in transwell con macrofagi THP-1. Il fenotipo dei macrofagi sarà caratterizzato testando l'espressione di citochine e recettori di membrana pro- ed anti-tumorali attraverso le tecniche di qPCR ed immunofluorescenza. In base al fenotipo ottenuto verrà testata la funzione dei macrofagi utilizzando saggi cellulari appropriati.

DATI PRELIMINARI

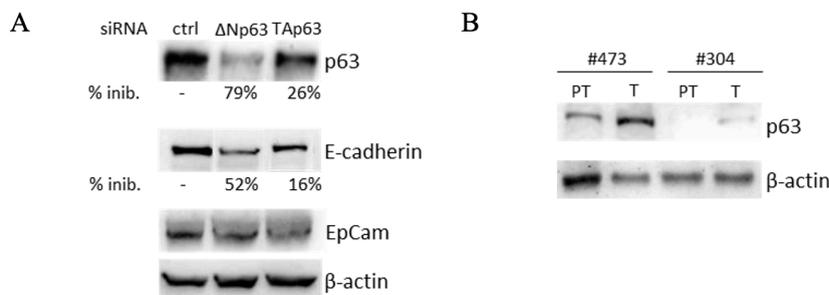


Fig.1 A) Linea cellulare SW480 trasfettata con i siRNA indicati e **B)** campioni tissutali ottenuti da resezioni chirurgiche di tumore al colon (T) e corrispondente zona peri-tumorale (PT). In entrambi i casi i campioni sono stati processati per Western Blot con gli anticorpi indicati.

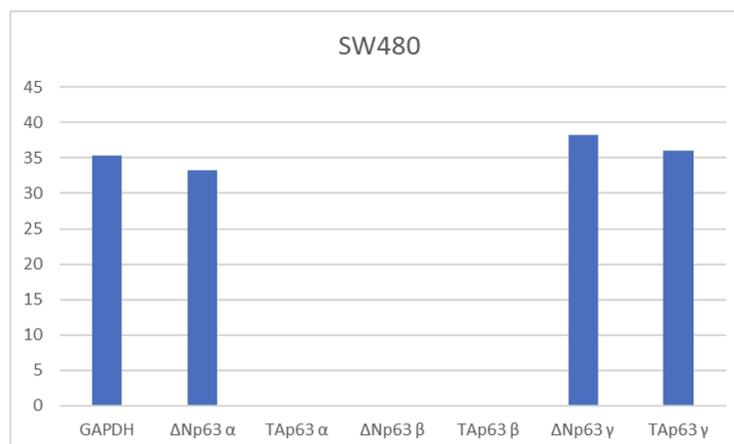


Fig.2 Rappresentazione grafica di qPCR eseguita sulla linea cellulare SW480.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Gli esperimenti in vitro comprendono analisi di immunofluorescenza, saggi ELISA, qPCR, Western Blot, saggi di proliferazione (incorporazione di BrDU e MMT) ed apoptosi cellulare (TUNEL), migrazione (scratch wound test e imaging su colture cellulari). La sovraespressione ed il silenziamento di p63 saranno ottenuti veicolando siRNA o plasmidi nelle cellule tramite i liposomi o infettando con lentivirus codificanti la proteina di interesse o shRNA. La capacità di invasione cellulare e la formazione di organoidi saranno studiate usando il Matrigel. I macrofagi saranno derivati da linee cellulari monocitiche THP-1 e successivamente polarizzati. I linfociti T naive saranno ottenuti da campioni di sangue umani e quindi trasformati ed attivati in linfociti T CD4+ e CD8+. I CAF saranno isolati da tessuti di CRC umani espianati in fase di resezione chirurgica. Come analisi statistica per determinare la significatività delle differenze osservate si propone di utilizzare un minimo di triplicati tecnici per esperimento e di calcolare la media \pm deviazione standard (SD) di almeno 3 esperimenti indipendenti.

RISULTATI ATTESI

Il nostro piano sperimentale si propone di capire il ruolo di p63 durante la formazione di tumore al colon ed eventuale sviluppo di metastasi al fegato. In particolare, data l'esistenza di diverse isoforme di p63 ci aspettiamo di capire se l'attivazione o lo spegnimento di una specifica isoforma sia necessaria o meno per una determinata fase



dello sviluppo del CRLM, come ad esempio EMT, migrazione delle cellule tumorali, angiogenesi, crescita del tumore secondario. Inoltre, capire se e come la modulazione di p63 possa modificare il TME ci consentirà di approfondire il potenziale dell'inibizione o induzione di p63 in combinazione con terapie antitumorali come l'immunoterapia e le terapie basate sull'uso di citochine.

INNOVAZIONE

La funzione di p63 è stata ben caratterizzata nel contesto epiteliale, sia normale che patologico. Tuttavia, ancora poco è noto circa la sua funzione nel tratto gastrointestinale, in particolare nel contesto delle metastasi al fegato derivanti da tumore al colon-retto. Definire quindi se e come sono coinvolte le diverse isoforme di p63 nello sviluppo del suddetto tumore sarà utile per sviluppare strategie terapeutiche mirate, ad esempio, a favorire la generazione di un microambiente immunocompetente che porti all'uccisione delle cellule tumorali e quindi ad una riduzione della massa tumorale stessa. In particolare, questo studio apre la porta a nuovi approcci terapeutici volti a superare la resistenza tumorale ai farmaci esistenti. Non meno importante, l'analisi della modulazione di p63 nelle diverse fasi tumorali è un punto di partenza per valutare la sua rilevanza clinico-patologica nel tratto gastrointestinale ed il suo utilizzo quale biomarcatore predittivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon

F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998 Sep;2(3):305-16. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80275-0.

2. Ghioni P, Bolognese F, Duijff PH, Van Bokhoven H, Mantovani R, Guerrini L. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol*. 2002 Dec;22(24):8659-68. doi: 10.1128/MCB.22.24.8659-8668.2002.

3. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):708-13. doi: 10.1038/19531.



4. Sethi I, Romano RA, Gluck C, Smalley K, Vojtesek B, Buck MJ, Sinha S. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. *BMC Genomics*. 2015 Aug 7;16:584. doi: 10.1186/s12864-015-1793-9.
5. Crum CP, McKeon FD. p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:349-71. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102117.
6. Su X, Napoli M, Abbas HA, Venkatanarayan A, Bui NHB, Coarfa C, Gi YJ, Kittrell F, Gunaratne PH, Medina D, Rosen JM, Behbod F, Flores ER. TAp63 suppresses mammary tumorigenesis through regulation of the Hippo pathway. *Oncogene*. 2017 Apr 27;36(17):2377-2393. doi: 10.1038/onc.2016.388.
7. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 May-Jun;73(3):233-254. doi: 10.3322/caac.21772.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590.
9. Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, Lu Y. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci*. 2021 Sep 3;17(14):3837-3849. doi: 10.7150/ijbs.64077.
10. Guo HQ, Huang GL, Liu OF, Liu YY, Yao ZH, Yao SN, Zhao Y, Liu T, Pu XX, Lin TY, Yang SJ. p63 Expression is a prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 2012 Oct 8;27(3):e212-8. doi: 10.5301/JBM.2012.9581.
11. Dai J, Wu H, Zhang Y, Gao K, Hu G, Guo Y, Lin C, Li X. Negative feedback between TAp63 and Mir-133b mediates colorectal cancer suppression. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):87147-87160. doi: 10.18632/oncotarget.13515.
12. Galindo-Pumariño C, Collado M, Herrera M, Peña C. Tumor Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer: The Arbitrator in Patients' Outcome. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 6;13(5):1130. doi: 10.3390/cancers13051130.
13. Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsokos M, Stamp GW, Stetler-Stevenson WG. Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol*. 2000 Dec;192(4):446-54. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH775>3.0.CO;2-K.



14. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, Jain RK, Zou W, Howcroft TK, Woodhouse EC, Weinberg RA, Krummel MF. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May;24(5):541-550. doi: 10.1038/s41591-018-0014-x.
15. Bhat AA, Nisar S, Singh M, Ashraf B, Masoodi T, Prasad CP, Sharma A, Maacha S, Karedath T, Hashem S, Yasin SB, Bagga P, Reddy R, Frennaux MP, Uddin S, Dhawan P, Haris M, Macha MA. Cytokine- and chemokine-induced inflammatory colorectal tumor microenvironment: Emerging avenue for targeted therapy. *Cancer Commun (Lond)*. 2022 Aug;42(8):689-715. doi: 10.1002/cac2.12295.
16. Gao G, Chen J, Wang D, Li Q, Yang X, Wang J, Pan Z, Xiao ZJ, Yi Y. TGF- β 1 Facilitates TAp63 α Protein Lysosomal Degradation to Promote Pancreatic Cancer Cell Migration. *Biology (Basel)*. 2021 Jun 28;10(7):597. doi: 10.3390/biology10070597.
17. Sundqvist A, Vasilaki E, Voytyuk O, Bai Y, Morikawa M, Moustakas A, Miyazono K, Heldin CH, Ten Dijke P, van Dam H. TGF β and EGF signaling orchestrates the AP-1- and p63 transcriptional regulation of breast cancer invasiveness. *Oncogene*. 2020 May;39(22):4436-4449. doi: 10.1038/s41388-020-1299-z.
18. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol [Internet]*. 2013 [cited 2018 Sep 14];35:585-600.
19. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124:263-6.
20. Wolfsberger J, Sakil HAM, Zhou L, van Bree N, Baldisseri E, de Souza Ferreira S, Zubillaga V, Stantic M, Fritz N, Hartman J, Rolny C, Wilhelm MT. TAp73 represses NF- κ B-mediated recruitment of tumor-associated macrophages in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 9;118(10):e2017089118. doi: 10.1073/pnas.2017089118.
21. Yang X, Lu H, Yan B, Romano RA, Bian Y, Friedman J, Duggal P, Allen C, Chuang R, Ehsanian R, Si H, Sinha S, Van Waes C, Chen Z. Δ Np63 versatilely regulates a Broad NF- κ B gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation. *Cancer Res*. 2011 May 15;71(10):3688-700. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-34.
22. Sakakibara N, Clavijo PE, Sievers C, Gray VC, King KE, George AL, Ponnampertuma RM, Walter BA, Chen Z, Van Waes C, Allen CT, Weinberg WC.



Oncogenic Ras and $\Delta Np63\alpha$ cooperate to recruit immunosuppressive polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of squamous cancer pathogenesis. *Front Immunol.* 2023 Aug 10;14:1200970. doi: 10.3389/fimmu.2023.1200970. PMID: 37638000; PMCID: PMC10449460.

23. Kubo T, Ichimiya S, Tonooka A, Nagashima T, Kikuchi T, Sato N. p63 induces CD4+ T-cell chemoattractant TARC/CCL17 in human epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2008 Dec;28(12):725-32. doi: 10.1089/jir.2008.0035. PMID: 18937546.

TIMELINE

	I anno				II anno				III anno			
	M1-3	M3-6	M7-9	M10-12	M1-3	M3-6	M7-9	M10-12	M1-3	M3-6	M7-9	M10-12
Ob. 1.1	■	■										
Ob. 1.2		■	■	■								
Ob. 2.1		■	■									
Ob. 2.2			■	■								
Ob. 2.3			■	■	■							
Ob. 3.1					■	■	■					
Ob. 3.2						■	■	■	■			
Ob.3.3									■	■	■	■
Ob.3.4									■	■	■	■



TITOLO DEL PROGETTO

8. NANOPARTICELLE BIOMIMETICHE COME NUOVA STRATEGIA PER IL TRASPORTO DI FARMACI NELLE TERAPIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO

2786670

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Drug Discovery and Molecular Pharmacology - DMP

Responsabile: SCAVO MARIA PRINCIPIA

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Parole chiave: CRC, GC, drug delivery, nanoparticelle biomimetiche, target therapy

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Metodologica

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), risidenti 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 risidenti 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 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 farmaco-resistenza 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 gastrointestinale (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.

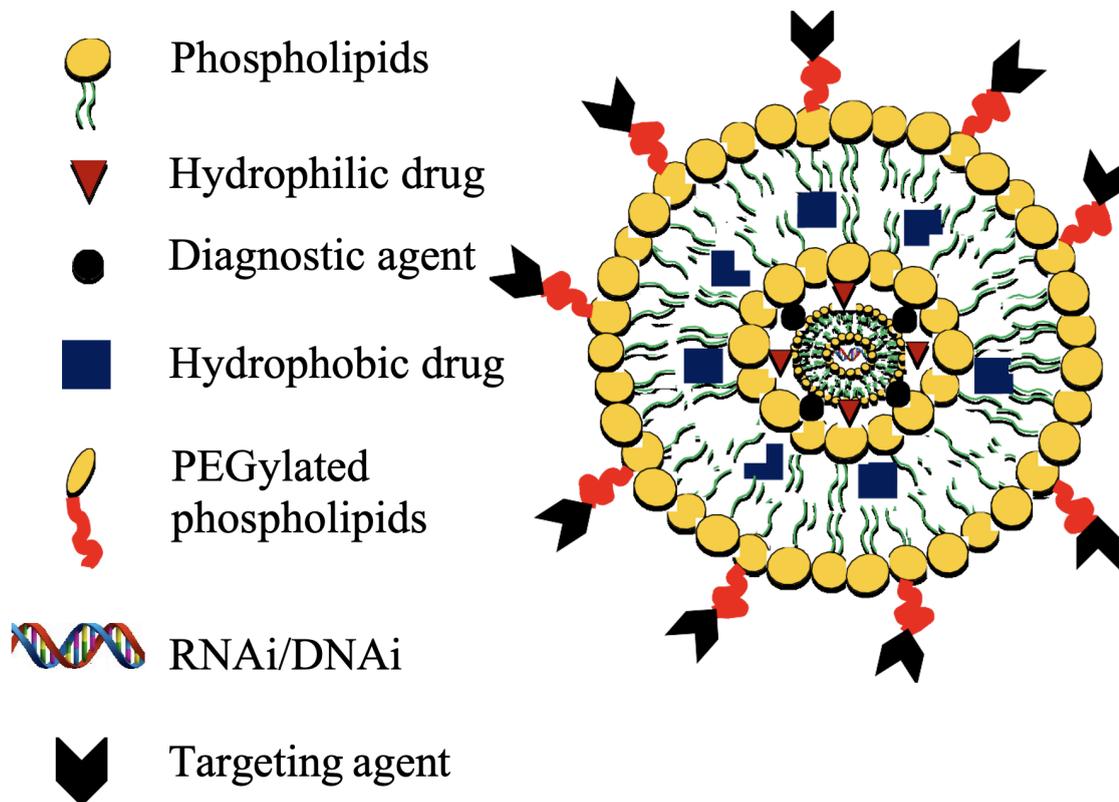


Figura 1: Schema descrittivo e proprietà delle AVs.

Tutte queste componenti sono approvate dall’Agenzia 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).

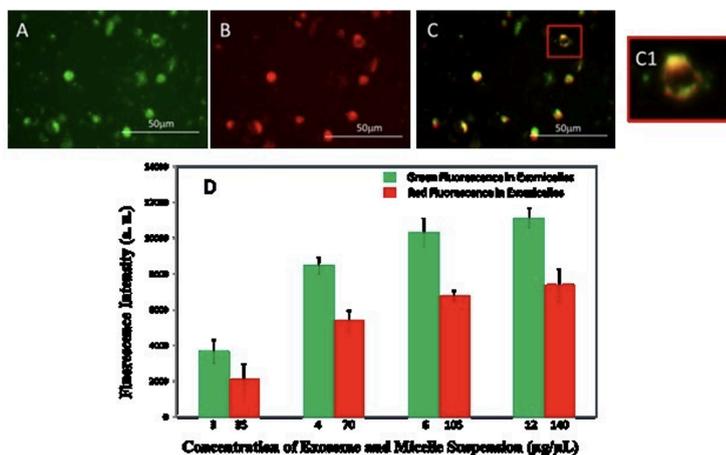


Figura 2: Dati preliminari sulla caratterizzazione di ibridi EVs-micelle ottenuti per fusione diretta di EV con le micelle. Immagine rappresentativa mediante microscopia confocale di Evs-micelle rossi e verdi ottenuti per fusione diretta di Evs marcati rossi con micelle di PEG-funzionalizzati in verde: canale verde (A), canale rosso (B) e fusione (C e C1) Ingrandimento 60x. Scala 50 µm . D) Intensità di fluorescenza registrata a 550 nm (ex 488 nm) e 635 nm (ex 550 nm) per i campioni di EV-micelle preparati per fusione diretta di EV marcati di rosso e di micelle che emettono di verde provenienti da diverse concentrazioni iniziali di EV e micelle.

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.

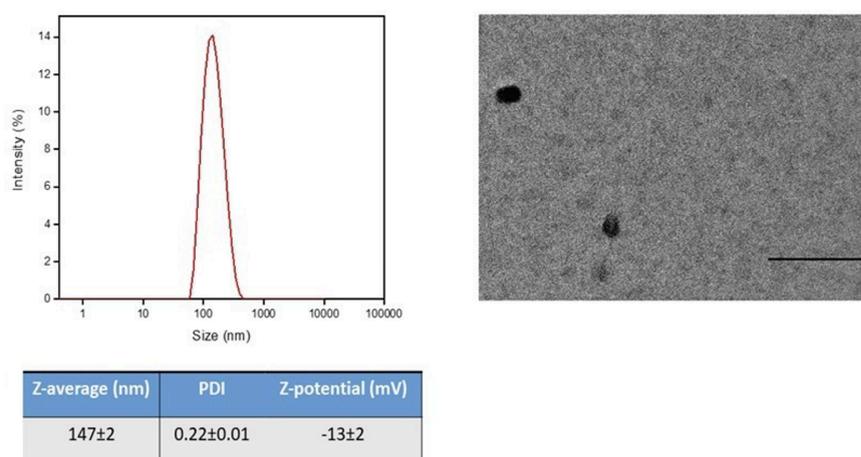


Figura 3: Dati preliminari sulla caratterizzazione di ibridi EV-micelle ottenuti per fusione diretta di EV con micelle. Immagine rappresentativa tramite TEM e diagramma ottenuti con DLS. La distribuzione monomodale è stata riportata nel diagramma DLS dopo la fusione, e nell'immagine TEM la forma, le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

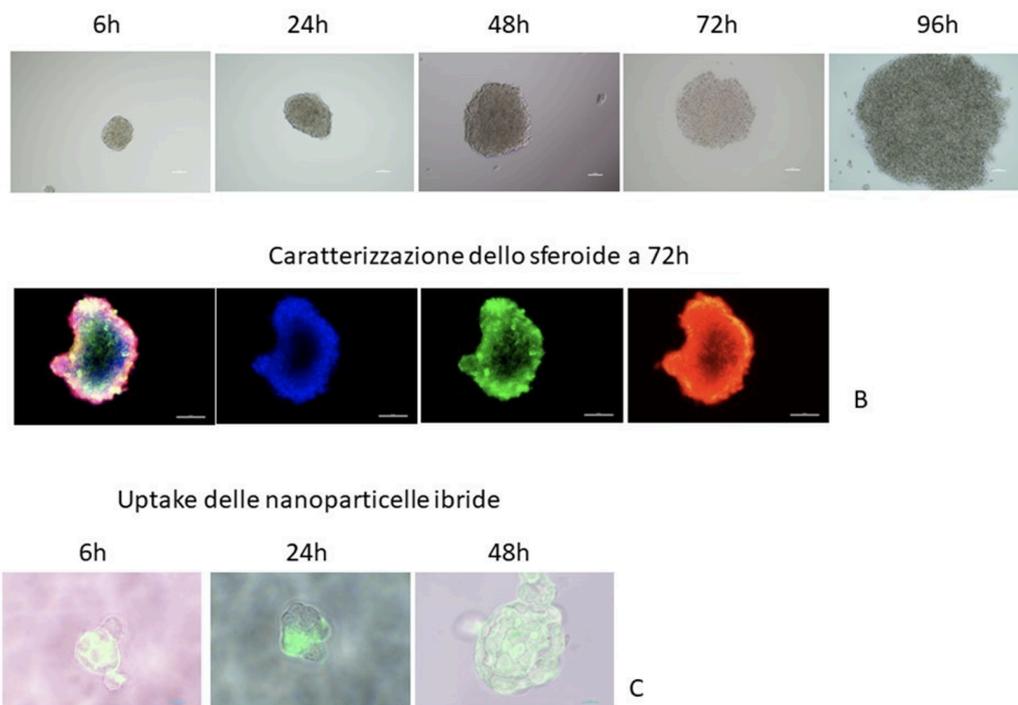


Figura 4: Crescita e caratterizzazione di sferoidi coltivati in 3D. A) Immagini rappresentative di microscopia a campo luminoso di sferoidi coltivati in 3D di cellule Caco-2 in fase di crescita crescente (senza matrigel). Scala 50 µm. B) Immagini rappresentative mediante microscopia confocale di uno 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-distearoyl-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, stearilamina, 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 microsfere 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 microsfere 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'endoscopio 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
9. Youn Jae Jung, Hark Kyun Kim, Yoonsuk Cho, Ji Suk Choi, Chang Hee Woo, Kyoung Soo Lee, Jae Hoon Sul, Chan Mi Lee, Jihoon Han, Jae Hyung Park, Dong-Gyu Jo, Yong Woo Cho. Science Advances 25 Mar 2020; Eaay6721. doi: 10.1126/sciadv.aay6721
10. Maria Principia Scavo, Federica Rizzi, Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Chiara Ingrosso, Maria Lucia Curri and Gianluigi Giannelli . 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, 21, 6705; doi:10.3390/ijms21186705
11. Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, Cosco D, Schiavon O, Shen H, Fresta M. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. J Control Release. 2015 Feb 10;199:106-13. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.008. Epub 2014 Dec 9

TIMELINE

<i>Event/Name</i>	<i>Start</i>	<i>End</i>	<i>Length</i>
<i>Generation of hybrid engineered EV nanoparticles carrying different drugs, starting from EVs from CRC patients blood, combined with liposomes or micelles</i>	0	6	6
<i>Evaluation of encapsulation efficiency and cytotoxicity</i>	6	12	6
<i>In vitro assessment of therapeutic effectiveness of hybrids EVs nanoparticles</i>	12	24	12
<i>In vivo assessment of therapeutic efficacy of hybrid EVs nanoparticles</i>	18	36	12
<i>Management, Scientific, Technological, Economic impact.</i>	1	36	36



TITOLO DEL PROGETTO

**9. NOTCH ED INFLAMMASOMA NELLA PATOGENESI DEL
COLANGIOCARCINOMA**

2786664

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Tumor Cell Biology - TCB

Responsabile: GIGANTE ISABELLA

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: iCCA, Notch, inflammasoma, inibitori farmacologici

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

Il colangiocarcinoma (CCA) è un cancro del tratto biliare (BTC) che insorge nell'epitelio dell'albero biliare ed in base alla posizione anatomica di insorgenza è classificato in intraepatico (iCCA), peri-ilare (pCCA) e distale (dCCA) (Figura 1). Il CCA rappresenta circa il 3% dei tumori gastrointestinali e il 10-15% di tutti i tumori maligni epatobiliari. In particolare, relativamente all'iCCA, sebbene sia ancora considerato un tumore raro, negli ultimi 20 anni sono stati registrati tassi di incidenza e mortalità fortemente aumentati (Banales J 10.1038/nrgastro.2016.51 Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016 May). In Italia, l'aumento dell'incidenza degli iCCA è il più alto in Europa [1]. Gli iCCA presentano tipicamente una massiccia reazione desmoplastica caratterizzata da un'abbondante deposizione di componenti della matrice extracellulare (ECM). Il verificarsi di questa iper-reazione tissutale va a creare un guscio protettivo abitato da citochine, cellule infiammatorie, neovasi, fibroblasti associati al cancro (CAFs) [2,3]. Tutte queste componenti cellulari e non, costituiscono il cosiddetto "microambiente

tumorale” e caratterizzano la sua dinamicità. Lo stroma modula i processi chiave della carcinogenesi, tra cui comunicazione cellulare, differenziazione, invasività, chemioresistenza e transizione epiteliale- mesenchimale.

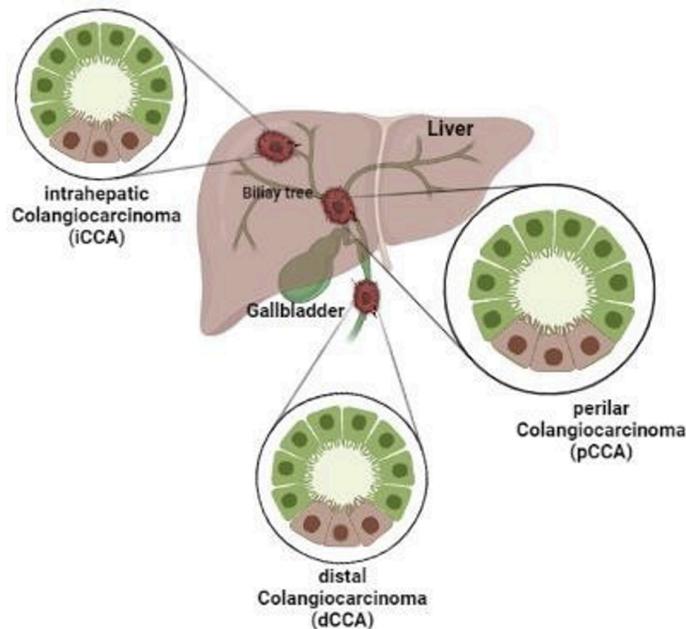


Figura 1. Definizione dei tumori delle vie biliari in base alla loro localizzazione.

Le cellule cancerose CCA scambiano segnali autocrini/paracrini con altre cellule tumorali e con le componenti che popolano il microambiente tumorale mediante la produzione e il rilascio di varie molecole quali citochine, chemochine e fattori di crescita [4]. Tra queste vie di segnalazione, vi è la segnalazione di Notch che svolge un ruolo essenziale nella differenziazione biliare [5]. Nello specifico, l’attivazione del pathway di Notch avviene quando uno dei quattro recettori transmembrana della famiglia di Notch (Notch 1-4) interagisce con uno dei cinque ligandi affini, tra cui Jagged (JAG 1, 2) e Delta-like (DLL 1, 3 e 4), espressi sulle cellule adiacenti. A seguito dell’attivazione del recettore, si ha il clivaggio proteolitico del dominio intracellulare di Notch (NICD), da parte del complesso γ -secretasi. In seguito, NICD trasloca nel nucleo e si associa con l’effettore nucleare RBP-Jk/CBF-1 che costituisce la porzione legante il DNA in grado di convertire il complesso trascrizionale da un repressore ad un attivatore della trascrizione dei geni bersaglio di Notch (HES, HEY) [6]. Recenti studi eseguiti in modelli sperimentali preclinici hanno dimostrato che la disfunzione della via di segnalazione di Notch è correlata alla rigenerazione e riparazione epatica, alla fibrosi epatica e allo sviluppo del colangiocarcinoma [7]. Recentemente, abbiamo dimostrato che Crenigacestat, uno degli inibitori del pathway di Notch, precisamente inibitore della gamma secretasi (GSI), è in grado di ridurre la crescita dei tumori che esprimono alti



livelli di CD90, marcatore di staminalità [8] e di ridurre l'angiogenesi NOTCH-dipendente in un modello di xenotrapianto derivato da pazienti (PDX) di iCCA [9]. In particolare, Crenigacestat è stato in grado di inibire selettivamente NOTCH1 in vitro e nel modello PDX, riducendo la progressione del tumore attraverso il blocco della formazione di nuovi vasi nel tessuto circostante a reazione desmoplastica [9].

Si hanno ad oggi numerose evidenze sulla presenza di un certo grado infiammatorio nel microambiente tumorale, al punto da considerarlo un vero e proprio biomarker prognostico della cancerogenicità [10]. Non fa eccezione il microambiente del colangiocarcinoma, nel quale si è potuto riscontrare un'alta concentrazione di cellule immunitarie, quali neutrofili, monociti, macrofagi, piastrine e linfociti, come mediatori dell'infiammazione mediata, in gran parte, da un complesso multiproteico intracellulare chiamato inflammasoma.

Nel 2020, Lee S. e colleghi hanno dimostrato che nel cheloide, condizione fibroproliferativa cronica, i fibroblasti mostrano livelli aumentati di espressione di Notch1 e dell'inflammasoma NLRP3 rispetto ai fibroblasti normali. Tali aumenti sono stati accompagnati da una riduzione del flusso autofagico. Il silenziamento di Notch1 nei fibroblasti cheloidi mediante trasfezione di siRNA ha soppresso in modo significativo l'aumento dei livelli complessivi delle proteine del complesso NLRP3 inflammasome, di NF- κ B e di α -actina muscolare liscia. Quindi la diminuzione dell'attività autofagica nei cheloidi può provocare l'attivazione miofibroblastica mediata da Notch1 e l'attivazione del segnale dell'inflammasoma NLRP3, che è fondamentale per l'infiammazione cronica [11]. Nel complesso, questi risultati identificano Notch1 come un nuovo attivatore della segnalazione dell'inflammasoma NLRP3 che porta al danno cronico dei tessuti e alla differenziazione dei miofibroblasti nella progressione dei cheloidi. Di contro, nello stesso anno, Jin Y. e colleghi hanno dimostrato che la segnalazione di Notch1 mediata da JAG1 promuove l'attivazione mediatori molecolari (HSF1 e Snail), che a loro volta inibiscono il funzionamento dell'inflammasoma NLRP3 e quindi la via apoptotica/necrotica nei fegati stressati da danno da ischemia/riperfusionem [12]. In linea con questi risultati descritti, nel 2015, Matsushita e colleghi hanno osservato che una risposta immunitaria insufficiente attraverso la segnalazione di NLRP3 può essere associata allo sviluppo del colangiocarcinoma [13]. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che nella colangite sclerosante primitiva (PSC), una malattia epatica rara caratterizzata dall'infiammazione dei dotti biliari nonché uno dei fattori di rischio di sviluppo di CCA, un'eccessiva risposta immunitaria attraverso la segnalazione di Toll-like receptor 9 (TLR9), recettore di attivazione dell'inflammasoma, può essere associata alla progressione della malattia [13]. La



valutazione delle espressioni di TLR9 e NLRP3 nelle BEC può risultare pertanto utile come marker di prognosi.

L'inflammasoma è stato descritto per la prima volta nel 2002 [14], e, 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'inflammatione stessa [12,15,16]. 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 [17]. Ad oggi, sono stati descritti quattro inflammasomi principali (pur essendo questo un numero in crescita): absent in melanoma 2 (AIM2), NLR family pyrin domain containing (NLRP) 1 e 3 (NLRP1 e NLRP3), e NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) [18]. Il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nell'inflammatione 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 [19,20]. 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 [21]. Tumori xenograft che overesprimono IL-1 β evidenziano accumuli di MDSC ed una progressione più rapida del tumore stesso [22]. Dati questi confermati da modelli animali con diversi tipi di carcinoma deficienti per il recettore IL-1 β (IL-1 β R) nei quali si è vista una ridotta crescita della massa tumorale [23]. In aggiunta, IL-1 β derivante dall'attivazione di NLRP3 nei tumor associated macrophages (TAM), stimola le CD4+ T-cells a produrre e secernere IL-22, citochina anch'essa associata alla crescita di numerosi tumori [24]. Parallelamente, IL-18 svolge la sua funzione di immunosoppressione attraverso l'induzione, sulla membrana plasmatica delle cellule natural killer (NK), che normalmente possiedono funzioni anti-tumorali, della proteina pro-tumorale, nota come programmed cell death 1 (PD1) [25]. 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.

Gli inflammasomi originano come immuno-risposta a segnali esogeni o endogeni integrando una moltitudine di segnali e convertendoli in risposte pro-infiammatorie. L'inflammasoma è associato a molteplici condizioni patologiche. Sebbene gli effettori dell'inflammasoma guidano efficacemente la risposta immunitaria innata, la loro segnalazione aberrante è associata alla patogenesi di malattie infiammatorie e metaboliche, alla neurodegenerazione e ai tumori maligni [26]. L'infiammazione cronica perpetuata dall'attivazione dell'inflammasoma svolge un ruolo centrale in tutte le fasi della tumorigenesi, compresa l'immunosoppressione, la proliferazione, l'angiogenesi e le metastasi. Al contrario, la segnalazione dell'inflammasoma contribuisce anche alla soppressione del tumore, il che illustra i diversi ruoli degli inflammasomi nella tumorigenesi. Infatti, gli inflammasomi svolgono ruoli distinti e talvolta contrastanti in molteplici aspetti della tumorigenesi. Nei tumori l'inflammasoma ha un comportamento ambivalente: può sopprimere la crescita tumorale attraverso il fenomeno della piroptosi e della morte di cellule pre-maligne o anche contribuire alla patogenesi, allo sviluppo ed alla progressione neoplastica.

I progressi nella comprensione della biologia dell'iCCA, vale a dire la complessità dei network molecolari che si sviluppano nel contesto tumorale, sono la base per nuovi farmaci che agiscono su nuovi bersagli biologici terapeutici. Ad oggi, numerosi inibitori del signaling di Notch, diversi tra loro in termini di classificazione, target molecolare e meccanismo d'azione, sono in fase di sperimentazione. Al contrario, non sono note evidenze del coinvolgimento dell'inflammasoma (attivazione/inibizione) nella patogenesi dell'iCCA, come mediatore dell'infiammazione cronica e progressione tumorale. Pertanto, a fronte di tutto ciò che è stato finora discusso, tale progetto verterà sullo studio di un potenziale link esistente tra il signaling di Notch e il sistema dell'inflammasoma nella progressione della patogenesi dell'iCCA e sugli effetti risultanti dall'inibizione dell'una o dell'altra parte.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

L'iCCA è tra i tumori ancora poco conosciuti per diversi aspetti rispetto ad altri, per quanto comunque l'oncologia fornisce in generale sempre punti critici investigabili. Appurata l'importanza ed il ruolo chiave ricoperto da Notch e dall'attivazione del suo segnale nella progressione della patogenesi di questo tumore, obiettivo generale dello studio sarà l'investigare se tale pathway abbia una correlazione con l'inflammasoma,



qualora presente in tale condizione patologica. In seconda istanza, data la duplice natura che caratterizza l'inflammasoma, ci si concentrerà sulla comprensione del suo ruolo nell'iCCA. Infine, obiettivo dello studio sarà anche quello di comprendere come poter intervenire sull'eventuale link Notch-inflammasoma nell'iCCA affinché si possa osservare una risposta anti-tumorale.

Obiettivo specifico 1: Sulle orme di quanto osservato nella PSC, il primo obiettivo verterà sulla comprensione in vitro se l'inflammasoma e quale tipo sia espresso dalle cellule epiteliali tumorali dell'iCCA e dalle altre componenti cellulari del microambiente tumorale. Nota la bivalenza dell'inflammasoma a seconda del contesto patologico e delle condizioni, si andrà a valutare il ruolo della sua attivazione nel tumore oggetto dello studio. Andremo ad individuare l'inflammasoma più idoneo su cui agire e da mettere in relazione con Notch. (Figura2).

Obiettivo specifico 2: Con questo secondo obiettivo, anch'esso in vitro, ci proponiamo di comprendere se l'inflammasoma riscontrato nell'obiettivo precedente sia in relazione con Notch e con l'attivazione del suo segnale. Compreso ciò, si andranno a valutare gli effetti a livello cellulare dell'inibizione di Notch sull'attivazione dell'inflammasoma e viceversa. (Figura 3 e Figura 4).

Obiettivo specifico 3: Il terzo obiettivo di questo studio sperimentale sarà quello di valutare come il trattamento con inibitori farmacologici di Notch e/o dell'inflammasoma e la loro combinazione qualora quest'ultima abbia dato risultati in vitro, influenzi lo sviluppo e la progressione dell'iCCA in modelli murini. (Figura 5).

Obiettivo 1:

Nella prima parte dello studio, ci proponiamo di investigare la presenza dell'inflammasoma e quale tipo nelle cellule tumorali e nel microambiente (macrofagi) nell'iCCA (Figura 2, punto 1). Linee cellulari di iCCA verranno caratterizzate per le varie componenti dei principali inflammasomi (NLRP1, NLRP3 e NLRC4), la cui espressione verrà investigata mediante analisi genica e proteica. Nello sviluppo degli esperimenti in vitro, verranno utilizzate 4 linee cellulari di iCCA, nello specifico, HUCCT1, RBE, KKU-M123 e KKU-M156 e gli esperimenti saranno condotti in triplicato, su culture cellulari in 2D. Successivamente, compreso se e quale tipo di inflammasoma è espresso, utilizzando le stesse linee cellulari di iCCA si andrà a valutarne il ruolo, cioè se l'attivazione dell'inflammasoma comporta un'azione pro- o anti-tumorale (Figura 2, punto 2). A tal fine, si procederà con co-culture di monociti umani e linee cellulari di iCCA, in cui i primi saranno attivati per aggiunta esogena dell'LPS e l'attivazione

dell'inflammasoma sarà confermato mediante immunofluorescenza per ASC e western blotting sulla Caspasi-1 clivata, ed infine rilascio nel mezzo delle citochine pro-infiammatorie (IL-1b e IL-18) mediante tests ELISA. Per elucidare il ruolo dell'inflammasoma, sulle linee cellulari di iCCA verrà valutata la vitalità cellulare post trattamento mediante saggi di MTS, l'espressione di alcuni marcatori dell'EMT, l'espressione di marcatori dell'apoptosi. Dopo aver individuato l'inflammasoma presente ed il suo ruolo nella colangiocarcinogenesi, si procederà al raggiungimento del secondo obiettivo. (Figura 2).

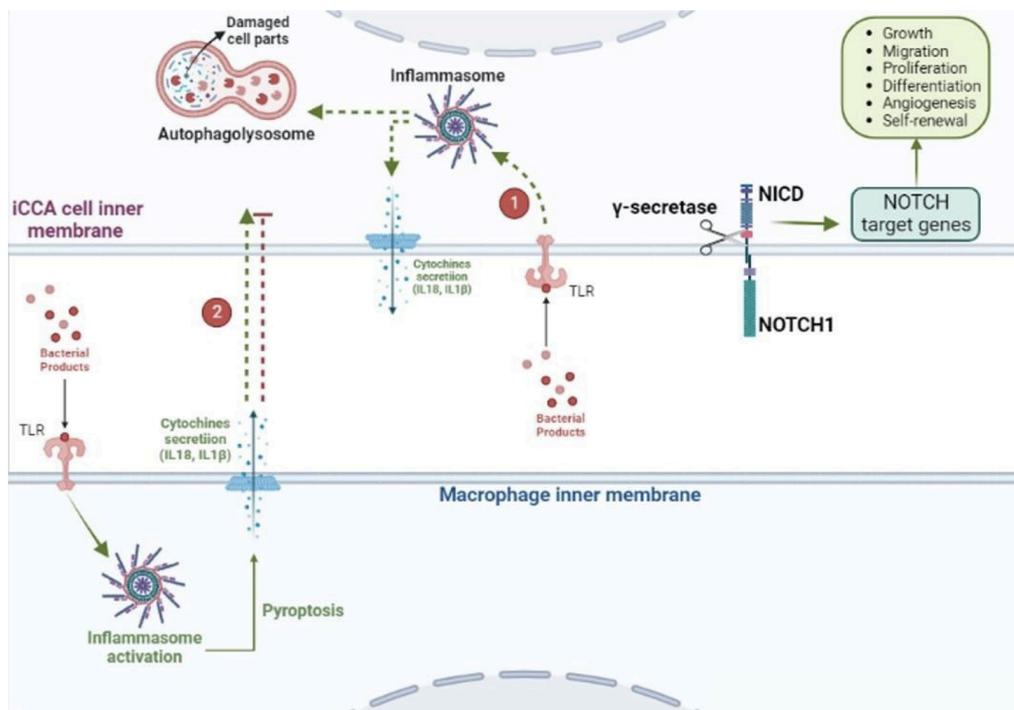


Figura 2. Raffigurazione schematica dell'obiettivo 1.

- (1)** Nell'iCCA (cellule tumorali e microambiente) è presente l'inflammasoma?;
- (2)** Laddove presente, che ruolo ha, pro- o anti-tumorale?

Obiettivo 2:

Nella seconda parte, anch'essa in vitro andremo a valutare l'effetto dell'attivazione dell'inflammasoma su Notch (Figura 3). Negli stessi sistemi di coltura cellulari descritti sopra, si andrà ad analizzare l'espressione del dominio attivato di NOTCH, Notch intracellular domain (NICD) e dei geni target della segnalazione di Notch, mediante western blotting. In seguito, compreso come il pathway di Notch è influenzato dall'attivazione dell'inflammasoma nell'iCCA, si procederà con l'inibizione farmacologica o di Notch o dell'inflammasoma (Figura 4). Nel primo caso si valuterà come l'inibizione di Notch influenzi l'attivazione dell'inflammasoma mediante analisi

proteica dei componenti dell'inflammasoma. Nel secondo caso si valuterà come l'inibizione dell'inflammasoma influenzi l'attivazione del segnale di Notch mediante analisi proteica del dominio NICD e dei target di attivazione del suo segnale. In entrambe le condizioni sperimentali si eseguiranno test funzionali di vitalità cellulare, analisi proteica sull'espressione delle molecole cardine dell'apoptosi, dell'infiammazione e dell'autofagia.

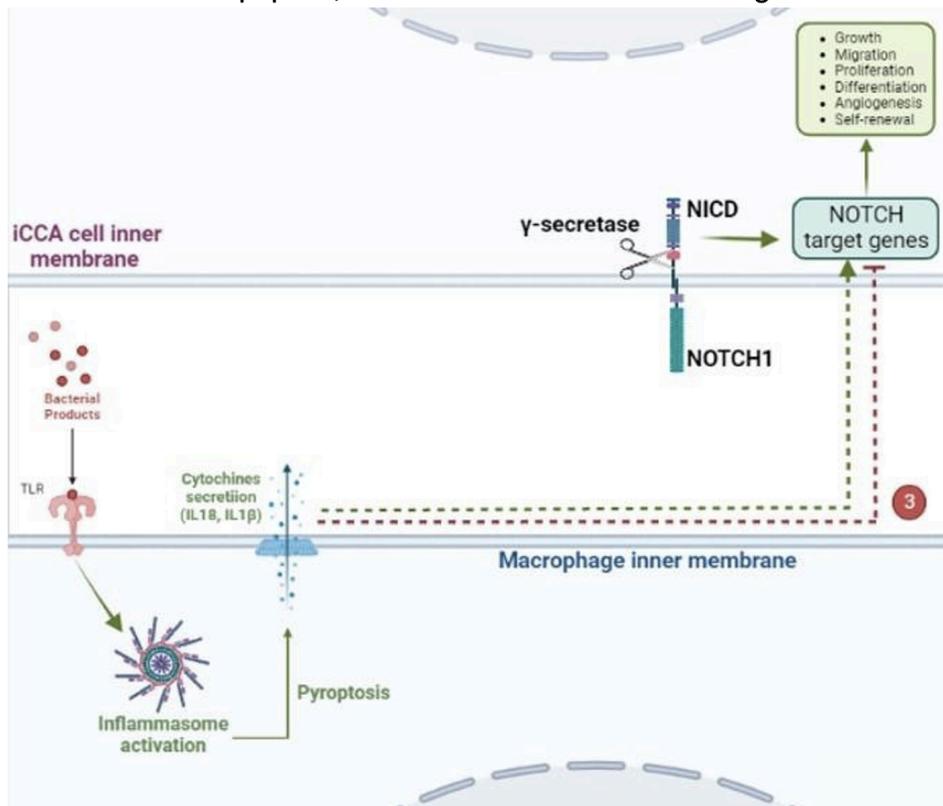


Figura 3. Raffigurazione schematica dell'obiettivo 2.

③ Esiste nell'iCCA un link Notch-inflammasoma? Promuove o ritarda la progressione tumorale?

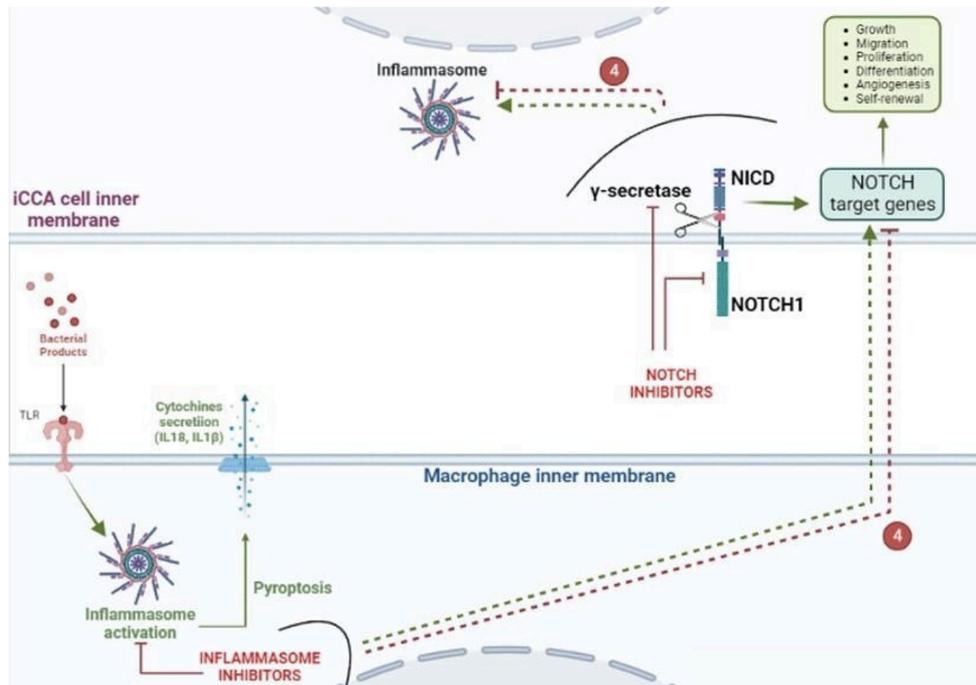


Figura 4. Raffigurazione schematica degli obiettivi 2.

(4) Cosa comporta l'inibizione di una delle due parti, Notch-inflammasoma, sull'altra e cosa ne consegue?

Obiettivo 3:

Nella terza ed ultima parte del progetto ci proponiamo di traslare in vivo, in modelli animali di iCCA, le condizioni sperimentali che abbiano dato i migliori risultati in vitro. I modelli murini di iCCA verranno generati utilizzando topi FVB/N sottoposti ad iniezione idrodinamica nella vena caudale di vettori plasmidici AKT/Jag1. Per cui, durante la sperimentazione animale, si andrà a valutare l'azione biologica e farmacologica dell'Inibitore di Notch e dell'inibitore dell'inflammasoma, o in combinazione sulla crescita tumorale, mediante osservazione diretta e misurazione del volume del tumore, così come anche il peso degli animali, indice di tossicità farmacologica. Concludendo, al termine dell'esperimento si procederà con prelievo ematico dalla vena orbitale per analisi su plasma delle citochine infiammatorie (IL1-β, IL-18), con il sacrificio degli animali e con relativo espianto delle masse tumorali su cui verranno eseguite analisi di tipo molecolare e biochimico. (Figura 5).

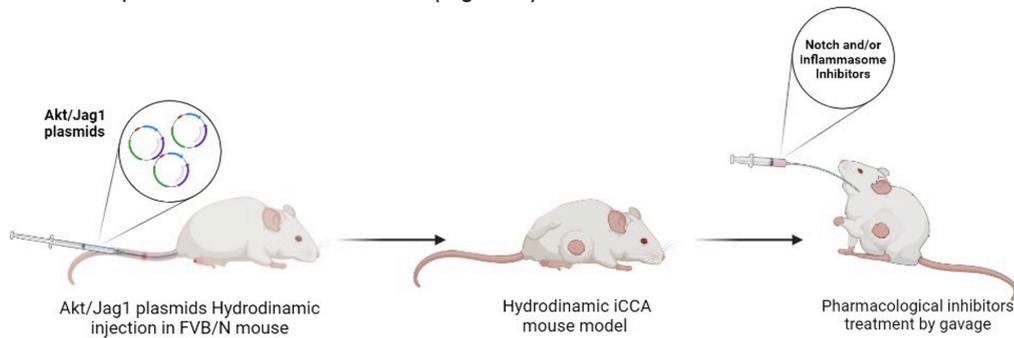


Figura 5. Preparazione del modello animale per la sperimentazione *in vivo* e trattamento con gli inibitori oggetto dello studio.

DATI PRELIMINARI

Al fine di individuare un coinvolgimento dell'infiammazione nel colangiocarcinoma, abbiamo analizzato i dati di espressione RNA sequencing di 31 campioni umani di iCCA e abbiamo confrontato i tessuti epatici normali circostanti scaricati dal database GEO (GSE107943) [27]. È importante notare che i geni TLR9, ASC, CARD8, IL18, GSDMD, CASP1) sono risultati significativamente upregolati ($P < 0,001$) nei tumori rispetto ai tessuti non neoplastici adiacenti (Figura 6), indicando diversi bersagli molecolari potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'iCCA.

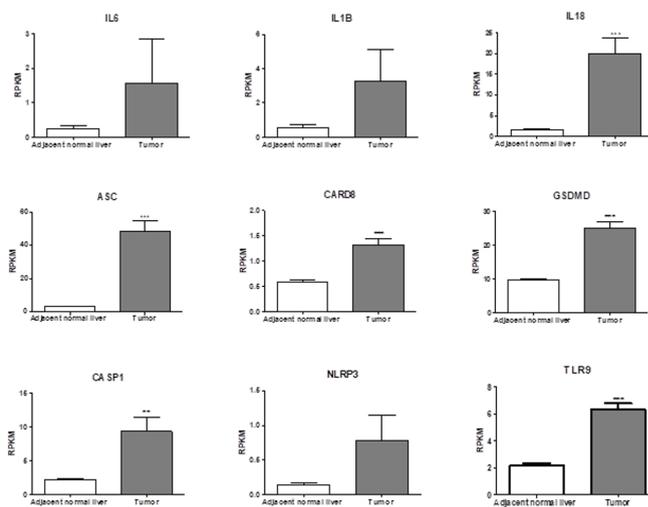


Figure 6: Analisi di diversi geni coinvolti nella risposta infiammatoria, come IL6, IL1B, IL18 e geni coinvolti nel complesso oligomero dell'inflammasoma NLRP3, come ASC, CARD8, GSDMD, CASP1, NLRP3, TLR9 nei tessuti tumorali e peritumorali corrispondenti di 31 pazienti affetti da iCCA, tratti dal database GEO (GSE107943). Mean expression data in RPKM (Reads Per Kilobase Million). *** $p < 0.0001$ calculated with Student's t-test.



METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Colture cellulari, Isolamento e caratterizzazione. Per gli esperimenti in vitro saranno utilizzate le linee cellulari umane HUCCT1, RBE, KCU-M123 e KCU-M156 di iCCA. Le linee cellulari HuCCT1/RBE e KCU-M213/KCU-M156 verranno coltivate, rispettivamente, in RPMI e DMEM addizionato da 10% di FBS, 1% penicillina/streptomina e 1% di glutamina (Gibco). Una volta che la coltura cellulare raggiungerà una confluenza idonea, mediante l'utilizzo della tripsina, si procederà a staccare le cellule aderenti alla superficie della fiasca, a contarle, e seminarle in maniera opportuna agli esperimenti di trattamento con gli inibitori di Notch e dell'inflammasoma.

Monociti umani saranno isolati da buffy coat di donatori di sangue sani mediante centrifugazione a gradiente utilizzando un gradiente di Ficoll (GE Healthcare) e ulteriormente purificati dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) mediante ordinamento cellulare attivato magneticamente (MACS) utilizzando microsferi CD14 (Miltenyi Biotec). Dopo la purificazione MACS, si otterranno due frazioni: la frazione CD14+ e l'eluato (composto da tutte le cellule PBMC CD14-). La frazione CD14+ verrà confermata mediante analisi di citofluorimetria. Le cellule CD14+ verranno coltivate nel top di transwell per co-coltura con diametro dei pori della membrana pari a 0,4 µm. Nel bottom del transwell si provvederà a coltivare con densità cellulare opportuna le linee di iCCA. Per i macrofagi, si procederà all'attivazione dell'inflammasoma mediante trattamento con LPS (10mg/mL), per 4 ore seguito da 30 minuti di incubazione con la nigericina a concentrazione finale di 20 mM. A questo punto si procederà con i trattamenti farmacologici con gli inibitori suddetti.

Test di proliferazione cellulare. Il test di proliferazione cellulare che verrà utilizzato è l'MTS, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Le linee cellulari verranno seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità di 2×10^3 cellule/pozzetto. Dopo 24 h, le cellule verranno trattate nel seguente modo:

-inibitori di Notch:

-inibitori dell'inflammasoma.

I trattamenti verranno effettuati per 24, 48 e 72h. Dopo le cellule verranno trattate con MTS per 4h e si procederà a misurare l'assorbanza.

Real time PCR. L'RNA totale sarà estratto con TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione di RNA sarà determinata con lo spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Il cDNA sarà retrotrascritto a



partire da 2 µg di RNA totale, utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. Le reazioni di PCR quantitativa saranno eseguite utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) e primers specifici dei geni oggetto di studio (geni coinvolti nel pathway di Notch, nell'inflammasoma, nell'infiammazione, nell'apoptosi).

Analisi bioinformatica. Il software Ingenuity pathway analysis (IPA) (Qiagen, USA) sarà utilizzato per identificare i percorsi e i regolatori trascrizionali a monte modulati nelle condizioni sperimentali riprodotte in vitro su cellule ed in vivo nei modelli animali. I replicati biologici e tecnici saranno analizzati con i test statistici più appropriati (ad esempio, test-t o ANOVA) per stabilire la significatività statistica e la riproducibilità. Per eseguire tutte le analisi statistiche sarà utilizzato il software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA).

Western, ELISA. I saggi di western blotting ed ELISA, saranno effettuati con protocolli standardizzati in precedenza, utilizzando anticorpi per i pathways di: Notch (Notch, HES1), apoptotici (Bcl2, Bax, Bad, cleavedPARP, Caspasi...), infiammatori (IL1β, IL18...) e dell'EMT (vimentina, e-caderina..); come proteina housekeeping, utilizzeremo la GAPDH (cell signaling). Dopo aver estratto le proteine totali con RIPA-Buffer, completo di inibitori di proteasi (Thermo Fisher Scientific), e aver trasferito le proteine su membrane in PVDF, si procede all'incubazione con i vari anticorpi primari di nostro interesse, e dopo un periodo di incubazione o.n., si procede ai lavaggi e al trattamento con il secondario coniugato con la perossidasi, per poi procedere la rilevazione del segnale mediante reagente chemiluminescente, Clarity Max Western Substrate (Bio-Rad Laboratories), utilizzando il ChemiDoc MP instrument (Bio-Rad Laboratories). I saggi di western verranno effettuati sia sulle colture cellulari che sui tessuti provenienti dai modelli animali. I tests ELISA per IL-1b e IL-18, verranno effettuati secondo protocollo applicato dall'azienda venditrice (abCAM).

Immunofluorescenza e immunoistochimica. L'immunofluorescenza verrà eseguita per lo studio dei marcatori (ASC) utilizzando come anticorpi utili a rilevare le proteine coinvolte, in modo da cogliere le variazioni di sovra-espressione o riduzione di espressione nelle cellule di iCCA trattate con inibitori di Notch o inibitori dell'inflammasoma, oppure per evidenziare modifiche delle proteine dell'inflammasoma. L'immunofluorescenza verrà effettuata sia su cellule che sui tessuti provenienti dai modelli animali trattati. A tal proposito, ricordiamo che tutti i tessuti da analizzare, saranno inclusi in paraffina tamponata e successivamente tagliati a 4 µm per poterli sottoporre all'indagine analitica. Di ogni campione cellulare e tissutale, si acquisiranno 5 campi, con il microscopio confocale Eclipse Ti2 by Nikon (Nikon, Japan)



su cui verrà effettuata un'analisi semiquantitativa rispetto al controllo non trattato mediante Image J.

Sperimentazione in vivo. Per la sperimentazione in vivo verrà utilizzato il modello murino di iCCA idrodinamico [28,29]. I topi FVB/N saranno acquistati dal Jackson Laboratory, ai quali verrà indotto il colangiocarcinoma intraepatico primario mediante iniezione idrodinamica nella vena caudale con la combinazione di plasmidi AKT (10ug), Jagged1 (40ug) e SB (2ug). A partire dalla seconda settimana dall'inoculo delle cellule o dei tessuti, quando il volume tumorale raggiungerà circa i 60-70mm³, si procederà al trattamento degli animali. Ai topi verrà somministrato l'inibitore di Notch che ha dato i migliori risultati in vitro o un veicolo per via orale alla nona settimana, ogni due giorni per una durata di 3 settimane. Secondo lo stesso modus operandi verrà somministrato l'inibitore/i dell'inflammasoma. I topi verranno pesati 2 volte a settimana insieme ai diametri dei tumori per tutta la durata dell'esperimento. La dimensione del tumore (in mm³) sarà calcolata usando l'equazione $(length \times width^2)/2$. L'effetto del trattamento sulla crescita tumorale sarà valutato come T/C% (mediana peso tumore nei trattati/mediana peso tumori nei controlli, in %). Il prelievo ematico verrà eseguito dalla vena orbitale, previo utilizzo di anestetico oftalmico. Le masse espantate subiranno dei processi di omogeneizzazione tissutale da cui estrarre RNA o proteine e procedere con lo studio genico e proteico dei pathway coinvolti nei processi infiammatori, apoptotici e pathway di Notch.

RISULTATI ATTESI

In letteratura non sono presenti conoscenze riguardo l'inflammasoma nel colangiocarcinoma e tantomeno quindi il suo ruolo nella patogenesi dell'iCCA. Nonostante la nota natura bivalente dell'inflammasoma a seconda delle condizioni fisiologiche e patologiche, pensiamo che esso possa avere un ruolo "anti-survival" in questo contesto patologico. Siamo propensi al pensare ciò anche per quello che è stato riportato da alcuni autori nella PSC, condizione potenzialmente correlata all'insorgenza dell'iCCA in un paziente. Pertanto, al netto di ciò, ci aspettiamo di riscontrare espressione dell'inflammasoma nelle cellule epiteliali tumorali dell'iCCA e di avere conferma della sua espressione nei macrofagi presenti nel microambiente di tale neoplasia. Procedendo con l'inibizione dell'inflammasoma supponiamo di riscontrare un contesto protumorale o almeno di mantenimento della vitalità cellulare mediata da Notch. Di contro, nel momento in cui si procederà con l'inibizione del pathway di Notch, l'inflammasoma attivato dovrebbe poter innescare i meccanismi che inducono a morte cellulare. Se così dovesse essere, i risultati ci porterebbero a descrivere



l'inflammasoma nell'iCCA con un ruolo anti-tumorale e quindi antagonista del pathway di Notch attivato, induttore per eccellenza di progressione tumorale nell'iCCA.

Nel caso in cui tali risultati attesi non dovessero essere confermati, ma al contrario se dovessimo riscontrare una riduzione della vitalità cellulare e quindi riscontrare un ruolo pro- tumorale dell'inflammasoma nell'iCCA, saremmo indotti a pensare di poter essere di fronte ad un caso di sinergia con il pathway di Notch nel favorire un contesto infiammatorio. In tal caso potremmo descrivere il link Notch-inflammasoma come un team che la cellula tumorale di iCCA sfrutta a suo favore per poter sopravvivere e favorire un contesto pro-infiammatorio e perché no, magari un meccanismo di chemioresistenza, magari anche per attivazione di meccanismi di autofagia per poter distruggere tutto ciò che la cellula riconosce come danneggiato e da eliminare per poter sopravvivere. La possibilità di poter traslare lo studio su modelli animali di colangiocarcinoma ci porrà in condizioni sperimentali più affini all'uomo, consentendoci di comprendere più chiaramente tali meccanismi cellulari.

Alla luce di tutte queste ipotesi, di tutto ciò che potremmo o non aspettarci, sicuramente siamo di fronte a punti di domanda importanti, a ciascuno dei quali sono associati tanti potenziali target di trattamenti terapeutici.

INNOVAZIONI

La prognosi sfavorevole che caratterizza il colangiocarcinoma (CCA) è dovuta in parte alla diagnosi tardiva della neoplasia e in parte all'unica opzione di trattamento curativo per il colangiocarcinoma intraepatico, l'epatectomia parziale o la chemioterapia e la radioterapia nei pazienti con malattia in stadio precoce, con qualche beneficio parziale. Tuttavia, i protocolli per il trattamento dell'iCCA prevedono l'applicazione della chirurgia solo al 20% dei casi. Pertanto, sarebbe necessario individuare nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici per l'iCCA andando ad agire non solo sul tumore, ma anche sull'infiltrato infiammatorio e sulla risposta immunitaria. Nel nostro studio, andremo ad osservare quali sono i meccanismi che si attivano e/o che vengono silenziati quando andremo ad indurre due inibizioni, del pathway di Notch e dell'inflammasoma, contemporaneamente o singolarmente. In questo modo si potranno definire effettivamente i ruoli molecolari di entrambi i meccanismi, sia in vitro sia in vivo, direttamente sui modelli animali proposti. Dato che i risultati della segnalazione dell'inflammasoma sono diversi tra i vari tipi di tumore, la comprensione di come gestire questa diversità sarà un'area importante per le indagini future.



BIBLIOGRAFIA

1. Alvaro D, Crocetti E, Ferretti S, Bragazzi MC, Capocaccia R. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma in Italy. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42:490–5.
2. Kim Y, Kim M, Shin JS, Park SH, Kim SB, Kim J, et al. Hedgehog Signaling Between Cancer Cells and Hepatic Stellate Cells in Promoting Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:2684–98.
3. Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Horino K, Masuda T, Komori H, et al. Hepatic stellate cells may relate to progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:2555–64.
4. Fabris L, Sato K, Alpini G, Strazzabosco M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology*. 2021;73:75–85.
5. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*. 2009;136:1727–39.
6. Strazzabosco M, Fabris L. Notch Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Guilty in Association! *Gastroenterology*. 2012;143:1430–4.
7. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, et al. Yes-Associated Protein Up-regulates Jagged-1 and Activates the NOTCH Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2013;144:1530-1542.e12.
8. Mancarella S, Serino G, Gigante I, Cigliano A, Ribback S, Sanese P, et al. CD90 is regulated by notch1 and hallmarks a more aggressive intrahepatic cholangiocarcinoma phenotype. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41:65.
9. Mancarella S, Serino G, Dituri F, Cigliano A, Ribback S, Wang J, et al. Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. *Cell Death Differ*. 2020;27:2330–43.
10. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*. 2014;15:e493–503.
11. Lee S, Kim SK, Park H, Lee YJ, Park SH, Lee KJ, et al. Contribution of Autophagy-Notch1-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation to Chronic Inflammation and Fibrosis in Keloid Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8050.



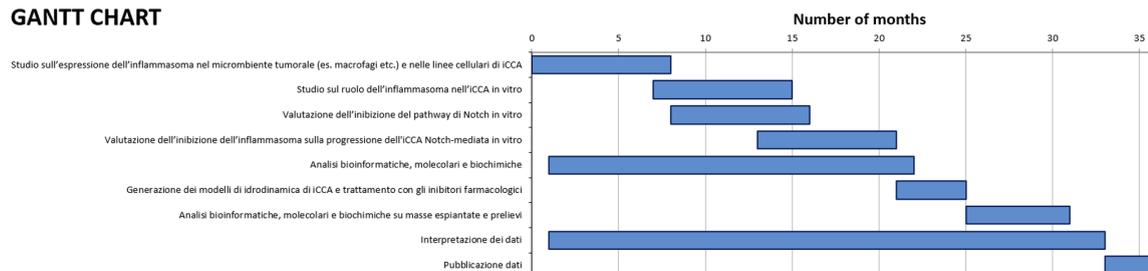
12. Jin Y, Li C, Xu D, Zhu J, Wei S, Zhong A, et al. Jagged1-mediated myeloid Notch1 signaling activates HSF1/Snail and controls NLRP3 inflammasome activation in liver inflammatory injury. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:1245–56.
13. Matsushita H, Miyake Y, Takaki A, Yasunaka T, Koike K, Ikeda F, et al. TLR4, TLR9, and NLRP3 in biliary epithelial cells of primary sclerosing cholangitis: Relationship with clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:600–8.
14. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Mol Cell*. 2002;10:417–26.
15. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol*. 2014;15:738–48.
16. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:99–109.
17. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell*. 2010;140:821–32.
18. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*. 2016;165:792–800.
19. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010;59:1192–9.
20. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, et al. IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4⁺ Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209:1595–609.
21. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125:3356–64.
22. Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b + /Gr-1 + Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 β -Secreting Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;175:8200–8.
23. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Res*. 2007;67:10019–26.



24. Voigt C, May P, Gottschlich A, Markota A, Wenk D, Gerlach I, et al. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114:12994–9.
25. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 Induces PD-1–Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Res*. 2011;71:5393–9.
26. Karki R, Kanneganti T-D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:197–214.
27. Ahn KS, Kang KJ, Kim YH, Kim T-S, Song B-I, Kim HW, et al. Genetic features associated with 18F-FDG uptake in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Treat Res*. 2019;96:153–61.
28. Che L, Fan B, Pilo MG, Xu Z, Liu Y, Cigliano A, et al. Jagged 1 is a major Notch ligand along cholangiocarcinoma development in mice and humans. *Oncogenesis*. 2016;5:e274.
29. Chen X, Calvisi DF. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am J Pathol*. 2014;184:912–23.

TIMELINE

GANTT CHART





TITOLO DEL PROGETTO

11. LA CLAUDINA 18.2: POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO PER ZOLBETUXIMAB NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO DUTTALE

2786671

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Tumor Progression and Metastasis - TPM2

Responsabile: Valentini Annamaria

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: Claudina, adenocarcinoma pancreatico duttale, Zolbetuximab

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) rappresenta oltre il 90% di tutte le neoplasie pancreatiche. Tuttavia, ad oggi non esiste uno strumento di screening efficace per la diagnosi precoce e i pazienti mancano di sintomi clinici specifici nelle fasi iniziali. Pertanto, la maggior parte dei pazienti ha una diagnosi in stadio avanzato, con metastasi a distanza, risultando non idonea ad un intervento chirurgico radicale. È quindi urgente sviluppare approcci terapeutici non chirurgici per un trattamento efficace del PDAC. Per il trattamento palliativo sistemico di pazienti con PDAC non resecabili, la chemioterapia è l'approccio di prima linea anche se la chemiosensibilità del PDAC risulta essere moderata

La Claudina 18.2 (CLDN18.2) è una proteina transmembrana, presente a livello delle giunzioni serrate, la cui funzione è mantenere la polarità cellulare e l'adesione intercellulare. Nelle cellule epiteliali normali, essa è principalmente presente nella frazione apicale delle giunzioni serrate. L'espressione di CLDN18.2 diminuisce



generalmente durante la carcinogenesi, tuttavia, la sua overespressione è stata osservata in diversi tipi di cancro e studiata come uno strumento diagnostico e bersaglio terapeutico.

Zolbetuximab è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi in maniera altamente selettiva alla CLDN18.2. Lo studio clinico di fase II (FAST: NCT01630083) ha rivelato che Zolbetuximab combinato con la chemioterapia di prima linea ha migliorato significativamente la sopravvivenza globale, la sopravvivenza libera da progressione e il tasso di risposta obiettiva con pochi eventi avversi di alto grado nei pazienti con tumori gastrici e tumori della giunzione gastroesofagea che mostravano overespressione di CLDN18.2. Pochi dati sono disponibili sulla espressione di CLDN18.2 nel PDAC, pertanto questo studio è stato progettato allo scopo di fornire un contributo allo sviluppo di studi clinici sul possibile utilizzo del Zolbetuximab nel PDAC.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo 1:

Valutare la overespressione immunoistochimica della Claudina 18.2 nel adenocarcinoma duttale pancreatico rispetto al tessuto normale in 100 campioni paraffinati appartenenti all' istoteca del Servizio di Anatomia Patologica.

Obiettivo 2:

Correlare l'espressione della Claudina 18. 2 con i linfonodi metastatici, metastasi a distanza, invasione neurale, stadio e sopravvivenza.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

La overespressione della Claudina 18. 2 sarà valutata mediante metodica immunoistochimica con l'anticorpo monoclonale EPR19202 (Abcam) su immunocoloratore automatico Bond III (Leica).

I risultati ottenuti saranno sottoposti ad adeguate indagini statistiche



RISULTATI ATTESI

Correlazione della overespressione della Claudina 18.2 con fattori di peggiore prognosi

BIBLIOGRAFIA

Wang Xi, et al World J Gastronterol Oncol 2022, 14: 1252-1264

Yu S et al. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2021, 1875: 188461

Sahin U et al. Ann Oncol 2021, 32: 609-619. Woll S et al. Int J Cancer 2014, 134: 731-739

Tureci O et al . Oncoimmunology 2019, 8: e1523096

Sahin U et al. Clin Cancer Res 2008, 14: 7624-7634.



TITOLO DEL PROGETTO

12. RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA A TERAPIE SISTEMICHE NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA GASTRICO

2790444

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Tumor Progression and Metastasis - TPM2

Responsabile: D'ALESSANDRO ROSALBA

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: chemioterapia, terapia molecolare, marcatori predittivi, microambiente tumorale, resistenza farmacologica, marcatori circolanti

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

In Italia nel 2019 sono stati registrati 14.300 nuovi casi di tumore dello stomaco (8.400 tra gli uomini e 5.900 tra le donne), che rappresenta il quinto tumore più frequente nelle persone con più di 70 anni e la quinta causa di morte per cancro nella popolazione generale [1]. Nei paesi occidentali, l'80% dei pazienti viene diagnosticato con malattia in stadio avanzato non resecabile o sviluppa una recidiva entro 5 anni dalla chirurgia con intento curativo. Pertanto, la prognosi della malattia avanzata rimane sfavorevole con un tasso di sopravvivenza a 5 anni < 30% per tutte le fasi e < 4% per la malattia metastatica [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 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, leucovorin, 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 peri-operatorio.

La ricerca di marcatori predittivi/prognostici assume un ruolo cruciale anche nel trattamento del GC localmente avanzato e metastatico. Malgrado l'avvento dell'immunoterapia e delle nuove terapie a bersaglio molecolare, le opzioni terapeutiche disponibili in questi pazienti sono ad oggi limitate. I pazienti in buone condizioni cliniche e con un'adeguata funzione d'organo sono candidati a ricevere un trattamento chemioterapico, che rappresenta il caposaldo del trattamento del tumore dello stomaco avanzato, con una sopravvivenza mediana di circa un anno rispetto ai 3-4 mesi delle cure di supporto [8].

L'avvento delle tecniche di sequenziamento genico (NGS) ha contribuito a comprendere meglio il complesso panorama molecolare del tumore gastrico, portando ad una nuova classificazione di sottotipi molecolari: tumori positivi per EBV, tumori con instabilità dei microsatelliti (MSI), tumori genomicamente stabili (GS) e tumori con instabilità cromosomica (CIN) [9]. Inoltre, queste nuove tecnologie genomiche hanno permesso l'individuazione di nuove mutazioni "driver" che potrebbero rappresentare nuovi potenziali bersagli terapeutici, come le alterazioni genetiche correlate al deficit dei meccanismi di riparo del DNA.

Il pathway di riparo del DNA è composto da un intricato network di proteine coinvolte nella riparazione del DNA e nel controllo del ciclo cellulare, che hanno la funzione di sovrintendere alla corretta replicazione del materiale genico e all'efficiente svolgimento della proliferazione cellulare. Un efficiente sistema di riparo è necessario per la preservazione dell'integrità del patrimonio genetico e alterazioni in questi geni potrebbero rappresentare potenziali target terapeutici per la terapia antitumorale, come



i sali di platino e i PARP inibitori [10, 11]. BRCA1 e BRCA2 sono i geni più noti correlati ai meccanismi di riparo del DNA, ma in realtà un più ampio spettro di mutazioni somatiche e germinali possono conferire il cosiddetto fenotipo “BRCAness”, come nel caso di mutazioni a carico dei geni ARID1A, ATM, ATR, CDK12, CHEK1, CHEK2, PALB2, e RAD51 [12]. Tuttavia, la prevalenza e la rilevanza clinica di queste mutazioni nel tumore gastrico rappresentano una terra incognita. Interessanti studi preclinici hanno dimostrato un possibile coinvolgimento dell’infezione/inflammation mediata dall’ *H. pylori*, riconosciuto come uno dei maggiori fattori di rischio nella cancerogenesi del tumore gastrico, sia nell’indurre danni al materiale genetico che nel compromettere l’efficienza dei sistemi di riparo [13, 14].

Questi sottogruppi differiscono non solo per l’assetto biomolecolare ma anche per numerose varianti clinico-patologiche (sede, età di insorgenza, istotipo predominante) e suggeriscono un nuovo approccio terapeutico che riconosca specifici target su cui agire. Nonostante l’analisi molecolare abbia contribuito ad esplorare il complesso panorama molecolare del tumore gastrico e a identificare nuovi bersagli terapeutici, spesso non vi sono evidenze circa la rilevanza clinica di queste “firme” genetiche.

Numerose evidenze hanno inoltre dimostrato che il GC è caratterizzato da una stretta interdipendenza tra il sottotipo molecolare e il profilo angiogenico e immunitario del microambiente tumorale. Come in altri tumori solidi, diverse citochine e fattori di crescita svolgono un duplice ruolo nel microambiente tumorale, in quanto promuovono sia l’angiogenesi tumorale che l’immunosoppressione. I fattori di crescita appartenenti alla famiglia del “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGFs) sono i promotori più diffusi e potenti dell’angiogenesi. I membri della famiglia VEGF sono coinvolti a diversi livelli nella regolazione del ciclo immunitario del cancro, producendo cambiamenti sostanziali che contribuiscono a creare un microambiente che consente al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. I profili angiogenico ed immunitario sono in stretta correlazione con le classi molecolari del tumore. I sottotipi MSI ed EBV-positivi sono caratterizzati da elevata espressione di PD-L1, da un infiltrato linfocitario citotossico ricco in CD8+ TILs e da un elevato tasso mutazionale (TMB ≥ 10), questi sono stati definiti “Hot Tumors” che rendono questi tumori aggredibili da farmaci immunoterapici. Al contrario, i sottogruppi molecolari dei tumori geneticamente stabili e con instabilità cromosomica sono definiti “Cold Tumors” e sono spesso caratterizzati da un microambiente immunosoppressivo e ricco in fattori che favoriscono l’angiogenesi. In quest’ultima classe di tumori rientrano i tumori con amplificazione del VEGFA che si riscontra con un’incidenza del 7%. Il VEGFA è un fattore molecolare in grado di entrare in diverse fasi del ciclo immunitario del cancro, producendo modifiche sostanziali che contribuiscono in ultima analisi a creare un microambiente tollerogenico che consente



al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. Questi tumori però potrebbero essere trattati in modo efficace con terapie antiangiogeniche. L'analisi delle "firme" molecolari e dei pattern immunitario e angiogenico può pertanto portare ad individuare biomarcatori utili non solo a selezionare pazienti che possano beneficiare di uno specifico trattamento farmacologico ma anche a monitorarne nel tempo l'efficacia rivelando fenomeni di resistenza [15, 16].

Tra i biomarcatori di recente interesse per la carcinogenesi e la progressione tumorale assumono ruolo cruciale specifici RNA non codificanti (ncRNA), come i microRNA (miRNA) e i long non-coding RNA (lncRNA). Tali molecole hanno acquisito la funzione di regolare il metabolismo cellulare sia a livello nucleare, esercitando un controllo nel processo di trascrizione (lncRNA), sia a livello citoplasmatico agendo sul processo di traduzione di specifici RNA messaggeri (miRNA) [17, 18]. Questa classe di molecole è facilmente rilevabile e relativamente stabile nei fluidi biologici e presenta un'elevata sensibilità; inoltre, i miRNA sono spesso down- o up-regolati nelle cellule neoplastiche e per questo possono costituire nuovi marcatori per i tumori umani compreso il carcinoma gastrico [19].

Molte delle caratteristiche della cellula tumorale possono essere diffuse nel microambiente tumorale attraverso gli esosomi [20]. Gli esosomi sono vescicole di derivazione cellulare con diametro compreso tra 20 e 100 nm, in grado di influenzare l'angiogenesi, le metastasi e altre proprietà biologiche cellulari legate alla tumorigenesi [21]. Pertanto, questo tipo di comunicazione extracellulare svolge un ruolo chiave nella progressione del cancro, nell'invasione, nella neo-vascolarizzazione, nelle metastasi e nella resistenza ai farmaci. In diversi tumori, è stato dimostrato che gli esosomi derivati dalle cellule tumorali facilitano la progressione del GC trasferendo specifici fattori di crescita così come miRNA differenzialmente espressi rispetto alle cellule del tessuto sano. Queste vescicole si ritrovano anche nel siero o nel plasma dei pazienti con GC e la loro caratterizzazione può portare ad individuare utili biomarcatori predittivi di risposta ad una data terapia farmacologica [22].

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Il presente progetto di ricerca si propone di individuare marcatori molecolari nel processo di progressione tumorale del Carcinoma Gastrico (GC). Tale progetto si svilupperà attraverso studi specifici incentrati sull'analisi delle "firme" molecolari e dei pattern immunitario e angiogenico sia in pazienti affetti da forme precoci della malattia e sottoposti a terapie perioperatorie, sia in pazienti affetti da malattia metastatica sottoposti a terapie di prima o seconda linea. Individuare marcatori è cruciale non solo



nella selezione di pazienti che possano beneficiare di uno specifico trattamento farmacologico ma anche nel monitorarne nel tempo l'efficacia rivelando possibili fenomeni di resistenza.

Obiettivo specifico 1:

Studio del pattern molecolare del tumore gastrico correlato alla risposta a schemi farmacologici previsti dal protocollo terapeutico

- Correlazione delle caratteristiche molecolari con le caratteristiche clinico-patologiche del tumore;
- Ricerca di mutazioni somatiche con valore prognostico di sopravvivenza globale e predittivo di risposta ai trattamenti chemioterapici standard derivati dal platino.

Obiettivo specifico 2:

Studio 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.

Obiettivo specifico 3:

Studio del pattern angiogenico 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 e con le caratteristiche molecolari del tumore.

Obiettivo specifico 1:

Il nostro progetto di ricerca intende articolarsi in studi focalizzati sulla ricerca di quelle caratteristiche molecolari cruciali nella risposta ad un dato schema terapeutico. I dati molecolari saranno ottenuti per sequenziamento massivo (NGS) o tramite metodiche che individuano specifiche alterazioni molecolari. Tali dati saranno integrati ad informazioni relative ai dati anamnestici e parametri clinici, laboratoristici e strumentali dei pazienti affetti da carcinoma gastrico.

- Un primo studio già avviato nel nostro gruppo di ricerca intende esplorare le caratteristiche molecolari del carcinoma gastrico resecabile importanti nel determinare il tipo di risposta alla terapia neoadiuvante. In particolare in questo studio sono arruolati pazienti con GC resecabile sottoposti a terapia neoadiuvante secondo lo schema



FLOT. Lo studio si avvale della determinazione dello stato MSI e positività per EBV che verrà eseguita dall'Unità di Anatomia Patologica del nostro istituto. Ci sono infatti alcune evidenze che i tumori gastrici resecabili con elevato grado di MSI e MMRD beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento perioperatorio. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento perioperatorio. 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 immunopermissivi e sono quelli che potrebbero beneficiare delle terapie perioperatorie integrate con farmaci immunoterapici. Le informazioni sulle caratteristiche molecolari saranno messe in relazione con la valutazione patologica eseguita sulla biopsia chirurgica che stabilirà il grado di regressione tumorale (TRG) secondo i criteri di regressione di Becker (Al-Batran SE et al. The Lancet Oncology 2016).

Lo studio recluterà circa 70 pazienti coinvolgendo anche altri centri coinvolti nella nostra proposta progettuale tra cui il Policlinico di Bari ed il dipartimento di scienze chirurgiche, odontostomatologiche e materno infantili dell'Università di Verona.

- Un secondo studio è incentrato sulle mutazioni somatiche responsabili di deficit dei meccanismi di riparo del DNA in pazienti con GC sottoposti a Chemioterapia a base di sali di platino. Lo studio prevede l'individuazione tramite sequenziamento massivo (Next Generation Sequencing) di profili molecolari correlati al deficit di riparazione dei danni al DNA, analizzando il materiale genetico estratto da tessuto tumorale ricavato in corso di intervento chirurgico (su primitivo e/o metastasi) o biopsia diagnostica eseguiti nell'ambito del normale percorso clinico-assistenziale. I profili molecolari saranno correlati alla presenza di infezione da H. pylori. Inoltre sono individuate le mutazioni somatiche con valore prognostico di sopravvivenza globale e predittivo di risposta alla chemioterapia. Lo studio recluterà circa 50 pazienti per quanto riguarda la componente retrospettiva ed indicativamente 50 pazienti per quanto riguarda la parte prospettica.
- Un terzo studio già avviato nel nostro gruppo di ricerca è incentrato sull'analisi dei biomarcatori di risposta ad una terapia combinata tra chemioterapico appartenente alla famiglia dei taxani, il Paclitaxel, ed un farmaco molecolare antiangiogenico il Ramucirumab, il quale è diretto a bloccare il VEGFR2. Tale schema terapeutico rappresenta una terapia di seconda linea nel trattamento del GC metastatico. In questo studio sono reclutati pazienti sottoposti a questa combinazione di farmaci. Il nostro interesse in questo caso è incentrato sull'analisi di una specifica alterazione molecolare, costituita dall'amplificazione del gene VEGFA, che codifica per il fattore che lega il recettore VEGFR2. Il nostro obiettivo è quello di stabilire la correlazione tra



amplificazione del gene, la sua overespressione nel tessuto tumorale e la risposta alla terapia. Abbiamo effettuato analisi di FISH per determinare lo stato di amplificazione del gene e analisi di IHC per determinare lo stato di espressione del gene nel tessuto tumorale. Tale analisi è stata effettuata su 30 pazienti ed i risultati sono riportati nella sezione dei Risultati Preliminari. Intendiamo estendere tale analisi prospettica ad altri 30 pazienti coinvolgendo le Unità di Oncologia coinvolte nella presente proposta progettuale.

Obiettivo specifico 2

La presente proposta progettuale si propone altresì di caratterizzare l'immunofenotipo delle diverse classi di pazienti arruolate nei singoli studi. La caratterizzazione delle diverse popolazioni linfocitarie isolate sia dal tessuto tumorale (ove possibile) che dal sangue periferico sarà effettuata utilizzando citofluorimetria a flusso multiparametrica che permette una caratterizzazione dal punto di vista numerico, fenotipico e funzionale. 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, basandosi sulle seguenti ipotesi scientifiche:

1. Nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti T (CD4, CD8, Treg), T (V1, V2) e NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione. La stretta relazione tra cellule tumorali e 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.



3. I linfociti infiltranti il tumore, con il loro fenotipo tumore-dipendente, hanno un ruolo rilevante nella risposta del tumore alla terapia in atto.

4. La caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti T, T 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 specifico 3:

Data la stretta interdipendenza tra caratteristiche molecolari, profilo immunitario e profilo angiogenico il terzo obiettivo della nostra proposta progettuale riguarda proprio l'analisi del profilo angiogenico sia nel tessuto tumorale che nel sangue periferico. In particolare, riteniamo di grande interesse le variazioni di marcatori angiogenici nel corso di una data terapia. Nel caso di pazienti sottoposti a terapia di seconda linea Ramucirumab e Paclitaxel le variazioni dei livelli sierici di Angiopoietin 2 si sono rivelate essere correlate alla risposta alla terapia. Pertanto intendiamo estendere la nostra analisi prospettica di un pannello di marcatori coinvolti in angiogenesi, anche ad altre classi di pazienti con GC sottoposti a terapia sistemica al fine di correlare questi dati all'analisi del profilo immunitario e del pattern molecolare.

L'analisi prospettica dei marcatori circolanti verrà estesa all'analisi dei miRNA e degli esosomi estratti dal sangue periferico. I dati preliminari ottenuti nel caso dei pazienti con GC metastatico e sottoposti alla terapia con Ramucirumab e Paclitaxel sono molto incoraggianti e sostengono l'ipotesi che sia i miRNA che le vescicole esosomiche possano costituire marcatori predittivi di risposta alla terapia in atto, fornendo utili informazioni circa possibili meccanismi di resistenza.

DATI PRELIMINARI E RISULTATI ATTESI

I dati preliminari riportati in questa sezione si riferiscono a due studi già approvati dal Comitato Etico e nell'ambito dei quali abbiamo già arruolato dei pazienti e condotto parte delle analisi.

Il primo dei due studi "Analisi di biomarcatori predittivi in pazienti con GC metastatico sottoposti a seconda linea di terapia basata sulla combinazione di un chemioterapico ed un farmaco molecolare anti-angiogenico" ha già concluso la sua prima fase come studio monocentrico e ne chiederemo una nuova approvazione come studio multicentrico per allargare la casistica e condurre nuove analisi sulla base dei risultati ottenuti.



Questo primo studio approvato dal comitato etico, si è basato sul reclutamento di pazienti con GC metastatico sottoposti ad una terapia di seconda linea con un farmaco anti-angiogenico, il Ramucirumab, associato ad un chemioterapico appartenente alla famiglia dei taxani, il Paclitaxel. Si tratta di uno studio prospettico che ad oggi ha incluso 40 pazienti.

Marcatori angiogenici circolanti: In una prima fase sono stati misurati i livelli sierici di biomarcatori angiogenici selezionati a partire dall'inizio della terapia (T0) e ad intervalli di tre mesi sino al momento della progressione di malattia (TP). Sulla base della prima valutazione radiologica (dopo tre mesi dall'inizio della terapia), la popolazione è stata suddivisa in "gruppo con controllo di malattia (CD)" e "gruppo con malattia in rapida progressione (RP)". I livelli dei diversi marcatori sono stati misurati al basale, all'inizio del terzo ciclo di terapia e al momento della progressione della malattia. Sono stati considerati tutti i membri della famiglia VEGF, nonché l'Angiopietina2 (Ang2) e il suo recettore (Tie2).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare possibili marcatori predittivi e di valutare se le variazioni di un determinato marcatore nel tempo potessero essere predittive dell'esito terapeutico. I risultati ottenuti hanno evidenziato che i pazienti con PFS più lunga presentavano livelli basali più elevati di VEGF e Ang2 rispetto a quelli con PFS più breve. Sebbene i livelli basali dei marcatori esaminati non fossero predittivi di risposta, i risultati indicavano che le diminuzioni di Ang2 e VEGFC, entrambi coinvolti nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi, misurate all'inizio del terzo ciclo erano associate a un minor rischio di progressione e quindi a una PFS più lunga. Inoltre, si è registrato un aumento significativo di VEGFC e Ang2 al momento della progressione, il che potrebbe suggerire l'attivazione di vie alternative come VEGFC/VEGFR3 e Ang2/Tie2 che potrebbero contrastare il blocco di VEGFR2 da parte di Ramucirumab.

I risultati di questa ricerca sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica: D'Alessandro R. et al., Variations in Circulating Levels of Angiopietin-2 Over Time Are Predictive of Ramucirumab-Paclitaxel Therapy Outcome in Advanced Gastric Cancer: Results of Prospective Study. *Front Oncol.* 2022 Apr 6;12:862116. doi: 10.3389/fonc.2022.862116. PMID: 35463372; PMCID: PMC9019360.

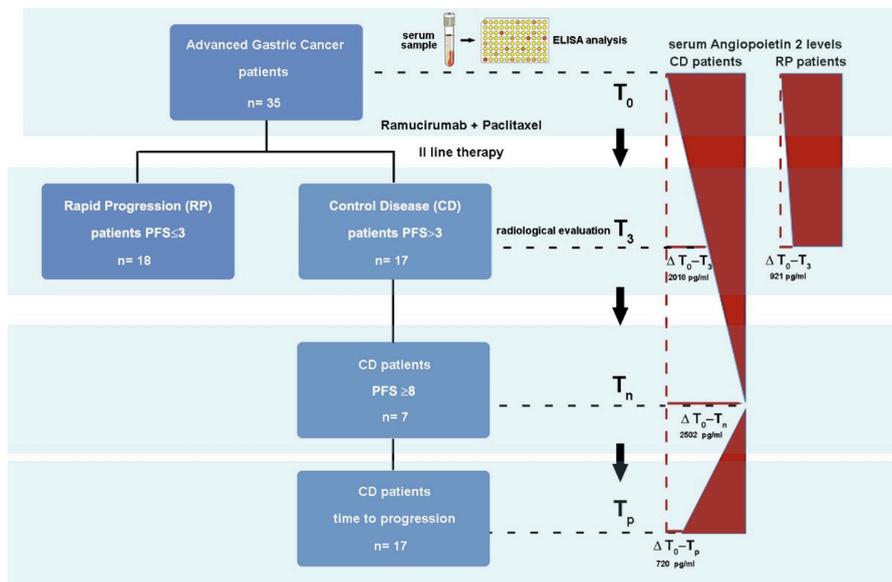


Fig. 1 Variazioni dei livelli sierici di Ang2 in 17 pazienti con controllo di malattia (CD) e 18 pazienti con malattia in rapida progressione (RP) misurati all’inizio della terapia (T₀) e dopo tre mesi (T₃), in corrispondenza del primo controllo radiografico. Nei pazienti CD si osserva una riduzione crescente dei livelli sierici di Ang2 e un successivo aumento al momento della progressione (T_p).

miRNA circolanti:

In collaborazione con la Dr Grazia Serino stiamo effettuando un’analisi di un ampio pannello di miRNA circolanti nel plasma degli stessi pazienti appartenenti ai due gruppi CD e RP. Verranno effettuate le analisi sui miRNA estratti al T₀ e dopo tre mesi dall’inizio della terapia (T₃) e nel gruppo dei pazienti CD ad intervalli di tempo successivi sino al tempo della progressione (T_p). La nostra analisi è incentrata su diversi aspetti:

- definire un pannello di miRNA correlati all’outcome della terapia;
- correlare l’espressione di specifici miRNA circolanti al pattern degli stessi nel tessuto tumorale;
- correlare l’espressione di specifici miRNA al tipo molecolare e alle caratteristiche fisio-patologiche del tumore;
- correlare l’espressione di specifici miRNA al pattern angiogenico ed immunitario.

Analisi e caratterizzazione degli esosomi circolanti:

In collaborazione con la Dr. Maria Principia Scavo, stiamo effettuando un'analisi delle vescicole esosomiali circolanti estratte dal siero degli stessi pazienti appartenenti ai due gruppi CD e RP. Verranno effettuate le analisi sugli esosomi estratti al T0 e dopo tre mesi dall'inizio della terapia (T3) e nel gruppo dei pazienti CD ad intervalli di tempo successivi sino al tempo della progressione (TP). La nostra analisi è incentrata su diversi aspetti:

- Caratterizzare il contenuto di molecole di RNA, miRNA e proteine differenzialmente espresse nei due gruppi di pazienti;
- Correlare il contenuto degli esosomi alla risposta alla terapia sistemica in atto;
- Correlare il contenuto degli esosomi al tipo molecolare e alle caratteristiche fisio-patologiche del tumore;
- Correlare il contenuto degli esosomi al pattern angiogenico ed immunitario.
- Gli esosomi estratti dai due gruppi di pazienti CD e RP saranno utilizzati in esperimenti in vitro con modelli cellulari al fine di studiare le vie del segnale implicate nella crescita delle cellule tumorali ed indagare possibili meccanismi di resistenza alla terapia in atto.

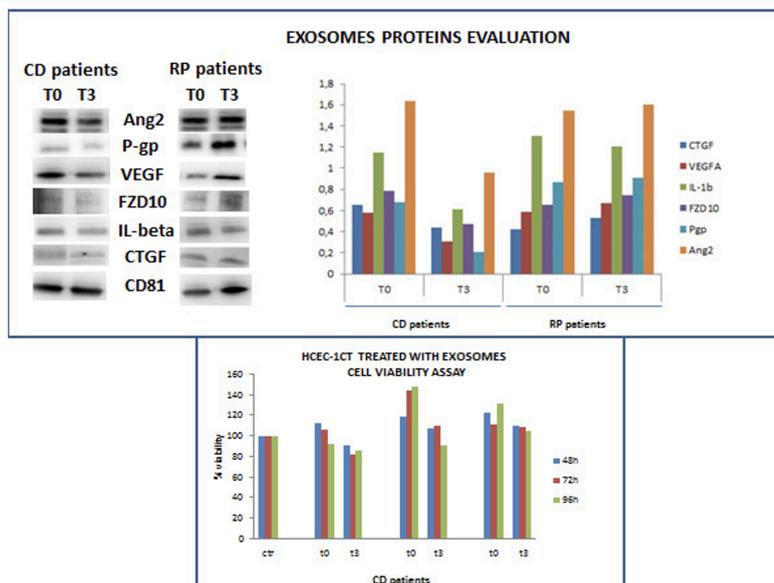


Fig. 2 Variazioni del contenuto di alcune proteine coinvolte in angiogenesi in esosomi estratti da pazienti dei due gruppi CD e RP il cui livello è stato valutato al T3 e al T0. I livelli di Ang2 e VEGFA diminuiscono al T3 rispetto al T0 nei pazienti del gruppo CD. Nel pannello sottostante, cellule epiteliali immortalizzate derivanti da individuo sano, HCEC-1CT, sono state trattate con esosomi estratti da pazienti del gruppo CD ai tempi T0 e T3. L'azione citotossica degli esosomi derivati dal tempo T3 è risultata maggiore rispetto a quella degli esosomi derivanti da T0. Questo risultato sarebbe in linea con l'efficacia della terapia Ramu-PTX in questo gruppo di pazienti.



Analisi e caratterizzazione dei PBMC circolanti:

In collaborazione con la Dr. Marina Liso, ci proponiamo di analizzare il fenotipo immunitario dei Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) già estratti dal sangue venoso di un gruppo selezionato di 20 pazienti appartenenti ai due gruppi CD e RP mediante analisi in citofluorimetria a flusso. I PBMC di questi pazienti sono stati estratti e risospesi in siero e 10% DMSO che ne preservano la vitalità e così sono congelati in azoto liquido. Le analisi descritte di seguito saranno estese ai nuovi pazienti che saranno arruolati e dalle cui aliquote di sangue verranno estratti i PBMC secondo le modalità descritte. Verranno effettuate le analisi sui PBMC estratti al T0 e dopo tre mesi dall'inizio della terapia (T3) e nel gruppo dei pazienti CD ad intervalli di tempo successivi sino al tempo della progressione (TP).

In particolare, verranno utilizzati kit CE-IVD che consentano l'identificazione e la conta assoluta delle percentuali di linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, del rapporto CD4/CD8, dei Linfociti B CD19+ e delle cellule Natural Killer CD3-CD56+.

Per l'identificazione delle cellule Treg, invece, si procederà alla marcatura dei PBMCs con anticorpi di superficie CD4-CD25 e successivo intracellular staining con anticorpo specifico anti-Foxp3.

Al termine dello staining con gli anticorpi specifici, si procederà con l'acquisizione al citofluorimetro e l'analisi dei dati con il software Kaluza (Versione 1.5A, Beckman Coulter).

Le percentuali delle popolazioni linfocitarie e le conte assolute, saranno quindi correlate con i dati clinici e di laboratorio, al fine di determinare il potenziale valore predittivo di ciascun parametro.

Analisi di espressione di VEGFA nel tessuto tumorale di pazienti appartenenti ai due gruppi CD e RP e correlazione con lo stato cromosomico del gene VEGFA e con la risposta alla terapia combinata Ramucirumab e PTX: Analisi prospettica e retrospettiva

Al fine di correlare la migliore risposta alla terapia antiangiogenica ad una maggiore espressione basale del VEGFA nel tessuto tumorale e all'amplificazione dello stesso gene nelle cellule tumorali, sono stati eseguiti esperimenti di immunoistochimica e di FISH su campioni biotici o tessuto operatorio (ove disponibile) di pazienti con Carcinoma Gastrico metastatico sottoposti a terapia di seconda linea con Ramucirumab e Paclitaxel. Le analisi sono state condotte su 19 pazienti del gruppo CD e su 10 pazienti del gruppo RP. I risultati riassunti nella tabella sottostante evidenziano che sebbene all'amplificazione genica non sempre corrisponda una maggiore



espressione di VEGFA nel tessuto e quindi una migliore risposta alla terapia, nei casi cui all'amplificazione si associ una over-espressione nel tessuto, si osserva una migliore risposta alla terapia.

Tab. 1 Association between PFS (≤ 3 / >3) FISH, and VEGFA (n=29)

Parameters *	PFS (months)		p ^
	≤ 3 (n=10)	>3 (n=19)	
FISH VEGFA			0.44
Not Amplified	4 (40.00)	12 (66.67)	
Amplified	2 (20.00)	2 (11.11)	
Polysomic	4 (40.00)	4 (22.22)	
FISH VEGFA			
Unisomic	4 (40.00)	12 (63.16)	
Polysomic	6 (60.00)	7 (36.84)	
VEGFA (IHC)	17.00±27.51	62.63±72.25	0.12[§]
VEGFA score			0.07
0	7 (70.00)	9 (47.37)	
40-60	3 (30.00)	3 (15.79)	
90-180	0 (0.00)	7 (36.84)	
			0.10
VEGFA (0) & Polysomic	5 (83.33)	2 (28.57)	
VEGFA (40-180) & Polysomic	1 (16.67)	5 (71.43)	

Abbreviations: FISH, Fluorescence in situ hybridization; VEGFA, Vascular Endothelial Growth Factor.

^ Fisher's exact test; §Wilcoxon rank-sum test (Mann-Whitney).

Alla luce di questi risultati riteniamo interessante estendere la nostra analisi ad un numero maggiore di pazienti (n=60) equamente distribuiti tra i due gruppi CD e RP. Pertanto, questa parte retrospettiva dello studio potrebbe facilmente essere completata grazie alla collaborazione di altri centri di Oncologia.

Hanno dato disponibilità a partecipare allo studio il gruppo coordinato dal Prof. Ferdinando De Vita dell'Unità di Oncologia del Secondo Policlinico di Napoli ed il gruppo coordinato dal Dr Evaristo Maiello dell'Unità di Oncologia della Casa Sollievo della Sofferenza di S. Giovanni Rotondo.

Meccanismi molecolari alla base della terapia combinata Ramucirumab e Paclitaxel:
Studio in modelli cellulari



La resistenza al Paclitaxel coinvolge diversi processi, molti dei quali non sono ancora stati completamente compresi. Gli esperimenti condotti in modelli cellulari di GC umano hanno esplorato alcuni dei tratti distintivi della resistenza PTX-mediata attraverso l'analisi comparativa di due linee cellulari in cui è stata indotta la resistenza al taxano e le rispettive controparti sensibili. Nelle linee resistenti abbiamo riscontrato le seguenti caratteristiche:

- Overespressione di fattori come VEGFA, VEGFC e Ang2, che non solo sono pro-angiogenici, ma supportano anche la crescita delle cellule tumorali;
- L'induzione di TUB β III, un'isoforma della tubulina che opera la stabilizzazione dei microtubuli, in entrambe le linee resistenti;
- Overespressione di P-gp, uno dei trasportatori MDR responsabili dell'efflusso della chemioterapia dalle cellule; (In collaborazione con il gruppo delle Prof.sse Alessandra Contino e Maria Grazia Perrone del dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Bari).

Questi elementi spiegano quindi la maggiore sensibilità al Ramucirumab e all'Elacridar riscontrata nelle cellule resistenti al PTX rispetto a quelle sensibili ai farmaci. Il primo ha ridotto significativamente l'espressione non solo delle molecole angiogeniche ma anche di TUBIII, il secondo ha ripristinato l'effetto della chemioterapia bloccandone il suo efflusso, facendole recuperare la sua citotossicità grazie agli effetti anti-mitotici e pro-apoptotici.

Infine, i risultati di questo studio hanno evidenziato il ruolo svolto dagli esosomi nel trasporto e nella diffusione nel microambiente tumorale di alcuni fattori over-espressi nelle cellule resistenti, come VEGFA, VEGFC, Ang2 e P-gp. Nel complesso, questi risultati hanno rivelato l'efficacia del triplo trattamento combinato con PTX, Elacridar e Ramucirumab nell'aggirare la resistenza indotta dal PTX (In collaborazione con la Dr. Maria Pia Scavo).

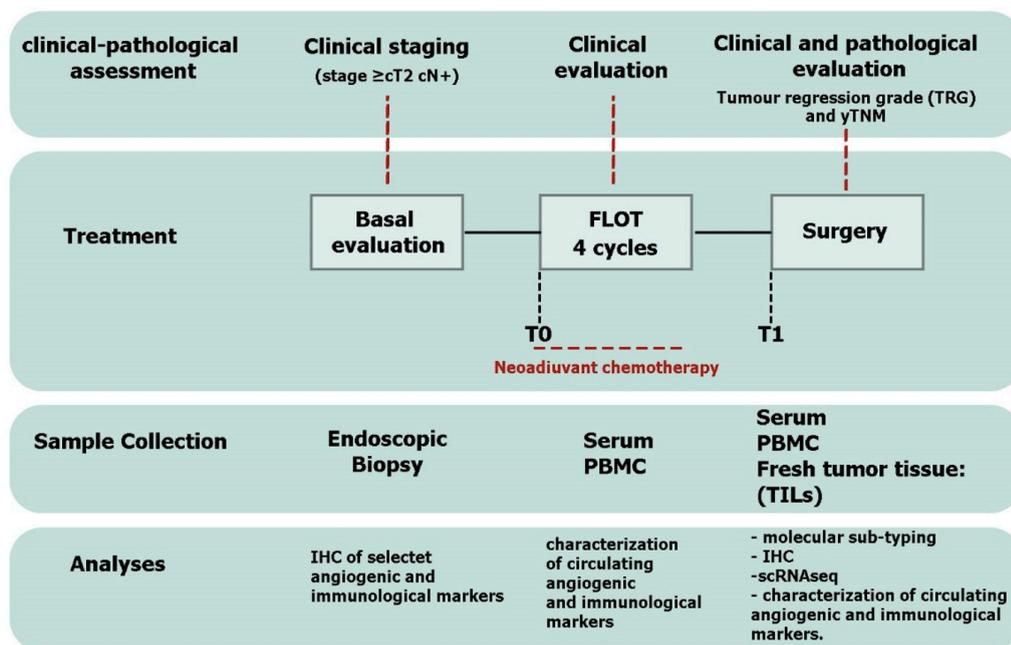
I risultati oggetto di questo studio in vitro sono stati inclusi in due pubblicazioni scientifiche:

- 1- Refolo MG et al. Molecular mechanisms of synergistic action of Ramucirumab and Paclitaxel in Gastric Cancers cell lines. *Sci Rep.* 2020 Apr 28;10(1):7162. doi: 10.1038/s41598-020-64195-x. PMID: 32346056; PMCID: PMC7188894.
- 2- "The multiple combination of Paclitaxel, Ramucirumab and Elacridar reverses the Paclitaxel-mediated resistance in Gastric Cancer cell lines". Annalisa Schirizzi et al. *IJMS* (ri-sottomissione del manoscritto revisionato)



Il secondo studio è nel corso della seconda annualità dall’approvazione del Comitato Etico. Il titolo dello studio è “Analisi di biomarcatori predittivi di risposta in pazienti con GC resecabile sottoposti a terapia neoadiuvante secondo lo schema FLOT”

Nell’ambito di questo studio multicentrico già approvato dal Comitato Etico a luglio del 2021 abbiamo arruolato 13 pazienti con GC resecabile e sottoposti a terapia neoadiuvante secondo lo schema FLOT. Sono stati raccolti ed opportunamente stoccati campioni di siero, plasma, PBMC estratti dal sangue periferico e linfociti infiltranti il tumore (TILs) estratti dal tessuto tumorale e dal tessuto circostante. Il disegno dello studio è di seguito riportato:



METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

1. Pazienti

Nella parte retrospettiva saranno arruolati pazienti con diagnosi di tumore gastrico che hanno ricevuto terapia medica presso la nostra U.O. Oncologia o presso le Unità esterne che partecipano al progetto (prescritta conformemente al normale percorso assistenziale ed indipendentemente dalla partecipazione allo studio). Saranno raccolti dati clinici, laboratoristici ed istopatologici, al fine di valutare le correlazioni tra le alterazioni molecolari, i patterns immunitario e angiogenico e la risposta ai trattamenti, progressione di malattia, sopravvivenza globale. Inoltre, potranno essere inclusi pazienti in follow up clinico strumentale laboratoristico sottoposti a regolari controlli



nell'ambito della normale pratica clinica. Ai pazienti verrà fornita una scheda informativa circa gli obiettivi dello studio e successivamente sarà acquisito il consenso informato.

Studio multicentrico IMAN: pazienti con GC resecabile sottoposti a terapia neoadiuvante FLOT

Approvato dal CE in data 19/04/2021.

Centri partecipanti: IRCCS "S. de Bellis" Castellana Grotte, Policlinico di Bari

Studio monocentrico DRAGO: pazienti HER-2 negativi sottoposti a terapia a base di Sali di platino. In questi pazienti verrà riscontrata la presenza di infezione da H. pylori. Si tratta di un nuovo studio condotto dalla Dr Dalia Ricci, Dirigente Medico della nostra U.O. di Oncologia e prevede una parte retrospettiva ed una prospettica nella quale saranno arruolati pazienti con nuova diagnosi di tumore gastrico HER-2 negativo candidati a terapia medica o che hanno ricevuto terapia medica presso l'U.O. Oncologia. I pazienti verranno inseriti in un programma di valutazioni cliniche, laboratoristiche e strumentali come previsto da normale pratica clinica in corso di trattamento medico per malattia avanzata inoperabile/metastatica o in corso di follow up clinico per pregressa neoplasia gastrica.

I dati registrati in entrambe le fasi dello studio derivano da esami e valutazioni di norma eseguiti nella pratica clinica per una corretta gestione del paziente oncologico. Lo studio verrà proposto per l'approvazione del CE.

Studio Ramu-PTX

Lo studio ha già concluso una prima fase in cui come studio monocentrico sono stati arruolati 40 pazienti con GC metastatico sottoposti a terapia di seconda linea con Ramucirumab e Paclitaxel. Sulla base dei risultati ottenuti la presente proposta progettuale si propone di ripresentare lo studio al CE come studio multicentrico per allargare la casistica soprattutto nella sua parte retrospettiva di raccolta di materiale per lo più bioptico (trattandosi di malattia metastatica)

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 misura del 4% (con un limite di confidenza del 95%).

2. Campionamento: Raccolta e Stoccaggio dei campioni ematici, bioptici 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 dell'inizio dei cicli di terapia e a tempi successivi secondo il modello sperimentale di ogni singolo 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 bioptici

I reperti bioptici fissati in formalina ed inclusi in paraffina per le analisi di immunoistochimica verranno forniti dall'Anatomia Patologica dell'IRCCS "S. De Bellis", o dai centri che parteciperanno allo studio 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 o presso il nostro laboratorio di Immunologia. 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 5×10^6 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.

Next Generation Sequencing (NGS)

Verranno eseguite in pazienti che esprimeranno consenso informato e di cui sia disponibile materiale patologico precedentemente archiviato e residuo da intervento chirurgico su primitivo/metastasi o biopsie eseguite a scopo diagnostico. Il DNA verrà estratto a partire da blocchetti istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e quantificato mediante fluorimetro. Le indagini molecolari prevederanno sequenziamento genico massivo tramite Next Generation Sequencing.

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, DNAM);
- 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).

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, DIDO1, 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 refertata 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 livelli sierici 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 indagati pannelli stabiliti di fattori coinvolti in angiogenesi tumorale

12. Analisi dei livelli di espressione dei miRNA circolanti

I campioni di plasma saranno utilizzati per l'estrazione dei miRNA circolanti che sarà effettuata mediante il kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen). La valutazione dell'espressione miRNA circolanti verrà effettuata mediante piastre di Real-time PCR "Human Serum/Plasma PCR plates" (Qiagen). Questa analisi ci permetterà di identificare i miRNA differenzialmente espressi tra i gruppi analizzati. Si procederà, quindi, con l'individuazione dei target computazionali (geni e pathways) dei miRNA mediante diversi programmi bioinformatici. I livelli di espressione dei miRNA identificati saranno, in seguito, correlati con i parametri clinici dei pazienti analizzati.

13. Isolamento degli esosomi:

Il plasma dei pazienti verrà processato per l'estrazione degli esosomi, che dopo essere stato prelevato verrà tenuto a temperatura ambiente per 30'. Successivamente verrà centrifugato a temperatura controllata di 4° con vari cicli di centrifugate con aumento del numero di giri ad ogni passaggio, da un minimo di 1550 ad un massimo di 3800, per 15 minuti ogni volta. Dopo l'utilizzo della centrifuga ordinaria, si passerà all'utilizzo dell'ultracentrifuga con un ciclo da 75000g per 1 h sempre a 4° e da 100000g per 1h e 30'. Il sovrantante verrà eliminato mentre il pellet verrà risospeso in 200 microlitri di acqua ultrapura, per le analisi di caratterizzazione con DLS, TEM e SEM mentre il resto del campione sarà stoccato per le analisi biochimiche e bio-molecolari.

Analisi Statistica

I risultati verranno descritti tramite media e deviazione standard ($M \pm SD$) o mediana e range, per le variabili quantitative e mediante frequenze e percentuali (%) per le categoriche.

Per confrontare le differenze tra il gruppo di pazienti in cui si riscontra un controllo di malattia inseguito ad un dato trattamento e pazienti in cui si riscontra progressione



rapida, verrà adoperato il test del Chi-Quadrato o il test di Fisher quando necessario per le variabili categoriche e verrà valutata la scelta di un test parametrico o non parametrico, a seconda della distribuzione, per le continue.

Verranno adoperati test specifici di confronto tra i due gruppi indipendenti per valutare la differenza di espressione genica tra i geni valutati. Inoltre grafici come gli heatmaps verranno costruiti per una rappresentazione grafica dei dati genetici a due dimensioni. L'analisi per cluster verrà adoperata per valutare la relazione e la co-regolazione della funzionalità genica.

Per valutare l'associazione, nonché il valore predittivo tra i biomarcatori analizzati e la progressione tumorale (Progressione Si vs Progressione No) verrà adoperato un modello di regressione logistica, la cui stima di rischio verrà espressa come Odds Ratio (OR), ed eventuali covariate verranno aggiunte per aggiustare i modelli.

Per tutte le analisi verrà valutato un intervallo di confidenza al 95% e per testare l'ipotesi nulla, si prediligerà l'analisi a due code con un livello di errore a 0.05.

Le analisi verranno effettuate con il Software STATA 17.0 (StataCorp. 2021. Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCorp LLC.) e il software RStudio ("Prairie Trillium" Release).

INNOVAZIONI

Lo studio dei marcatori predittivi di risposta ai trattamenti sistemici si configura come uno degli strumenti più importanti per il miglioramento degli outcomes di sopravvivenza, nella misura in cui ci permettono di:

- selezionare a priori i pazienti che più potrebbero beneficiare di quel trattamento specifico;
- anticipare l'eventuale resistenza al trattamento stesso, prima della conferma di progressione mediante gli esami strumentali o il deterioramento delle condizioni cliniche del paziente. L'individuazione di biomarcatori tramite tecniche facilmente riproducibili potrebbe permettere di superare i ritardi nella diagnosi di progressione di malattia, attualmente diagnosticata solo sulla base dell'imaging o del dosaggio di marcatori sierici, integrando la ricerca traslazionale con la pratica clinica.



Infine, lo studio del pattern immunitario e della correlazione tra *H. pylori* e meccanismi di riparo del DNA getterà nuova luce sui meccanismi alla base della cancerogenesi nell'adenocarcinoma gastrico.

BIBLIOGRAFIA

1. AIOM –AIRTUM – Fondazione – AIOM – PASSI. I numeri del cancro in Italia, 2019. Intermedia Editore. Settembre 2019
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* (2021) 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* (2017) 8(8):CD004064. doi: 10.1002/14651858
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 gastro-esophageal 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 gastro-esophageal 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. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI et al. Gastric cancer. *Lancet* 2020, 635–648
9. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513:202-209.



10. Goldstein M, Kastan MB. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med.* 2015;66:129–43.
11. Ricci AD, Rizzo A, Brandi G. DNA damage response alterations in gastric cancer: knocking down a new wall. *Future Oncol* [Internet]. 2021 Jan 29; Available from: <http://dx.doi.org/10.2217/fon-2020-0989>.
12. Ronchetti L, Melucci E, De Nicola F, Goeman F, Casini B, Sperati F, et al. DNA damage repair and survival outcomes in advanced gastric cancer patients treated with first-line chemotherapy. *Int J Cancer.* 2017 Jun 1;140(11):2587–95.
13. Sokolova O, Naumann M. Crosstalk Between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Gastric Carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2019;421:107–37.
14. Imai S, Ooki T, Murata-Kamiya N, Komura D, Tahmina K, Wu W, et al. Helicobacter pylori CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis. *Cell Host Microbe.* 2021 Jun 9;29(6):941-958.e10.
15. Solimando AG, Summa S, Vacca A, Ribatti D. Cancer-Associated Angiogenesis: The Endothelial Cell as a Checkpoint for Immunological Patrolling. *Cancers (Basel).* (2020) Nov 15;12(11):3380. doi: 10.3390/cancers12113380. PMID: 33203154; PMCID: PMC7696032
16. Refolo MG, Lotesoriere C, Messa C, Caruso MG, D'Alessandro R. Integrated immune gene expression signature and molecular classification in gastric cancer: New insights. *J Leukoc Biol.* (2020) Aug;108(2):633-646. doi: 10.1002/JLB.4MR0120-221R. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32170872
17. C.H.Yeh, R. Moles and C. Nicot. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular Cancer* 2016;15:37
18. C. Zhang , G. Peng . Non-coding RNAs: an emerging player in DNA damage response. *Mutat Res RevMutat Res.* 2015 Jan-Mar;763:202-11.
19. Wang J-L, Hu Y, Kong X, Wang Z-H, Chen H-Y, Xu J, et al. (2013) Candidate microRNA Biomarkers in Human Gastric Cancer: A Systematic Review and Validation Study. *PLoS ONE* 8(9): e73683.
20. Qu, Z.; Jiang, C.; Wu, J.; Ding, Y., Exosomes as potent regulators of HCC malignancy and potential bio-tools in clinical application. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015, 8 (10), 17088-95.



21. Mirzaei, H.; Sahebkar, A.; Jaafari, M. R.; Goodarzi, M.; Mirzaei, H. R., Diagnostic and Therapeutic Potential of Exosomes in Cancer: The Beginning of a New Tale? *Journal of cellular physiology* 2017, 232 (12), 3251-3260.

22. Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhang X. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Mol Cancer*. 2019 Mar 15;18(1):41. doi: 10.1186/s12943-019-1001-7. PMID: 30876419; PMCID: PMC6419325.

TIMELINE

PRIMO ANNO

Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Caratterizzazione molecolare	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS						Orange	Orange				Orange	Orange
Analisi fattori angiogenici						Orange	Orange				Orange	Orange
Analisi miRNA	Purple	Purple	Purple							Purple	Purple	Purple
Analisi Esosomi	Blue				Blue	Blue						
Sperimentazione <i>in vitro</i>	Light Blue											
Elaborazione dati				Dark Blue								

SECONDO ANNO

Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Caratterizzazione molecolare	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS			Orange	Orange					Orange	Orange		
Analisi fattori angiogenici			Orange	Orange					Orange	Orange		
Analisi miRNA				Purple	Purple	Purple	Purple				Purple	Purple
Analisi Esosomi	Blue				Blue	Blue	Blue				Blue	Blue
Sperimentazione <i>in vitro</i>	Light Blue											
Elaborazione dati											Dark Blue	Dark Blue

TERZO ANNO

Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red											
Caratterizzazione Molecolare	Red											
Isolamento PBMCs e siero	Green											
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue											
Analisi FACS								Orange	Orange	Orange		
Analisi fattori angiogenici								Orange	Orange	Orange		
Analisi miRNA								Purple	Purple	Purple		
Analisi Esosomi								Blue	Blue	Blue		
Sperimentazione <i>in vitro</i>	Light Blue											
Elaborazione dati									Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue



TITOLO DEL PROGETTO

13. STUDIO DEL NOTCH SIGNALING PATHWAY NELLA POLARIZZAZIONE E FUNZIONE DEI MACROFAGI ASSOCIATI AL TUMORE (TAM)

2786666

IRG: Oncology 1 - Basic Translational

SS: Cancer Molecular Pathobiology - CAMP

Responsabile: Quaranta Valeria

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: macrofagi associati al tumore (TAM); microambiente tumorale (TME); Notch signaling pathway; tumore epatico; tumore al pancreas; colangiocarcinoma

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

I macrofagi associati al tumore (TAM) rappresentano una delle maggiori classi di cellule immunitarie presenti nel microambiente (TME) di diversi tipi di tumore, incluso l'adenocarcinoma del pancreas (1), il colangiocarcinoma (2) e il tumore epatico (3). Nel TME i macrofagi sono estremamente plastici e la loro interazione con cellule tumorali e altre componenti dello stroma può influenzare la loro polarizzazione verso un fenotipo anti-tumorale o verso un fenotipo pro-tumorale. Nella visione più semplicistica i macrofagi vengono suddivisi nel tipo M1, caratterizzati da un fenotipo pro-infiammatorio e quindi anti-tumorale, e nel tipo M2 che invece hanno un ruolo nel rimodellamento della matrice extracellulare e proprietà immunosoppressive (4). I TAM pro-tumorigenici sono solitamente associati a un fenotipo di tipo M2. Nel TME, infatti, essi sono coinvolti nell'orchestrare la proliferazione delle cellule tumorali, il rimodellamento della matrice extracellulare, l'angiogenesi, la formazione delle metastasi, l'immunosoppressione ma



anche la resistenza ai chemioterapici e all'immunoterapia (5). Per questo motivo, attualmente sono in sviluppo strategie anti-tumorali che hanno come obiettivo il neutralizzare specificatamente i TAM pro-tumorigenici o permettere la loro riprogrammazione verso un fenotipo anti-tumorale e pro-infiammatorio (6).

Il signaling pathway di Notch è estremamente conservato durante l'evoluzione ed è critico per lo sviluppo di diversi organi. La sua disregolazione però è implicata in diversi aspetti del tumore, tra cui l'angiogenesi e il mantenimento delle proprietà staminali delle cellule tumorali. Il segnale di Notch regola anche diversi aspetti della risposta immunitaria al tumore, tra cui il differenziamento delle cellule T e la maturazione e funzionalità delle cellule mieloidi (7). Infatti, il coinvolgimento del signaling di Notch nella regolazione delle funzioni dei macrofagi e in particolare dei TAM ha evidenziato come questo signaling pathway possa essere manipolato per aumentare le proprietà anti-tumorali dei macrofagi (8).

I componenti principali del Notch signaling pathway canonico includono i recettori transmembrana Notch 1- 4 e i 5 ligandi di membrana: Jagged 1 e 2 e i ligandi Delta-like (DLL) 1, 3 e 4. Brevemente, il contatto recettore-ligando tra le cellule risulta in una serie di eventi proteolitici che culminano con il taglio, mediato dalla secretasi, del recettore intracellulare di Notch (NICD) che trasloca nel nucleo dove lega la proteina CBF1/RBPJk. Questo complesso poi recluta il co-attivatore trascrizionale mastermind-like (MAML) e porta alla trascrizione dei geni target di Notch, inclusa la famiglia di fattori trascrizionali Hes (9). La cascata di Notch non canonica invece può essere attivata in maniera ligando-indipendente o dall'interazione del recettore NICD con altri pathways come quello del fattore nucleare-kB (NF-kB) e del transforming growth factor (TGF-) (10).

Sebbene il ruolo del signaling pathway di Notch nel tumore possa variare a seconda della tipologia di tumore stesso e del TME che lo compone, ci sono diverse evidenze che hanno dimostrato come Notch regoli il microambiente immuno-soppressivo. E' stato dimostrato infatti che Notch, e in particolare RBPJ, è importante per il differenziamento dei TAM e per la promozione dell'immuno-soppressione attraverso la modulazione della risposta delle cellule T CD8+ in un modello murino di tumore alla mammella (11). Nel tumore al seno triplo-negativo, l'attivazione di Notch mediata da Jagged-1 porta alla secrezione di diverse citochine che reclutano i macrofagi che a loro volta inibiscono la proliferazione delle cellule T (12). E' stato anche osservato che Jagged-1 espresso da cellule tumorali è coinvolto nella stimolazione di IL1 e CCL2 da parte dei TAM promuovendo così progressione del tumore al seno (13). Ancora, l'inibizione del segnale di Notch può promuovere la citotossicità delle cellule T CD8+ e la secrezione di citochine pro-infiammatorie come IFN, TNF, IL-1 nel tumore al colon



(14). E' stato anche dimostrato che inibendo Notch mediante un inibitore della -secretasi (GSI) si riduce la massa tumorale e la popolazione dei TAM in un modello murino di tumore al collo e testa (15).

Poco si sa sul Notch signaling pathway e il suo ruolo nel determinare il fato dei TAM nel contesto del colangiocarcinoma, e del tumore al pancreas ed epatico. L'obiettivo di questo studio è di investigare se il crosstalk mediato da Notch tra i macrofagi e le cellule tumorali o altre componenti del TME promuove un fenotipo pro-tumorale nei TAM. Sulla base di questa ipotesi, l'inibizione di Notch o di un downstream pathway da esso regolato può rappresentare una strategia terapeutica contro il tumore basata sull'inibizione dei TAM pro-tumorigenici o sulla loro riprogrammazione fenotipica verso uno stato anti- tumorigenico e pro-infiammatorio.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: Caratterizzare l'espressione e attivazione dei recettori e dei ligandi di Notch nei TAM pro-tumorigenici di colangiocarcinoma, tumore al pancreas ed epatico.

Obiettivo specifico 2: Indurre l'inibizione del signaling pathway di Notch con lo scopo di ottenere una riduzione del fenotipo pro-tumorigenico dei TAM oppure una sua reversione verso uno stato anti- tumorigenico. Identificare poi nei macrofagi una specifica proteina Notch-dipendente che sia responsabile del fenotipo pro-tumorigenico.

Obiettivo specifico 3: Una volta identificata, validare in vivo l'effetto dell'inibizione della proteina X Notch-dipendente nel riprogrammare il fenotipo pro-tumorigenico dei TAM verso uno stato anti- tumorigenico e pro-infiammatorio.

Obiettivo 1

Caratterizzare l'espressione e attivazione dei recettori e dei ligandi di Notch nei TAM pro-tumorigenici di colangiocarcinoma, tumore al pancreas ed epatico.

Per la realizzazione di questo obiettivo si propone:

i) La caratterizzazione attraverso citometria a flusso dell'espressione del signaling pathway di Notch nelle cellule tumorali e in TAM di campioni freschi umani tumorali e peri-tumorali di pancreas, fegato e colangiocarcinoma.



Per l'analisi attraverso citometria a flusso, i tessuti umani tumorali e peri-tumorali verranno dissociati per ottenere una sospensione a singole cellule la quale verrà analizzata attraverso lo strumento Navios, Beckman Coulter. Un esempio di pannelli di citometria a flusso usati per discriminare le diverse popolazioni è:

Cellule mieloidi: (DAPI^{neg}EpCAM^{neg}CD45⁺CD11b⁺) Cellule epiteliali:
(DAPI^{neg}EpCAM⁺CD45^{neg})

ii) Validazione in vitro dell'espressione e attivazione dei recettori e dei ligandi di Notch nelle linee cellulari di tumore al pancreas, epatico e di colangiocarcinoma e in macrofagi differenziati in vitro e stimolati verso un fenotipo di tipo M1 o di tipo M2 oppure indotti con il terreno condizionato delle linee cellulari tumorali di interesse (tumour conditioned media = TCM).

Per ricreare in vitro il fenotipo dei macrofagi M1 e M2 verrà utilizzato un cocktail di citochine ben conosciuto in letteratura.

Occorrerà verificare sperimentalmente che i macrofagi polarizzati in vitro in M1 o M2 abbiano assunto il fenotipo corrispondente. Di particolare importanza sarà testare se i macrofagi stimolati in vitro con il TCM abbiano assunto un fenotipo pro-tumorigenico che mimi quello dei TAM in vivo. Verrà utilizzata l'immunofluorescenza (IF) o la PCR quantitativa (qPCR) per verificare l'espressione di alcune citochine o recettori di membrana specifici, in particolare:

Per i macrofagi pro-tumorigenici: Il-10, Arg1, Il18, Tgf, CD206, CD163. Per i macrofagi anti-tumorigenici: Ifng, Cxcl9/10, Il-12, MMP9, iNOS, CD38.

L'espressione dei ligandi e dei recettori del Notch signaling verrà analizzata attraverso WB e qPCR.

Per questi esperimenti proponiamo idealmente di utilizzare macrofagi derivanti da PBMC umani ottenuti da sangue di donatori sani (> 100 ml). Come alternativa, saranno utilizzati i macrofagi differenziati dalla linea cellulare di monociti THP-1.

Per validare i risultati ottenuti su modelli murini, che verranno poi utilizzati successivamente per le sperimentazioni in vivo, verranno utilizzati i macrofagi derivati dal midollo osseo (BMDM) isolati da topi WT. In questo caso verranno anche utilizzate cellule tumorali murine.



Per soddisfare questo obiettivo si richiede il supporto della Biobanca/approvazione del comitato etico per l'acquisizione di tessuti umani derivanti da cancro al pancreas, epatico e colangiocarcinoma. Si richiede inoltre il supporto delle Dott.sse Bianco e Tafaro dello stabulario IRCCS DeBellis per l'acquisizione dei tessuti da topi WT.

Obiettivo 2

Indurre l'inibizione del signaling pathway di Notch con lo scopo di ottenere una riduzione del fenotipo pro-tumorigenico dei TAM oppure una sua reversione verso uno stato anti-tumorigenico. Identificare poi nei macrofagi una specifica proteina Notch-dipendente che sia responsabile del fenotipo pro-tumorigenico.

Per questo obiettivo sperimentalmente si procederà alla:

i) Validazione del cambiamento fenotipico e funzionale dei macrofagi indotto dall'inibizione

in vitro del segnale di Notch.

Crenigacestat (LY3039478) è un inibitore della secretasi che agisce bloccando il taglio proteolitico del dominio intracellulare di Notch-1 (N1ICD) e quindi la trascrizione dei geni da esso regolati. Ricercatori in questo Istituto hanno dimostrato che l'inibizione di Notch-1 utilizzando Crenigacestat riduce la massa tumorale di colangiocarcinoma avendo un impatto sull'angiogenesi e sulla fibrosi. Crenigacestat verrà preferenzialmente utilizzato in questo studio per inibire il signaling mediato da Notch-1. Come alternativa, se saranno identificati altri paraloghi di Notch nel determinare il fenotipo pro-tumorigenico dei macrofagi, verranno utilizzati inibitori o anticorpi bloccanti specifici disponibili commercialmente.

Il fenotipo dei macrofagi sarà caratterizzato testando l'espressione di citochine e recettori di membrana pro- e anti-tumorali attraverso le tecniche di qPCR e/o IF. Basandosi sul tipo di fenotipo indotto dall'inibizione di Notch, verrà anche testata la funzione dei macrofagi utilizzando saggi cellulari appropriati come quello di migrazione/invasione, proliferazione delle cellule tumorali, uccisione di cellule tumorali e saggi di immunosoppressione.

Particolare attenzione verrà data alla validazione degli effetti dell'inibizione di Notch sulle proprietà immunosoppressive dei TAM pro-tumorigenici nei confronti delle cellule T CD8+. Questo permetterà di valutare la possibilità di effettuare un trattamento combinatorio dell'inibizione di Notch con il blocco degli immuno-checkpoint.



ii) Analisi trascrizionale dei macrofagi in vitro trattati e non trattati con l'inibitore di Notch attraverso il Next Generation Sequencing (NGS).

Questo tipo di analisi permetterà di identificare nei macrofagi una specifica proteina Notch dipendente che sia responsabile della promozione del fenotipo pro-tumorigenico.

Per questi esperimenti, in particolare per effettuare saggi di immunosoppressione, cellule primarie di macrofagi e cellule T derivanti dallo stesso donatore sono richieste. Pertanto occorrerà isolare PBMC da sangue di donatori sani. In alternativa verranno utilizzate cellule primarie murine isolate da topi WT.

Obiettivo 3

Una volta identificata, validare in vivo l'effetto dell'inibizione della proteina X Notch-dipendente nel riprogrammare il fenotipo pro-tumorigenico dei TAM verso uno stato anti-tumorigenico e pro- infiammatorio.

In particolare, si propone di:

i) Studiare l'espressione e il ruolo della proteina X che caratterizza i TAM pro-tumoralmente in vivo. Validare poi, in modelli murini adatti, l'effetto della sua inibizione sulla crescita del tumore e sul TME circostante.

Come modello murino che meglio mima il TME tumorale verrà scelto un modello ortotopico disponibile presso l'azienda Biogem. Si procederà alla generazione di un modello murino ortotopico solo per il tipo di tumore che verrà considerato di interesse. Come esempio, per il:

- Cancro al pancreas: verrà effettuata un' iniezione ortotopica di cellule Panc02 o KPC in topi WT C57BL/6. Le cellule iniettate dovranno esprimere la luciferasi in maniera da poter monitorare la crescita tumorale attraverso in vivo imaging. Per questo occorrerà trasfettare le cellule tumorali con plasmidi contenenti il costrutto Luc-z/s green (addgene).

- Cancro al fegato: verrà effettuata un' iniezione nel lobo sinistro del fegato di cellule Hepa1-6 in topi WT C57BL/6. Le cellule iniettate dovranno esprimere la luciferasi in maniera da poter monitorare la crescita tumorale attraverso in vivo imaging.



ii) Validare l'espressione della proteina X Notch-dipendente in campioni umani freschi e FFPE di campioni umani tumorali e peri-tumorali.

Per la richiesta di materiale FFPE umano e l'immunoistochimica verrà richiesto il supporto del dipartimento di Anatomia Patologica e del Dott. Armentano.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Per la caratterizzazione dell'espressione dei recettori e dei ligandi del Notch signaling, ma anche delle proteine da esso regolate in TAM di campioni tumorali e peri-tumorali di tumore al pancreas, epatico e colangiocarcinoma, si propone di utilizzare la citometria a flusso per i campioni freschi o immunofluorescenza/immunoistochimica per campioni FFPE. Si conta di analizzare un numero minimo,

uguale o maggiore a 5 campioni per gruppo. Come analisi statistica per determinare la significatività delle differenze osservate potrà essere utilizzato l'unpaired t-test e/o il Bonferroni multiple comparison.

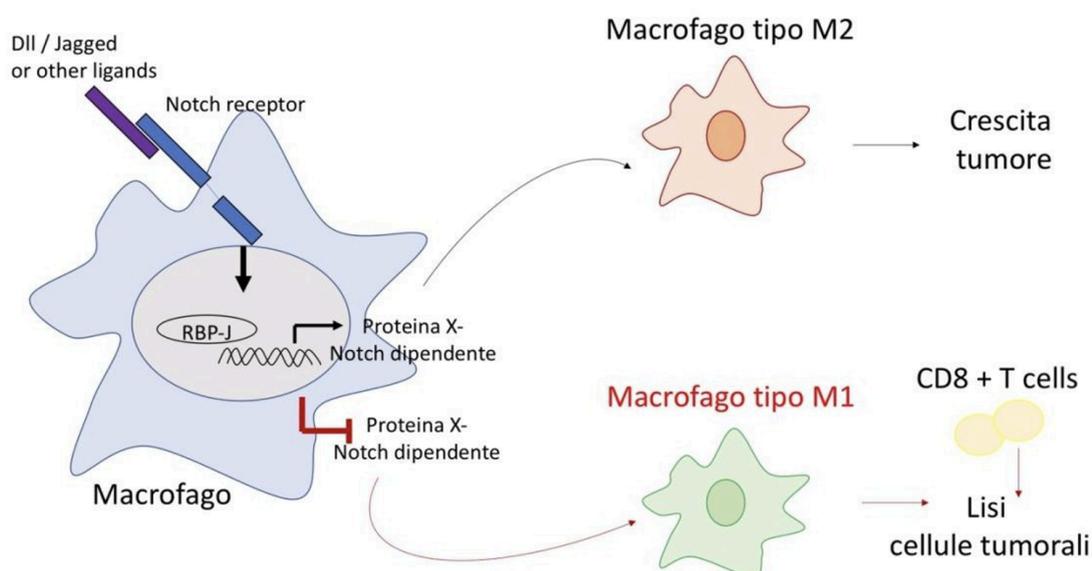
Per gli esperimenti in vitro i macrofagi verranno ottenuti da linee cellulari monocitiche THP-1 o da cellule primarie isolate da campioni di sangue umani o di midollo osseo di topi WT. I macrofagi differenziati verranno poi polarizzati con un cocktail di citochine o utilizzando il TCM di linee cellulari dei tumori di interesse al fine di ricreare i diversi fenotipi che i macrofagi possono assumere nel contesto del microambiente tumorale. Gli esperimenti in vitro che sono proposti in questo studio comprendono analisi di immunofluorescenza, qPCR, WB e diversi saggi cellulari come migrazione/invasione, proliferazione delle cellule tumorali, uccisione di cellule tumorali e saggi di immunosoppressione. In questi esperimenti come analisi statistica per determinare la significatività delle differenze osservate si propone di utilizzare un minimo di triplicati tecnici per esperimento e di calcolare la media \pm deviazione standard (SD) di 3 esperimenti indipendenti.

Gli esperimenti in vivo con modelli tumorali murini verranno gestiti dall'azienda Biogem e si considera l'utilizzo di un numero minimo, uguale o maggiore di 5 topi per gruppo, per esperimento. Come analisi statistica per determinare la significatività delle differenze osservate potrà essere utilizzato l'unpaired t-test e/o il Bonferroni multiple comparison.

RISULTATI ATTESI

- Con l'obiettivo 1 si propone di validare l'espressione e attivazione del pathway di Notch nei TAM pro-tumorigenici in vitro e su campioni ottenuti da pazienti tumorali. L'analisi proposta permetterà anche l'identificazione di specifici tipi tumorali in cui il Notch signaling pathway abbia un ruolo nella regolazione del fenotipo pro-tumorigenico dei TAM.
- Con le sperimentazioni proposte nell'obiettivo 2 si vuole validare che l'inibizione del pathway di Notch in vitro blocchi o riprogrammi il fenotipo pro-tumorigenico dei macrofagi. Inoltre l'analisi trascrizionale sui macrofagi trattati e non con l'inibitore di Notch permetterà di identificare specifiche proteine responsabili delle proprietà pro-tumorigeniche dei macrofagi.
- Lo scopo degli esperimenti proposti nell'obiettivo 3 è di validare e studiare l'effetto inibitorio di una specifica proteina X Notch-dipendente espressa specificatamente nei TAM e responsabile del loro fenotipo pro-tumorigenico usando modelli murini in vivo e confermandone l'espressione in campioni tumorali umani.

L'inibizione della specifica proteina X Notch-dipendente potrebbe essere identificata come potenziale strategia per ridurre o riprogrammare il fenotipo dei TAM e quindi essere utilizzata come trattamento anti-tumorale.



INNOVAZIONI



Il ruolo del signaling pathway di Notch è stato molto studiato nei tumori, tuttavia meno conosciuta è la sua funzione nel contesto del microambiente tumorale. In particolare, diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato come il ruolo di questo signaling pathway nel regolare la funzione dei TAM dipenda strettamente dalle caratteristiche proprie delle diverse tipologie tumorali e dal microambiente che li compone. Questo studio propone di investigare il ruolo di Notch nei tumori gastrici come quello al fegato, pancreas e colangiocarcinoma con lo scopo di individuare specifici fattori Notch-dipendenti nei TAM che possano essere inibiti bloccando quindi la loro funzione pro-tumorale o riprogrammandola verso un tipo pro-infiammatorio. In questo modo si potrà favorire la generazione in un microambiente immunocompetente che porti all'uccisione delle cellule tumorali e quindi a una riduzione della massa tumorale stessa.

BIBLIOGRAFIA

1. Peng J, Sun B-F, Chen C-Y, Zhou J-Y, Chen Y-S, Chen H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res.* 2019;29:725–38.
2. Xu L, Yan M, Long J, Liu M, Yang H, Li W. Identification of macrophage correlated biomarkers to predict the prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Front Oncol.* 2022;12.
3. Sas Z, Cendrowicz E, Weinhäuser I, Rygiel TP. Tumor Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma: Challenges and Opportunities for New Treatment Options. *Int J Mol Sci.* 2022;23:3778.
4. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2013 [cited 2018 Sep 14];35:585–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657835>
5. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006;124:263–6.
6. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:887–904.
7. Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;34:536–48.



8. Palaga T, Wongchana W, Kueanjinda P. Notch Signaling in Macrophages in the Context of Cancer Immunity. *Front Immunol.* 2018;9.
9. Kopan R, Ilagan MaXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.* 2009;137:216–33.
10. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022.
11. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim M V., Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (1979). 2014;344:921–5.
12. Meng J, Jiang Y, Zhao S, Tao Y, Zhang T, Wang X, et al. Tumor-derived Jagged1 promotes cancer progression through immune evasion. *Cell Rep.* 2022;38:110492.
13. Shen Q, Cohen B, Zheng W, Rahbar R, Martin B, Murakami K, et al. Notch Shapes the Innate Immunophenotype in Breast Cancer. *Cancer Discov.* 2017;7:1320–35.
14. Wang F, Huang C, Long J, Zhao Z Bin, Ma HQ, Yao XQ, et al. Notch signaling mutations increase intra-tumor chemokine expression and predict response to immunotherapy in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2022;
15. Mao L, Zhao Z, Yu G, Wu L, Deng W, Li Y, et al. γ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2018;142:999–1009.

TIMELINE

Attività proposte	2024				2025				2026			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Caratterizzazione dell'espressione del Notch pathway nei TAM di campioni tumorali umani	■	■	■	■								
Caratterizzazione in vitro dell'espressione e attivazione del Notch pathway nei TAM	■	■	■									
Inibizione in vitro del Notch pathway e studio del suo effetto sulla polarizzazione dei TAM			■	■								
Analisi trascrizionale sui TAM trattati e non con l'inibitore di Notch					■	■	■	■				
Generazione di un modello murino ortotopico per il tumore di interesse					■	■	■	■				
Studio su modello murino degli effetti dell'inibizione della proteina X Notch dipendente nei TAM							■	■	■	■		
Validazione dell'espressione della proteina X Notch dipendente nei TAM di campioni tumorali umani									■	■	■	■



TITOLO DEL PROGETTO

**16. AZIONE PROTETTIVA DI UN MIX COMPLESSO DI PROBIOTICI SUL DANNO
INTESTINALE INDOTTO DA MICROPLASTICHE E NANOPLASTICHE**

2786674

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: Orlando Antonella

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: microplastiche, nanoplastiche, probiotici, barriera intestinale, colture cellulari, mitocondri, infiammazione, microbiota intestinale

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

INTRODUZIONE

L'uso delle plastiche, soprattutto in ambito industriale automobilistico, elettronico, meccanico, tessile, biomedicale, nonché del packaging, dei materiali per l'edilizia e delle energie rinnovabili, è in continuo aumento ed è legato alle loro proprietà specifiche, quali la stabilità chimica, il peso leggero, la resistenza all'usura e alla corrosione [1]. La loro decomposizione determina la produzione di particelle che, qualora abbiano una dimensione inferiore ai 5 mm sono definite microplastiche (MPs), mentre quelle inferiori a 0.1 μ m, nanoplastiche (NPs).

Polistirene (PS) e polimetacrilato (PMA) sono i materiali più studiati, disponibili in commercio con un diametro di 20-50 nm, marcati o meno con un tracciante fluorescente, e con superfici che possono essere uniformi o rese funzionali attraverso legami con gruppi amminici o carbossilici [2]. Il polistirene (PS) è un polimero sintetico di un idrocarburo aromatico e si forma dalla polimerizzazione di un monomero di stirene (vinilbenzene), sintetizzato a partire dal benzene e dall'etilene, e seguito dalla



deidrogenazione dell'etilbenzene. Il PS è, quindi, un materiale solido ampiamente utilizzato nella fabbricazione di giocattoli, prodotti da ufficio e prodotti per il packaging [3]. La formazione delle PS-MPs avviene nell'ambiente attraverso processi di degradazione foto-ossidativa e meccanica.

Il ritrovamento di MPs e NPs in cibi e bevande ha generato numerosi studi sugli effetti di tali particelle sulla barriera cellulare e sul loro successivo assorbimento da parte dell'organismo [4, 5]. Dopo essere state ingerite, attraversano il tratto gastrointestinale (GI) e cambiano le loro caratteristiche fisico- chimiche in risposta ai cambiamenti nelle proteine e nel pH che avvengono durante le diverse fasi digestive [6]. La digestione diventa quindi uno step fondamentale per determinare la tossicità di queste particelle. Le MPs con dimensioni maggiori di 150 m non sono assorbite, mentre quelle di dimensioni inferiori si legano allo strato di muco intestinale e interagiscono direttamente con la superficie apicale delle cellule epiteliali intestinali [7].

La barriera intestinale consiste di diversi strati. Lo strato esterno include le immunoglobuline A (IgA) secretorie, il muco, le proteine di difesa come quelle antimicrobiche e il microbiota intestinale. Lo strato intermedio consiste delle cellule epiteliali intestinali (IECs), mentre quello interno comprende le cellule del sistema immunitario adattativo e innato [8]. Le tight junctions (TJs), localizzate tra cellule epiteliali adiacenti, sono essenziali per il funzionamento della barriera intestinale. Esse consistono di numerose proteine citosoliche e transmembrana, tra cui le molecole giunzionali di adesione (JAM), cingulina, occludina, zonula occludens (ZO), claudine e tricelluline, che interagiscono tra loro e con il citoscheletro andando a costituire una complessa architettura [9].

Mentre molti studi hanno esaminato gli effetti delle MPs ed NPs su cellule target isolate, un modello più fisiologico include una co-coltura di cellule secernenti muco (es. HT29-MTX-E12) e cellule epiteliali (es. Caco-2) [10].

Numerosi studi su come tali molecole agiscano a livello del tratto intestinale hanno dimostrato che esse possono causare stress ossidativo e infiammazione delle cellule epiteliali, alterazioni della permeabilità intestinale, dell'espressione della mucina e della composizione del microbiota, con conseguente cambiamento nel recruitment delle cellule immunitarie e nella secrezione delle citochine [11, 12]. Poiché stress ossidativo, infiammazione e danno mitocondriale sono eventi strettamente interconnessi, alcuni studi in vivo hanno riportato alterazioni della funzionalità mitocondriale a seguito dell'esposizione alle MPs [13].

Al microbiota intestinale appartengono specie batteriche sia benefiche che patogene, e quando queste ultime predominano sulle altre si ha disbiosi intestinale. La disbiosi



intestinale è stata associata con il danno GI indotto dall'esposizione orale alle MPs e NPs e può portare ad una risposta immunitaria pronunciata e ad un aumento del danno ossidativo [14].

I probiotici sono microrganismi batterici vitali che hanno un effetto benefico sullo stato di salute dell'ospite promuovendo il bilancio microbico dell'intestino e modulando il sistema immunitario [15, 16]. Nonostante i numerosi reports sugli effetti protettivi dei probiotici sul danno causato dai contaminanti chimici, sono disponibili informazioni limitate su come tali microrganismi siano in grado di proteggere contro la tossicità delle MPs sia nell'uomo che negli animali [17].

Di conseguenza, è probabile che l'uso dei probiotici potrebbe modificare in senso positivo la popolazione microbica dell'intestino, aumentare la secrezione di muco, e prevenire l'alterazione delle TJs attraverso la riduzione dei livelli di lipopolisaccaride (LPS) indotta dall'esposizione alle MPs e NPs [18].

In conclusione, l'ampia diffusione delle plastiche ha portato alla contaminazione di tutti i possibili ambienti naturali, nei quali tali plastiche vanno incontro a degradazione con la produzione di MPs e NPs che possono essere ingerite da diversi organismi. Poiché esse esercitano un effetto tossico, la ricerca di nuove procedure che riducano la loro tossicità diventa necessario.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: valutazione in vitro della traslocazione, della tossicità, dell'alterazione della barriera cellulare e del danno mitocondriale indotto dalle MPs e NPs su una co-coltura di cellule Caco-2 e HT-29.

Obiettivo specifico 2: valutazione in vivo su ratti wild type degli effetti della somministrazione orale delle MPs e NPs sul danno di barriera intestinale, sulla composizione del microbiota, sul profilo infiammatorio, e sul danno mitocondriale.

Obiettivo specifico 3: valutazione dell'attività protettiva di un mix complesso di probiotici sul danno causato dall'esposizione alle MPs e NPs.

Obiettivo 1

La prima fase del progetto prevede una sperimentazione in vitro su una co-coltura di cellule secernenti muco (HT29) e cellule epiteliali (Caco-2) al fine di riprodurre un modello fisiologico di epitelio intestinale. Le colture saranno trattate con le MPs e NPs



e sarà valutata la loro traslocazione attraverso la membrana cellulare utilizzando dei traccianti fluorescenti. Saranno poi valutate le diverse alterazioni cui l'epitelio intestinale è soggetto, con particolare riferimento alla permeabilità intestinale, al profilo infiammatorio, al danno mitocondriale e alla composizione del microbiota.

Obiettivo 2

La seconda fase del progetto sarà condotta in vivo su un modello animale di ratti wild type a cui verranno somministrate oralmente le MPs e le NPs con successiva valutazione a livello tissutale del danno intestinale indotto da tale trattamento.

Obiettivo 3

Le potenzialità terapeutiche e/o preventive di un mix complesso di probiotici nei confronti del danno epiteliale indotto dall'azione delle MPs e NPs saranno saggiate sia nel sistema in vitro che in vivo.

DATI PRELIMINARI

Ad oggi gli studi sugli effetti protettivi dei probiotici nei confronti delle MPs e NPs riguardano la loro capacità di modificarne la tossicità, anche grazie alle proprietà di binding di proteine specifiche e strutture polisaccaridiche presenti sulla loro parete cellulare. Inoltre, è nota la capacità anti-infiammatoria di molecole prodotte dai probiotici, quali gli short chain fatty acids, che, pertanto, possono giocare un ruolo nel mantenimento della omeostasi e funzionalità cellulare. In aggiunta, metaboliti prodotti dai probiotici possono avere effetti sull'asse gut-brain, e quindi influenzare l'omeostasi del sistema nervoso.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Determinazione della permeabilità paracellulare: Come indicatore del trasporto paracellulare viene usata la fluoresceina isotiocianato destrano (FD4, massa molecolare di 4000 kDa). L'intensità di fluorescenza dell'FD4 viene misurata ad una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente pari a 485 nm e 535 nm.

Profilo infiammatorio: Il contenuto in IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, TNF- α , IFN- è misurato nel medium di coltura cellulare e nel siero attraverso metodiche ELISA disponibili in commercio.



Analisi dell'espressione genica: 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 g di RNA totale vengono usati per la sintesi del cDNA. La trascrizione inversa (RT) è effettuata usando l'iScript Advanced cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). La real-time PCR viene effettuata in 25 l di volume finale contenente 2 l di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisenso di ogni gene. La Real-time PCR viene effettuata in un CFX96 Real- Time PCR Detection System (Bio-Rad, Milano, Italia).

L'analisi di Western Blot è condotta, previa estrazione delle proteine, eseguendo una gel-elettroforesi su pre-cast gel di poliacrilammide (Bio-Rad, Milano, Italia) e trasferimento su 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).

Dosaggio peptidi di barriera: Il dosaggio su siero di I-FABP e DAO è effettuato utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio.

Rilascio di zonulina: Il contenuto in zonulina del medium di coltura cellulare, nel siero e nelle feci è misurato attraverso metodiche ELISA disponibili in commercio.

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

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

- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti molecolari alla base del danno indotto dalle MPs e NPs.
- Valutazione dell'efficacia di un mix complesso di ceppi probiotici come agente terapeutico e/o preventivo.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

BIBLIOGRAFIA

1. Xu JL, Lin X, Wang JJ, Gowen AA . A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure.

Sci Total Environ 2022; 851(Pt 1):158111. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158111.

2. Shen M, Zhang Y, Zhu Y, Song B, Zeng G, Hu D, Wen X, Ren X. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review. Environ Pollut. 2019; 252(Pt A):511-521. doi: 10.1016/j.envpol.2019.05.102.

3. Kik K, Bukowska B, Sicińska P. Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. Environ Pollut. 2020; 262:114297. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114297.

4. Liu Q, Chen Z, Chen Y, Yang F, Yao W, Xie Y. Microplastics and Nanoplastics: Emerging Contaminants in Food. J Agric Food Chem. 2021; 69(36):10450-10468. doi: 10.1021/acs.jafc.1c04199.

5. Chen Y, Xu H, Luo Y, Ding Y, Huang J, Wu H, Han J, Du L, Kang A, Jia M, Xiong W, Yang Z. Plastic bottles for chilled carbonated beverages as a source of microplastics and nanoplastics. Water Res. 2023; 242:120243. doi: 10.1016/j.watres.2023.120243.

6. El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. Environ Sci Technol. 2010; 44(4):1260-6. doi: 10.1021/es902240k.

7. Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E, Pele LC. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. J Autoimmun. 2010; 34(3):J226-33. doi: 10.1016/j.jaut.2009.11.006.



8. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(23):12836. doi: 10.3390/ijerph182312836.
9. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018; 50(8):1-9. doi: 10.1038/s12276-018-0126-x.
10. García-Rodríguez A, Vila L, Cortés C, Hernández A, Marcos R. Exploring the usefulness of the complex in vitro intestinal epithelial model Caco-2/HT29/Raji-B in nanotoxicology. *Food Chem Toxicol*. 2018; 113:162-170. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.042.
11. Huang Z, Weng Y, Shen Q, Zhao Y, Jin Y. Microplastic: A potential threat to human and animal health by interfering with the intestinal barrier function and changing the intestinal microenvironment. *Sci Total Environ*. 2021; 785:147365. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147365.
12. Rawle DJ, Dumenil T, Tang B, Bishop CR, Yan K, Le TT, Suhrbier A. Microplastic consumption induces inflammatory signatures in the colon and prolongs a viral arthritis. *Sci Total Environ*. 2022; 809:152212. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152212.
13. Liu T, Hou B, Wang Z, Yang Y. Polystyrene microplastics induce mitochondrial damage in mouse GC-2 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022; 237:113520. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113520.
14. Qiao J, Chen R, Wang M, Bai R, Cui X, Liu Y, Wu C, Chen C. Perturbation of gut microbiota plays an important role in micro/nanoplastics-induced gut barrier dysfunction. *Nanoscale*. 2021; 13(19):8806-8816. doi: 10.1039/d1nr00038a.
15. Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician*. 2017; 96(3):170-178.
16. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*. 2023; 12(1):184. doi: 10.3390/cells12010184.
17. Bazeli J, Banikazemi Z, Hamblin MR, Chaleshtori RS. Could probiotics protect against human toxicity caused by polystyrene nanoplastics and microplastics? *Front Nutr* 2023; 10:1186724. doi: 10.3389/fnut.2023.1186724. eCollection 2023.



18. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front Immunol.* 2021; 12:578386. doi: 10.3389/fimmu.2021.578386.

TIMELINE

Milestones	0	6	12	18	24	30	36
Sperimentazione in vitro: allestimento di co-culture di cellule Caco-2 e HT-29 e trattamento con <u>MPs</u> e <u>NPs</u> .							
Sperimentazione in vivo: somministrazione per via orale di <u>MPs</u> e <u>NPs</u> in ratti wild type.							
Indagini molecolari relative agli obiettivi sopra descritti sui campioni cellulari.							
Indagini molecolari relative agli obiettivi sopra descritti sui campioni tissutali e fecali murini.							
Analisi dei dati.							
Disseminazione dei risultati e produzione di pubblicazioni scientifiche.							



LINEA DI RICERCA 2

PATOLOGIE FUNZIONALI, INFIAMMATORIE E DEGENERATIVE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

Responsabile Scientifico: Gianluigi Giannelli

Descrizione

Le patologie funzionali, infiammatorie e degenerative gastrointestinali pur essendo entità nosologiche ben distinte e profondamente diverse, soprattutto nell'approccio terapeutico, recentemente, proprio grazie ad un notevole miglioramento dell'efficacia terapeutica, possono subire delle metamorfosi. Ad esempio, pazienti con una patologia degenerativa quale la cirrosi epatica da HCV possono regredire ad uno stato di patologia infiammatoria, o quelli con malattie infiammatorie croniche intestinali in caso di remissione possono di fatto assumere il fenotipo di pazienti con colonpatia funzionale.

Obiettivi

Ottimizzare la terapia delle malattie funzionali, infiammatorie e degenerative sulla base delle caratteristiche fenotipiche di ogni singolo individuo, e, dove possibile, intervenendo sulla genesi ed il mantenimento del processo infiammatorio, chiave di volta per l'evoluzione degenerativa dell'organo coinvolto.



TITOLO DEL PROGETTO

10. STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI MEDIATI DAI MIRNAS PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE PATOLOGIE DEL TRATTO GASTROENTERICO

2786678

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: SERINO GRAZIA

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: miRNAs, IBD, tumori del tratto gastroenterico

Area interesse: 1 Diagnostica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

L'era della medicina personalizzata prevede principalmente l'uso sistematico di informazioni genetiche o di altro tipo su un singolo paziente per selezionarne o ottimizzarne le cure preventive e terapeutiche. La profilazione molecolare nei campioni di pazienti consente un maggiore grado di medicina personalizzata. Le informazioni sul profilo proteico, genetico e metabolico dell'individuo potrebbero essere utilizzate per adattare l'assistenza medica alle esigenze di quell'individuo. In questo contesto, piccoli frammenti di RNA non codificante chiamati microRNA (miRNAs), hanno catturato l'attenzione nel campo della biologia molecolare, sottolineando il loro coinvolgimento nel processo di traduzione, la loro influenza sui livelli di espressione di mRNA e proteine e la loro capacità di riprogrammare le vie di segnalazione molecolare. L'azione dei miRNAs, non dissimilmente da quella di altre tipologie di RNA non codificante, si esprime nell'interazione fisica specifica con trascritti genici (mRNA) e nell'impedimento o nella riduzione quantitativa della produzione di proteine. L'effetto biologico del miRNA



dipende pertanto dalla natura del suo bersaglio, chiamato target. Non è al momento disponibile una mappa completa dei target di ciascuno degli oltre 2000 miRNAs umani noti ma numerosi studi hanno già dimostrato per molti di essi un coinvolgimento diretto nei meccanismi patogenetici di numerose patologie (1).

La scoperta, relativamente recente, che variazioni dell'espressione dei miRNAs siano associati all'insorgenza di diverse tipologie di malattie del tratto gastroenterico, tra cui le malattie infiammatorie croniche gastrointestinali e le neoplasie, ha portato in breve tempo alla definizione di profili di espressione di miRNAs specificamente associati alle diverse patologie. Esiste, dunque, un profilo unico di espressione dei miRNAs per ogni malattia e che l'espressione alterata di uno o più miRNA è caratteristico di ogni patologia. Per questi motivi, i miRNAs 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 miRNAs consiste nel fatto che sono in grado di regolare simultaneamente più pathway cellulari e ciò li rende adatti al trattamento di patologie complesse che in genere sono associate all'alterazione di diverse vie del segnale.

I miRNAs non agiscono solo come regolatori locali all'interno delle cellule; possono essere veicolati anche in siti lontani dalla loro biogenesi e sono direttamente o indirettamente coinvolti in tutti i tipi di regolazione dei processi biologici negli organismi viventi (2-3). Inoltre, i miRNAs risultano essere stabili nei fluidi corporei come siero, plasma, urina, saliva e altri tessuti (4-7).

Nelle diverse patologie del tratto gastroenterico, la variazione nell'espressione dei miRNAs avviene nelle diverse fasi di malattia. Pertanto è molto importante studiare i profili di espressione dei miRNA e i loro geni bersaglio come biomarcatori per la diagnosi, la prognosi, la progressione e la risposta al trattamento. Ad esempio, nella pratica clinica, il 10% dei pazienti con IBD del colon non può essere classificato con una diagnosi di morbo di Chron (CD) o colite ulcerosa (CU) sulla base dei consueti test clinici standard tra cui colonscopia, imaging, test di laboratorio e istologia (8). Questa distinzione ha spesso implicazioni prognostiche e terapeutiche significative, soprattutto in coloro che non rispondono alla terapia medica e considerano la chirurgia. I marcatori sierologici quando usati in combinazione, inclusi gli anticorpi citoplasmatici antineutrofili perinucleari (pANCA) e gli anticorpi antimicrobici (anticorpo anti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anti-OmpC, anti-I2 e anti-CBir1) hanno una sensibilità relativamente bassa nel distinguere CD e CU del colon (9). Quindi, lo studio dei profili di espressione di miRNAs in queste due patologie potrebbero facilitarne la loro discriminazione ed individuare peculiari profili associati alle diverse caratteristiche cliniche (10).



Diverse evidenze sperimentali dimostrano il ruolo cruciale dei miRNAs nella trasformazione neoplastica

(11). La prima evidenza del coinvolgimento dei miRNA nelle neoplasie è data dalla downregolazione o delezione di miR-15 e miR-16 nella maggior parte dei pazienti affetti da Leucemia Linfocitica Cronica (CLL) (12). Questa scoperta ha dato il via a numerosi studi che hanno rivelato l'espressione differenziale dei miRNAs non solo tra tessuto normale e tumorale, ma anche tra tumore primario e metastatico. Queste differenze sono tumore-specifiche ed in alcuni casi associabili alla prognosi.

In generale, vengono considerati oncosoppressori i miRNAs la cui riduzione di espressione rispetto ad una situazione fisiologica causa la sovraespressione del bersaglio molecolare, che in questo caso è un oncogene direttamente implicato nella trasformazione tumorale. Al contrario, i miRNAs oncogeni sono il prodotto di mutazioni a carico di proto-oncogeni in grado di inibire specificamente l'espressione di oncosoppressori, impedendo la loro funzione di controllo delle normali attività cellulari e causando l'acquisizione da parte della cellula di una o più caratteristiche neoplastiche.

Le evidenze sperimentali ottenute nell'ultimo decennio dimostrano quindi che l'espressione aberrante degli RNA non codificanti nei differenti tipi di tumore è correlata con le specifiche caratteristiche bio- patologiche del tumore stesso, con la prognosi della malattia e con la risposta ai trattamenti farmacologici. Dunque, oltre al loro potenziale diagnostico, questi piccoli RNA possono potenzialmente essere utilizzati come farmaci mediante terapie a base di miRNAs (13). Ciò che rende questo tipo di terapia più efficiente, e di conseguenza particolarmente attraente, è l'ampio spettro di target che possono essere regolati da un singolo miRNA. Pertanto, un singolo miRNA può regolare interi pathway cellulari nonostante un effetto relativamente moderato su ciascuno dei geni bersaglio. Viceversa, un gene o una via di segnalazione possono essere specificamente regolati da diversi miRNAs, che potenzialmente coinvolge diversi meccanismi patogenetici molecolari (14).

Sebbene un futuro uso terapeutico dei miRNAs sia senza dubbio promettente, ci sono ancora grandi difficoltà pratiche da superare, tra cui l'identificazione di vie di somministrazione corrette, il controllo della stabilità corporea, il targeting di tessuti e tipi cellulari specifici e il raggiungimento degli effetti intracellulari previsti. Pertanto, solo pochi farmaci basati su miRNAs sono entrati, al momento, in una fase di test clinici. Attraverso studi approfonditi un team di ricercatori italiani ha recentemente identificato il ruolo chiave di uno specifico inibitore (Lna-i-miR-221, che agisce sul miR-221) (15). Nella prima fase di sperimentazione clinica è stato testato su un campione di 17 pazienti oncologici con tumori solidi in stadio avanzato. Il tutto con successo dal punto



di vista della sicurezza e della verifica di un effetto biologico. Superata la fase 1, il trattamento è pronto per le successive sperimentazioni, ossia le fasi 2 e 3, per effettuare analisi più approfondite sull'efficacia e stabilirne gli effetti su un campione più ampio di pazienti oncologici (16).

Questo progetto si propone, quindi, di investigare il ruolo dei miRNAs nelle patologie del tratto gastroenterico per comprenderne i meccanismi biologici e valutare la possibilità che possano fungere da target specifici di terapia farmacologica innovativa. La conoscenza di tali meccanismi molecolari permetterà di personalizzare la terapia farmacologica sulla base delle condizioni cliniche del paziente e del suo background clinico-genetico-biologico. Una volta identificati i miRNAs la cui espressione risulti essere correlata con la malattia, l'obiettivo è investigarne la funzione in relazione ai geni che sono bersaglio della loro azione. Per questa seconda parte è previsto l'utilizzo di metodi bioinformatici associati a studi funzionali, sia in vitro che in vivo, per validare biologicamente il ruolo dei miRNAs investigati e per porre le basi per una futura terapia mirata ad approccio molecolare.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Il presente progetto di ricerca si propone di individuare marcatori molecolari nella patogenesi delle patologie del tratto gastroenterico sia infiammatorie che tumorali. Tale progetto permetterà di studiare specifiche firme molecolari in pazienti sottoposti a intervento chirurgico e non sottoposti a terapia farmacologica neoadiuvante.

Obiettivo specifico 1: Identificazione di profili di miRNAs coinvolti nella patogenesi delle patologie del tratto gastroenterico

Obiettivo specifico 2: Individuazione mediante programmi bioinformatici di target predittivi dei miRNAs identificati allo scopo di determinare i geni e le pathways regolate

Obiettivo specifico 3: Caratterizzazione funzionale dei miRNAs individuati in linee cellulari e in modelli murini

Obiettivo 1

WP1. Selezione della casistica e profilo di espressione dei miRNAs

Saranno utilizzati campioni biotipici fissati in formalina e inclusi in paraffina ottenuti da pazienti affetti da malattie del tratto gastroenterico sia infiammatorie che tumorali archiviati presso l'UO di Anatomia Patologica dell'IRCCS "Saverio de Bellis". L'analisi



dei miRNAs sarà condotta sull'RNA ottenuto da biopsie mediante sequenziamento con piattaforma di Next Generation Sequencing.

Per ciascuna patologia analizzata, saranno inizialmente individuati i miRNAs che differenziano la componente patologica dalla componente normale al fine di individuare un pattern di espressione differenziale caratteristico di ciascuna patologia. Successivamente, saranno individuati i miRNAs coinvolti nella patogenesi del processo infiammatorio e quelli che caratterizzano l'insorgenza e la progressione delle neoplasie del tratto gastroenterico.

I dati ottenuti saranno validati mediante Real-Time PCR.

Obiettivo 2

WP2. Analisi computazionale dei miRNAs e dei relativi geni target

Si procederà con l'identificazione dei target computazionali dei miRNAs mediante diversi programmi bioinformatici. L'identificazione dei target dei miRNAs si basa sull'utilizzo di algoritmi bioinformatici che identificano le sequenze complementari ai miRNAs nelle regioni 3' UTR degli mRNA.

Saranno inoltre studiate le pathway molecolari regolate dai miRNAs individuati mediante l'utilizzo di software come mirPath e Ingenuity Pathway analysis (IPA).

Obiettivo 3

WP3. Studi funzionali in vitro

Una volta identificati i miRNAs e quindi i geni coinvolti nella malattia, si andrà a validare biologicamente l'interazione predetta tra uno specifico miRNA e il suo corrispondente gene. Per fare ciò, si provvederà ad aumentare o diminuire i livelli di miRNAs usando linee cellulari appropriate mediante la transfezione transiente con miRNAs sintetici (mimic e inibitori a seconda di come il miRNA è modulato).

I miRNAs mimic sono miRNAs sintetici disegnati per inserirsi nella pathway della biogenesi dei miRNAs a livello di miRNAs maturi. In questo modo, i mimic aumentano i livelli di miRNAs già presenti nella cellula determinando una riduzione dell'espressione del gene e quindi della proteina target.

Gli inibitori vanno a silenziare i miRNAs endogeni cellulari, essi sono degli oligonucleotidi sintetici complementari alla sequenza del miRNA maturo che una volta entrati nella cellula determinano un'efficace alterazione funzionale del miRNA complementare.



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, migrazione, invasione, ecc.).

WP4. Studi funzionali in vivo

Per confermare il diretto coinvolgimento del/i miRNA nella patogenesi delle malattie analizzate, gli inibitori dei miRNAs o le molecole mimic validate negli esperimenti in vitro (WP3) verranno inoculati in un gruppo di modelli murini messi a punto per ciascuna patologia allo scopo di vedere se il trattamento migliora l'infiammazione o la progressione tumorale.

DATI PRELIMINARI

Recentemente il nostro team di ricerca ha individuato e caratterizzato due miRNAs, chiamati miR-369-3p e miR-195-5p, deregolati nelle malattie infiammatorie croniche intestinali e nel cancro al colon retto (CRC). Nello specifico, in diversi lavori, abbiamo dimostrato che nelle cellule dell'immunità innata, come cellule dendritiche e macrofagi, il miR-369-3p è capace di modulare l'infiammazione cronica andando a influenzare geni come C/EBP- β e NOS2, che a loro volta intervengono nella produzione di citochine infiammatorie e nell'attivazione del pathway di NF- κ B. Inoltre, abbiamo funzionalmente dimostrato che il miR-369-3p regola l'espressione e l'attività dell'immunoproteasoma e dell'inflamosoma (17-20).

Nelle cellule epiteliali del colon, invece, abbiamo caratterizzato il ruolo del miR-195-5p nella regolazione di proteine delle giunzioni cellulari. In dettaglio, nell'infiammazione intestinale, abbiamo dimostrato che il miR-195-5p modulando l'espressione della CLDN2 e di altre proteine delle tight junction regola la permeabilità intestinale sia in vitro che in vivo (21-22).

Nel cancro coloretale, abbiamo dimostrato che il miR-195-5p controlla l'espressione di proteine dei desmosomi mediante la regolazione della γ -catenina (manoscritto in revisione). Infatti, abbiamo determinato che il miR-195-5p è significativamente downregolato nei tessuti tumorali di pazienti affetti da CRC rispetto alla controparte normale. Al contrario, l'espressione dell'mRNA di JUP (gene che codifica per la γ -catenina) risulta aumentato nei tessuti tumorali. L'analisi effettuata mediante immunistoichimica ha messo in evidenza che l'espressione tissutale della proteina corrispondente è più elevata nell'intero strato epiteliale del tessuto tumorale rispetto ai



campioni normali adiacenti, suggerendo che JUP potrebbe essere un buon target farmacologico per il trattamento del CRC. Inoltre, mediante esperimenti di transfezione su linee cellulari di CRC abbiamo confermato biologicamente che l'mRNA di JUP e l'espressione proteica sono strettamente regolati da questo miRNA. Questa modulazione da parte del miR-195-5p, a sua volta, comporta una sovraespressione indiretta delle caderine desmosomiali (DSG2 e DSC2) a livello proteico.

Abbiamo confermato l'effetto del miR-195-5p sulla progressione del cancro coloretale poiché in vitro regola la proliferazione, la vitalità, la migrazione e l'invasione cellulare. Infine, abbiamo verificato l'effetto in vivo del miR-195-5p in un modello murino di CRC indotto da AOM/DSS. Abbiamo osservato che la somministrazione in vivo di miR-195-5p mimic ha aumentato l'espressione del miR-195-5p nel colon mediale e distale dei topi trattati. I livelli più alti di miR-195-5p, a sua volta, determinano una significativa riduzione nell'espressione di JUP. Inoltre, i topi trattati con miR-195-5p hanno mostrato la presenza di una quantità inferiore di lesioni per tutta la lunghezza del colon rispetto al gruppo di controllo.

La somministrazione di miR-195-5p è in grado di ridurre significativamente il numero di neoformazioni di dimensioni inferiori a 2 mm e quelle superiori a 2 mm. Questi dati hanno fortemente confermato i nostri risultati in vitro e convalidano ulteriormente il ruolo del miR-195-5p nel contrastare la progressione del CRC.

I nostri risultati pongono le basi per uno studio più ampio che mira a sviluppare delle firme molecolari di miRNAs specificatamente associate a ciascuna patologia del tratto gastroenterico. Infatti, negli studi precedenti siamo partiti dall'analisi dell'espressione dei miRNAs nelle singole tipologie cellulari. Con questo progetto andremo a studiare l'espressione globale dei miRNAs nell'intero tessuto patologico rispetto alla controparte normale fornendo una più ampia caratterizzazione molecolare della malattia in esame.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

I miRNAs saranno estratti da tessuti archiviati fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) utilizzando il kit miRNeasy FFPE (Qiagen). La concentrazione del campione ottenuto sarà determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop (Agilent). La qualità sarà valutata mediante lo strumento TapeStation (Agilent).

Allo scopo di studiare quali miRNAs e quali geni differenziano il tessuto patologico dal tessuto sano, si effettuerà un profilo di espressione globale dei miRNAs e dei geni mediante la tecnica di next generation sequencing. I risultati di espressione ottenuti da



ciascun campione, saranno inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione. Questi dati verranno sottoposti alle successive analisi statistiche che comprenderanno diversi approcci come: FDR(BH), Q Value, Family Wise Error Rate (FWER), P-Value, e test di Bonferroni allo scopo di determinare quali sono i miRNAs e i geni che correlano maggiormente con il fenotipo della malattia e il loro grado di correlazione.

L'identificazione dei target dei miRNAs si basa largamente sull' utilizzo di algoritmi bioinformatici che identificano le sequenze complementari ai miRNAs nelle regioni 3' UTR degli mRNA. Sono disponibili diverse procedure computazionali per predire geni-bersaglio dei miRNAs, tra cui TargetScan (<http://www.targetscan.org>), Argonaute (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/argonaute/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), DianamicroT 5.0 (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index) e RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Precomputed/>). Dato che si tratta di risultati predittivi, per ridurre i falsi positivi, i risultati ottenuti da ciascun database verranno sovrapposti e saranno considerati solo quei target predetti da almeno 2 programmi.

Gli esperimenti di transfezione saranno effettuati utilizzando inibitori dei miRNA o mimic. Queste molecole vanno a inibire o 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, racchiuso nel liposoma, viene successivamente rilasciato nel citoplasma dove va ad aumentare (mimic) oppure a ridurre (inibitori) i livelli di miRNA preesistente.

Ciascun esperimento di transfezione includerà inoltre: 1. un controllo negativo (mock), transfettato nelle stesse condizioni senza miRNA per valutare effetti tossici del reagente di transfezione, 2. un controllo non transfettato per valutare il livello basale del gene, 3. un controllo di transfezione.

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

Per la validazione in vivo dei risultati ottenuti, saranno utilizzati modelli murini messi a punto per ciascuna patologia mediante induzione chimica e/o xenotrapianto. Gli inibitori dei miRNA o le molecole mimic saranno veicolate da liposomi a base lipidica e saranno iniettate per via intraperitoneale e/o intratumore.



RISULTATI ATTESI

Il principale obiettivo di questo progetto è di identificare delle firme molecolari di miRNAs specificatamente associate a ciascuna patologia del tratto gastroenterico sia infiammatoria che tumorale. Inoltre, saranno individuati i miRNAs coinvolti nella patogenesi del processo infiammatorio e quelli che sono alla base della trasformazione neoplastica nei tumori del tratto gastroenterico.

Le stesse firme molecolari potrebbero anche fornire nuovi bersagli terapeutici e consentire il disegno di protocolli terapeutici innovativi per i pazienti a prognosi più sfavorevole. Questi nuovi approcci principalmente focalizzati su molecole target specifiche potrebbero portare a una riduzione di questi effetti collaterali. Sfruttando la natura evolutivamente conservata dei miRNAs, i nostri studi su modelli preclinici potrebbero essere potenzialmente traslati per il trattamento dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Ali, S. A., Peffers, M. J., Ormseth, M. J., Jurisica, I., & Kapoor, M. (2021). The non-coding RNA interactome in joint health and disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(11), 692- 705.
2. Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132 (21): 4653–4662.
3. Lu, M., Zhang, Q., Deng, M., Miao, J., Guo, Y., Gao, W., & Cui, Q. (2008). An analysis of human microRNA and disease associations. *PloS one*, 3(10), e3420.
4. Cortez, M. A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., & Calin, G. A. (2011). MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(8), 467-477.
5. Kupec, T., Bleilevens, A., Iborra, S., Najjari, L., Wittenborn, J., Maurer, J., & Stickeler, E. (2022). Stability of circulating microRNAs in serum. *Plos one*, 17(8), e0268958.
6. Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical chemistry*, 56(6), 998-1006.



7. Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical chemistry*, 56(6), 998-1006.
8. Thia, K. T., Loftus Jr, E. V., Pardi, D. S., Kane, S. V., Faubion, W. A., Tremaine, W. J., ... & Sandborn, W. J. (2011). Measurement of disease activity in ulcerative colitis: interobserver agreement and predictors of severity. *Inflammatory bowel diseases*, 17(6), 1257-1264.
9. Prideaux, L., De Cruz, P., Ng, S. C., & Kamm, M. A. (2012). Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflammatory bowel diseases*, 18(7), 1340-1355.
10. Chapman, C. G., & Pekow, J. (2015). The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 8(1), 4-22.
11. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1(1), 1-9.
12. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., ... & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13944-13949.
13. Huang, W. (2017). MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Bioinformatics in MicroRNA research*, 57-67.
14. Gebert, L. F., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 21-37.
15. Di Martino, M. T., Gullà, A., Gallo Cantafio, M. E., Altomare, E., Amodio, N., Leone, E., ... & Tassone, P. (2014). In vitro and in vivo activity of a novel locked nucleic acid (LNA)- inhibitor-miR-221 against multiple myeloma cells. *PloS one*, 9(2), e89659.
16. Tassone, P., Di Martino, M. T., Arbitrio, M., Fiorillo, L., Staropoli, N., Ciliberto, D., ... & Tagliaferri, P. (2023). Safety and activity of the first-in-class locked nucleic acid (LNA) miR-221 selective inhibitor in refractory advanced cancer patients: a first-in-human, phase 1, open-label, dose-escalation study. *Journal of Hematology & Oncology*, 16(1), 1-12.
17. Galleggiante, V., De Santis, S., Liso, M., Verna, G., Sommella, E., Mastronardi, M., ... & Serino, G. (2019). Quercetin-Induced miR-369-3p Suppresses Chronic



Inflammatory Response Targeting C/EBP- β . *Molecular nutrition & food research*, 63(19), 1801390.

18. Scalavino, V., Liso, M., Cavalcanti, E., Gigante, I., Lippolis, A., Mastronardi, M., ... & Serino, G. (2020). miR-369-3p modulates inducible nitric oxide synthase and is involved in regulation of chronic inflammatory response. *Scientific Reports*, 10(1), 15942.

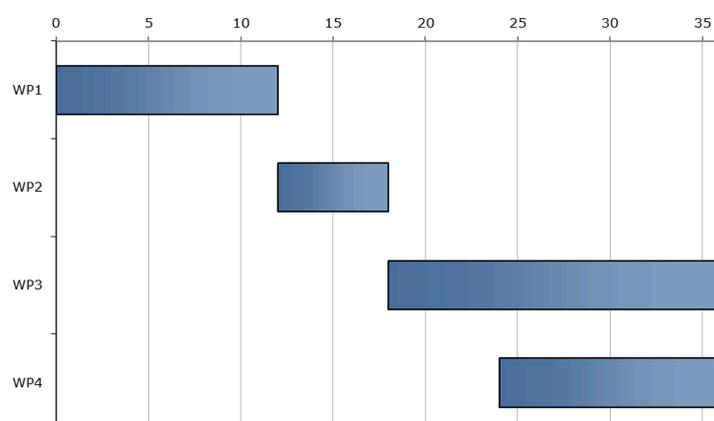
19. Scalavino, V., Piccinno, E., Valentini, A. M., Mastronardi, M., Armentano, R., Giannelli, G., & Serino, G. (2022). A Novel Mechanism of Immunoproteasome Regulation via miR-369-3p in Intestinal Inflammatory Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13771.

20. Scalavino, V., Piccinno, E., Valentini, A. M., Schena, N., Armentano, R., Giannelli, G., & Serino, G. (2023). miR-369-3p Modulates Intestinal Inflammatory Response via BRCC3/NLRP3 Inflammasome Axis. *Cells*, 12(17), 2184.

21. Scalavino, V., Piccinno, E., Lacalamita, A., Tafaro, A., Armentano, R., Giannelli, G., & Serino, G. (2022). miR-195-5p Regulates Tight Junctions Expression via Claudin-2 Downregulation in Ulcerative Colitis. *Biomedicines*, 10(4), 919.

22. Scalavino, V., Piccinno, E., Bianco, G., Schena, N., Armentano, R., Giannelli, G., & Serino, G. (2022). The increase of miR-195-5p reduces intestinal permeability in ulcerative colitis, modulating tight junctions' expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5840

TIMELINE





TITOLO DEL PROGETTO

**14. UTILIZZO DEI BIOMARCATORI EMATICI PER LA DIAGNOSI PRECOCE
DELL'EPATOCARCINOMA (HCC)**

2786672

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Cancer Biomarkers - CBSS

Responsabile: SHAHINI ENDRIT

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Parole chiave: Biomarcatori sierici

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica osservazionale

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 aflatoossine (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).

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 TASWakoTM 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.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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).

RISULTATI ATTESI

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.
4. 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.
5. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020;18(12):2650-2666.



6. <https://www.registri-tumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2020>.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.



16. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, et al. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984;310:1427–1431.
17. Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M. Yet al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561–569.
18. Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for Hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int* 2008;2:17–30.
19. Toyoda H, Kumada T, Tada T, et al. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/mL. *Cancer Sci.* 2011;102(5):1025-1031.
20. Best J, Bilgi H, Heider D, et al. The GALAD scoring algorithm based on AFP, AFP-L3, and DCP significantly improves detection of BCLC early stage hepatocellular carcinoma. Der GALAD-Score, ein AFP-, AFP-L3- und DCP-basierter Diagnosealgorithmus verbessert die Detektionsrate des hepatozellulären Karzinoms im BCLC-Frühstadium signifikant. *Z Gastroenterol.* 2016;54(12):1296-1305.
21. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130(7):417-422.
22. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124-31.e1.
23. Heimbach JK. Overview of the Updated AASLD Guidelines for the Management of HCC. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2017;13(12):751-753.
24. Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, et al. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int.* 2010;4(2):439-474.
25. Makuuchi M, Kokudo N, Aii S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res.* 2008;38(1):37-51.



26. Weinmann A, Koch S, Niederle IM, et al. Trends in epidemiology, treatment, and survival of hepatocellular carcinoma patients between 1998 and 2009: an analysis of 1066 cases of a German HCC Registry. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(3):279-289.
27. Ikai I, Kudo M, Arii S, et al. Report of the 18th follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatology Research* 2010; 40: 1043–1059.
28. Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, Takayama T, Kubo S, Shimada M, Nagano H, Hatano E, Izumi N, Kaneko S, Kudo M, Iijima H, Genda T, Tateishi R, Torimura T, Igaki H, Kobayashi S, Sakurai H, Murakami T, Watadani T, Matsuyama Y. Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC guidelines) 2019 update. *Hepatology Res* 2019; 49: 1109-1113.
29. Craig AJ, von Felden J, Garcia-Lezana T, Sarcognato S, Villanueva A. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17: 139-152.
30. Johnson PJ, Pirrie SJ, Cox TF, Berhane S, Teng M, Palmer D, Morse J, Hull D, Patman G, Kagebayashi C, Hussain S, Graham J, Reeves H, Satomura S. The detection of hepatocellular carcinoma using a prospectively developed and validated model based on serological biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 144-153.
31. Berhane S, Toyoda H, Tada T, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, Schweitzer N, Vogel A, Manns MP, Benckert J, Berg T, Ebker M, Best J, Dechêne A, Gerken G, Schlaak JF, Weinmann A, Wörns MA, Galle P, Yeo W, Mo F, Chan SL, Reeves H, Cox T, Johnson P. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14: 875-886.e6.
32. Caviglia GP, Abate ML, Petrini E, Gaia S, Rizzetto M, Smedile A. Highly sensitive alpha-fetoprotein, Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin for hepatocellular carcinoma detection. *Hepatology Res*. 2016;46(3):E130-E135.
33. Best J, Bechmann LP, Sowa JP, et al. GALAD Score Detects Early Hepatocellular Carcinoma in an International Cohort of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(3):728- 735.e4.
34. Yang JD, Addissie BD, Mara KC, et al. GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(3):531-538.



35. Ertle JM, Heider D, Wichert M, et al. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion*. 2013;87(2):121-131.
36. Makuuchi M, Kokudo N, Aii S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res*. 2008;38(1):37-51.
37. Chang W. W. P. et al., Microfluidic Immunoassays on Polymeric Microships, *IVD Technology Magazine*, Spring 2010, p. 6-11.
38. Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, et al. Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem*. 2009;388(2):306-311.
39. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3(1):32–5.
40. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44(3):837–45.



TITOLO DEL PROGETTO

15. EFFETTI DEL CONSUMO DI ARANCE SUL METABOLISMO GLUCIDICO E LIPIDICO IN SOGGETTI CON MAFLD: STUDIO IN VITRO E TRIAL CLINICO

2786676

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Hepatobiliary Pathophysiology - HBPP

Responsabile: Notarnicola Maria

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Parole chiave: arance, esperidina, polifenoli, lipidomica, enzimi deglicanti, steatosi

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

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.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

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 μM) 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'idrossitirosole 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 APCMin+.

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 di-metiliazol-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 l 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 l di volume finale contenente 2 l 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 -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 g 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



ematichi 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 X2. 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

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													█												█											



TITOLO DEL PROGETTO

17. I CANALI IONICI E LE ACQUAPORINE (AQP) COME TARGET DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI NEI DISTURBI FUNZIONALI GASTROINTESTINALI (FGID) E NELL'INFIAMMAZIONE DI BASSO GRADO

2790445

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: Maqoud Fatima

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: canalopatie, canali ionici, disturbi funzionali gastrointestinali, trasportatori, potenziale transitorio del recettore, acquaporina, canali ionici, FGID, sindrome dell'intestino irritabile (IBS), dismicrobismo intestinale, sistema 5-HT e BDNF

Area interesse: 1 Diagnostica

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

I disturbi funzionali gastrointestinali (FGID) inclusa la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) sono condizioni croniche comuni che colpiscono decine di milioni di persone in tutto il mondo [1]. Si stima che il 4-10% della popolazione mondiale soffre di IBS, mentre il 40% soddisfa i criteri per altri FGID [2]. Gli FGID insieme ad altri disturbi della motilità gastrointestinale sono altamente costosi per il sistema sanitario poiché sono responsabili di morbilità a lungo termine (ospedalizzazione e visite ambulatoriali) e talvolta di mortalità nei pazienti affetti [2]. Oltre all'onere economico, gli FGID influiscono sulla qualità della vita dell'individuo correlata alla salute, alla produttività lavorativa e alle attività della vita quotidiana [3].



Nonostante i significativi progressi nella comprensione della fisiopatologia degli FGID, le strategie diagnostiche e terapeutiche rimangono complicate e difficoltose. Ciò deriva dalla fisiopatologia multisistemica degli FGID, comprese le anomalie di elaborazione di segnalazione e interazione tra il sistema nervoso centrale e periferico (enterico) [2], la disfunzione motoria a carico della muscolatura liscia nella parete gastrointestinale [4], la disbiosi intestinale [5], e l'alterazione della funzione e della permeabilità della barriera epiteliale intestinale [6], [7]. Tale disturbo può essere innescato da fattori di rischio avviati a livello centrale (p. es., eventi avversi nei primi anni di vita, ansia e depressione, stress psicologico cronico o acuto) oppure da segnali periferici (p. es., infezione intestinale, disbiosi, alterazioni degli acidi biliari nel lume, acidi grassi a catena corta, disfunzione del sistema 5-HT e BDNF [8].

Nonostante un rapido aumento della conoscenza delle fondamentali interazioni neuronali cervello-intestino, molti aspetti restano da svelare a livello neuroanatomico e molecolare. La nostra comprensione dei meccanismi molecolari responsabili del complesso e variabile comportamento elettrico e di permeabilità del tratto gastrointestinale rimane incompleta.

I canali ionici, incluso le acquaporine, sono proteine di membrana che regolano selettivamente i flussi ionici e di acqua attraverso le membrane delle cellule e degli organelli cellulari [9], [10]; il loro meccanismo di controllo dipende dai cambiamenti nel voltaggio della membrana, dal legame dei ligandi o dagli stimoli fisici e chimici [11]. La presenza di isoforme distinte di canali ionici e la loro espressione età-dipendente e tessuto-specifica consente la regolazione fine di molte funzioni cellulari, come l'eccitabilità cellulare, la contrazione, il rilascio di neurotrasmettitori e ormoni, l'espressione genica, l'omeostasi di ioni e acqua. Le interruzioni della capacità dei canali ionici di condurre ioni possono portare a malattie chiamate canalopatie ioniche [12]. Le canalopatie possono derivare da cambiamenti nella funzione biofisica o nell'espressione dei canali ionici dovuti a mutazioni, modifiche post-traduzionali e malfunzionamento delle proteine accessorie [13]. Da molto tempo, le canalopatie sono fortemente consolidate nei campi della cardiologia e della neurologia, ma il loro ruolo sta guadagnando molto interesse anche in gastroenterologia a causa delle loro molteplici azioni nel controllo delle funzioni gastrointestinali [14].

I canali ionici nei tessuti gastrointestinali sono stati poco studiati e il loro ruolo è rimasto poco indagato. Nel tratto gastrointestinale, i canali ionici voltaggio-sensibili sono le principali unità molecolari che generano e regolano l'attività elettrica e mecano-sensibile nelle cellule interstiziali di Cajal, nella muscolatura liscia e nelle cellule del sistema nervoso enterico coinvolte nella motilità e nel dolore gastrointestinale [15]. Inoltre, queste proteine-canale mediano l'assorbimento e la



secrezione degli elettroliti nelle cellule epiteliali del tratto gastrointestinale e interagiscono con le proteine citoscheletriche (Occludine, Claudine, Zonula-occludens) coinvolte nella permeabilità epiteliale. Recenti evidenze scientifiche supportano il coinvolgimento dei canali ionici nell' IBS [13]. In studi di associazione sull'intero genoma, il locus SCN5A è risultato essere fortemente associato all'IBS [16]. Le mutazioni a carico del gene che codifica per il regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) o delle proteine associate al CFTR provocano canalopatie con stitichezza o diarrea come fenotipi. Nei nervi sensoriali, le canalopatie dei canali del sodio voltaggio- dipendenti NaV1.7 e NaV1.9 (codificati rispettivamente da SCN9A e SCN11A) si manifestano con iper o ipo-sensibilizzazione gastrointestinale [17]. Al contrario, molti pazienti con aritmie cardiache causate da mutazioni in SCN5A, che codifica per la subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV1.5, presentano anche sintomi da IBS [15], [18]. Inoltre, i pazienti epilettici portatori di mutazioni nel gene SCN2A (che codifica per la subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV1.2), presentano gravi sintomi gastrointestinali [14]. Soggetti portatori di mutazioni nei geni TRPV1 e TRPA1 manifestano ipersensibilità e dolore viscerale. Recentemente, pazienti con la sindrome di Cantù (CS) con mutazioni a carico dei geni KCNJ8 e ABCC9, hanno mostrato disfunzione della contrattilità in tutto l'intestino [19]. Studi su modelli animali hanno inoltre suggerito che l'ipersensibilità viscerale può essere indotta o modulata dal microbiota intestinale, dai suoi mediatori. Inoltre, anche interventi dietetici che possono agire indipendentemente o di concerto con altri meccanismi sopra menzionati. In un modello animale di IBS, è stata recentemente dimostrata un'alterazione della via di segnalazione serotoninergica enterica, una upregolazione di TrkB (recettore del BDNF) e di 5-HT nella mucosa intestinale e nel cervello, nonché un basso contenuto di SERT, 5-HT3B e 5-HT4 rispetto ai controlli [20]. In tale modello, la dieta chetogenica ha mostrato un duplice effetto nel migliorare i sistemi alterati del 5-HT e BDNF. Altri studi recenti hanno dimostrato il ruolo del 5-HT nel mantenimento della sopravvivenza delle cellule del Cajal mediante la modulazione dei canali ionici [21]. Sulla base di quanto riportato, diventa fondamentale la comprensione del possibile ruolo dei canali ionici e delle acquaporine come biomarcatori e come bersagli dietetici o farmacologici negli FGID.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: Valutazione in vitro e in vivo, in un modello animale di IBS del ruolo dei canali ionici come possibili biomarcatori e bersagli farmacologici nell'ambito degli FGID.



Obiettivo specifico 2: Valutazione in vitro della modulazione dei canali ionici da parte dei prodotti della microflora batterica (LPS, PUFA, Istamina, SCFA, tossine), PH, acidità, citochine, e componenti specifici della dieta.

Obiettivo specifico 3: Eventuale sviluppo di antagonisti/ agonisti o terapie biologiche specifiche che agiscono selettivamente su determinati sottotipi di canali ionici o AQP con valutazione del profilo di efficacia in vitro e in vivo delle possibili molecole candidate.

Obiettivo 1:

1- Valutazione dell'espressione differenziale dei geni codificanti per i canali ionici e canali AQP, e del profilo delle varianti genetiche e delle mutazioni nei tessuti del modello animale, allo scopo della determinazione di biomarcatori e bersagli farmacologici.

2- Valutazione del profilo elettrofisiologico funzionale dei canali ionici nelle cellule da coltura primaria del modello animale di IBS.

3- Valutazione in vitro dell'impatto della modulazione dell'attività dei canali ionici e/ o AQP identificati nel punto 1 sulle cellule intestinali.

Obiettivo 2:

1- Valutazione in vitro degli effetti modulanti sui canali ionici dei prodotti della microflora batterica (LPS, PUFA, Istamina, SCFA, tossine), dei parametri immunitari, PH, acidità, citochine, e i componenti specifici nella dieta.

2- Determinazione del profilo elettrofisiologico dei canali in risposta alla modulazione sopra citata.

3- Correlazione della modulazione dei canali ionici con i prodotti sopra elencati con l'effetto sulle cellule intestinali.

Obiettivo 3:

1. Valutazione dell'effetto benefico in vitro e in vivo nel modello animale di IBS delle molecole o farmaci che agiscono sulle proteine eventualmente identificati nell'obiettivo 1 e 2.

2. Valutazione del profilo tossicologico tessuto specifico delle molecole testate ed eventuale sviluppo di antagonisti/ agonisti o terapie biologiche specifiche che agiscono



selettivamente su determinati sottotipi di canali ionici o AQP per trattare i sintomi del FGID.

DATI PRELIMINARI

Nel report scientifico pubblicato da Maqoud et al., [22], mediante una ricerca stratificata nei database quale PubMed, Virtual Library in Health (BVS) e NCBI, è stato possibile evidenziare il ruolo e il forte legame tra i canali ionici e le mutazioni che colpiscono tali canali (canalopatie) nei FGID/IBS e nell' infiammazione di basso grado. Inoltre, dati ancora in fase di pubblicazione (Maqoud et al, 2023), che riguardano l'impatto protettivo dell'estratto di Lens Culinaris (LE) sull'integrità della mucosa intestinale durante l'infiammazione indotta da LPS, valutata su cellule CaCo-2, hanno dimostrato che l'effetto citotossico dell'LPS è mediato da una sovraregolazione dei geni proinfiammatori TRPA1 e TRPV1 e da una forte modulazione agonizzante delle correnti ioniche mediate dal canale TRPV1. In questa condizione, LE e in maniera simile alla Capsazepina (antagonista del canale TRPV1), ha contrastato la sovraregolazione dei geni proinfiammatori TRPA1 e TRPV1 indotta da LPS e ha ridotto i marcatori proinfiammatori. Questi risultati dimostrano il possibile ruolo dei canali ionici nella regolazione della barriera intestinale. Inoltre, sottolineano il potenziale dei composti naturali come LE nel regolare la barriera intestinale e ridurre gli effetti dannosi dell'infiammazione sulle cellule intestinali mediante canali ionici.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Metodologie

Per raggiungere gli obiettivi sopra elencati saranno adottate diverse procedure e modalità sperimentali:

- 1- Test di immunoistochimica, RT-PCR, Western blot e immunofluorescenza per valutare l'espressione dell'mRNA e delle proteine canale di interesse e dei geni di interesse.
- 2- Test di vitalità cellulare come CCK8, MTT, Crystal violet, clonogenico per valutare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule, e studiare il profilo delle citochine.
- 3- Analisi transwell per valutare la permeabilità in vitro.



4- Tecnica del patch clamp per lo studio dell'attività e la caratterizzazione elettrofisiologica dei canali, e per la valutazione dell'effetto della modulazione con agonisti e antagonisti sulle correnti ioniche generate dai canali di interesse.

Analisi statistiche

In base alla normalità o non normalità dei dati verificate mediante il test di normalità di Shapiro-Wilk saranno adottati test parametrici (t di Student, Anova, Bonferroni, Takey o Dunnet) o non parametrici (U di Mann-Whitney i test di Kruskal-Wallis). I coefficienti di correlazione possono essere calcolati da Spearman e analisi di correlazione della distanza. I test esatti di Fisher a due code saranno utilizzati per analizzare le tabelle di contingenza. Il metodo Kaplan-Meier può essere utilizzato per generare curve di sopravvivenza e il test log-rank (Mantel-Cox) può essere utilizzato per determinare la significatività statistica delle differenze. Tutte le analisi statistiche saranno condotte utilizzando R o Prisma. I valori P inferiori a 0,05 saranno considerati statisticamente significativi.

RISULTATI ATTESI

- 1- Identificazione dei biomarcatori specifici utili per ampliare i programmi limitanti di diagnosi e gestione dei FGID, attualmente basati sui sintomi.
- 2- Identificazione dei geni o le combinazioni di geni che contribuiscono ai fenotipi correlati ai FGID; identificazione dei target terapeutici.
- 3- Identificazione dei metaboliti del microbiota intestinale, dei parametri immunitari, PH, acidità, e citochine e determinazione del loro ruolo nel guidare i cambiamenti strutturali a livello gastrointestinale e il loro impatto sull'asse intestino- cervello.
- 4- Eventuale sviluppo di antagonisti/ agonisti o terapie biologiche specifiche che agiscono selettivamente su determinati sottotipi di canali ionici o AQP per trattare i sintomi del FGID.
- 5- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

BIBLIOGRAFIA

[1] C. J. Black, D. A. Drossman, N. J. Talley, J. Ruddy, and A. C. Ford, "Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management.," Lancet



(London, England), vol. 396, no. 10263, pp. 1664–1674, Nov. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)32115-2.

[2] M. Duffy, V. L. Boggiano, R. Ganesh, and M. Mueller, “Functional Gastrointestinal Disorders,” *Prim. Care Clin. Off. Pract.*, vol. 50, no. 3, pp. 429–446, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.03.006>.

[3] U. Ladabaum et al., “Diagnosis, Comorbidities, and Management of Irritable Bowel Syndrome in Patients in a Large Health Maintenance Organization,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 1, pp. 37–45, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.08.015>.

[4] D. H. Vasant and A. C. Ford, “Functional gastrointestinal disorders in inflammatory bowel disease: Time for a paradigm shift?,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 26, no. 26, pp. 3712–3719, Jul. 2020, doi: 10.3748/wjg.v26.i26.3712.

[5] T. Karakan, C. Ozkul, E. Küpeli Akkol, S. Bilici, E. Sobarzo-Sánchez, and R. Capasso, “Gut-Brain-Microbiota Axis: Antibiotics and Functional Gastrointestinal Disorders,” *Nutrients*, vol. 13, no. 2, Jan. 2021, doi: 10.3390/nu13020389.

[6] M. Camilleri, K. Madsen, R. Spiller, B. G. Van Meerveld, and G. N. Verne, “Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 24, no. 6, pp. 503–512, Jun. 2012, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>.

[7] H. F. Dale and G. A. Lied, “Gut microbiota and therapeutic approaches for dysbiosis in irritable bowel syndrome: recent developments and future perspectives,” *Turkish J. Med. Sci.*, vol. 50, no. SI-2, pp. 1632–1641, Nov. 2020, doi: 10.3906/sag-2002-57.

[8] M. Linsalata, G. Riezzo, B. D’Attoma, C. Clemente, A. Orlando, and F. Russo, “Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 18, no. 1, p. 167, 2018, doi: 10.1186/s12876-018-0888-6.

[9] B. Roux, “Ion channels and ion selectivity,” *Essays Biochem.*, vol. 61, no. 2, pp. 201–209, May 2017, doi: 10.1042/EBC20160074.

[10] N. Ikarashi, R. Kon, and K. Sugiyama, “Aquaporins in the Colon as a New Therapeutic Target in Diarrhea and Constipation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 7, Jul. 2016, doi: 10.3390/ijms17071172.



- [11] A. Becchetti, G. Petroni, and A. Arcangeli, "Ion Channel Conformations Regulate Integrin-Dependent Signaling," *Trends Cell Biol.*, vol. 29, no. 4, pp. 298–307, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.005>.
- [12] T. E. Verstraelen, R. M. A. Ter Bekke, P. G. A. Volders, A. A. M. Masclee, and J. W. Kruimel, "The role of the SCN5A-encoded channelopathy in irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders.," *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.*, vol. 27, no. 7, pp. 906–913, Jul. 2015, doi: [10.1111/nmo.12569](https://doi.org/10.1111/nmo.12569).
- [13] Y. A. Saito et al., "Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy," *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 296, no. 2, pp. G211–G218, Feb. 2009, doi: [10.1152/ajpgi.90571.2008](https://doi.org/10.1152/ajpgi.90571.2008).
- [14] V. C. Beck, L. L. Isom, and A. T. Berg, "Gastrointestinal Symptoms and Channelopathy-Associated Epilepsy," *J. Pediatr.*, vol. 237, pp. 41-49.e1, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.06.034>.
- [15] G. R. 3rd Locke, M. J. Ackerman, A. R. Zinsmeister, P. Thapa, and G. Farrugia, "Gastrointestinal symptoms in families of patients with an SCN5A-encoded cardiac channelopathy: evidence of an intestinal channelopathy.," *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, no. 6, pp. 1299–1304, Jun. 2006, doi: [10.1111/j.1572-0241.2006.00507.x](https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00507.x).
- [16] A. Beyder et al., "Loss-of-function of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 (channelopathies) in patients with irritable bowel syndrome.," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 7, pp. 1659–1668, Jun. 2014, doi: [10.1053/j.gastro.2014.02.054](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.054).
- [17] N. R. Choi et al., "The traditional herbal medicines mixture, Banhasasim-tang, relieves the symptoms of irritable bowel syndrome via modulation of TRPA1, NaV1.5 and NaV1.7 channels.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 312, p. 116499, Aug. 2023, doi: [10.1016/j.jep.2023.116499](https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116499).
- [18] A. Beyder and G. Farrugia, "Ion channelopathies in functional GI disorders.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 311, no. 4, pp. G581–G586, Oct. 2016, doi: [10.1152/ajpgi.00237.2016](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00237.2016).
- [19] H. Zhang et al., "Complex consequences of Cantu syndrome SUR2 variant R1154Q in genetically modified mice.," *JCI insight*, vol. 6, no. 5, Mar. 2021, doi: [10.1172/jci.insight.145934](https://doi.org/10.1172/jci.insight.145934).



- [20] A. Orlando, G. Chimienti, M. Notarnicola, and F. Russo, “The Ketogenic Diet Improves Gut-Brain Axis in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome: Impact on 5-HT and BDNF Systems.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 3, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms23031098.
- [21] G. M. Mawe and J. M. Hoffman, “Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets.,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 8, pp. 473–486, Aug. 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.105.
- [22] F. Maqoud, D. Tricarico, R. Mallamaci, A. Orlando, and F. Russo, “The Role of Ion Channels in Functional Gastrointestinal Disorders (FGID): Evidence of Channelopathies and Potential Avenues for Future Research and Therapeutic Targets.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 13, Jul. 2023, doi: 10.3390/ijms241311074.



TIMELINE

Obiettivo	Milestone	6	12	18	24	30	36
1	Valutazione dell'espressione differenziale dei geni codificanti per i canali ionici e canali AQP, e del profilo delle varianti genetiche e delle mutazioni nei tessuti del modello animale, allo scopo della determinazione di biomarcatori e bersagli farmacologici.						
	Valutazione del profilo elettrofisiologico funzionale dei canali ionici nelle cellule da coltura primaria del modello animale di IBS.						
	Valutazione <i>in vitro</i> dell'impatto della modulazione dell'attività dei canali ionici e/ o AQP identificati nel punto 1 sulle cellule intestinali.						
2	Valutazione <i>in vitro</i> degli effetti modulanti sui canali ionici dei prodotti della microflora batterica (LPS, PUFA, Istamina, SCFA, tossine), dei parametri immunitari, PH, acidità, citochine di origine sistemica e fecale, e i componenti specifici nella dieta.						

	Determinazione del profilo elettrofisiologico dei canali in risposta alla modulazione sopra citata.						
	Correlazione della modulazione dei canali ionici con i prodotti sopra elencati con l'effetto sulle cellule intestinali.						
3	Valutazione dell'effetto benefico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> nel modello animale di IBS delle molecole o farmaci che agiscono sulle proteine eventualmente identificati nell'obiettivo 1 e 2.						
	Valutazione del profilo tossicologico tessuto specifico delle molecole testate ed eventuale sviluppo di antagonisti/ agonisti o terapie biologiche specifiche che agiscono selettivamente su determinati sottotipi di canali ionici o AQP per trattare i sintomi del FGID.						
4	Disseminazione dei dati e produzione di pubblicazioni scientifiche						



TITOLO DEL PROGETTO

20. ANALISI DI FARMACO-UTILIZZAZIONE DEI FARMACI BIOLOGICI PER LE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI FINALIZZATO ALL'INDIVIDUAZIONE DELLE CLASSI DI PAZIENTI DA SOTTOPORRE A MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEL FARMACO (TDM)

2786684

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: Polignano Maurizio Gaetano

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: farmaco-utilizzazione, Immune-Mediated Inflammatory Disease (IMID), Inflammatory Bowel disease (IBD), Monitoraggio Terapeutico del Farmaco (Tdm), medicina di precisione

Area interesse: 2 Terapeutica

Tipologia progetto: Gestionale

INTRODUZIONE

Si definiscono malattie infiammatorie immuno-mediate (Immune-Mediated Inflammatory Disease, IMID) un insieme di patologie di natura flogistica a carattere cronico e progressivamente disabilitante, caratterizzate da meccanismi patogenetici di natura immunitaria (1). Rientrano in questo gruppo l'artrite reumatoide, le spondiloartropatie, l'artrite giovanile idiopatica, l'artrite psoriasica, la psoriasi, la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (2). Sebbene l'incidenza e la prevalenza di queste patologie valutate singolarmente non siano particolarmente elevate (2–5), fatta eccezione per la psoriasi (6), considerate come insieme coinvolgono invece una quota non secondaria della popolazione italiana (prevalenza 3,7%; incidenza 0,2%) (7).



Negli ultimi anni, numerosi studi hanno analizzato l'onere socioeconomico di varie malattie infiammatorie immuno-mediate (IMID) (1,2,3,4,5,6), tra cui le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD). Sono stati presentati anche gli esiti a lungo termine delle terapie disponibili, tra cui gli inibitori del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α). I costi diretti (cioè quelli sanitari) associati ad alcune IBD, come evidenziato da questi studi, sono stati tradizionalmente dominati dall'assistenza ospedaliera, soprattutto chirurgica (2,3). Con l'avvento degli inibitori del TNF- α , più efficaci nel ritardare o prevenire la necessità di interventi chirurgici e ricoveri ospedalieri e più costosi delle farmacoterapie convenzionali, la maggior parte dei costi diretti si sta spostando verso i trattamenti farmacologici (2,3). I costi sostenuti dagli individui e dalla società al di fuori di quelli legati al sistema sanitario sono definiti costi indiretti. I costi sociali riguardano fattori quali le assenze dei lavoratori, la riduzione della produttività dovuta alla disabilità e il pensionamento anticipato. La maggior parte delle IBD colpisce persone nella loro prima età lavorativa, con effetti considerevoli sul comportamento occupazionale. In effetti, i costi totali associati all'IBD sono dominati dalla disabilità lavorativa. A causa della loro natura cronica e invalidante, l'IBD influisce notevolmente sulla capacità dei pazienti di svolgere attività lavorative.

In linea con quanto riportato per altre malattie cronico-degenerative (8–11), anche per le IBD i costi diretti sanitari costituiscono un importante capitolo di spesa. Esse esercitano anche un forte impatto sociale poiché, sin dalle fasi iniziali, determinano una significativa riduzione della qualità di vita, non solo dei soggetti che ne sono affetti, ma anche dei caregiver (12–15).

L'avvento, sul finire degli anni Novanta, dei primi farmaci biologici ha rivoluzionato il trattamento delle IBD rispetto ai farmaci antinfiammatori e immunosoppressori tradizionali, caratterizzati da un'efficacia limitata nel rallentare/arrestare la progressione della malattia nelle forme più severe. I farmaci biologici si sono dimostrati efficaci nel promuovere e mantenere la remissione in un'ampia proporzione di pazienti affetti da forme non responsive ai trattamenti farmacologici convenzionali (16–18).

La disponibilità di tale armamentario terapeutico ha determinato un incremento dei costi a carico del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), ponendo il dilemma di come conciliare le esigenze di contenimento della spesa farmaceutica con il diritto alla tutela della salute di tutti i cittadini (19–21).

In questo contesto, diventa importante monitorare in modo continuo e attento, anche a livello della singola struttura ospedaliera, questa voce di spesa. In particolare, si è focalizzata l'attenzione sulle modalità di utilizzo, nella normale pratica clinica, di questi farmaci, in termini di variazioni di dosaggio. Infatti, le stesse Linee Guida (22, 23) in



ambito gastroenterologico, consigliano, laddove necessario, di incrementare il dosaggio del farmaco in caso di risposta insufficiente o di ridurre la dose se il paziente ha raggiunto una remissione clinica da almeno 6 mesi. Nella pratica clinica tali variazioni (in incremento o decremento) del dosaggio vengono effettuate incrementando la quantità di farmaco somministrata o riducendo l'intervallo di somministrazione, oppure riducendo la quantità di farmaco o prolungando l'intervallo di somministrazione.

Poiché è riconosciuto che la variazione dei dosaggi di somministrazione dei farmaci biologici può modificare i costi di trattamento (24), si ritiene opportuno condurre un'analisi di farmaco-utilizzazione finalizzata a stimare la percentuale di pazienti per i quali sia necessario ottimizzare il dosaggio dei farmaci biologici nel trattamento cronico delle IBD.

Il primo passo per ottimizzare l'efficacia di una terapia in generale, e di quella biologica in particolare, è quello di identificare quei pazienti in cui il trattamento darà i risultati migliori in termini di efficacia clinica e di riduzione di effetti collaterali. Da un lato occorrerà quindi identificare quei pazienti con caratteristiche clinico-demografiche

associate ad una migliore risposta terapeutica (e ne accenneremo più avanti). Dall'altro occorrerà ridurre al minimo il rischio degli effetti collaterali, in particolare quelli legati alle infezioni e alle neoplasie. Prima di iniziare una terapia con anticorpi anti-TNF α occorre pertanto considerare la presenza di alcune condizioni in modo da mettere in atto le precauzioni e gli accorgimenti necessari.

Ad oggi il TDM non fa parte delle attività di normale pratica clinica ma è effettuato, da alcuni Centri, solo a scopo sperimentale.

Scopo del progetto è quello di contribuire ad una ridefinizione dei percorsi diagnostici terapeutici assistenziali (PDTA) delle IBD, finalizzati ad una migliore utilizzazione dei farmaci biologici ad oggi inseriti nel prontuario farmaceutico ospedaliero, nonché aumentare le conoscenze legate ai fenotipi di pazienti/patologie che possano risultare potenzialmente no-responders alle terapie con farmaci biologici e per i quali sarà opportuno, sin da subito, iniziare un monitoraggio attivo delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci biologici utilizzati.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: Analisi retrospettiva del consumo di farmaci biologici in pazienti affetti da IBD finalizzato all'individuazione delle caratteristiche dei pazienti che



presentino maggiore variabilità nell'impiego di farmaci biologici, stratificati per farmaci utilizzati e patologie.

Obiettivo specifico 2: Validazione prospettica dei risultati dell'analisi mediante conduzione studio clinico prospettico controllato.

Obiettivo specifico 3: Individuazione delle caratteristiche, cliniche e omiche dei pazienti sottoposti a monitoraggio seriato delle concentrazioni ematiche di farmaco biologico.

Obiettivo specifico 4: Analisi dei dati e validazione dei risultati ottenuti al fine di proporre l'inserimento del TDM all'interno dei DRG regionali.

Obiettivo 1:

L'analisi, osservazionale e retrospettiva, utilizzerà come base dati il flusso informativo delle prescrizioni dei farmaci biologici dispensati secondo procedura File F dalla farmacia ospedaliera del IRCCS "Saverio de Bellis" (Piattaforma Edotto- Regione Puglia). Il periodo di osservazione iniziale coprirà un orizzonte temporale di 6 anni: da gennaio 2016 a dicembre 2022. Per tutti i pazienti oggetto di valutazione sarà garantito un periodo minimo di osservazione di 6 mesi, idoneo a verificare le modalità di utilizzo del farmaco biologico somministrato e quindi l'eventuale presenza di un fenomeno di aumento o riduzione del dosaggio. L'analisi dei dati consentirà di individuare, sulla totalità dei pazienti in trattamento con farmaci biologici per IBD il numero di quelli che, nel periodo di osservazione hanno avuto la maggiore variabilità nella gestione della terapia. Verranno quindi esaminate le caratteristiche dei suddetti pazienti (dati antropometrici, condizioni generali di salute, tipo e gravità della patologia, patologie concomitanti, etc.) per individuare fattori comuni che possano rappresentare "marcatori" predittivi della mancata risposta alla terapia e per i quali si renderebbe necessario un più attivo monitoraggio attraverso il dosaggio del farmaco nel circolo sanguigno.

Obiettivo 2:

Verificare che le caratteristiche individuate siano in effetti predittive di una necessità di un approccio più attivo nel controllo della terapia farmacologica attraverso il dosaggio della concentrazione ematica del farmaco biologico. Al fine di validare il modello predittivo si procederà alla conduzione di un trial clinico prospettico controllato in tre bracci (Braccio 1: pazienti potenzialmente beneficiati dal TDM a cui viene eseguito il monitoraggio, Braccio 2: pazienti candidabili a ricevere il TDM ma per i quali non verrà eseguito, Gruppo di controllo: pazienti non candidabili al TDM). I miglioramenti della risposta farmacologica verranno misurati in termini di riduzione degli score di malattia



(Mayo score, SES-CD, etc.). Si riterrà rilevante una differenza di almeno il 10% nel valore medio dello score preso in esame rispetto a quello misurato nel gruppo di controllo.

Obiettivo 3:

Tutti i pazienti verranno sottoposti a indagini volti a individuare le caratteristiche comuni mediante analisi di biomarcatori ematici di infiammazione (citochine pro-infiammatorie/anti-infiammatorie), nonché il profilo trascrittomico e immunitario e del microbioma fecale in modo da individuare la presenza di ulteriori fattori predittivi che forniscano, sin dall'esordio di malattia, indicazioni circa la necessità di un controllo costante delle concentrazioni ematiche di farmaco e di un conseguente più stretto controllo delle condizioni di salute.

Obiettivo 4:

Lo studio si occuperà di valutare l'impatto economico delle terapie farmacologiche impiegate nel trattamento delle IBD mediante l'applicazione di modelli di valutazione dei costi basati su un modello di Markov. Al fine di determinare gli effetti sulla spesa farmaceutica di un uso "ottimizzato" dei farmaci si utilizzerà uno specifico software (di cui si propone l'acquisto) sviluppato per effettuare sia calcoli sui dati disponibili che modelli di previsione a lungo termine.

Al termine delle attività sperimentali verranno valutati i risultati raccolti per verificare che le assunzioni derivanti dalle analisi retrospettive di farmaco utilizzazione siano state verificate, applicando, se nel caso i dovuti correttivi/approfondimenti sui dati raccolti.

BIBLIOGRAFIA

1. Shurin MR Smolkin YS Immune mediated diseases: from theory to therapy. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:3–12
2. De Waure C Sferrazza A Gualano MR et al. Epidemiologia e burden of disease dell'artrite reumatoide. *Quaderni dell'Italian Journal of Public Health* 2010;7Suppl.
3. Stolwijk C Boonen A van Tubergen A Reveille JD Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;38:441–76
4. Catanoso M Pipitone N Salvarani C Epidemiology of psoriatic arthritis. *Reumatismo* 2012;64(2):66– 70



5. Di Domenicantonio R Cappaia G Arcà M et al. Occurrence of inflammatory bowel disease in central Italy: A study based on health information systems. *Dig Liver Dis* 2014;46:777–82
6. Parisi R Symmons DP Griffiths CE et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 2013;133:377–85
7. Lucioni C Mazzi S Caporali R Analisi di budget impact del biosimilare di infliximab: lo scenario italiano. *Global & Regional Health Technology Assessment* 2015;2(2):78–88
8. Marcellusi R Viti R Capone A et al. Costi diretti e indiretti assorbiti dalle patologie HCV-indotte in Italia: stima basata su una metodologia probabilistica di Cost of Illness. *Pharmacoeconomics-Italian Research Articles*. January 2014 online.
9. Allegri M Lucioni C Mazzi S et al. Il costo sociale del dolore cronico in Italia. *Global & Regional Health Technology Assessment* 2015;2(1):33–42
10. Kobelt G Berg J Lindgren P et al. Costs and quality of life in multiple sclerosis in Europe: method of assessment and analysis. *Eur J Health Econ* 2006;7:S5–13
11. De Vol R Bedroussian A An unhealthy America: the economic burden of chronic disease. Santa Monica, CA, US The Milken Institute 2007.
12. Zink A Braun J Listing J Wollenhaupt J Disability and handicap in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis – results from the German rheumatological database. German Collaborative Arthritis Centers. *J Rheumatol* 2000;27(3):613–22
13. Borman P Toy GG Babaoğlu S et al. A comparative evaluation of quality of life and life satisfaction in patients with psoriatic and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26(3):330–334
14. Uhlig T Loge JH Kristiansen IS et al. Quantification of reduced health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis compared to the general population. *J Rheumatol* 2007;34(6):1241–7
15. Lundkvist J Kastang F Kobelt G The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ* 2008;8 Suppl 2:549–60
16. Wiens A Venson R Correr CJ et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacotherapy* 2010;30:339–53



TITOLO DEL PROGETTO

22. EFFETTI DELL'ATTIVITÀ INDOOR SULL'INTEGRITÀ E FUNZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE DI PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E FIBROMIALGIA

2790446

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: Russo Francesco

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: Attività indoor, Sindrome Fibromialgica, IBS, Permeabilità Intestinale.

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

INTRODUZIONE

Il termine “sindrome funzionale somatica” identifica diverse sindromi, i cui quadri clinici sono in parte sovrapponibili, caratterizzate prevalentemente da sintomi soggettivi, sofferenza e disabilità, non accompagnate da evidenti alterazioni organiche o di funzione. Molte sindromi funzionali somatiche hanno importanti implicazioni socioculturali e notevoli ripercussioni economiche. Tra esse si annoverano la Sindrome Fibromialgica (FM), la sindrome del colon irritabile (IBS), la sindrome da fatica cronica (CFS), il disordine da stress post-traumatico (PTSD) e la sindrome delle gambe senza riposo (RLS). I pazienti che presentano questi sintomi, così spesso disabilitanti e stressanti, consultano frequentemente medici di molte diverse specialità nel tentativo di ottenere una diagnosi, ma soprattutto una terapia adeguata ai loro disturbi organici e psicologici []. In questo contesto un approccio alternativo che preveda l'attività fisica come cardine del trattamento delle sindromi funzionali somatiche, con particolare



riferimento alla FM, può rappresentare una strategia innovativa. Analogamente, il nostro gruppo sta già valutando un protocollo di esercizio fisico di tipo aerobico per la gestione di pazienti con IBS ed i risultati preliminari, in corso di elaborazione, indicano promettenti potenzialità per tale tipo di approccio.

Clinicamente, i sintomi principali della FM sono rappresentati dal dolore muscolo-scheletrico, la stanchezza cronica, oltre al sonno non ristoratore, la rigidità mattutina, nonché la depressione e l'ansia. Inoltre, i pazienti possono soffrire di sensibilità tattile, e spesso si manifesta una "iperestesia" generalizzata con disturbi sensoriali come, ad esempio, sensibilità alla luce, ai rumori e odori. Può essere riferita una concomitante presenza di cefalea, emicrania, dolore toracico non cardiaco, pirosi gastrica, dismenorrea. Altri sintomi comprendono: parestesie, gambe senza riposo e sensazione di gonfiore dei tessuti [, ,]. Gli esami ematochimici e strumentali sono solitamente negativi.

Per la formulazione di diagnosi di FM devono essere soddisfatti contemporaneamente 3 criteri diagnostici ACR 2010-2011:

1. WPI (indice di dolore diffuso): in quante aree il paziente ha avuto dolore? Indicare la regione di dolore secondo immagine allegata al questionario (Allegato 1 "La diagnosi di Fibromialgia). Sommare il numero delle aree nelle quali il paziente ha avuto dolore durante l'ultima settimana. Punteggio: 0-19.

2. SSS (Scala di severità dei sintomi) a. Per ognuno dei sintomi elencati (Astenia, Disturbi cognitivi, Svegliarsi non riposati), indicare il grado di severità durante l'ultima settimana utilizzando la seguente scala: Nessun problema. Problemi lievi o moderati, generalmente moderati o intermittenti. Problemi moderati, considerevoli, spesso presenti e/o moderata intensità. Problemi severi, penetranti, continui, che compromettono la vita (Punteggio: 0-9). B) Indicare la presenza/assenza dei seguenti sintomo (Dolore/crampi addominali Depressione Cefalea). Punteggio: 0-3. Il punteggio SSS si ottiene sommando i due punteggi ottenuti. Punteggio totale: 0-12.

3. Un paziente soddisfa i criteri diagnostici per la fibromialgia se risponde alle 3 seguenti condizioni:

- Indice per il dolore diffuso (WPI) ≥ 7 e punteggio della scala per la severità dei sintomi (SSS) ≥ 5 OPPURE WPI 3-6 e punteggio della scala per la SSS ≥ 9
- I sintomi sono stati presenti con la stessa intensità da almeno 3 mesi
- Il paziente non ha una patologia che potrebbe spiegare in modo diverso il dolore



Le multiformi espressioni cliniche della fibromialgia rendono difficile una determinazione dello stato di severità di malattia che sia del tutto oggettiva. Uno dei problemi principali è che la multifattorialità della sindrome richiede necessariamente una valutazione composita, che consideri non solo il sintomo dolore, ma anche altre manifestazioni quali il sonno, la fatica, lo stato globale di salute, l'impatto della malattia nella vita quotidiana. Gli strumenti più utili in questo senso sono la versione modificata del Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR), il Fibromyalgia Assessment Status modified (FAS mod) e il Polysymptomatic Distress Scale (PDS).

Il FIQR comprende 21 domande, strutturate su scale di valutazione numerica comprese tra 0 e 10. I quesiti vengono suddivisi in tre distinti domini: la funzione fisica (9 quesiti), in relazione alla difficoltà di assolvere le comuni attività della vita quotidiana; lo stato di salute generale (2 quesiti), che indaga l'impatto della malattia sullo svolgimento dell'attività lavorativa; l'autovalutazione dell'intensità/gravità dei sintomi correlati alla malattia (10 quesiti).

Il FAS modificato prevede la valutazione della stanchezza e dei disturbi del sonno (su scale numeriche da 0 a 10) e del numero delle aree dolenti. Il punteggio complessivo (compreso fra 0 e 39) è ottenuto dalla somma dei tre parametri.

Il PDS è calcolato dalla somma dei punteggi conseguiti da 2 sotto-indici:

- indice di diffusione del dolore (Widespread Pain Index -WPI): corrisponde alla somma delle aree dolorose presenti (comprese da 0 a 19)
- indice di gravità dei sintomi (Symptom Severity Scale- SSS): corrisponde alla somma dei livelli di gravità di 3 sintomi (astenia, sonno non ristoratore, problemi cognitivi), misurati con una scala ordinale a 4 livelli, e alla presenza/assenza di altri 3 sintomi (emicrania, dolore / crampi addominali, depressione). Il punteggio massimo ottenibile è pari a 12.

Il PDS fa parte anche dei criteri diagnostici per la sindrome fibromialgica, come illustrato nel capitolo precedente.

I criteri descritti in modo più dettagliato sono riportati nella sezione a fine progetto (cfr. Diagnosi di Fibromialgia).

La terapia farmacologica prevede l'impiego di analgesici, miorilassanti e farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) []. Le Linee Guida specifiche sul trattamento della FM pubblicate negli ultimi anni sono concordi nel raccomandare la terapia farmacologica nell'ambito di un approccio multidisciplinare, in particolare la terapia farmacologica deve essere riservata alla situazione in cui i segni/sintomi della FM non



sono stati migliorati dalle strategie non farmacologiche (ad es., l'approccio comportamentale, dietetico, e motorio). Purtroppo, i farmaci maggiormente utilizzati nel trattamento della FM (i.e. Duloxetina e Pregabalin), non hanno soddisfatto l'EMA nella richiesta di estensione delle indicazioni al trattamento di questa patologia. L'agenzia regolatoria dopo aver valutato le prove di efficacia e sicurezza presentate a supporto della registrazione, ha deciso di non autorizzare tale estensione, ritenendo le prove presentate non sufficienti a dimostrare una differenza clinicamente rilevante rispetto al placebo in termini di sollievo dal dolore e miglioramento della qualità di vita. Inoltre, il profilo di sicurezza è stato considerato critico, considerati gli eventi avversi osservati e l'uso prolungato nel tempo che l'indicazione implica [].

Nel presente progetto, l'attenzione è rivolta proprio ai fattori che sottendono la sintomatologia dei pazienti con FM. Oltre la sintomatologia reumatologica, i pazienti fibromialgici spesso lamentano disturbi gastrointestinali (GI), in particolare quelli riconducibili all'IBS sono i più frequentemente riscontrati. Infatti, è noto come pazienti con IBS possano riferire compresenza di FM con una frequenza del 32.5%, e un range compreso tra il 26 e il 65%. []. La presenza di FM potrebbe, inoltre, contribuire alla predominanza di pazienti IBS di sesso femminile e le due sindromi condividono numerosi meccanismi fisiopatologici che riguardano la sensibilità al dolore, l'alterata regolazione del sistema nervoso autonomo, l'alterazione dell'asse intestino-cervello, nonché le alterazioni del sistema immunitario, del sistema di neurotrasmettitori, insieme ad alterazioni della permeabilità intestinale e la ricorrenza di disbiosi. Infine, non si deve tralasciare il ruolo dei fattori psicosociali che rappresentano dei potenti trigger sia per la FM che per l'IBS [7]. Nella pratica clinica, gli specialisti che gestiscono la FM, specificamente i reumatologi, considerano i sintomi IBS - in particolare il dolore addominale - come uno dei 10 più rilevanti elementi per la diagnosi di FM [].

Come accennato in precedenza, si può assistere ad una compromissione dell'integrità della parete intestinale. Diversi possono essere i meccanismi che sottendono tale fenomeno, ma sicuramente se ne possono isolare alcuni come l'alterata permeabilità intestinale (PI), l'infiammazione e la disbiosi. Tutti partecipano, in egual misura, al determinismo dell'alterazione di parete, inducendo un circolo vizioso che porta al passaggio di differenti sostanze, quali proteine proinfiammatorie, batteri, frammenti di alimenti non digeriti e altre particelle, nella sottomucosa o addirittura nel torrente ematico, provocando la conseguente attivazione del sistema immunitario e liberazione di neurotrasmettitori che svolgono effetti locali e sistemici. Tali effetti possono dare adito a patologie cardiovascolari, neurodegenerative, diabete, ma anche a patologie infiammatorie quali le artriti croniche. Una condizione di "low grade inflammation", se persiste nel tempo, può quindi portare alla comparsa di dolore e addirittura alla



cronicizzazione del sintomo, la cui estensione dipenderà dal grado di diffusione dell'infiammazione [].

Fortunatamente, a fronte di una parziale efficacia del trattamento farmacologico, vi sono evidenze che l'attività fisica regolare possa comportare un evidente miglioramento della sintomatologia del paziente con FM. Diversi studi scientifici hanno dimostrato che (re-) introdurre l'attività motoria riduce la quantità e l'entità dei problemi di salute, migliorando la sintomatologia così come la socializzazione e il tono dell'umore []. Dal punto di vista gastroenterico, la mancata attività fisica impedisce una stimolazione adeguata della muscolatura intestinale. La sedentarietà è un fattore determinante che porta, ad esempio, ad un indebolimento e ad 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 all'intestino, contrastando disturbi comuni come il reflusso gastrico e l'IBS. E' stato dimostrato infatti che il movimento favorisce e/o regolarizza la motilità gastro-intestinale (peristalsi) e il transito intestinale [].

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: valutare l'effetto dell'attività indoor sul profilo sintomatologico di pazienti ambulatoriali affetti da IBS ed FM.

Obiettivo specifico 2: analizzare, prima e dopo l'attività indoor, la funzionalità e l'integrità dell'epitelio intestinale, attraverso lo studio della PI e i livelli circolanti di zonulina e i markers di danno epiteliale cellulare [fatty-acid binding protein (I-FABP), diamine oxidase (DAO)] [], e considerare l'eventuale presenza di disbiosi intestinale. Oltre all'IBS, esiste una relazione dimostrata tra FM e PI le cui implicazioni eziopatogenetiche e terapeutiche meritano un preciso approfondimento.

Obiettivo specifico 3: dosare i livelli ematici di differenti marcatori di flogosi, inclusi IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa, LPS, e i livelli ematici di peptidi coinvolti nella regolazione della motilità GI (compresi somatostatina, motilina, serotonina, BDNF etc.) prima e dopo l'attività indoor al fine di valutare l'influenza della stessa sulla concentrazione ematica di questi peptidi.

Obiettivo specifico 4: esaminare gli outcomes dei suddetti approcci attraverso lo studio dei profili psicologici, nutrizionali e metabolici, al fine di comprendere quali alterazioni, deficit, carenze o componenti nutrizionali possono essere associate alla FM e IBS. I



risultati dello studio potrebbero essere utili ad approntare strategie di intervento per riequilibrare i cambiamenti metabolici ritrovati.

Obiettivo specifico 5: confrontare l'effetto dell'attività indoor in pazienti FM con e senza IBS sui sintomi GI ed extra GI. Come riportato nell'introduzione, esiste, infatti, un'evidente sovrapposizione fra FM e IBS, sia in termini di sintomatologia GI sia nei riguardi del profilo psicologico.

DATI PRELIMINARI

Il progetto di ricerca si basa sulle competenze 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 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) e nelle patologie funzionali GI, come ad esempio l'IBS. Queste patologie, a vario titolo, sono caratterizzate da modificazioni della PI e possono avvantaggiarsi di un approccio dietetico nonché fisico che rappresentano valide strategie. Tali aspetti sono stati già affrontati in parte in precedenti progetti di ricerca, con diverse pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con I.F. [,].

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Reclutamento Pazienti: Per questo studio si recluteranno pazienti adulti (18-65 anni) affetti da FM afferenti agli Ambulatori di "Reumatologia" e "Celiachia e Disturbi Funzionali" dell'IRCCS "S de Bellis" di Castellana Grotte. I pazienti saranno altresì reclutati tra i soggetti fibromialgici iscritti all' "Associazione Smile" di Castellana Grotte.

I criteri di esclusione saranno: la presenza di gravi patologie cardiache, epatiche, neurologiche o psichiatriche o di malattie GI diverse dall'IBS (ad esempio, malattia infiammatoria intestinale, malattia diverticolare/diverticolite) che potrebbero spiegare i sintomi attuali. I pazienti non devono aver effettuato recenti cambiamenti nella terapia per la FM (farmaci, programmi educativi, medicina alternativa, psicoterapia). La dieta a ridotto contenuto di lattosio è consentita, purché i pazienti accettino di mantenere costante questa assunzione durante il periodo di studio. L'uso di prodotti probiotici è consentito, e i pazienti che li consumano devono essere istruiti a continuare ad assumere per tutto il periodo di studio la stessa quantità precedentemente assunta

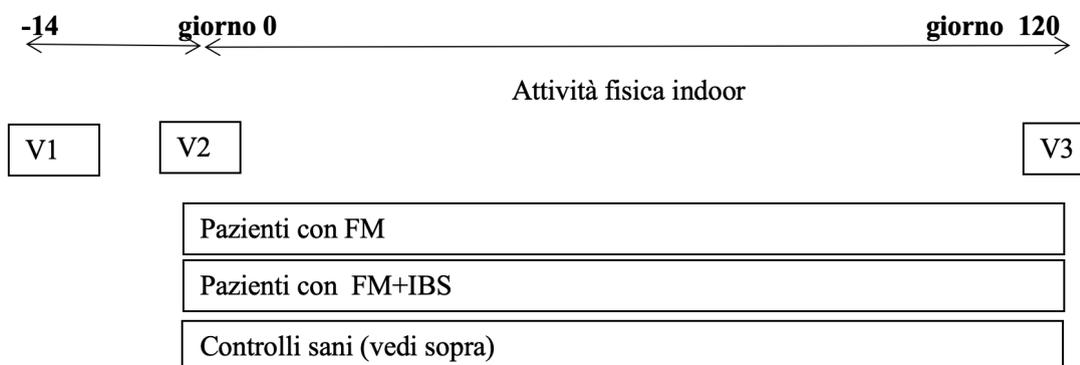


I soggetti sani saranno reclutati tra i partecipanti a concomitanti progetti di ricerca in essere presso il nostro Istituto. Questi ultimi non dovranno avere sintomatologia GI ed extra GI valutabile, nonché non saranno affetti da patologie cardiovascolari, metaboliche, endocrine, autoimmuni, psicologiche. Inoltre, non dovranno assumere terapie croniche e non avranno eseguito interventi chirurgici maggiori.

Per quanto riguarda l'attività fisica eventualmente svolta prima del reclutamento, i pazienti e i controlli risulteranno eligibili se non avranno svolto attività fisica nei 6 mesi precedenti con le seguenti caratteristiche: attività fisica di intensità moderata per ≥ 30 minuti su ≥ 5 giorni alla settimana o attività fisica di intensità vigorosa ≥ 3 volte alla settimana per ≥ 20 minuti a sessione.

Informazioni sullo stato di salute saranno ottenute durante una visita consistente in un'intervista sulla dieta attuale, sullo stile di vita, notizie anamnestiche ed un esame obiettivo. Inoltre, i parametri metabolici (glicemia, HbA1c, profilo lipidico, peso corporeo) devono rientrare nell'intervallo di valori normale.

Tutti i soggetti riceveranno informazioni verbali e scritte specifiche per lo studio prima di dare il loro consenso scritto. Il reclutamento e la valutazione dei pazienti saranno articolati nelle seguenti fasi:



V1. (Selezione). 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 e sul fatto che sinora nessun specifico trattamento si è dimostrato in grado di curare definitivamente la FM o di controllare completamente tutti i sintomi.

V2. (Verifica). Dopo la visita di screening, i pazienti torneranno per eseguire un prelievo ematico e la raccolta di campioni biologici (urine, feci) necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio. Nella stessa i pazienti completeranno i questionari



sintomatologici (IBS Symptom Severity Scale - IBS-SSS e Gastrointestinal Symptom Rating Scale – GSRS) (vedi allegati) e quelli relativi alla FM. Nel corso della visita, i pazienti completeranno anche i questionari relativi alla qualità della vita (Quality of Life - QoL).

Attraverso la valutazione del punteggio totale di IBS-SSS sarà possibile individuare un sottogruppo di pazienti FM affetti anche da IBS se il punteggio ≥ 125 (ovverosia, i sintomi IBS dovranno risultare da moderati a gravi). I criteri di inclusione e di esclusione saranno nuovamente esaminati, incluse le abitudini alimentari.

I pazienti e i controlli saranno istruiti, con il supporto di personale specializzato in attività motoria, a partecipare ad uno specifico schema di attività indoor (vedi paragrafo dedicato) prima di tornare alla visita finale prevista dallo studio.

V3. (giorno 120): (Fine periodo attività indoor). Durante questa visita i pazienti compileranno nuovamente i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e i questionari relativi alla QoL (IBS-QoL, SCL-90 e SF-36 – vedi paragrafo) così come i questionari sull'intensità dei sintomi FM. Si effettuerà la raccolta dei parametri di attività fisica e si valuteranno 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.

Attività fisica. I soggetti affetti da FM presentano una ridotta capacità aerobica e funzione muscolare (cioè forza e resistenza), nonché ridotte prestazioni funzionali (ad esempio, camminare, salire le scale) e forma fisica [, ,]. In generale, queste riduzioni sono causate dal dolore cronico diffuso che limita le capacità dell'individuo di portare a termine le attività quotidiane.

È particolarmente complesso individuare l'insieme di terapie in grado di controllare il decorso della malattia in quanto possono essere presenti svariati sintomi extrascheletrici nel malato di FM. L'esercizio fisico, però, se svolto con costanza ed a basso impatto, diventa un aiuto molto valido per interrompere il circolo vizioso del dolore cronico, aumentando la resistenza alla fatica, agendo sullo stress psicofisico, migliorando così la qualità della vita.

In generale, l'esercizio fisico migliora [14, , , , , ,]

- la flessibilità,
- la funzione neuromuscolare,
- la funzione cardiorespiratoria,



- le prestazioni funzionali,
- i livelli di pressione arteriosa (PA),
- il dolore e gli altri sintomi della FM,
- l'autoefficacia,
- la depressione,
- l'ansia

A causa del potenziale dolore e dell'esacerbazione dei sintomi, l'anamnesi e lo stato di salute del soggetto devono essere esaminati prima di condurre test da campo o di prescrivere un programma di esercizio. La valutazione oggettiva delle limitazioni fisiologiche e funzionali consentirà di eseguire i test e un allenamento ottimale.

RISULTATI ATTESI

- Informazioni circa i meccanismi di regolazione della barriera intestinale in pazienti fibromialgici con o senza IBS.
- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari alla base di una patologia complessa come la FM e utili per elaborare un possibile intervento non farmacologico mirato.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

TIMELINE

	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	Red												Red												Red											
Raccolta campioni biologici	Green												Green												Green											
Valutazione dei questionari sintomatologici	Green												Green												Green											
Diagnostica per il GI	Blue												Blue												Blue											
Valutazione Permeabilità intestinale	Blue												Blue												Blue											
Determinazione profilo lipidico	Yellow												Yellow												Yellow											
Analisi del Microbiota intestinale	Blue												Blue												Blue											
Analisi dei dati	Blue												Blue												Blue											
Preparazione dei lavori scientifici	Green												Green												Green											





LINEA DI RICERCA 3

ASSE NUTRIZIONE/MICROBIOTA E SALUTE

Responsabile Scientifico: Gianluigi Giannelli

Descrizione

Evidenze sempre maggiori propongono la nutrizione ed in senso più ampio lo stile di vita come unico strumento non soltanto per la prevenzione delle malattie croniche ma anche come approccio terapeutico per una serie di patologie di interesse gastroenterologico quali le patologie funzionali, o quelle dismetaboliche, specie a carico del fegato: la steatoepatite non alcolica (NASH). D'altra parte, è stato dimostrato che il microbiota è responsabile della alterata permeabilità intestinale, quindi di modificare l'assorbimento di metaboliti in grado sia di attivare una alterata risposta infiammatoria, sia di condizionare il metabolismo sistemico.

Obiettivi

Prevenire e/o curare le patologie croniche degenerative e funzionali, anche su base dismetabolica dell'apparato gastroenterico modulando l'omeostasi del microbiota intestinale attraverso una correzione dello stile di vita.



TITOLO DEL PROGETTO

18. EFFICACIA DELL'ESERCIZIO FISICO ABBINATO ALLA DIETA MEDITERRANEA NELLE PATOLOGIE GASTROINTESTINALI E OBESITÀ E RIPERCUSSIONI SULLA BARRIERA INTESTINALE E LO STATO DI FLOGOSI: IDENTIFICAZIONE DELL'ESERCIZIO OTTIMALE

2786681

IRG: Endocrinology, Metabolism, Nutrition and Reproductive Sciences

SS: Integrative Nutrition and Metabolic Processes - INMP

Responsabile: BIANCO ANTONELLA

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: esercizio fisico, obesità, dieta mediterranea, stili di vita, flogosi, barriera intestinale

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

INTRODUZIONE

La malattia del fegato grasso non alcolica (NAFLD) è una delle malattie epatiche più comuni che colpisce un terzo della popolazione mondiale (1).

La NAFLD comprende uno spettro di malattie tra cui il fegato grasso non alcolico (NAFL) e la steatoepatite non alcolica (NASH) in cui si sviluppano infiammazione e fibrosi. La NASH può progredire verso la cirrosi e il carcinoma epatocellulare; pertanto, la gravità della fibrosi diventa un fattore prognostico chiave. La presenza di fibrosi, piuttosto che la diagnosi di steato-epatite, è la caratteristica più rilevante associata a eventi correlati al fegato e alla mortalità.



Poiché la gestione farmacologica dei pazienti con NASH e fibrosi epatica è limitata, la modifica dello stile di vita, compresa la dieta e l'attività fisica (PA), è la prima linea di intervento per la NAFLD/NASH. Più studi hanno dimostrato un miglioramento della fibrosi quando si raggiunge una perdita di peso del 10% o più e si include un programma di PA. Un recente studio basato sulla popolazione ha osservato l'associazione tra l'adesione alla dieta mediterranea (MD) e il rischio di fibrosi epatica negli adulti con NAFLD. (2) I risultati, in accordo con studi precedenti, hanno mostrato che l'aderenza alla MD era significativamente associata a un migliore controllo metabolico, soprattutto del peso. Il peso è considerato un fattore predittivo indipendente per la progressione della steatosi verso la fibrosi epatica nella NAFLD; nei soggetti obesi con NASH, la perdita di peso ha migliorato la fibrosi. Mentre gli effetti benefici della PA sui pazienti con NAFLD sono ampiamente noti, la relazione tra PA e fibrosi epatica resta da indagare.

Sebbene l'impatto della PA sulla fibrosi epatica ed il corredo di marcatori biochimici della infiammazione sistemica non sia ancora chiaro e non sia stato ancora definito un protocollo ottimale che segua i parametri del FITT (frequenza, intensità, tipo e tempo), la PA influenza l'andamento della fibrosi nella NAFLD. Studi precedenti hanno dimostrato una riduzione della fibrosi nei soggetti obesi con NAFLD che hanno seguito un programma di interval training ad alta intensità (HIIT), con un miglioramento della rigidità epatica pari a -16,8%.

Uno studio incrociato del NASH Clinical Research Network (3) ha dimostrato che i soggetti che seguivano le raccomandazioni per un'attività fisica vigorosa (6 MET, almeno 75 min/settimana) rispetto a quelli che seguivano le raccomandazioni per un'attività fisica moderata (3- 5,9 MET, almeno 150 min/settimana) avevano maggiori benefici per la salute, tra cui una riduzione significativa della fibrosi avanzata e una minore probabilità di avere la NASH. Il laboratorio di Epidemiologia e Statistica studia da tempo gli effetti dei cambiamenti dello stile di vita sulla NAFLD. Abbiamo osservato gli effetti della dieta mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) da sola (4), dell'esercizio aerobico rispetto all'esercizio di resistenza (5) e della combinazione di dieta ed esercizio fisico (6). In particolare, abbiamo dimostrato che l'associazione tra LGIMD e l'esercizio aerobico è tra i trattamenti più efficaci per i soggetti con NAFLD (6). Inoltre, abbiamo evidenziato l'effetto sinergico degli interventi sullo stile di vita (dieta e/o programmi di esercizio fisico) sulla composizione del microbiota intestinale in pazienti con NAFLD (7) e sul metabolismo glucidico in soggetti con diversi gradi di severità di NAFLD (8).

I meccanismi che regolano la funzione di barriera intestinale sono alterati sia nell'obesità che nella NAFLD e questa situazione rappresenta un fattore aggravante in



entrambe le malattie. Il sistema gastrointestinale, con tutte le molecole coinvolte nel suo controllo, può contribuire allo sviluppo dell'obesità in diversi modi, si pensi ad esempio al ruolo degli ormoni che regolano la sazietà. In questo rapporto bidirezionale, l'infiammazione associata all'obesità può a sua volta avere un ruolo significativo nello sviluppo di disturbi gastrointestinali. (GI). Si tratta di uno stato di infiammazione cronica di basso livello che coinvolge l'intero organismo, compresi gli organi GI. Rispetto alle persone magre, l'obesità è correlata a un aumento delle citochine infiammatorie nei tessuti, attivando le risposte immunitarie e alterando le vie metaboliche cellulari. In generale, l'infiammazione cronica di basso livello e le modifiche negli ormoni metabolici, insieme alla distribuzione del tessuto adiposo nella cavità addominale, ed alterazioni delle popolazioni batteriche del microbiota intestinale rappresentano i principali fattori coinvolti nello sviluppo di patologie gastrointestinali che si sviluppano proprio attraverso alterazioni della barriera intestinale. 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). 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-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, rappresentano markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell'epitelio intestinale. Allo stesso modo, la diamina 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 intestinale.

Le alterazioni nella 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. Il triptofano è un aminoacido essenziale per l'uomo poiché non è sintetizzato nell'essere umano, i batteri commensali catabolizzano il triptofano in diversi derivati, che vengono assorbiti dall'intestino e vengono eliminati con le urine. Due di questi composti, indossil solfato (altrimenti noto come indicano) e 3-metil-indolo (scatolo), sono attualmente utilizzato per diagnosticare la disbiosi del piccolo intestino e del colon, rispettivamente.



Alla luce di queste considerazioni, il nostro studio, ha l'obiettivo di stimare l'effetto di due tipi di esercizio fisico di intensità differenti (esercizio aerobico e HIIT) uniti alla dieta mediterranea, rispetto alla sola dieta in soggetti obesi con NAFLD sui marcatori biochimici di infiammazione sistemica e dello stato di integrità e funzione della barriera intestinale.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo 1:

- Stimare l'effetto dei due programmi di Esercizio fisico di diverso tipo ed intensità associati ad una Dieta Mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) rispetto alla sola dieta sull'indice d'infiammazione sistemica (SII), sulla funzione e integrità della barriera intestinale e sui biomarcatori legati allo stato infiammatorio: TNF-alfa; IL-1, IL-6, IL-10, CK-18, PCR e VES, in pazienti con obesità e NAFLD di età compresa tra i 18 e i 65 anni dopo un intervento di 4 mesi.

Obiettivo 2:

- Valutare se l'adozione dei due programmi di Esercizio fisico di diverso tipo ed intensità associato ad una LGIMD rispetto alla sola dieta in pazienti con obesità e NAFLD possa modificare

Obiettivo 3:

- Indagare in pazienti con obesità e NAFLD, se l'adozione dei due programmi di Esercizio fisico di diverso tipo ed intensità associato ad una LGIMD rispetto alla sola dieta possa la funzione e integrità della barriera intestinale e il microbiota intestinale, in termini di abbondanze dei taxa microbici, studiando, partendo dai dati ottenuti dal 16S, le vie metaboliche del microbiota e metaboloma fecale.

Obiettivo 4:

- Valutare i miglioramenti sulla Qualità della Vita, mediante compilazione di specifici questionari, in seguito all'adozione dei due programmi di Esercizio fisico di diverso tipo ed intensità associato ad una LGIMD rispetto alla sola dieta in pazienti con obesità e NAFLD per 4 mesi.

Obiettivo 5:



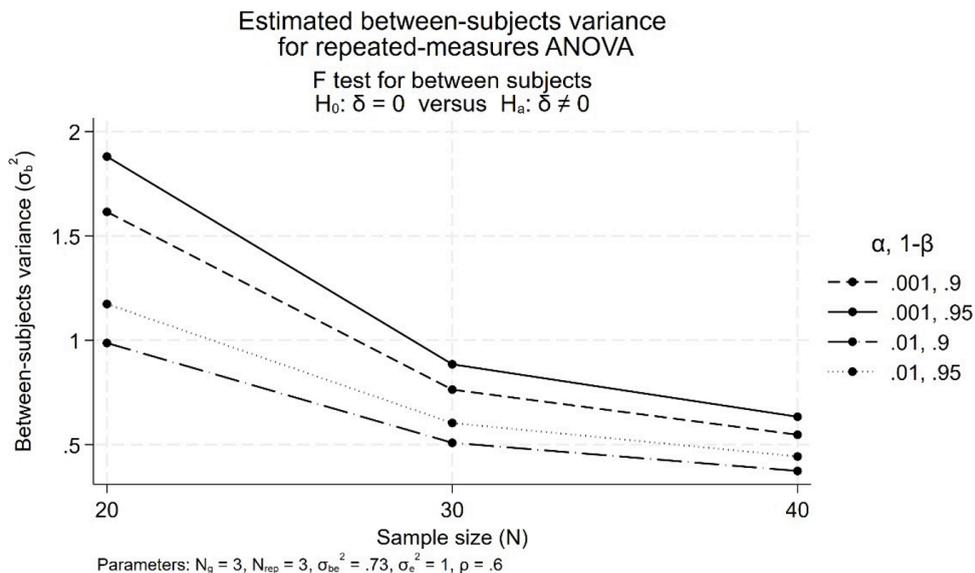
- Valutazione del profilo degli acidi grassi delle membrane degli eritrociti in seguito all'adozione dei due programmi di Esercizio fisico di diverso tipo ed intensità associato ad una LGIMD rispetto alla sola dieta.

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 obesità e NAFLD. Il laboratorio di Epidemiologia e Statistica studia da tempo gli effetti dei cambiamenti dello stile di vita sulla NAFLD. Si sono osservati gli effetti della dieta mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) da sola (4), dell'esercizio aerobico rispetto all'esercizio di resistenza (5) e della combinazione di dieta ed esercizio fisico (6). In particolare, si è dimostrato che l'associazione tra LGIMD e l'esercizio aerobico è tra i trattamenti più efficaci per i soggetti con NAFLD (6). Inoltre, è stato evidenziato l'effetto sinergico degli interventi sullo stile di vita (dieta e/o programmi di esercizio fisico) sulla composizione del microbiota intestinale in pazienti con NAFLD (7) e sul metabolismo glucidico in soggetti con diversi gradi di severità di NAFLD (8). Tali aspetti sono stati già affrontati in parte in precedenti progetti di ricerca, dando vita a differenti pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con I.F.

ANALISI STATISTICA

La dimensione del campione è stata stimata per la procedura ANOVA per misure ripetute. Sono stati considerati i cut-off descritti nella letteratura (9) ed una combinazione di Errori Probabilistici di tipo I (0.01 e 0.001) e tipo II (0.10 e 0.05) per una potenza pari a 0.90 e 0.95. Per una riduzione della varianza pari a 0.90 è stata stimata e scelta una dimensione del campione pari a $n_1=n_2=n_3=30$.



La descrizione e il confronto tra le categorie di NAFLD (assente/lieve, moderata e grave), di fibrosi (assente, moderata e avanzata) e le variabili socio-demografiche, di stile di vita, antropometriche e biologiche saranno riportate come medie (\pm SD), eseguite con il test t, mentre le variabili categoriche saranno riportate come frequenze (%) e le differenze di proporzione saranno valutate con il test χ^2 . Tutte le misure saranno in UI.

La fase modellistica dell’analisi statistica verrà eseguita tramite “Generalized Estimating Equation” (GEE). I modelli GEE sono particolarmente utili negli studi biomedici per stimare le variazioni medie dei valori dei biomarcatori controllando per le covariate e consentendo di scegliere la miglior struttura di correlazione dei dati (misure ripetute su ciascun soggetto). La selezione del modello sarà effettuata utilizzando strumenti diagnostici che consentono di scegliere l’insieme di covariate più performante, le strutture di correlazione più efficaci e tutte le opzioni SE/robust. Dopo l’applicazione dei modelli GEE verranno utilizzate i comandi di post-stima per ottenere predizioni e graficare i dati. Le analisi verranno effettuate con il Software STATA 18.0 (StataCorp. 2023. Stata Statistical Software: Release 18. College Station, TX: StataCorp LLC). In particolare verranno usati il comando ufficiale -xtgee- e la procedura -qic- che fa parte dei contributi della comunità degli utenti di Stata.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Ye Q, Zou B, Yeo YH, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non- alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Aug;
- 2) Miryan M, Darbandi M, Moradi M, et al. Relationship between the Mediterranean diet and risk of hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional analysis of the RaNCD cohort. *Front Nutr*. 2023 Feb 22;10:1062008.
- 3) Sanyal AJ, Anstee QM, Trauner M, et al. Cirrhosis regression is associated with improved clinical outcomes in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2022 May;75(5):1235-1246. doi: 10.1002/hep.32204. Epub 2022 Feb 7
- 4) Misciagna, G.; Del Pilar Diaz, M.; Caramia, D.V.; et al. Effect of a Low Glycemic Index Mediterranean Diet on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. A Randomized Controlled Clinical Trial. *J. Nutr. Health Aging* 2017, 21, 404–412.
- 5) Franco, I.; Bianco, A.; Diaz, M.D.P.; et al. Effectiveness of two physical activity programs on non- alcoholic fatty liver disease. a randomized controlled clinical trial. *Rev. Fac. Cienc. Médicas Córdoba* 2019, 76, 26.
- 6) Franco, I.; Bianco, A.; Mirizzi, A.; et al. Physical Activity and Low Glycemic Index Mediterranean Diet: Main and Modification Effects on NAFLD Score. Results from a Randomized Clinical Trial. *Nutrients* 2020, 13, 66.
- 7) Calabrese, F.M.; Disciglio, V.; Franco, I.; et al. A Low Glycemic Index Mediterranean Diet Combined with Aerobic Physical Activity Rearranges the Gut Microbiota Signature in NAFLD Patients. *Nutrients* 2022, 14, 1773.
- 8) Bianco, A.; Franco, I.; Curci, R; et al. Diet and Exercise Exert a Differential Effect on Glucose Metabolism Markers According to the Degree of NAFLD Severity. *Nutrients* 2023
- 9) Xu M, Chen R, Liu L, et al. Systemic immune-inflammation index and incident cardiovascular diseases among middle-aged and elderly Chinese adults: The Dongfeng-Tongji cohort study. *Atherosclerosis*. 2021 Apr; 323:20-29. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.02.012. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33773161.



TIMELINE

	1 anno												2 anno												3 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	Yellow												White												White											
Raccolta campioni biologici	Green												White												White											
Valutazione dei questionari	Green												White												White											
Valutazione barriera intestinale	White												Blue												Blue											
Determinazione profilo lipidomico	White												Blue												Blue											
Analisi microbiota intestinale	White												Blue												Blue											
Analisi dei dati	White												Blue												Blue											
Preparazione dei lavori scientifici	White												White												Purple											



TITOLO DEL PROGETTO

19. STUDIO PRECLINICO E CLINICO SULLA VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE NEL PAZIENTE CON OBESITÀ E MASLD. IMPATTO DELLA DIETA CHETOGENICA SUI MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI VEICOLATI DALLE VESCIOLE EXTRACELLULARI NELLE EPATOPATIE LEGATE ALLA MASLD

2786683

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: De Pergola Giovanni

Anno inizio: 2022

Durata: 36

Parole chiave: Obesità, Permeabilità intestinale, Steatosi epatica, Fibrosi epatica, NAFLD, NASH, Dieta chetogenica

Area interesse: 1 Diagnostica

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

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]. E' 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 utilizzati 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 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 tight junctions (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-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].

E' 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.



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 assumo 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

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												█	█



TITOLO DEL PROGETTO

21. CONFRONTO TRA DIGIUNO INTERMITTENTE 14/10 E DIETA MEDITERRANEA DEL SUD ITALIA NELLA VARIAZIONE DELLO SCORE DI NAFLD, DEGLI INDICI INFIAMMATORI E DEL MICROBIOTA INTESTINALE

2786682

IRG: Digestive, Kidney and Urological Systems

SS: Gastrointestinal Mucosal Pathobiology - GMPB

Responsabile: Rotolo Ornella

Anno inizio: 2024

Durata: 36

Parole chiave: NAFLD, digiuno intermittente, dieta mediterranea, microbiota intestinale, metabolomica, indici infiammatori

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica sperimentale

INTRODUZIONE

La steatosi epatica associata a disfunzione metabolica (NAFLD), è la malattia epatica cronica più comune al mondo.

La perdita di peso attraverso cambiamenti nello stile di vita è l'attuale strategia terapeutica nutrizionale basata sull'evidenza [1]. Linee guida, come l'American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), non hanno formulato alcuna raccomandazione dietetica specifica per la NAFLD. L'Associazione Europea per lo Studio del Fegato (EASL) raccomanda una composizione in macronutrienti che sia in linea con la dieta mediterranea [2]. In una recente revisione è emerso che le diete caratterizzate da grande consumo di vegetali, ridotto contenuto di acidi grassi saturi, carni lavorate e carboidrati raffinati sono la DASH, la dieta mediterranea, vegetariana e vegana [3]. Nello specifico molti studi supportano la dieta mediterranea (MD) a basso



indice glicemico (IG) [4] che è definita come una dieta caratterizzata da un elevato apporto di frutta e verdura, legumi, cereali integrali e un elevato apporto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA), ed è associata a un minor rischio di malattie croniche [5]. Infatti, sono stati dimostrati i benefici della MD a basso IG in molte patologie come sindrome metabolica, diabete mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari. Queste condizioni solitamente coesistono e hanno una relazione fisiopatologica con la NAFLD [6,7]. Inoltre, l'adesione alla MD a basso IG è stata correlata a una NAFLD meno avanzata e a un minor rischio di sviluppare sindrome metabolica [8]. La dieta MD a basso IG può migliorare la NAFLD riducendo il grasso epatico e la resistenza all'insulina [9,10].

In assenza di terapie farmacologiche approvate per il trattamento della NAFLD, le linee guida cliniche europee considerano gli interventi sullo stile di vita, compresi i cambiamenti nella dieta ed esercizio fisico regolare, come la migliore strategia terapeutica per la gestione dei pazienti con NAFLD [11,12]. Studi ancor più recenti prendono in considerazione il digiuno intermittente (Intermittent fasting, IF) come potente modulatore dell'infiammazione sistemica con conseguenze positive nella riduzione della steatosi epatica.

Il digiuno intermittente (IF) è un intervento dietetico che prevede intervalli periodici di astinenza completa o quasi completa dal cibo e dai liquidi contenenti energia. La pratica dell'IF è stata eseguita fin dai tempi delle prime civiltà, principalmente per ragioni religiose o culturali [13]. L'IF ha dimostrato i benefici per la salute senza perdita di peso nel cancro [14,15], nelle malattie cardiovascolari [15] e nelle funzioni cognitive e cerebrali [16].

Studi osservazionali hanno riportato benefici metabolici dell'IF, tra cui perdita di peso [17], miglioramento dell'emoglobina glicosilata [17], diminuzione del rischio aterogenico [18,19], miglioramento delle citochine circolanti [18,19] e proliferazione delle cellule immunitarie [20].

Altri studi interventistici hanno riportato perdita di peso [21], miglioramento della resistenza all'insulina [20], riduzione dello stress ossidativo [21,22], miglioramenti del colesterolo sierico e dei trigliceridi [22] e diminuzione dei livelli di marcatori infiammatori sistemici [23] inclusi i fattori di necrosi tumorale (TNF)- α e fattori neurotrofici derivati dal cervello [22]. Una revisione generale di 11 meta-analisi, tra cui un totale di 130 studi controllati randomizzati (RCT) con gruppi di confronto assegnati a restrizione energetica continua o dieta regolare, ha riportato che l'IF era associato alla perdita di peso, ad una riduzione della massa grassa e a miglioramenti dei lipidi nel sangue, della glicemia e dell'insulina a digiuno, della pressione sanguigna e della proteina C-reattiva [24].



Sebbene lo schema classico del digiuno intermittente preveda 16 ore di digiuno e 8 ore di feeding, sono presenti in letteratura studi che supportano l'efficacia del digiuno notturno protratto per 13 ore [25].

Infatti, uno studio osservazionale pubblicato su JAMA Oncology, ha preso in considerazione una coorte di 2.413 donne (età media 52.4 anni [DS 8.9]) sottoposte ad un digiuno di 12.5 (DS 1.7) ore a notte. Nei modelli di regressione dei rischi proporzionali di Cox con misure ripetute, il digiuno inferiore a 13 ore a notte (i 2 terzi inferiori di distribuzione di digiuno notturno) era associato ad un aumento del rischio di recidiva rispetto a 13 o più ore di digiuno (Hazard Ratio, HR 1.36; 95% CI, 1.05-1.76). Il digiuno notturno per meno di 13 ore non era associato ad un maggiore rischio di mortalità per cancro al seno (HR 1.21; 95% CI, 0.91-1.60) né ad un maggiore rischio di mortalità per tutte le cause (HR 1.22; 95% CI, 0.95-1.56). Nei modelli di regressione lineare multivariata, ogni aumento di 2 ore del digiuno notturno era associato a livelli di emoglobina A1c significativamente inferiori ($\beta = -0.37$; 95% CI, - 0.72-0.01) e a una durata più lunga del sonno notturno ($\beta = 0.20$; 95% CI, 0.14-0.26) [26].

Quindi, sulla base dei risultati di numerosi studi [27,28,29,30,31], si può ipotizzare che l'IF conferirebbe benefici metabolici e probabili benefici clinici ai pazienti con NAFLD.

Infine, studi recenti suggeriscono che la modifica del microbiota intestinale può essere una nuova strategia per prevenire o trattare la NAFLD [32,33,34].

I benefici apportati al microbiota dal largo consumo di fibre e da uno scarso apporto di proteine animali, testimoniato dall'analisi di campioni fecali, è ben noto in letteratura [35,36,37].

È stato stimato che nell'intestino sono presenti 10 volte più microrganismi (oltre 1.014) rispetto al numero di cellule umane [38].

Questi microrganismi sono associati alla regolazione del metabolismo dell'ospite, dell'immunità e delle malattie. Il microbioma intestinale svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione della NAFLD attraverso l'asse intestino-fegato [39].

L'assunzione a lungo termine di una dieta non sana (ad esempio ricca di grassi saturi o fruttosio) causa una disbiosi del microbiota intestinale che a sua volta determina la perdita della funzione di barriera e dell'omeostasi immunitaria a cui si aggiungono i componenti e i metaboliti derivati dai batteri, che vengono trasportati al fegato attraverso la vena porta [40].

Infatti, una varietà di cellule immunitarie (ad esempio, cellule di Kupffer e cellule stellate epatiche) risiedono nel fegato e fanno fronte ai fattori proinfiammatori derivati



dall'intestino come il lipopolisaccaride, il peptidoglicano e l'acido lipoteicoico (LTA). Le cellule immunitarie iperattivate, indotte dai prodotti generati dai batteri, possono provocare danni al fegato, infiammazioni e fibrosi provocando e/o accelerando così lo sviluppo della NAFLD. D'altra parte, metaboliti come gli acidi grassi a catena corta (SCFA), gli acidi biliari, i metaboliti del triptofano, i carotenoidi e i composti fenolici dei batteri intestinali possono migliorare le risposte infiammatorie, il danno ossidativo e la lipogenesi nel tessuto epatico.

Pertanto, il microbiota intestinale è considerato l'elemento chiave che regola il processo patologico della NAFLD. [41].

La diffusione di tecniche di sequenziamento high-throughput ha apportato notevoli sviluppi nello studio del genoma umano e batterico, che consentono di produrre enormi quantità di sequenze ad un costo minore e ad una velocità superiore rispetto alle tecniche precedenti. Si possono infatti ottenere fino a 20 milioni di basi in contemporanea, rendendo tali tecnologie adatte a sequenziare genomi sempre più grandi.

Inoltre, attualmente sono disponibili tecniche di metabolomica in grado di fornire una visione integrata della biochimica di un organismo complesso. Con il rapido sviluppo di tecniche molecolari come la gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa e microestrazione in fase solida (GC-MS/SPME) è possibile raccogliere una grande mole di dati sui nutrienti e metaboliti presenti nei campioni fecali ed urinari.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo 1:

Valutare la variazione dello score della steatosi epatica dopo 4 mesi di DM a basso IG e IF (14/10 DM a basso IG)

Obiettivo 2:

Valutare la variazione della composizione corporea rilevata mediante DEXA ed esame bioimpedenziometrico

Obiettivo 3:

Valutare la variazione delle analisi cliniche: glicemia, emoglobina glicata, insulina, azotemia, creatinina, colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi, urato, AST, ALT, gamma GT, proteine totali, elettroforesi proteica, PCR ad alta



sensibilità, TSH, FT3, FT4, emocromo, ferritina, vitamina D, prolattina, cortisolo, esami urine, raccolte delle urine per 12 ore, curva glicemica da carico (con 5 determinazioni: 0, 30, 60, 90, 120II) e curva insulinemica da carico (con 5 determinazioni: 0, 30, 60, 90, 120II)

Obiettivo 4:

Valutare la variazione degli indici infiammatori (IL 1, 4, 6, 8, 10, CK18 e TNF α)

Obiettivo 5:

Valutare la variazione del microbiota intestinale e dei composti volatili mediante metabolomica

DATI PRELIMINARI

Attualmente nessuna terapia farmacologica risulta efficace per la cura della NAFLD.

Linee guida cliniche europee considerano gli interventi sullo stile di vita, compresi i cambiamenti nella dieta, come la migliore strategia terapeutica per i pazienti con NAFLD.

Numerose evidenze scientifiche hanno confermato l'importante ruolo della DM a basso IG nel ridurre lo score di steatosi epatica riducendo il grasso epatico e la resistenza insulinica.

Studi ancor più recenti prendono in considerazione l'IF come potente modulatore dell'infiammazione sistemica con conseguenze positive nella riduzione della steatosi epatica.

Lo schema classico del digiuno intermittente prevede 16 ore di digiuno e 8 ore di feeding, tuttavia, sono presenti in letteratura studi che supportano l'efficacia del digiuno notturno protratto per 13 ore.

Infine, numerosi studi suggeriscono che la modifica del microbiota intestinale può essere una nuova strategia per prevenire o trattare la NAFLD.

I microrganismi dell'intestino, infatti, sono associati alla regolazione del metabolismo dell'ospite, dell'immunità e delle malattie e svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione della NAFLD attraverso l'asse intestino-fegato.



Attualmente sono disponibili tecniche di metabolomica in grado di fornire una visione integrata della biochimica di un organismo complesso.

Alla luce di questi dati della letteratura, modulare la strategia dietetica da somministrare al paziente potrebbe rivelarsi un vero e proprio mezzo terapeutico e preventivo nei confronti della NAFLD.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Trial clinico interventistico, randomizzato a 2 bracci e controllato, che prevede l'arruolamento di 60 soggetti (30 per ciascun braccio), assegnati in modo casuale ai due gruppi di studio: DM a basso IG e IF 14 ore di digiuno notturno/10 ore di feeding con DM a basso IG.

La dimensione del campione è stata calcolata in base alla variazione del punteggio di fibrosi dopo un digiuno intermittente (16/8) come descritto nell' articolo già presente in letteratura [Kord-Varkaneh H.; Salehi-Sahlabadi A.; Tinsley G.M., et al. —Effects of time-restricted feeding (16/8) combined with a low-sugar diet on the management of non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Nutrition*. 2023, 105, 111847]. È stata scelta una potenza dell'80% e un livello di significatività di 0,05 a due code e la dimensione totale del campione è stata stabilita in circa 60 pazienti, 30 per braccio.

La durata dell'intervento nutrizionale è pari a 4 mesi ed i criteri di inclusione prevedono un'età compresa tra 30 e 65 anni, NAFLD di grado medio/severo, BMI compreso tra 25 e 35 (soggetti che presentano una buona risoluzione di immagini al Fibroscan).

Sono esclusi i soggetti con diabete trattato con insulina, steatosi epatica legata al consumo di alcol, malattie infiammatorie croniche intestinali ed oncologiche, obesità viscerale che non consente una buona risoluzione delle immagini al Fibroscan, soggetti in gravi condizioni mediche che possono compromettere la partecipazione al trial, persone che seguono una dieta speciale o incapaci di seguire una dieta per motivi religiosi o di altro genere.

Al T0 e T2 (dopo 4 mesi) tutti i soggetti arruolati dovranno sottoporsi ai seguenti esami:

- rilevazione dei parametri antropometrici: peso, altezza, circonferenza vita, fianchi, collo e polso,



- valutazione della composizione corporea mediante esame bioimpedenziometrico,
- valutazione della composizione corporea mediante DEXA,
- valutazione del grado di steatosi epatica mediante fibroscan,
- analisi cliniche: glicemia, emoglobina glicata, insulina, azotemia, creatinina, colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi, urato, AST, ALT, gamma GT, proteine totali, elettroforesi proteica, PCR ad alta sensibilità, TSH, FT3, FT4, emocromo, ferritina, vitamina D, prolattina, cortisolo, esami urine, raccolte delle urine per 12 ore,
- curva da carico glicemica e insulinemica (OGTT) con 5 determinazioni ai tempi 0, 30, 60, 90, 120 minuti,
- prelievo di campione fecale e urinario per analisi del microbiota intestinale e metabolomica,
- somministrazione di uno dei due tipi di dieta (DM a basso IG e IF 14/10 DM a basso IG) (solo al T0),
- somministrazione di un diario in cui il soggetto annoterà quotidianamente gli alimenti assunti ed eventuale attività fisica praticata (solo al T0).

E' previsto un controllo intermedio, dopo 2 mesi dall'inizio dell'intervento dietetico (T1), in cui verranno valutati il diario alimentare e i parametri antropometrici al fine di rilevare l'aderenza al piano alimentare.

Verranno effettuate analisi per la caratterizzazione e studio del microbiota intestinale, metabolomica ed analisi statistiche relativa alle variazioni dei singoli parametri oggetto di studio. Nello specifico:

- l'analisi del microbiota intestinale prevede 2 step: il primo consiste nel processare i campioni biologici ed estrarne il DNA, mentre in un secondo momento esso viene sequenziato, in modo da trovare l'ordine delle basi nucleiche lungo la catena di DNA. Attualmente lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento high-throughput hanno portato a progressi notevoli in quest'ambito grazie ai principali vantaggi legati alla capacità di produrre centinaia di milioni di read in breve tempo poiché si effettua il sequenziamento di un solo gene (il 16S del DNA ribosomiale) che, essendo specifico delle specie batteriche, ne consente la discriminazione; seguirà poi l'analisi bioinformatica dei risultati delle analisi di metagenomica;



- determinazione dell'intero spettro dei metaboliti presenti in un ambiente mediante tecniche di metabolomica in grado di fornire una visione integrata della biochimica di un organismo complesso. Con il rapido sviluppo di tecniche molecolari come la gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa e microestrazione in fase solida (GC-MS/SPME) è possibile raccogliere una grande mole di dati sui nutrienti e metaboliti presenti nei campioni fecali ed urinari. Risulta interessante confrontare la produzione di composti volatili (o Short Chain Fatty Acid) prodotti in seguito alla somministrazione delle due differenti diete;
- analisi bioinformatica dei risultati di metagenomica e metabolomica;
- analisi statistica relativa alle variazioni dei singoli parametri oggetto di studio (esami clinico- laboratoristici, parametri antropometrici, score di steatosi epatica ecc..) per individuare l'effetto delle singole diete sul soggetto e le eventuali differenze esistenti tra i due tipi di interventi, verrà eseguita tramite —Generalized Estimating Equationll (GEE). I modelli GEE sono particolarmente utili negli studi biomedici per stimare le variazioni medie dei valori dei biomarcatori controllando per le covariate e consentendo di scegliere la miglior struttura di correlazione dei dati (misure ripetute su ciascun soggetto). La selezione del modello sarà effettuata utilizzando strumenti diagnostici che consentono di scegliere l'insieme di covariate più performante, le strutture di correlazione più efficaci e tutte le opzioni SE/robust. Dopo l'applicazione dei modelli GEE verranno utilizzate i comandi di post-stima per ottenere predizioni e graficare i dati. Le analisi verranno effettuate con il Software STATA 18.0.

RISULTATI ATTESI

Endpoint primario: miglioramento dello score della NAFLD dopo 4 mesi di IF 14/10.

Endpoint secondari:

- miglioramento dei parametri antropometrici dopo 4 mesi di IF 14/10;
- miglioramento delle analisi cliniche e degli indici infiammatori dopo 4 mesi di IF 14/10;
- miglioramento della composizione del microbiota intestinale e dei composti organici volatili rilevati mediante metabolomica dopo 4 mesi di IF 14/10.



BIBLIOGRAFIA

1. Zelber-Sagi S., Godos J., Salomone F. Lifestyle changes for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: A review of observational studies and intervention trials. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2016;9:392–407
2. European Association for the Study of the Liver (EASL) European Association for the Study of Diabetes (EASD) European Association for the Study of Obesity (EASO) EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2016;64:1388– 1402.
3. Hydes T.J., Ravi S., Loomba R., Gray M.E. Evidence-based clinical advice for nutrition and dietary weight loss strategies for the management of NAFLD and NASH. *Clin. Mol. Hepatol.* 2020;26:383– 400.
4. Eslamparast T., Tandon P., Raman M. Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017;9:800.
5. Bach-Faig A., Berry E.M., Lairon D., Reguant J., Trichopoulou A., Dernini S., Medina F.X., Battino M., Belahsen R., Miranda G., et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* 2011;14:2274–2284.
6. Sofi F., Macchi C., Abbate R., Gensini G.F., Casini A. Mediterranean diet and health status: An updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public Health Nutr.* 2014;17:2769–2782.
7. Franco I., Bianco A., Mirizzi A., Campanella A., Bonfiglio C., Sorino P., Notarnicola M., Tutino V., Cozzolongo R., Giannuzzi V., et al. Physical activity and low glycaemic index Mediterranean diet: Main and modification effects on NAFLD score. Results from a randomized clinical trial. *Nutrients.* 2020;13:66.
8. Cave M., Deaciuc I., Mendez C., Song Z., Joshi-Barve S., Barve S., McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: Predisposing factors and the role of nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 2007;18:184–195.
9. Trovato F.M., Catalano D., Martines G.F., Pace P., Trovato G.M. Mediterranean Diet and Non- Alcoholic Fatty Liver Disease: The Need of Extended and Comprehensive Interventions. *Clin. Nutr.* 2015;34:86–88.
10. Conlon B.A., Beasley J.M., Abersold K., Jhangiani S.S., Wylie-Rosett J. Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) *Nutrients.* 2013;5:4093–4114.



11. Sberna A.L., Bouillet B., Rouland A., Brindisi M.C., Nguyen A., Mouillot T., Duvallard L., Denimal D., Loffroy R., Vergès B., et al. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO) Clinical Practice Recommendations for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Evaluation of Their Application in People with Type 2 Diabetes. *Diabet. Med.* 2018;35:368– 375.
12. European Association for the Study of the Liver (EASL) European Association for the Study of Diabetes (EASD) European Association for the Study of Obesity (EASO) EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetologia.* 2016;59:1121–1140.
13. Malik S., Hamer R., Shabir S., Youssouf S., Morsy M., Rashid R., Waqar S., Ghouri N. Effects of fasting on solid organ transplant recipients during Ramadan—A practical guide for healthcare professionals. *Clin. Med.* 2021;21:e492–e498. doi: 10.7861/clinmed.2021-0250.
14. Clifton K.K., Ma C.X., Fontana L., Peterson L.L. Intermittent fasting in the prevention and treatment of cancer. *CA Cancer J. Clin.* 2021;71:527–546. doi: 10.3322/caac.21694.
15. Christensen R.A.G., Kirkham A.A. Time-restricted eating: A novel and simple dietary intervention for primary and secondary prevention of breast cancer and cardiovascular disease. *Nutrients.* 2021;13:3476. doi: 10.3390/nu13103476.
16. Gudden J., Arias Vasquez A., Bloemendaal M. The effects of intermittent fasting on brain and cognitive function. *Nutrients.* 2021;13:3166. doi: 10.3390/nu13093166.
17. Yeoh E.C., Zainudin S.B., Loh W.N., Chua C.L., Fun S., Subramaniam T., Sum C.F., Lim S.C. Fasting during Ramadan and associated changes in glycaemia, caloric intake and body composition with gender differences in Singapore. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2015;44:202–206. doi: 10.47102/annals-acadmedsg.V44N6p202.
18. Aksungar F.B., Eren A., Ure S., Teskin O., Ates G. Effects of intermittent fasting on serum lipid levels, coagulation status and plasma homocysteine levels. *Ann. Nutr. Metab.* 2005;49:77–82. doi: 10.1159/000084739.
19. Aksungar F.B., Topkaya A.E., Akyildiz M. Interleukin-6, C-reactive protein and biochemical parameters during prolonged intermittent fasting. *Ann. Nutr. Metab.* 2007;51:88–95. doi: 10.1159/000100954.



20. Faris M.A., Kacimi S., Al-Kurd R.A., Fararjeh M.A., Bustanji Y.K., Mohammad M.K., Salem M.L. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr. Res.* 2012;32:947–955. doi: 10.1016/j.nutres.2012.06.021.
21. Cienfuegos S., Gabel K., Kalam F., Ezpeleta M., Wiseman E., Pavlou V., Lin S., Oliveira M.L., Varady K.A. Effects of 4- and 6-h time-restricted feeding on weight and cardiometabolic health: A randomized controlled trial in adults with obesity. *Cell Metab.* 2020;32:366–378.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.018.
22. Johnson J.B., Summer W., Cutler R.G., Martin B., Hyun D.H., Dixit V.D., Pearson M., Nassar M., Telljohann R., Maudsley S., et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;42:665–674. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.005.
23. Kord-Varkaneh H.; Salehi-Sahlabadi A.; Tinsley G.M., et al. —Effects of time-restricted feeding (16/8) combined with a low-sugar diet on the management of non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Nutrition.* 2023, 105, 111847.
24. Patikorn C., Roubal K., Veettil S.K., Chandran V., Pham T., Lee Y.Y., Giovannucci E.L., Varady K.A., Chaiyakunapruk N. Intermittent fasting and obesity-related health outcomes: An umbrella review of meta-analyses of randomized clinical trials. *JAMA Netw. Open.* 2021;4:e2139558. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.39558.
25. Blandine Laferrère et al. —Calorie and Time Restriction in Weight Loss. *N Engl J Med* 2022; 386:1572-1573
26. Catherine R Marinac et al. —Prolonged Nightly Fasting and Breast Cancer Prognosis. *JAMA Oncol.* 2016 Aug 1;2(8):1049-55.
27. Cignarella F., Cantoni C., Ghezzi L., Salter A., Dorsett Y., Chen L., Phillips D., Weinstock G.M., Fontana L., Cross A.H., et al. Intermittent fasting confers protection in CNS autoimmunity by altering the gut microbiota. *Cell Metab.* 2018;27:1222–1235.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.006.
28. Varady K.A., Bhutani S., Klempel M.C., Kroeger C.M., Trepanowski J.F., Haus J.M., Hoddy K.K., Calvo Y. Alternate day fasting for weight loss in normal weight and overweight subjects: A randomized controlled trial. *Nutr. J.* 2013;12:146. doi: 10.1186/1475-2891-12-146.



29. Trepanowski J.F., Kroeger C.M., Barnosky A., Klempel M.C., Bhutani S., Hoddy K.K., Gabel K., Freels S., Rigdon J., Rood J., et al. Effect of alternate-day fasting on weight loss, weight maintenance, and cardioprotection among metabolically healthy obese adults: A randomized clinical trial. *JAMA Intern. Med.* 2017;177:930–938. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.0936.
30. Harvie M.N., Pegington M., Mattson M.P., Frystyk J., Dillon B., Evans G., Cuzick J., Jebb S.A., Martin B., Cutler R.G., et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: A randomized trial in young overweight women. *Int. J. Obes.* 2011;35:714–727. doi: 10.1038/ijo.2010.171.
31. Harvie M., Wright C., Pegington M., McMullan D., Mitchell E., Martin B., Cutler R.G., Evans G., Whiteside S., Maudsley S., et al. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v. daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. *Br. J. Nutr.* 2013;110:1534–1547. doi: 10.1017/S0007114513000792.
32. Hrnčir T., Hrnčířová L., Kverka M., Hromádka R., Machová V., Trčková E., Kostovčiková K., Kralicková P., Krejsek J., Tlaskalová-Hogenová H. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms.* 2021;9:957.
33. Liu Q., Liu S., Chen L., Zhao Z., Du S., Dong Q., Xin Y., Xuan S. Role and Effective Therapeutic Target of Gut Microbiota in NAFLD/NASH. *Exp. Ther. Med.* 2019;18:1935–1944.
34. Francesco Maria Calabrese, Vittoria Disciglio, Isabella Franco, Paolo Sorino, Caterina Bonfiglio, Antonella Bianco, Angelo Campanella, Tamara Lippolis, Pasqua Letizia Pesole, Maurizio Polignano, Mirco Vacca, Giusy Rita Caponio, Gianluigi Giannelli, Maria De Angelis, and Alberto Ruben Osella. A Low Glycemic Index Mediterranean Diet Combined with Aerobic Physical Activity Rearranges the Gut Microbiota Signature in NAFLD Patients.
35. Zimmer J et al: —A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Jan;66(1):53-60.
36. Yao CK et al: — Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Jan;43(2):181-96
37. Cotillard A. et al: —Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):585-8.



38. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 2017, 474, 1823–1836.
39. Zhu, L.; Baker, R.D.; Baker, S.S. Gut microbiome and nonalcoholic fatty liver diseases. *Pediatr. Res.* 2015, 77, 245–251.
40. Son, G.; Kremer, M.; Hines, I.N. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010, 2010.
41. Yun Ji et al. —Gut Microbiota-Derived Components and Metabolites in the Progression of Non- Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)II. *Nutrients* 2019 Jul 25;11(8):1712.

TIMELINE

1° anno:

- approvazione progetto da parte del CE competente;
- elaborazione diete;
- organizzazione -percorso clinico del paziente;
- reclutamento soggetti;
- analisi antropometriche;
- somministrazione di diete con successivo follow up;

2° anno:

- reclutamento soggetti;
- analisi antropometriche;
- somministrazione di diete e successivo follow up;
- analisi del microbiota intestinale e metabolomica;
- analisi di biochimica clinica e delle citochine proinfiammatorie;

3° anno:

- valutazione dei risultati di biochimica clinica e delle citochine proinfiammatorie;
- valutazione dei risultati relativi all'analisi del microbiota e metabolomica;
- analisi statistica;
- congresso di presentazione progetto e risultati ottenuti;
- pubblicazione dei risultati ottenuti.



TITOLO DEL PROGETTO

23. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI AGENTI SENOLITICI NATURALI IN MODELLI SPERIMENTALI DI TUMORI GASTROENTEROLOGICI

2786677

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Drug Discovery and Molecular Pharmacology - DMP

Responsabile: NOTARNICOLA MARIA

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: senescenza cellulare, senolitici, quercetina, resveratrolo

Area interesse: 6 Prevenzione

Tipologia progetto: Preclinica

INTRODUZIONE

La senescenza cellulare è un processo biologico in cui le cellule, in presenza di determinati stimoli, smettono di replicarsi e vanno incontro a modificazioni morfologiche e funzionali. Potrebbe essere considerato un meccanismo di difesa della cellula, ma sembra essere anche correlato all'invecchiamento e all'insorgenza di patologie legate all'età.

La senescenza cellulare è un processo dinamico ed eterogeneo, nel quale vengono prodotte molecole specifiche ad attività pro-infiammatoria, che accumulandosi nei tessuti possono essere la causa dell'insorgenza di patologie come l'Alzheimer, l'aterosclerosi e il cancro. Le cellule senescenti sono caratterizzate da alterazioni morfologiche, danni strutturali a carico della membrana nucleare e soprattutto possiedono aumentata espressione di citochine infiammatorie, fattori di crescita e proteasi, che insieme vanno a costituire il SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Questo specifico fenotipo cellulare, strettamente associato ad alterazioni



delle normali funzioni cellulari, è in grado di agire anche in maniera paracrina, causando danni tissutali e di organo. L'infiammazione causata da SASP ha un ruolo chiave nello sviluppo di alterazioni a livello della matrice extracellulare che portano alla progressione di patologie infiammatorie croniche e/o degenerative. Le cellule senescenti diventano più suscettibili ad ulteriori deterioramenti quando sottoposti ad agenti "stressori" e quindi non sorprende l'idea che le cellule senescenti possono essere prodotte dalla patologia stessa. Alla luce di queste premesse, l'uso di farmaci senolitici capaci di indurre selettivamente la morte delle cellule "invecchiate" (apoptosi selettiva) può essere considerato uno strumento utile per intervenire nel trattamento di patologie croniche legate all'invecchiamento. La rimozione delle cellule senescenti potrebbe evitare la loro trasformazione in senso neoplastico; i farmaci senolitici, come il dasatinib, un inibitore delle fosfochinasi, si è dimostrato abile a migliorare le funzioni cardiache e vascolari in un modello animale di invecchiamento cellulare.

Recentemente, la senescenza cellulare è stata associata alla patologia epatica umana, infatti la senescenza negli epatociti causa modificazioni del profilo secretorio delle cellule epatiche che promuove la migrazione dei macrofagi e l'aumento della steatosi. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato la stretta relazione tra senescenza epatica e progressione clinica della NAFLD in NASH, dovuto ad un aumento della sintesi del glucosio, dell'ossidazione degli acid grassi, associati ad alterazioni a carico del metabolismo lipidico. Questi dati sperimentali supportano lo sviluppo di nuove terapie che hanno come target le cellule senescenti per il trattamento della NASH.

Molti principi attivi estratti da vegetali possiedono proprietà senolitiche; la quercetina, ad esempio, principio attivo di alimenti come mele, cipolle, capperi, etc. è un potente antinfiammatorio con spiccate proprietà senolitiche. La genisteina, allo stesso modo, possiede un'ampia gamma di proprietà farmacologiche: induce l'apoptosi di cellule senescenti e l'inibizione della proliferazione cellulare. Un'altra molecola utilizzata come farmaco naturale per la rimozione delle cellule senescenti è il resveratrolo, composto presente soprattutto nell'uva e nel vino, dotato di proprietà antiossidanti.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Obiettivo specifico 1: studiare gli effetti di molecole senolitiche naturali in vitro su linee cellulari di carcinoma coloretale ed epatico. Lo studio sulle cellule in coltura consentirà di valutare, gli effetti dei senolitici sui principali biomarcatori di senescenza cellulare.



Obiettivo specifico 2: valutare gli effetti del trattamento con senolitici sull'attività metabolica delle cellule trattate, studiando in particolare i pathways coinvolti nel metabolismo lipidico, glucidico ed energetico.

Obiettivo specifico 3: valutare gli effetti dei senolitici naturali sulla variazione del profilo lipidomico della membrana cellulare.

Obiettivo 1:

La senescenza delle cellule SW480 ed HepG2 sarà indotta con Doxorubicina alla concentrazione di 75 nM. Le cellule senescenti saranno caratterizzate per i loro cambiamenti morfologici, produzione di ROS e presenza di alte concentrazioni di beta-Galattosidasi. Successivamente, le cellule saranno trattate con diverse concentrazioni di Quercetina e/o Resveratrolo (senolitici naturali, nel range 20-100 μ M) e confrontati con farmaci noti per la loro attività senolitica (Dasatinib, K5, etc.). Gli effetti dei senolitici naturali saranno valutati studiando i livelli dei principali biomarcatori di senescenza cellulare.

Obiettivo 2:

Lo studio del metabolismo cellulare dopo trattamento con i farmaci senolitici sarà effettuata studiando i principali metaboliti della glicolisi e del pathway degli acidi grassi attraverso l'analisi del metabolismo energetico della cellula.

Obiettivo 3:

Le cellule in coltura trattate con i senolitici saranno sottoposte ad analisi lipidomica per valutare possibili cambiamenti del profilo lipidomico di membrana.

DATI PRELIMINARI

E' Noto che i polifenoli sono in grado di modulare la crescita e la proliferazione di linee cellulari in coltura. Studi nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i principali polifenoli dell'olio d'oliva l'idrossitirosolo e l'oleuropeina, così come una miscela di polifenoli estratti dall'uva 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, inibendo la crescita e lo sviluppo dei polipi intestinali in topi APCMin+.



Lo studio con i polifenoli dell'uva ha dimostrato la capacità di questi polifenoli 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. Inoltre, anche il trial clinico effettuato con uva ha dimostrato che l'assunzione giornaliera di uva ha effetti antitrombotici ed è in grado di modificare il profilo lipidomico dei soggetti trattati con una dieta arricchita di uva. In particolare, l'uva nella dieta, determinava la down-regolazione dell'espressione sierica dei miRNAs, metabolicamente correlati al "metabolismo del cancro del tratto gastroenterico".

Gli studi di lipidomica effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che alterazioni del profilo lipidomico delle membrane cellulari siano strettamente associate all'aumento della loro attività proliferativa e a deficit funzionali. Pertanto, qualsiasi intervento che vada a migliorare i livelli dei lipidi nelle membrane si traduce in un vantaggio funzionale della singola cellula e dell'intero organismo.

Infine, sono in corso nel nostro laboratorio esperimenti in vitro finalizzati a studiare gli effetti di una miscela polifenolica di un sottoprodotto della filiera vitivinicola, la cosiddetta vinaccia. La vinaccia ha dimostrato attività antiproliferativa e pro-apoptotica in cellule umane di carcinoma coloretale.

Alla luce di queste evidenze sperimentali, testare le capacità senolitiche di molecole naturali, quali la quercetina che è un flavonoide appartenente alla classe dei flavonoli, e il resveratrolo, molecola polifenolica non flavonoide, sarà interessante per elucidare i meccanismi molecolari che correlano la dieta e lo sviluppo di patologie neoplastiche gastrointestinali.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Colture cellulari

Le cellule umane SW480 ed HepG2 saranno coltivate utilizzando un terreno di coltura specifico ed incubate a 37°C e in presenza del 5% di CO₂. La senescenza cellulare sarà indotta, secondo protocollo, con doxorubicina per 5 giorni.

Valutazione della senescenza cellulare

Lo studio della senescenza sarà effettuato con un pannello di anticorpi capace di individuare i principali markers di senescenza cellulare. Verranno utilizzati il Kit di Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) Sampler Kit e/o Senescence Marker Antibody Sampler Kit forniti dalla Cell Signaling.



Trattamento delle cellule

Le cellule in coltura verranno trattate con differenti concentrazioni di senolitici naturali (quercetina, resveratrolo). 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.

Vitalità cellulare

La citotossicità delle sostanze saggiate negli esperimenti verrà valutata attraverso il test colorimetrico 3-(4,5 di-metiliazol-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.

Espressione genica e proteica

L'espressione genica e proteica sarà effettuata su cellule in coltura trattate con i senolitici. Saranno valutati i livelli di mRNA e proteine delle principali proteine coinvolte nei processi di proliferazione, apoptosi e senescenza cellulare 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 l di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNASynthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). Real-time PCR viene effettuata in 25 l di volume finale contenente 2 l 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 -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 g 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).

Analisi lipidomica

L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane delle cellule in coltura. 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.

Studio del metabolismo cellulare

La valutazione del metabolismo energetico cellulare, così come lo studio dell'ossidazione degli acidi grassi e della glicolisi nelle cellule trattate saranno effettuate con una piattaforma in real-time.

Studio della morfologia cellulare

Lo studio della morfologia delle cellule SW480 ed HepG2 sarà effettuato mediante l'utilizzo di un microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FE-SEM). Le cellule vengono fissate con 3% gluteraldeide in PBS ed incubate a t.a. in 1% osmium tetroxide (OsO₄). Dopo diversi lavaggi con 0.005 M di sodium cacodylate pH 7.2, vengono idratate con acetone per 10 minuti ed adese usando 208HR High Resolution Sputter Coater. Le cellule così fissate vengono osservate al microscopio Zeiss Sigma (FE-SEM) e le immagini vengono successivamente acquisite a tensione continua (constant Extra-High Tension (EHT) in un range di valori da 1.8 a 3 mm.

Analisi statistica

I dati saranno presentati come media e SD, salvo diversa indicazione. Le differenze fra i gruppi di trattamento saranno analizzate con l'analisi della varianza (ANOVA) e Tukey's post test. I valori di $P < 0.05$ saranno considerati statisticamente significativi. Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software STATA 13.

RISULTATI ATTESI

- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari che sono alla base dell'azione dei senolitici naturali.



- Individuazione di nuovi biomarcatori di senescenza cellulare
- 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 validare l'uso di agenti senolitici naturali nel contrastare e prevenire i processi di invecchiamento cellulare che predispongono a patologie degenerative e al cancro.

BIBLIOGRAFIA

1. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-1435. doi:10.1038/nm.4000
2. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
3. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77. doi:10.1083/jcb.201708092
4. Melo Pereira S, Ribeiro R, Logarinho E. Approaches towards Longevity: Reprogramming, Senolysis, and Improved Mitotic Competence as Anti-Aging Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4):938. Published 2019 Feb 21. doi:10.3390/ijms20040938
5. Gigante I, Milella RA, Tutino V, Debiase G, Notarangelo L, Giannandrea MA, De Nunzio V, Orlando A, D'Alessandro R, Caruso MG, Notarnicola M. Autumn Royal and Egnatia grape extracts differently modulate cell proliferation in human colorectal cancer cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020, 20(10), pp. 1740–1750
6. Tutino V, Gigante I, Milella RA, De Nunzio V, Flamini R, De Rosso M, Scavo MP, Depalo N, Fanizza E, Caruso MG, Notarnicola M. Flavonoid and non-flavonoid compounds of Autumn Royal and Egnatia grape skin extracts affect membrane PUFA's profile and cell morphology in human colon cancer cell lines. *Molecules* 2020, 25, 3352
7. Tutino V, De Nunzio V, Milella RA, Gasparro M, Cisternino AM, Gigante I, Lanzilotta E, Iacovazzi PA, Lippolis A, Lippolis T, Caruso MG, Notarnicola M. Impact of fresh table



grape intake on circulating microRNAs levels in healthy subjects: a significant modulation of gastrointestinal cancer-related pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 2021, Sep 8;e2100428. doi: 10.1002/mnfr.202100428

8. Notarnicola M, De Nunzio V, Lippolis T, Tutino V, Cisternino AM, Iacovazzi PA, Milella RA, Gasparro M, Negro R, Polignano M, Caruso MG. Beneficial Effects of Table Grape Use on Serum Levels of Omega-3 Index and Liver Function: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Biomedicines* 2022,10,2310.

9. Caponio GR, Lippolis T, Tutino V, Gigante I, De Nunzio V, Milella RA, Gasparro M, Notarnicola M. Nutraceuticals: Focus on Anti-Inflammatory, Anti-Cancer, Antioxidant Properties in Gastrointestinal Tract. *Antioxidants*, 2022, 11(7), 1274.

TIMELINE

Attività	I anno												II anno												III anno											
Studi <i>in vitro</i>	[Red blocks]																																			
Studio del fenotipo senescente	[Blue blocks]																																			
Analisi Lipidomica	[Yellow blocks]																																			
Analisi dell'espressione genica e proteica	[Green blocks]																																			
Analisi del metabolismo cellulare	[Orange blocks]																																			
Analisi dei dati	[Green blocks]																																			
Preparazione lavori scientifici	[White blocks]												[Dark blue blocks]																							



TITOLO DEL PROGETTO

24. CAMBIAMENTI NEL PROFILO LIPIDOMICO, IMMUNOLOGICO E DEI MICRORNA CIRCOLANTI IN PAZIENTI CON PATOLOGIA EPATO-BILIARE, AFFETTI DA OBESITÀ PATOLOGICA SOTTOPOSTI AD UN INTERVENTO DIETETICO E/O AD INTERVENTO DI CHIRURGIA BARIATRICA.

2786675

IRG: Oncology 2 - Translational Clinical

SS: Cancer Biomarkers - CBSS

Responsabile: DONGHIA ROSSELLA

Anno inizio: 2023

Durata: 36

Parole chiave: Obesità, Chirurgia Bariatrica, Dieta, Lipidomica, miRNAs

Area interesse: 1 Diagnostica

Tipologia progetto: Clinico-Epidemiologica osservazionale

INTRODUZIONE

L'obesità è una malattia cronica caratterizzata fenotipicamente da un incremento del peso corporeo ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) ed da una serie di patologie associate [1], come ipertensione, diabete, steatosi epatica, che compromettono la sopravvivenza del paziente affetto e la sua qualità di vita. L'origine multifattoriale dell'obesità rende la sua eziopatologia difficile da gestire con un'unica strategia terapeutica, soprattutto nel lungo termine. Un trattamento appropriato affinché il paziente possa godere di un notevole calo ponderale è la chirurgia bariatrica. A questo approccio deve essere associato un team multidisciplinare (il medico, il dietista, lo psicologo e il chinesiologo) affinché il paziente possa migliorare sensibilmente il suo stato di salute.

L'obesità si associa spesso con patologie epato-biliari, diagnosticate in circa il 75% dei pazienti in sovrappeso; fra questi, il 90-95 % è affetto da NAFLD (Non-alcoholic fatty



liver disease), ma possono presentarsi anche patologie che coinvolgono la colecisti e i dotti biliari [2-5].

Ci sono pochi studi che descrivono le complicanze della chirurgia bariatrica in pazienti con tali disordini, ma sicuramente le tecniche mininvasive sono da preferire al fine di evitare complicanze, decompensazione epatica e mortalità post-operatoria [6-9].

Pertanto, le tecniche chirurgiche maggiormente adoperate nella comune pratica clinica sono i palloni intragastrici, il by pass gastrico (RYGB) e la sleeve gastrectomy [10].

La scelta del medico chirurgo è vincolante alla scelta di un intervento piuttosto che dell'altro.

Ogni paziente obeso che si affaccia dall'Ambulatorio di Nutrizione e con diagnosi di patologia epato-biliare (steatosi epatica, calcolosi della colecisti o infiammazione dei dotti biliari), diagnosticata mediante ecografia dell'addome completo e Fibroscan, verrà indirizzato verso la procedura più idonea al suo status di salute, ed ove questo non sia possibile con le tecniche chirurgiche sopra citate, si procederà con il trattamento mediante somministrazione di una dieta, perchè questi pazienti hanno un comportamento alimentare alterato (iperfagia, gorging, sweet eating, grazing, snacking).

La perdita di peso è solo l'aspetto fenotipico di un cambiamento metabolico che interessa la fisiologia cellulare.

L'analisi lipidomica sarebbe utile, in questo caso per valutare la composizione degli acidi grassi e delle membrane di un organismo, nonché comprendere l'alterazione dei pathway cellulari coinvolti [11-12]. Al profilo lipidomico si aggiungerà il dosaggio delle lipoproteine piccole e dense (sdLDL) che sono più comuni in alcune dislipidemie [13] e possono essere ossidate più facilmente rispetto alle LDL più grandi le quali LDL ossidate nella parete cellulare, stimolano la produzione di citochine e fattori di crescita, con conseguente reclutamento di monociti.

Da un punto di vista biologico, l'obesità, nonché l'alterazione del metabolismo, comporta oltre ad una variazione del pattern lipidomico, anche del pattern infiammatorio, con disregolazione delle citochine circolanti e la modificazione dell'espressione dei microRNA circolanti che dalla letteratura emerge siano associate all'insulino-resistenza nonché all'alterazione dell'omeostasi del glucosio, e regolatori della funzione endocrina [14].

Il tessuto adiposo possiede numerose funzioni endocrine, in grado di stimolare una risposta infiammatoria da parte dei linfociti T regolatori e dei macrofagi. L'attivazione di



queste cellule immunitarie determina la secrezione di citokine pro-infiammatorie, come TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 [15-18].

Nei pazienti obesi è stata osservata la presenza di elevati livelli di citokine pro-infiammatorie in circolo, che possono determinare l'instaurarsi di un microambiente infiammatorio in diversi distretti corporei [19-21]. Studi in letteratura hanno dimostrato che la perdita di peso ottenuta con metodi terapeutici dietetici o chirurgici può produrre risultati diversi nella sintesi dei mediatori dell'infiammazione [22]. Pertanto, studi futuri si rendono necessari per determinare il ruolo predittivo dei mediatori dell'infiammazione nei pazienti sottoposti a intervento di chirurgia bariatrica.

OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

L'avvio del progetto comprenderà la stesura del protocollo da sottomettere al Comitato Etico per l'eventuale approvazione.

In un primo step il paziente affetto da sovrappeso o obesità patologica, con associata patologia epato-biliare (criterio di inclusione per lo studio stesso), verrà valutato da un'equipe multidisciplinare che comprende il medico esperto in obesità, il medico chirurgo, il gastroenterologo, il dietista, il chinesiologo e lo psicologo, seguendo quanto descritto nel "Percorso diagnostico terapeutico assistenziale per il Trattamento integrato del paziente obeso (P.D.T.A)" dell'ente (Delibera n. 992/2022 del 27/10/2022). In seguito allo screening iniziale che consentirà l'inquadramento del paziente dal punto di vista clinico, sarà indirizzato alla procedura bariatrica (Gruppo 2 "Caso") oppure, se non idoneo verrà indirizzato verso un percorso nutrizionale (Gruppo 1 "Controllo"). Oltre ad una serie di valutazioni basate sulla somministrazione di questionari validati e presenti nelle linee guida, i pazienti saranno sottoposti a prelievo ematico, che oltre a valutare quantitativamente i parametri ematici clinicamente validati utili per il percorso terapeutico, andrà a valutare pattern -omici, infiammatori e i miRNA circolanti.

La scelta del prelievo ematico e di esami diagnostici è basata sulla propensione del paziente a ritornare in un tempo successivo, trattandosi di tecniche non invasive e non dolorose. Questo sarà possibile mediante il coordinamento dei laboratori e dei reparti dell'IRCCS "S. de Bellis".

La valutazione strumentale verterà su una ecografia dell'addome completa, mentre l'utilizzo del Fibroscan sarà utile per indagare in maniera più approfondita la funzionalità epatica, essendo una tecnica non invasiva e con una buona ripetibilità. Infatti, dati pubblicati in letteratura suggeriscono che la CAP (Parametro di



Attenuazione Controllata) può essere confrontata persino con la biopsia epatica per la quantificazione della steatosi [23-24].

Verranno valutati i profili lipidomici quantificandoli con il software Cromequest. Dei 37 profili, si distingueranno gli acidi grassi saturi (SFA), i monoinsaturi (MUFA) e i polinsaturi (PUFA). Inoltre la loro quantificazione, consentirà di calcolare degli indici il cui rapporto è dato da particolari acidi grassi, consentendo di valutare il corretto funzionamento delle vie biosintetiche. A questi lipidi si aggiungeranno le analisi delle lipoproteine piccole e dense (sdLDL).

La valutazione delle citochine infiammatorie circolanti, permetterà di classificare i gruppi di studio sulla base di un profilo immunologico ben distinto; inoltre, l'osservazione longitudinale dei mediatori dell'infiammazione, basata sul follow-up, fornirà ai clinici informazioni sullo stato immunologico del paziente nel tempo. I dati immunologici saranno poi associati con i parametri clinici e di laboratorio (profili lipidomici e valutazione dei miRNA circolanti) al fine di individuare una possibile interazione tra i diversi parametri. Infine, l'individuazione di biomarcatori dal possibile valore predittivo, getterà le basi per studi futuri sui pazienti obesi con patologie epato-biliari, sottoposti a intervento chirurgico, aventi come target terapeutico specifici marcatori dell'infiammazione.

La valutazione dell'espressione miRNA circolanti verrà effettuata mediante array di Real-time PCR e ci consentirà di identificare i miRNA differenzialmente espressi tra i gruppi analizzati. Si procederà, quindi, con l'individuazione dei target computazionali dei miRNA mediante diversi programmi bioinformatici. I livelli di espressione dei miRNA identificati saranno, in seguito, associati con i parametri clinici dei pazienti analizzati.

Obiettivo specifico 1: Valutare la differenza dei parametri lipidomici, immunologici e genetici nei pazienti che si sottopongono ad intervento nutrizionale (non idonei all'intervento) rispetto a coloro che verranno sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica.

Obiettivo specifico 2: Valutare la variazione dei parametri lipidomici, immunologici e genetici durante il follow-up, in entrambi i gruppi.

Obiettivo specifico 3: Valutare il valore predittivo del pattern lipidomico, immunologico e di microRNAs, dell'aumento di peso post-intervento in pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica.

Obiettivo 1: Valutare differenziale dei parametri lipidomici, immunologici e genetici.



La prima fase prevede la creazione di due gruppi indipendenti di pazienti che afferiscono all'ambulatorio di nutrizione e hanno ricevuto diagnosi di patologia epato-biliare. Questa prima valutazione che avverrà con l'ausilio del team multidisciplinare, consentirà di valutare se i pazienti saranno indirizzabili verso il trattamento nutrizionale o la chirurgia bariatrica. Avendo in letteratura una eterogeneità di lavori basati sullo studio di efficacia della chirurgia bariatrica ma pochi su specifici profili lipidici che verranno qui analizzati, la grandezza campionaria verrà stimata come 30 pazienti per braccio ovvero un campione totale di $n=60$. L'utilizzo di tale strategia consente di calcolare seppur in modo fittizio, la grandezza minima del campione, rispettando il rigore metodologico del teorema del limite centrale, consentendo cioè, di avere almeno teoricamente una distribuzione normale dei parametri analizzati.

Obiettivo 2: Valutazione dei parametri lipidomici, immunologici e genetici durante il follow-up.

La seconda fase prevederà il dosaggio del profilo lipidomico, immunologico e dei miRNA circolanti al fine di cominciare a valutare un possibile cluster di molecole nei due bracci di trattamento durante il follow-up.

Obiettivo 3: Valutazione predittiva dei patter lipidomici, immunologici e microRNA circolanti della non perdita di peso del patter lipidomico, immunologico. Dati preliminari:

L'ultima fase prevederà oltre ad incrementare i dati di follow-up dell'obiettivo 2 anche quello di costruire modelli predittivi dell'incremento di peso post-intervento nel gruppo dei pazienti trattati ed individuare tra le molecole dosate il predittore migliore o il cluster di predittori per predire questo outcome, anche mediante tecniche di machine learning.

DATI PRELIMINARI

A tutt'oggi essendo un progetto non ancora approvato dal Comitato Etico, non sono presenti dati preliminari. Si aggiunge anche l'attivazione ex-novo dell'ambulatorio di Chirurgia Bariatrica, nel nostro ente.

METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

- 1) Test diagnostici (ecografia e Fibroscan);
- 2) Quantificazione profili lipidici;



3) Quantificazione molecole immunologiche, mediante ELISA o citofluorimetria;

4) valutazione miRNA circolanti mediante array di Real-Time PCR.

I risultati verranno descritti tramite media e deviazione standard ($M \pm SD$) o mediana e range, per le variabili quantitative e mediante frequenze e percentuali (%) per le categoriche.

Per confrontare le differenze tra il gruppo di controllo e la categoria di pazienti già selezionati sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica, verrà adoperato il test del Chi-Quadrato o il test di Fisher quando necessario per le variabili categoriche e verrà valutata la scelta di un test parametrico o non parametrico, a seconda della distribuzione, per le continue.

Verranno adoperati test specifici di confronto tra i due gruppi indipendenti per valutare la differenza di espressione genica tra i geni valutati. Inoltre, grafici come gli heatmaps verranno costruiti per una rappresentazione grafica dei dati genetici a due dimensioni. L'analisi per cluster verrà adoperata per valutare la relazione e la co-regolazione della funzionalità genica.

L'analisi per misure ripetute verrà utilizzata per valutare le differenze nello stesso paziente tra il post trattamento (trattamento dietetico o intervento chirurgico) ed il baseline.

Test di correlazione (parametrici o non parametrici) verranno adoperati per testare la forza e la direzione di associazione tra le variabili misurate.

Per valutare l'associazione, nonché il valore predittivo tra i biomarcatori analizzati e la perdita di peso (Perdita di Peso Si vs Perdita di Peso No) verrà adoperato un modello di regressione logistica, la cui stima di rischio verrà espressa come Odds Ratio (OR), ed eventuali covariate verranno aggiunte per aggiustare i modelli.

Eventuali algoritmi di machine learning, sia di tipo supervisionato che non supervisionato verranno implementati per l'analisi dei dati.

Per tutte le analisi verrà valutato un intervallo di confidenza al 95% e per testare l'ipotesi nulla, si prediligerà l'analisi a due code con un livello di errore a 0.05.

Le analisi verranno effettuate con il Software STATA 17.0 (StataCorp. 2021. Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCorp LLC.) e il software RStudio ("Prairie Trillium" Release).



RISULTATI ATTESI

Questo progetto si propone di definire un profiling comune, ma anche personalizzato dei pazienti affetti da obesità patologica ed individuare terapie mirate al fine di migliorarne lo stato di salute.

INNOVAZIONI

Questo studio rappresenta un'innovazione perché è la prima volta che il nostro Istituto, grazie all'attivazione del Centro di Chirurgia Bariatrica consente di effettuare queste prestazioni e quindi studiare l'obesità patologica da un punto di vista non solo clinico ma anche chirurgico e sperimentale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bischoff S.C.; Schweilin A. Obesity therapy. Clin Nutr ESPEN. 2020;38:9-18.
- [2] Cerreto M.; Santopaolo F.; Gasbarrini A.; Maurizio Pompili M.; Ponziani F.P. Bariatric surgery and liver disease: general considerations and role of the gut-liver axis. Nutrients. 2021;13(8):2649.
- [3] Neuschwander-Tetri, B. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. In Handbook of Liver Disease, 3rd ed.; Friedman, L.S., Keeffe, E.B., Eds.; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 106–114.
- [4] Sasaki, A.; Nitta, H.; Otsuka, K.; Umemura, A.; Baba, S.; Obuchi, T.; Wakabayashi, G. Bariatric surgery and non-alcoholic fatty liver disease: Current and potential future treatments. Front. Endocrinol. 2014, 5, 164.
- [5] Subichin, M.; Clanton, J.; Makuszewski, M.; Zografakis, J.G.; Dan, A. Liver disease in the morbidly obese: A review of 1000 consecutive patients undergoing weight loss surgery. Surg. Obes. Relat. Dis. 2015, 11, 137–141.
- [6] Dallal, R.M.; Mattar, S.G.; Lord, J.L.; Watson, A.R.; Cottam, D.R.; Eid, G.M.; Hamad, G.; Rabinovitz, M.; Schauer, P.R. Results of laparoscopic gastric bypass in patients with cirrhosis. Obes. Surg. 2004, 14, 47–53.
- [7] Shimizu, H.; Phuong, V.; Maia, M.; Kroh, M.; Chand, B.; Schauer, P.R.; Brethauer, S.A. Bariatric surgery in patients with liver cirrhosis. Surg. Obes. Relat. Dis. 2013, 9, 1–6.

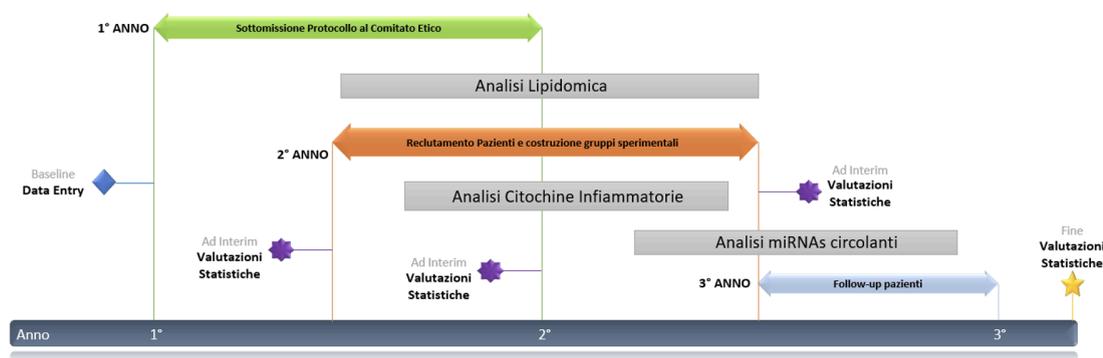


- [8] Minambres, I.; Rubio, M.A.; de Hollanda, A.; Breton, I.; Vilarrasa, N.; Pellitero, S.; Bueno, M.; Lecube, A.; Marcuello, C.; Goday, A.; et al. Outcomes of bariatric surgery in patients with cirrhosis. *Obes. Surg.* 2019, 29, 585–592.
- [9] Wolter, S.; Duprée, A.; Coelius, C.; El Gammal, A.; Kluwe, J.; Sauer, N.; Mann, O. Influence of Liver Disease on Perioperative Outcome After Bariatric Surgery in a Northern German Cohort. *Obes. Surg.* 2017, 27, 90–95.
- [10] Neff K.J.H.; le Roux C.W. Bariatric surgery: a best practice article. *J Clin Pathol.* 2013;66(2):90-8.
- [11] Lange M.; Angelidou G.; Ni Z.; Crisuolo A.; Schiller J.; Blüher M.; Ferodova M. AdipoAtlas: a reference lipidome for human white adipose tissue. *Cell Rep Med.* 2021;2(10):100407.
- [12] Mir S.A.; Chen L.; Burugupalli S.; Burla B.; Ji S.; Smith A.A.T.; Narasimhan K.; Ramasamy A.; Tan K.M.L.; Huynh K.; Giles C.; Mei D.; Wong G.; Yap F.; Tan K.H.; Collier F.; Saffery R.; Vuillermin P.; Bendt A.K.; Burgner D.; , Ponsonby A.L.; Lee Y.S.; Chong Y.S.; Gluckman P.D.; Eriksson J.G.; Meikle P.J.; Wenk M.R.; Karnani N. Population-based plasma lipidomics reveals developmental changes in metabolism and signatures of obesity risk: a mother-offspring cohort study. *BMC Med.* 2022;25;20(1):242.
- [13] Ivanova E.A., Myasoedova V.A.; Melnichenko A.A.; Grechko A.V.; Orekhov A.N. Small dense low-density lipoproteina as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;1273042.
- [14] Sangiao-Alvarellos S.; Theofilatos K.; Barwari T.; Gutmann C.; Takov K.; Singh B.; Juiz-Valiña P.; Varela-Rodríguez B. M.; Outeiriño-Blanco E.; Duregotti E.; Zampetaki A.; Lunger L.; Ebenbichler C.; Tilg H.; García-Brao M.J.; Willeit P.; Mena E.; Kiechl S.; Cordido F.; Mayr M. Metabolic recovery after weight loss surgery is reflected in serum microRNAs. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020;8(2):e001441.
- [15] Roubert A.; Gregory K.; Li Y.; Pfalzer A.C.; Li J.; Schneider S.S.; Wood R.J.; Liu Z. The influence of tumor necrosis factor- α on the tumorigenic Wnt-signaling pathway in human mammary tissue from obese women. *Oncotarget.* 2017;8(22):36127-36136.
- [16] Fischer-Posovszky P.; Wabitsch M.; Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res.* 2007;39(5):314–21.
- [17] Tilg H.; Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772–83.



- [18] Hotamisligil G.S.; Shargill N.S.; Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87–91.
- [19] Ramos E.J.; Xu Y.; Romanova I.; Middleton F.; Chen C.; Quinn R.; Inui A.; Das U.; Meguid M.M. Is obesity an inflammatory disease? *Surgery*. 2003;134(2):329–35.
- [20] Harvie M.; Hooper L.; Howell A.H. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev*. 2003;4(3):157–73.
- [21] Carmichael A.R. Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev*. 2006;7(4):333–40.
- [22] Bantulà M.; Tubita V.; Roca-Ferrer J.; Mullol J.; Valero A.; Bobolea I.; Pascal M.; de Hollanda A.; Vidal J.; Picado C.; Arismendi E. Differences in Inflammatory Cytokine Profile in Obesity-Associated Asthma: Effects of Weight Loss. *J Clin Med*. 2022;29;11(13):3782.
- [23] Franco I.; Bianco A.; Mirizzi A.; Campanella A.; Bonfiglio C.; Sorino P.; Notarnicola M.; Tutino V.; Cozzolongo R.; Giannuzzi V.; Aballay L.R.; Buongiorno C.; Bruno I.; Osella A.R. Physical activity and low glycemic index mediterranean diet: main and modification effects on NAFLD Score. Results from a randomized clinical trial. *Nutrients*. 2020;13(1):66.
- [24] Singh, S.; Muir, A.J.; Dieterich, D.T.; Falck-Ytter, Y.T. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the Role of Elastography in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2017, 152, 1544–1577.

TIMELINE





Castellana Grotte, 17/03/2025

Il Direttore Scientifico

Prof. Gianluigi Giannelli