

RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE
DELL'ANNO 2021

Direzione Scientifica

LINEA 1

MEDICINA DI PRECISIONE IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 1 - *“Medicina di precisione in Gastroenterologia”*, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell’anno 2021 sono i seguenti:

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

Responsabile: dott.ssa Silke Krol

Partecipanti: Francesco Dituri, Matteo Centonze, Nunzio Denora

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

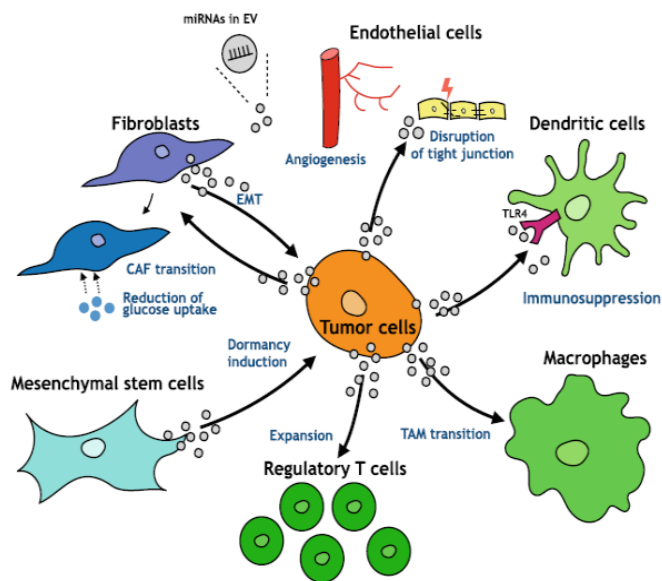


Figura. miRNA esosomiale e crosstalk nel microambiente tumorale.[2].

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

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

Obiettivi specifici dello studio:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dati preliminari:

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

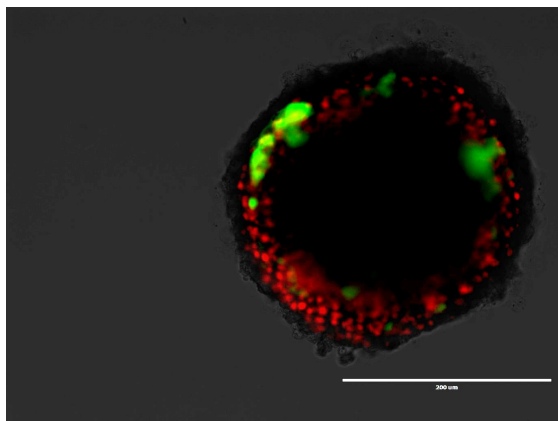


Figura: Immagine fluorescente di uno sferoide formato da cellule HepG2 dopo 5 giorni in coltura a goccia. Fluorescenza rossa: propidio ioduro; Fluorescenza verde: fluorescein acetato

Colture cellulari 3D di cellule CAF su superfici frattali

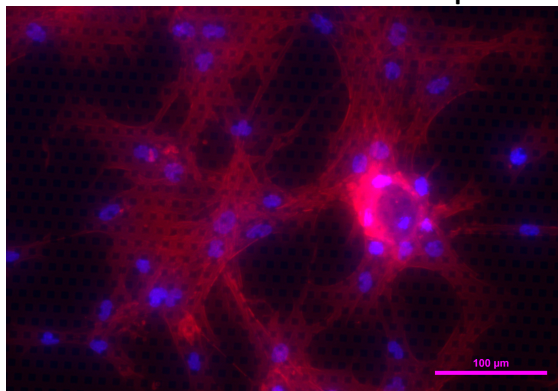


Figura: Immagini fluorescenti di CAFs che formano sferoidi multicellulari (destra) su superfici ricoperte di frattali. Fluorescenza blu: DAPI, la fluorescenza rossa è causata da filamenti di actina

Isolazione degli esosomi su TLC (thin layer chromatography)

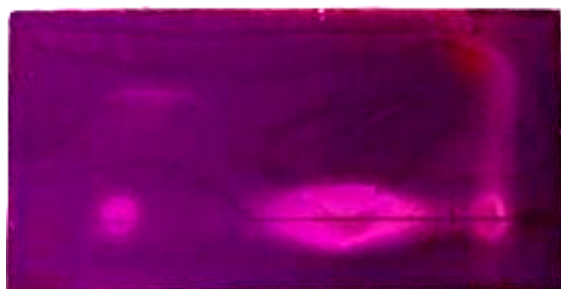


Figura: lastre di TLC dopo esposizione 2D a miscela di acqua e solventi organici. Corsia superiore: esosomi; Corsia inferiore: lipidi dopo il trattamento con Triton

Metodologie e analisi statistiche:

1. CAF isolation

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

Colture cellulari 3D

Metodo Goccia Sospesa

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

Piastre multi-wells coperte da PEG6000

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

Coltura di cellule CAF su frattali

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

Isolamento degli esosomi

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

2. Caratterizzazione degli esosomi su TLC

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

Risultati attesi:

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

Innovazioni:

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

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

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

Bibliografia:

1. Carloni V, Luong TV, Rombouts K. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: More complicated than ever. Liver Int. 2014;34: 834–843. doi:10.1111/liv.12465

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

Timeline (Gantt chart)

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

D1. Sferoidi di cellule HCC e CAF in 3D

M1. Presenza di esosomi con TGF-beta

M2. Esosomi che contengono nanoparticelle d'oro

M3. Pathway dagli esosomi con TGF-beta

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

Principal Investigator: dott.ssa Catia Messa

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

Background

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

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

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

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

le cascate molecolari attivate dal recettore. A tale riguardo, è noto che l'inibizione dei recettori VEGFR porta ad una diminuzione nei livelli della β -tubulina III (TUBB3) [19]. Pertanto, i segnali molecolari modulati dal Ramucirumab si intersecano con quelli modulati dal PTX. Il PTX esplica infatti la propria azione legandosi alla β -tubulina ed interferendo così con l'architettura dei microtubuli. Ciò determina un blocco nella fase G2/M e l'induzione del processo apoptotico, attraverso l'attivazione delle caspasi. Questo meccanismo d'azione è stato studiato in diversi tipi di cellule tumorali ed è alla base dell'attività antitumorale del PTX [20-22]. La resistenza acquisita al PTX nel GC può essere evidenziata attraverso alterazioni nei microtubuli, da ridotte risposte ai farmaci antimitotici e dalla resistenza apoptotica nonché da un'aumentata transizione epitelio-mesenchimale [EMT]. Chen e collaboratori hanno dimostrato che in cellule di GC resistenti erano rilevabili maggiori livelli di TUBB3, alterazioni nel ciclo cellulare, un'attenuata risposta ad agenti antimitotici e una maggiore capacità anti-apoptotica [23]. Si è dimostrato inoltre, che tale meccanismo d'azione è comune anche ad altri tumori resistenti alla terapia con PTX, come cancro ai polmoni, alle ovaie e alla prostata [24-27]. Tuttavia, questi studi suggeriscono che altre molecole potrebbero essere considerate come bio-marcatore nel processo di resistenza al PTX, nel carcinoma gastrico. Tra queste le proteine associate al citoscheletro o alcuni dei regolatori della transizione nella fase G2/M, come la Ciclina B1 la cui maggiore espressione viene identificata come marcatore di resistenza al PTX in alcuni tipi di tumore [28]. Inoltre, diversi studi hanno rivelato che le vie del segnale PI3K/Akt/mTOR e MAPK risultano attivate in caso di resistenza PTX [29, 30]. Alla luce di queste evidenze sperimentali e sulla base di uno studio che ha dimostrato che il blocco dei recettori VEGFR1/2 può portare a una diminuzione dei livelli di TUBB3 [19], abbiamo formulato la nostra ipotesi che vede nella combinazione di Ramucirumab e PTX la possibilità di superare possibili resistenze indotte dai due farmaci somministrati singolarmente. In particolare, la combinazione PTX e Ramucirumab potrebbe essere efficace anche in quei pazienti che hanno sviluppato insensibilità a una precedente terapia con taxani (schema FLOT). Se ciò si dimostrasse vero sarebbe di grande utilità per stabilire i criteri di eleggibilità per la terapia di seconda linea con PTX e Ramucirumab. Recentemente si è dimostrato che un altro componente della famiglia dei taxani, il Cabazitaxel, può essere impiegato nella terapia di seconda linea nei casi in casi di carcinoma prostatico che sviluppano resistenza alla terapia di prima linea con il Taxotere [26]. Si è dimostrato, *in vitro*, che il Cabazitaxel pur essendo in grado di stabilizzare i microtubuli con la stessa efficacia del Taxotere, risulta 10 volte più potente del Taxotere riuscendo così ad esplicare la propria azione antitumorale anche sulle cellule tumorali resistenti [31].

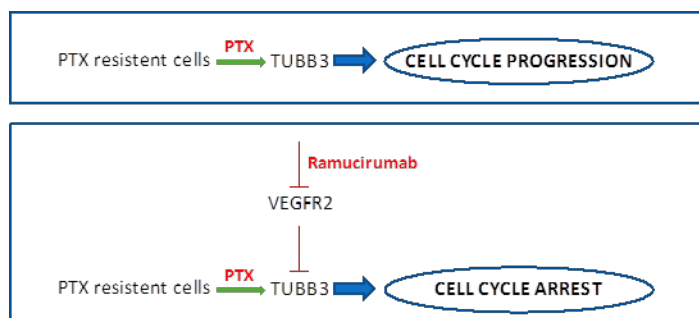
Obiettivi specifici dello studio

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

Obiettivo 1

Verranno studiati i meccanismi molecolari coinvolti nel processo di angiogenesi, la cui attivazione porta alla secrezione da parte delle cellule tumorali di quei fattori che, interagendo con il microambiente, rendono possibile la formazione di nuovi vasi. In particolare, saranno valutati gli effetti singoli e combinati di Ramucirumab e agenti chemioterapici sull'espressione delle forme del recettore VEGFR-1/3 che sembrano essere coinvolti nel controllo autocrino di alcuni processi biologici nelle cellule tumorali. Saranno altresì indagate vie angiogenetiche alternative a quella del VEGFR2 che potrebbero essere attivate dalla terapia con Ramucirumab, come ad esempio quelle del PDGF, FGF e TIE-2. Inoltre, considerando i possibili meccanismi di resistenza alla terapia con PTX verranno analizzati meccanismi quali l'organizzazione dei microtubuli, la transizione epitelio-mesenchimale, la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi

cellulare. Considerando l'ipotesi alla base del nostro studio, l'organizzazione dei microtubuli e in particolare l'espressione della TUBB3 potrebbe costituire un fattore importante nello stabilire l'efficacia della terapia combinata Ramucirumab e PTX. Nel modello da noi proposto, ad un possibile aumento dei livelli di questa proteina, dovuti a meccanismi di resistenza al PTX, si contrappone un'azione opposta del Ramucirumab che inibendo il recettore VEGFR2 andrebbe a diminuirne i livelli, rendendo possibile il superamento della resistenza indotta dal solo PTX.



Obiettivo 2

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

Metodologie

Studio *in vitro*

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

Per la proliferazione saranno utilizzati i seguenti metodi :

Saggio MTT

Dosaggio colorimetrico.

Ciclo cellulare

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

trattamenti e confrontata con quella rilevabile in seguito a trattamenti con agenti che bloccano il ciclo cellulare in fasi specifiche, come la timidina che blocca in G1/S o il nocodazolo che blocca in G2/M.

Determinazione del Ki67

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

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

Apoptosi

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

Organizzazione del citoscheletro e Migrazione cellulare

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

Invasione cellulare

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

Estrazione e quantificazione di RNA

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

Western-blotting (WB)

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

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

dei componenti al crocevia delle diverse vie del segnale o over-esprimendo gli stessi in seguito alla trasfezione di plasmidi ricombinanti recanti la proteina in esame.

Studi *in vivo*

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

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

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

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

Analisi statistica

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

Risultati attesi

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

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

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

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

Innovazioni

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

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca

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

Bibliografia

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

- 10-** Su JL, Yang PC, Shih JY. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9:209–23.
- 11-** Morelli MP, Brown AM, Pitts TM. Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2546–58.
- 12-** Fuchs CS, Tabernero J, Tomášek J, Chau I, Melichar B, Safran H, Tehfe MA, Filip D, Topuzov E, Schlittler L, Udrea AA, Campbell W, Brincaat S, Emig M, Melemed SA, Hozak RR, Ferry D, Caldwell CW, Ajani JA. Biomarker analyses in REGARD gastric/GEJ carcinoma patients treated with VEGFR2-targeted antibody ramucirumab. *Br J Cancer*. 2016 Oct 11;115(8):974-982.
- 13-** Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE (2013) Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer-Res* 73(6): 1649–1657.
- 14-** Rigamonti N, Kadioglu E, Keklikoglou I, WyserRmili C, Leow CC, De Palma M (2014) Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. *Cell Rep* 8(3): 696–706.
- 15-** Llovet JM, Pena CE, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J. Group SIS (2012) Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 18(8): 2290–2300.
- 16-** Jo MJ, Lee JH, Nam BH, Kook MC, Ryu KW, Choi IJ, Kim YW, Bae JM (2009) Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer. *Ann SurgOncol* 16(7): 2052–2057.
- 17-** U. T Hacker, L. Escalona-Espinosa, N. Consalvo, V. Goede, L. Schiffmann, S.J Scherer, P. Hedge, E. Van Cutsem, O. Coutelle and H. Büning. Evaluation of Angiopoietin-2 as a biomarker in gastric cancer: results from the randomised phase III AVAGAST trial *British Journal of Cancer* (2016) 114, 855–862.
- 18-** Ock CY, Nam AR, Lee J, Bang JH, Lee KH, Han SW, Kim TY, Im SA, Kim TY, Bang YJ, Oh DY. Prognostic implication of antitumor immunity measured by the neutrophil-lymphocyte ratio and serum cytokines and angiogenic factors in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017 Mar;20(2):254-262.
- 19-** J Hwang, J Lee, M Park, D Kim, W Bae, H Shim, S Cho and I Chung. Blockade of VEGFR-1 and VEGFR-2 Enhances Paclitaxel Sensitivity in Gastric Cancer Cells. *Yonsei Med J* 54(2):374-380, 2013.
- 20-** Yu J, Gao J, Lu Z, Li Y, Shen L. Serum levels of TUBB3 correlate with clinical outcome in Chinese patients with advanced gastric cancer receiving first-line paclitaxel plus capecitabine. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3029-34.
- 21-** He W, Zhang D, Jiang J, Liu P, Wu C. The relationships between the chemosensitivity of human gastric cancer to paclitaxel and the expressions of class III β -tubulin, MAPT, and survivin. *Med Oncol*. 2014 May;31(5):950.
- 22-** Hwang JE, Hong JY, Kim K, Kim SH, Choi WY, Kim MJ, Jung SH, Shim HJ, Bae WK, Hwang EC, Lee KH, Lee JH, Cho SH, Chung IJ. Class III β -tubulin is a predictive marker for taxane-based chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer. *BMC Cancer*. 2013 Sep 23;13:431.
- 23-** D Chen, X Lin, C Zhang, Z Liu, Z Chen, Z Li, J Wang, B Li, Y Hu, B Dong, L Shen, J Ji, J Gao and X Zhang. Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cell Death and Disease*. 2018 9:123.
- 24-** Kavallaris, M. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific β -tubulin isoforms. *J. Clin. Invest.* 100, 1282–1293 (1997).
- 25-** Duran, G. E., Wang, Y. C., Moisan, F., Francisco, E. B. & Sikic, B. I. Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-mesenchymal transition. *Br. J. Cancer* 116, 1318–1328 (2017).
- 26-** Sobue, S. et al. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 808–813 (2016).
- 27-** Gan, P. P. et al. Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of β -tubulin. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1339–1348 (2010).
- 28-** Ou, Y. et al. Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 14, 45–55 (2013).
- 29-** Liu, Z., Zhu, G., Getzenberg, R. H. & Veltri, R. W. The upregulation of PI3K/Akt and MAP kinase pathways is associated with resistance of microtubule-targeting drugs in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 116, 1341–1349 (2015).
- 30-** Zhang, W. et al. SET protein overexpression contributes to paclitaxel resistance in MCF-7/S cells through PI3K/Akt pathway. *J. Drug. Target.* 25, 255–263 (2017).
- 31-** Vrignaud, P., Semiond, S., Lejeune, P., Bouchard, H., Calvet, L., Combeau, L., Riou, GF., Commerc, A., Lavelle, F. and Bissery, MC. Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors. *Clin Cancer Res*; 19(11) June 1, 2973-2983(2013).

32- Busuttill RA, Liu DS, Di Costanzo N, Schröder J, Mitchell C, Boussioutas A. An orthotopic mouse model of gastric cancer invasion and metastasis. *Sci Rep.* 2018 Jan 16;8(1):825.

33- Prewett M1, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res.* 1999 Oct 15;59(20):5209-18.

Timeline / Prodotti finali:

Nel primo anno ci prefiggiamo:

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

Secondo anno:

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

Terzo anno:

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

Prima metà del progetto:

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

Seconda metà del progetto:

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

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

Responsabile: Prof. Cristiano Simone

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

Introduzione

Le cure per il cancro sono in continua evoluzione. Attualmente, il principale trattamento terapeutico è la chemioterapia, capace di distruggere le cellule in attiva replicazione mediante il danneggiamento del DNA. Le rotture a doppio filamento

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

SMYD3 è una lisina metiltrasferasi altamente espressa in diversi tipi di tumori [6]. Dati genomici e trascrittomici ottenuti dal Cancer Genome Atlas (TCGA) per i tumori gastrointestinali rivela che SMYD3 è alterato nel 30% dei campioni di adenocarcinoma allo stomaco, adenocarcinomi coloretali, colangiocarcinomi e tumori pancreatici. SMYD3 è stata dapprima caratterizzata come istone H3K4/H4K5 metiltrasferasi, coinvolta nell'attivazione trascrizionale quale membro del complesso dell'RNA polimerasi. I suoi geni bersaglio sono i regolatori chiave della proliferazione cellulare, del ciclo cellulare e della transizione epitelio- mesenchimale. Topi SMYD3-KO non hanno mostrato significative alterazioni dopo una completa fenotipizzazione [7]. In cellule normali, SMYD3 sembra non essere essenziale per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza. La sua elevata espressione è sufficiente per accelerare la crescita cellulare ed attiva geni coinvolti nella trasformazione tumorale e nella migrazione [8, 9].

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

Oltre alla regolazione dei processi relativi all'espressione genica, è stato recentemente scoperto che SMYD3 gioca un ruolo significativo nel cancro attraverso la modulazione di diverse cascate di segnalazione aventi un ruolo chiave. Esercita primariamente il suo ruolo oncogenico attraverso l'interazione con e la metilazione di proteine non istoniche, mediante cui transattiva specifiche vie di segnalazione cancro-specifiche [11-17]. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che il suo principale contributo nella regolazione della tumorigenesi sia ancora sconosciuto, in quanto non è basato sul sostegno della proliferazione autonoma delle cellule cancerose [18]. Inoltre, è stato proposto che il riparo via HR sia promosso dalla modulazione dell'espressione genica SMYD3-mediata [19]. Infatti, abbiamo recentemente pubblicato che SMYD3 è un interattore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA (DSBs). La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi dell'HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di DBS in risposta al danno endogeno o alla somministrazione di agenti danneggianti il DNA (come i chemioterapici) nel cancro del colon-retto e della mammella [20]. Interessante è proprio il fatto che il suo ruolo nel complesso dell'HR rende SMYD3 un valido bersaglio terapeutico e permette l'estensione dell'approccio del letale sintetico, basato sugli inibitori di PARP, ai tumori proficienti per l'HR in tessuti diversi [20]. Infatti, i tumori che presentano difetti nel pathway dell'HR dipendono dall'attivazione di PARP per preservare l'integrità genomica [21]. L'inibizione farmacologica dell'attività enzimatica di PARP attiva direttamente il pathway dell'HR come via per compensare questa disfunzione; come conseguenza le cellule con difetti nelle proteine dell'HR non possono più riparare il danno al DNA e ripristinare la replicazione, portando alla morte cellulare [22].

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

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

Obiettivi specifici dello studio:

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

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

Obiettivo specifico 1: Studio dell'espressione tissutale di SMYD3 nei tumori gastro/entero/pancreatici e caratterizzazione dei geni coinvolti nel pathway dell'HR.**Obiettivo specifico 2:** Validazione dell'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti con tumori dello stomaco, del pancreas, del colon-retto con lo scopo di identificare nuovi approcci terapeutici.

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

Obiettivo 1:

Negli ultimi anni, SMYD3 ha riscosso particolare interesse tra i ricercatori e le case farmaceutiche tanto che diversi inibitori chimici sono stati sviluppati [23,24]. Infatti SMYD3 risulta over-espresso nei tumori del colon-retto, come anche nel cancro della mammella, dell'ovaio, della prostata, del pancreas, dello stomaco, del polmone e del fegato [17,25,26]. Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica abbiamo valutato per prima cosa l'espressione dell'mRNA di SMYD3 in una coorte di pazienti provenienti dal dataset del TGCA Pan Cancer, nel quale l'analisi ha messo in evidenza che il 25-30% dei pazienti con tumori gastro/entero/pancreatici mostrano un aumento dei livelli di espressione di SMYD3. Lo studio è stato ampliato e sono stati integrati dati sulle mutazioni somatiche troncanti, delezioni, variazioni del numero di copie, eventi di silenziamento epigenetico che coinvolgono i geni di tutte le maggiori pathway del riparo del DNA. Abbiamo quindi valutato quello che viene chiamato "score HRD (*HR deficiency*)" [27] nei

pazienti riportati nel dataset con alti livelli di espressione di SMYD3 scoprendo che un'importante percentuale dei pazienti presentava alti livelli di SMYD3 e basso HRD score e sarebbero stati eligibili per la terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP. Inoltre, è stato interessante vedere che l'over-espressione dell'mRNA di SMYD3 risulta essere mutualmente esclusiva con alterazioni di perdita di funzione (*loss-of-function*) in diversi geni associati con HRD nel cancro (per esempio, TP53, BRCA1, NEIL2, HERC2, ATM, RAD51C, and BRCA2), supportando il potenziale terapeutico del protocollo che prevede la combinazione degli inibitori di SMYD3 e PARP nei tumori HR-proficienti con alti livelli di SMYD3. Questi dati sono stati associati a partire dal dataset del PanCanAtlas negli adenocarcinomi del colon-retto (COAD-READ) e del pancreas (PAAD, dove la terapia con inibitori di PARP è stata già approvata per il trattamento di pazienti con mutazioni germinali o somatiche di BRCA1/ BRCA2), confermando la correlazione e il potenziale beneficio della terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP.

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

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

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

Obiettivo 2:

L'importanza del dato di popolazione permetterà di traslare l'idea sperimentale e validare l'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli di organoidi ottenuti da pazienti con tumori dello stomaco, del pancreas, del CRC.

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

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

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

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

- Obiettivo 3:

Allo scopo di validare i potenziali protocolli terapeutici basati sulla valutazione degli alti livelli di SMYD3 e le alterazioni dei geni correlati al pathway dell'HR, gli organoidi dei pazienti ottenuti da pezzi operatori freschi dei tumori dello stomaco, del pancreas, del CRC, che ricapitolano i due differenti sottotipi tumorali identificati HR+/SMYD3 high e HR-/SMYD3 high, verranno inoculati sottocute in topi nudi atimici e sottoposti a trattamento con inibitori di SMYD3 e PARP (nei gruppi HR+/SMYD3 high) per valutare l'effetto letale sintetico e con inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale (nei gruppi HR-/SMYD3 high) per valutare l'effetto chemo-sensibilizzante dell'inibizione farmacologica di SMYD3.

- Dati preliminari:

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

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

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

18562683

Inhibition (%)

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 >95
- HCT116

0
BCI-121

+
HCT116

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

- **Metodologie e analisi statistiche:**

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

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

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

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

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

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

- Risultati attesi:

Il nostro piano sperimentale sarà focalizzato sulla caratterizzazione del coinvolgimento di SMYD3 nel HR pathway nella chemio-resistenza. Quindi, ci permetterà di valutare come attraverso l'inibizione di SMYD3 sarà possibile migliorare gli effetti della chemioterapia ed estendere l'approccio del letale sintetico ai tumori HR+. Permetterà anche di approfondire il potenziale dell'inibizione di SMYD3 per futuri trial clinici in modo da valutare l'effetto degli inibitori di SMYD3 in nuovi protocolli terapeutici.

- Innovazioni:

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

- Bibliografia:

1. Carreira A, et al. Cell. 2009;136:1032-43.
2. Venkitaraman AR, et al. Cell, 2002; 108(2):171-82.
3. Hine CM, et al. Proc Natl Acad Sci 2008;105:20810-20815.
4. Ohnishi T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1998;245:319-324.
5. Husain A, et al. Cancer Res. 1998;58:1120-1123.
6. Huang L and Xu AM. Am J Transl Res. 2017; 9(1): 1-14.
7. <http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5883840>.
8. Cock-Rada AM, et al. 2012;72:810-20.
9. Luo XG, et al. Cancer Letters. 2014;344:129-37.
10. Peserico A, et al., J Cell Physiol. 2015. 230(10):2447-2460.
11. Kim H, et al. Journal of Biological Chemistry. 2009;284:19867-77.
12. Yoshioka Y, et al. Oncotarget 2016; 7:75023-75037.
13. Kunizaki M, et al. Cancer Research. 2007;67:10759-65.
14. Yoshioka Y, et al. Cancer Medicine. 2017;6:1665-72.

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

- Timeline (Gantt chart)

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

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

Timeline

Progetto 04/2019: “Valutazione dell’efficacia della somministrazione dell’anticorpo anti-IL1 Anakinra nel modello murino di Colite Ulcerosa TNF α indipendente”

Responsabile: dott. Mauro Mastronardi

Partecipanti: Grazia Serino, Angela Tafaro, Marcello Chieppa, Antonio Lippolis

Background:

Il fine equilibrio tra tolleranza ed infiammazione presente a livello della mucosa intestinale risulta alterato nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), quali la malattia di Crohn (Crohn’s Disease, CD) e la Colite Ulcerosa (1, 2).

Nonostante il coinvolgimento fondamentale del sistema immunitario, la causa scatenante spesso non risiede in popolazioni cellulari di origine non ematopoietica (3, 4). È stato spesso dimostrato che un difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali possa scatenare una cascata di eventi che termina con l’attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario (5). L’epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50 μ m (6). Il muco è un elemento di separazione fondamentale tra le cellule epiteliali e il microbiota e rappresenta una barriera impenetrabile ai batteri commensali nella sua parte più vicina all’epitelio “lower mucus”. Il maggiore componente dello strato interno del muco è Muc2. Lo studio del Dr. Eri dell’Università’ della Tasmania in Australia (7) ha dimostrato nel modello murino proposto per il presente studio (WINNIE), come una mutazione missenso nel gene di Muc2 causi l’assenza dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale mediata dall’attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario.

Nello studio proposto studio utilizzeremo la mutazione in omozigosi, e per semplicità chiameremo questi topi Winnie-/-, come indice del genotipo mutato su entrambi gli alleli. Inoltre, analizzeremo un secondo gruppo di topi KO per il TNF α (linea 5540) (8) ed infine l’incrocio delle due linee (topi Winnie-5540).

Nel modello murino di Colite Ulcerosa (topi Winnie) abbiamo rilevato una elevata presenza dell'IL-1 β a livello del colon che aumenta ulteriormente nei topi Winnie knock-out per il TNF α (linea Winnie5540) [De Santis et al.] Questo dato suggerisce un regolazione, ad oggi sconosciuta, della produzione di IL-1 β da parte del TNF α .

Il recettore per l'IL-1 appartiene a una superfamiglia di recettori caratterizzati dalla presenza del dominio TIR (toll-IL-1 resistance) e del dominio Immunoglobulinico (9, 10). Esistono diverse possibilità di intervento farmacologico anti IL-1.

Negli ultimi 20 anni è stato studiato il ruolo del farmaco anakinra nei processi infiammatori (11). La molecola è un antagonista ricombinante del recettore per l'IL1. Andando a bloccare il sito di legame per l'IL-1 β sul rispettivo recettore, l'anakinra diminuisce l'effetto infiammatorio di questa citochina (11, 12).

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 β , è in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α . Eventuali risultati positivi saranno alla base di una richiesta di autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β per i pazienti affetti da colite ulcerosa non responder ai farmaci biologici anti-TNF α . I nostri dati preliminari, confermano l'aumento di IL-1 β osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

È stata ottenuta l'autorizzazione per la sperimentazione animale

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

Obiettivo 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 1: Lo studio prevede la somministrazione per via intraperitoneale di 0.4 mg/topo (in 0.1 ml di PBS) di anakinra giornalmente per 10 settimane, a partire dalla quarta settimana di età. Abbiamo utilizzato fonti presenti in letteratura per valutare le dosi e la via di somministrazione meno invasiva (13-16). Il farmaco ha già dimostrato di non comportare effetti avversi o sofferenza negli animali trattati. I topi verranno pesati giornalmente, verrà valutata la presenza di sangue nelle feci insieme alla valutazione di benessere generale. Alla fine del trattamento i topi saranno sacrificati, l'intestino verrà rimosso e ne verrà studiata la morfologia per valutare eventuali miglioramenti indotti dalla somministrazione del farmaco. Verranno isolati tratti intestinali dal colon mediale per permettere analisi molecolari ed i linfonodi mesenterici per le analisi della attivazione del sistema immunitario adattativo.

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 β , sia in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α .

Obiettivo 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 2: Il profilo di espressione genica del colon mediale ottenuto dai Winnie-TNF α KO e delle linee murine controllo (WT, 5540 e Winnie) verrà analizzato mediante RNAseq. In un secondo momento valuteremo il cambiamento del

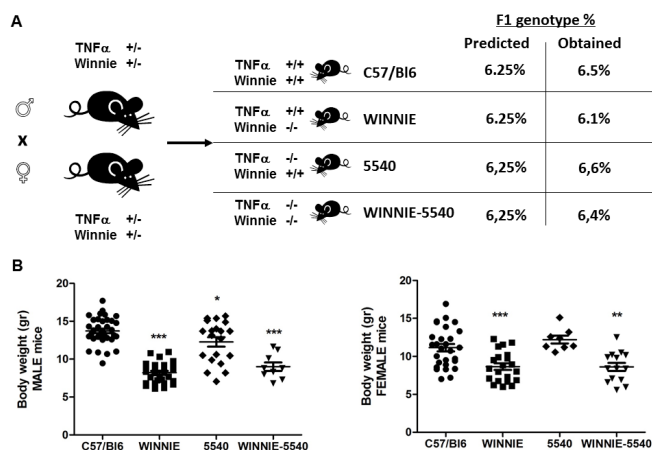
profilo di espressione indotto dal trattamento con il farmaco anti-IL-1 β . Dagli stessi campioni utilizzati per la valutazione del profilo di espressione genica, valuteremo il profilo di espressione dei miRNA, in modo tale da poter individuare miRNAs coinvolti nella patologia infiammatoria cronica TNF α -indipendente. L'eventuale identificazione di miRNA coinvolti nella modulazione dell'infiammazione intestinale nei topi trattati con farmaco anti-IL-1 β potrà consentire la nascita di nuove linee sperimentali basate sumiRNA-Based Therapeutic Strategies.

Obiettivo 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

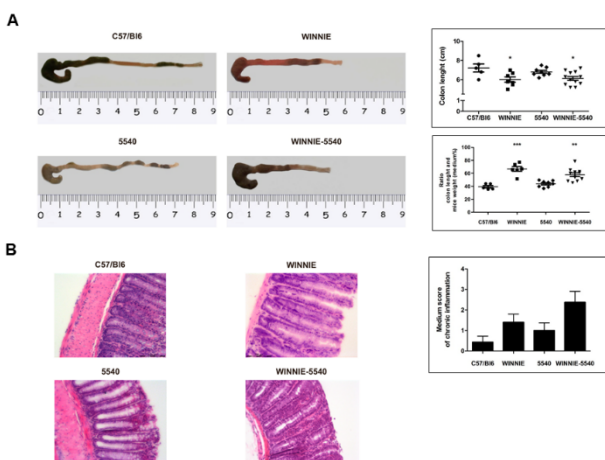
Obiettivo specifico 3:Eventuali risultati positivi ottenuti dalla sperimentazione su modello animale saranno alla base dell'analisi sistematica della banca di siero di pazienti trattati con farmaco anti-TNF α . Abbiamo già ottenuto l'autorizzazione dal comitato etico per la conservazione e la successiva analisi del siero dei pazienti affetti da colite ulcerosa e trattati con farmaco anti-TNF α .Valuteremo in parallelo il profilo citochinico dei pazienti che si sono rivelati dei responder o non responder alla terapia anti-TNF α , con particolare attenzione al livello di TNF α ed IL-1 β circolante. Se i risultati dovessero dimostrare la presenza di alti livelli di IL-1 β nel sangue dei pazienti non responder ai farmaci biologici anti-TNF α , chiederemo l'autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β in questa ristretta sottopopolazione di pazienti affetti da colite ulcerosa. I nostri dati preliminari confermano l'aumento di IL-1b osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

Dati preliminari:

Abbiamo creato e cominciamo a caratterizzare il modello Winnie-5540. Lo schema di breeding utilizzato prevede l'incrocio di topi eterozigoti per la mutazione Winnie e 5540. I topi con genotipo Winnie e Winnie-5540 sono caratterizzati da un minore peso già al momento svezzamento, questa caratteristica è evidentemente dell'infiammazione derivante dal difetto nello strato muco intestinale.



dello frutto di



Un'ulteriore analisi morfologica ha evidenziato come le caratteristiche morfo-patologiche siano dettate dalla mutazione Winnie sia a livello macroscopico che microscopico.

Infine l'analisi del profilo citochinico del siero dei Winnie-5540 ha evidenziato che in assenza di TNF α l'interlochina 1 β aumenta in maniera drammatica.

Ulteriori analisi a livello molecolare e su cellule dendritiche coltivate in coltura hanno confermato questa ipotesi portandoci a disegnare degli esperimenti specifici per analizzare l'asse tra TNF α ed IL-1 β che potrebbe rappresentare un nuovo target farmacologico per i pazienti affetti da colite ulcerosa non responder a terapia anti TNF α .

Metodologie e analisi statistiche:

Valutazione morfologiche: Gli animali verranno sacrificati secondo la tempistica stabilita, il colon espantato e fissato. Mediante colorazione con ematossilina-eosina dei campioni istologici procederemo alla valutazione del danno intestinale presente nei topi trattati o meno con farmaco.

Valutazione del profilo di espressione: Gli animali verranno sacrificati secondo la tempistica stabilita, il colon espantato ed immerso in RNAlater prima di essere congelato. Successivamente procederemo all'estrazione dell'RNA (o dei miRNA) che verranno sequenziati dai nostri collaboratori a presso l'Università degli Studi di Salerno.

Valutazione dei miRNA: Il profilo dei miRNA verrà valutato utilizzando i campioni di colon dei topi trattati o meno con anakinra. Eventuali miRNA associati alla risposta anti-infiammatoria potrebbero essere candidati come target terapeutici.

Protocollo sperimentale di somministrazione dei miRNA: In seguito all'analisi del profilo di espressione dei miRNA dei topi trattati con anakinra, valuteremo i miRNA principalmente coinvolti nella risposta protettiva e disegneremo un protocollo sperimentale basato sulla somministrazione di miRNA inhibitor o mimic in sostituzione al farmaco.

Risultati attesi:

Dal presente progetto è possibile attendersi l'individuazione di una sottopopolazione di pazienti IBD nei quali la patologia è TNF α indipendente. In questi pazienti sospettiamo che l'IL-1 β possa avere un ruolo fondamentale e per tale motivo ci aspettiamo che la somministrazione di anakinra possa portare ad un miglioramento clinico dei pazienti. Per verificare tale ipotesi utilizzeremo il nostro modello sperimentale winnie-5540 nel quale la patologia intestinale è presente anche in assenza di TNF α .

Mediante gli esperimenti su questo modello animale confidiamo di poter individuare biomarker predittivi entro la fine del secondo anno di sperimentazione. I risultati ottenuti verranno validati utilizzando il siero dei pazienti affetti da colite ulcerosa e sottoposti a trattamenti con anti-TNF α .

In caso di risultati positivi, per la fine del terzo anno ci aspettiamo di poter presentare un trial multicentrico basato sulla personalizzazione dell'intervento farmacologico utilizzando anti-IL1 β per i pazienti non responder.

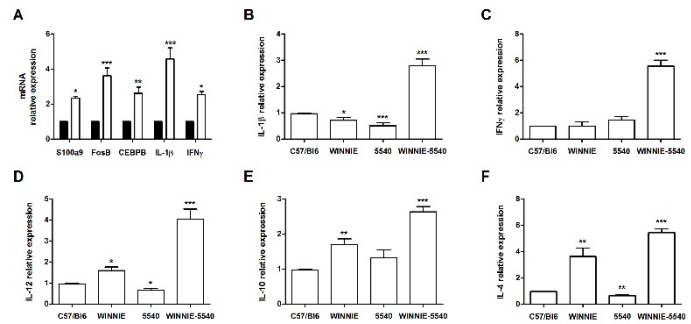
Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Abbiamo già ottenuto l'autorizzazione per la sperimentazione animale, questo riduce i tempi di attesa per l'inizio della sperimentazione. Nonostante i numerosi dati che indicano un coinvolgimento dell'IL-1 β nella colite ulcerosa di topi TNF α KO, è possibile che la somministrazione del farmaco risulti inefficace.

Nel caso di un fallimento della terapia farmacologica basata sulla somministrazione dell'IL-1 β , valuteremo interventi alternativi basati sulla somministrazione di composti bio-attivi in grado di ridurre la secrezione di citochine infiammatorie e la miRNA-Based Therapeutic Strategies attualmente in fase di validazione *in vitro* da parte della Dott.ssa Serino.

Innovazioni:

La medicina personalizzata e di precisione è considerata il nuovo standard per il trattamento clinico dei pazienti. Le nuove tecnologie a nostra disposizione e l'avvento delle multi-omiche permettono analisi che pochi anni fa erano impensabili. Nel



nostro ospedale i singoli gruppi hanno provato ad innalzare gli standard delle analisi preliminari sui pazienti in modo da meglio disegnare la terapia scelta sulle esigenze dei pazienti. Questo progetto si basa sull'espressione di IL-1 β come biomarcatore predittivo della risposta al farmaco biologico anti TNF α . Farmaci in grado di neutralizzare l'IL1 β sono già in commercio, ma non utilizzati per IBD in quanto la sperimentazione ha evidenziato una scarsa efficacia.

Sulla base dei nostri dati preliminari, riteniamo che l'uso di tale farmaco debba essere ristretto ad una popolazione IBD TNF α -indipendente e di conseguenza non responder al farmaco anti TNF α .

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

I gruppi di ricerca coinvolti nel presente progetto sono quasi esclusivamente parte dell'IRCCS "S.de Bellis". Le interazioni per progetti di ricerca sono state frequenti in questi anni, come dimostrano le prime pubblicazioni prodotte in collaborazione [18, 21].

La novità rappresentata dal nostro progetto è una interazione sistematica ed organizzata per far sì che i dati clinici e sperimentali confluiscono in un solo progetto che avrà rilevanza clinica e scientifica.

Formazione e attività tutoriali:

Per la formazione dei contrattisti coinvolti nel progetto, contiamo sulla crescita legata alle attività sperimentali necessarie per lo svolgimento del progetto ed all'presentazione dei risultati ottenuti durante il corso di almeno un congresso internazionale.

Bibliografia:

- 1) Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett.* 2014 Oct;161(2):231-5. doi: 10.1016/j.imlet.2014.04.004.
- 2) Rescigno M, Chieppa M. Gut-level decisions in peace and war. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):254-5.
- 3) Olson TS et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):541-52.
- 4) Eri R, Chieppa M. Messages from the Inside. The Dynamic Environment that Favors Intestinal Homeostasis. *Front Immunol.* 2013 Oct 9;4:323.
- 5) Fantini MC, Monteleone G, Macdonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Nov;13(11):1419-23.
- 6) Johansson ME. Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Nov;20(11):2124-31.
- 7) Eri RD et al. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol.* 2011 May;4(3):354-64.
- 8) Pasparakis M. et al. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med.* 1996 Oct 1;184(4):1397-411.
- 9) Molgora M. et al. Regulatory Role of IL-1R8 in Immunity and Disease. *Front Immunol.* 2016 Apr 20;7:149.
- 10) Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011 Apr 7;117(14):3720-32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417. Epub 2011 Feb 8.
- 11) Dinarello CA. et al. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 August ; 11(8): 633–652.
- 12) Ling YH. Et al. Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. *Pharmacol Res.* 2017 Feb;116:77-86.
- 13) Holen I. et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget.* 2016 Nov 15;7(46):75571-75584.
- 14) Ali A. et al. IL-1 Receptor Antagonist Treatment Aggravates Staphylococcal Septic Arthritis and Sepsis in Mice. *PLoS One.* 2015 Jul 2;10(7):e0131645.
- 15) Abbate A. et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation.* 2008 May 20;117(20):2670-83.
- 16) Lim WK. et al. Suppression of immune-mediated ocular inflammation in mice by interleukin 1 receptor antagonist administration. *Arch Ophthalmol.* 2005 Jul;123(7):957-63.

- 17) Nathaniel R West et al. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. Nat Med. 2017 Apr 3.
- 18) Secretory leukoprotease inhibitor is required for efficient quercetin-mediated suppression of TNF α secretion. De Santis S, Kunde D, Serino G, Galleggiante V, Caruso ML, Mastronardi M, Cavalcanti E, Ranson N, Pinto A, Campiglia P, Santino A, Eri R, Chieppa M. Oncotarget. 2016 Oct
- 19) Iron Chelators Dictate Immune Cells Inflammatory Ability: Potential Adjuvant Therapy for IBD. Chieppa M, Galleggiante V, Serino G, Massaro M, Santino A. Curr Pharm Des. 2017 Feb 15.
- 20) Secretory Leukoprotease Inhibitor (Sipi) Expression Is Required for Educating Murine Dendritic Cells Inflammatory Response Following Quercetin Exposure. De Santis S, Galleggiante V, Scandiffio L, Liso M, Sommella E, Sobolewski A, Spilotro V, Pinto A, Campiglia P, Serino G, Santino A, Notarnicola M, Chieppa M. Nutrients. 2017 Jul 6;9(7). pii: E706.
- 21) TNF α deficiency results in increased IL-1 β in an early onset of spontaneous murine colitis. De Santis S, Kunde D, Galleggiante V, Liso M, Scandiffio L, Serino G, Pinto A, Campiglia P, Sorrentino R, Cavalcanti E, Santino A, Caruso ML, Eri R, Chieppa M. Cell Death Dis. 2017 Aug 10;8(8):e2993.

Timeline / Prodotti finali:

Il fine ultimo del progetto proposto è la valutazione dell'efficacia della somministrazione di anti-IL1 β in pazienti affetti da colite ulcerosa e non responder al trattamento con anti-TNF α .

- individuare un pannello di miRNA in grado di aiutare i clinici alla scelta della terapia più efficace
- individuare possibili miRNA-Based Therapeutic Strategies
- validare l'asse tra IL-1 β e TNF α in pazienti affetti da colite ulcerosa

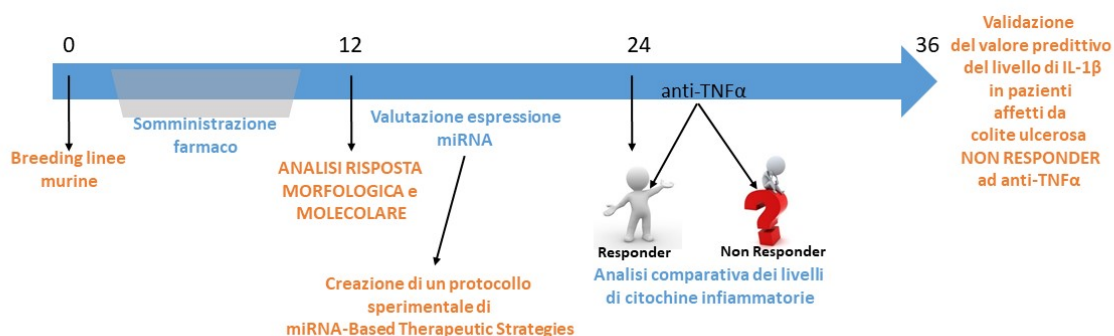
Prima metà del progetto:

- 0-6 mesi: Breeding delle colonie murine e trattamento farmacologico.
 0-12 mesi: Analisi morfologiche e molecolari

Seconda metà del progetto:

- 12-24 mesi: Individuazione dei miRNA espressi durante il trattamento con anti-IL1 β
 24 mesi: Report dei risultati mendiate meeting presso il nostro centro congressi
 24-36 mesi: Creazione di un trial per la miRNA-Based Therapeutic Strategies
 24-36 mesi: Validazione dei precedenti risultati, validazione dei biomarker utilizzando siero di pazienti IBD.
 34-36 mesi: Presentazione dei risultati, eventuale preparazione di un trial multicentrico

Gantt chart



Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

La spesa per il trattamento dei pazienti con IBD è di 2.000.000/anno solamente per quel che riguarda il nostro ospedale. La terapia con farmaci biologici ha portato ad enormi vantaggi per i pazienti, ma molto rimane ancora da fare per quei pazienti

che non rispondono al trattamento anti-TNF o perdono la risposta. Questi pazienti potrebbero far parte di un sottogruppo di pazienti affetti da colite ulcerosa TNF-indipendente. Il farmaco anti IL-1 β è stato valutato nella colite ulcerosa, ma con scarsi risultati. Il motivo potrebbe essere l'errata scelta dei pazienti ai quali somministrarlo. Investire per ottenere un più efficace trattamento dei pazienti vuol dire ridurre la spesa per farmaci, ma anche migliorare enormemente la qualità della vita dei pazienti e delle loro famiglie. Il progetto proposto è di enorme rilevanza per il SSN essendo le IBD un insieme di patologie croniche con un'incidenza sempre maggiore sulla popolazione.

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

Responsabile: dott.ssa Antonella Orlando

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

Introduzione

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

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

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

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

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

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

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

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

Un organoide è definito come un organo in miniatura cresciuto in vitro [20]. Può essere prodotto a partire dalle cellule staminali multipotenti adulte o dalle cellule pluripotenti indotte, coltivate in un sostituto stromale quale il Matrigel. Mentre le prime si differenziano esclusivamente nell'epitelio intestinale, le seconde, derivate da cellule staminali embrionali, sono in grado di differenziarsi in un ampio spettro di cellule [21]. Di conseguenza, quando si fa riferimento agli organoidi intestinali, il tessuto da cui originano definisce la struttura e le caratteristiche dell'organoide risultante, che avrà una struttura tridimensionale di cellule epiteliali. La struttura di queste cellule rispecchia perfettamente la loro organizzazione in vivo, quando è supplementata da un cocktail di fattori di crescita e piccole molecole, necessari per ricreare le condizioni ideali per la crescita delle cellule a lungo termine. La possibilità di creare questa struttura consente ai ricercatori di disporre così di un modello ex vivo di tessuto intestinale. Inoltre, la proprietà di auto-rinnovarsi degli organoidi intestinali permette la propagazione indefinita e l'espansione usando le tecniche standard di colture cellulari.

Obiettivi specifici dello studio:

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

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

Obiettivo 1:

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

Obiettivo 2:

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

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

Dati preliminari:

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

Metodologie e analisi statistiche:

1. STUDIO CLINICO

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

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

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

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

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

2. STUDIO PRE-CLINICO

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

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

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

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

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

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

L'estrazione di RNA è effettuata tramite l'RNAeasy Kit (Qiagen, Germany). La concentrazione e il grado di purezza dell'RNA estratto sono determinati tramite spettrofotometro (Nanodrop 2000, ThermoScientific, Germany). Due µg di RNA totale vengono usati per la sintesi del cDNA. La trascrizione inversa (RT) è effettuata in 20 µl di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). La real-time PCR viene effettuata in 25 µl di volume finale contenente 2 µl di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisenso di ogni gene. Il gene della β-actina è utilizzato come controllo interno e come gene di riferimento in quanto

housekeeping. La Real-time PCR viene effettuata in un CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Milano, Italia) usando il seguente protocollo: 45 cicli a 95°C per 3', 95°C per 10s, 55°C per 30s seguiti da un melting curve step a 65-95°C con una velocità di riscaldamento di 0.5°C per ciclo per 80 cicli. I prodotti della PCR sono quantizzati con curve di calibrazione esterne, una per ogni gene testato, ottenute con diluizioni seriali di un numero noto di molecole (10^2 - 10^7 molecole). Tutti i dati sono poi normalizzati, dividendo la quantità target per la quantità di β -actina usata come controllo interno per ciascun campione. La specificità del prodotto della PCR è confermata da una gel elettroforesi.

Per quanto riguarda l'analisi di Western Blot, la lisi cellulare è effettuata in RIPA buffer (Pierce Ripa buffer, ThermoScientific, Rockford, IL, USA), seguita da una centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C. La concentrazione delle proteine viene misurata tramite dosaggio Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia). Aliquote di 50 μ 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 Transblot Turbo (Bio-Rad, Milano, Italia). L'espressione di tutte le proteine da testare viene valutata con anticorpi specifici. Dopo un'incubazione overnight, le membrane sono poi incubate con lo specifico anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. Le proteine sono rilevate mediante chemiluminescenza (ECL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA) e l'analisi densitometrica di ogni proteina viene effettuata usando il Molecular Imager Chemidoc (Bio-Rad, Milano, Italia) e normalizzata vs il contenuto di β -actina.

Analisi statistica:

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

Risultati attesi:

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

Innovazioni:

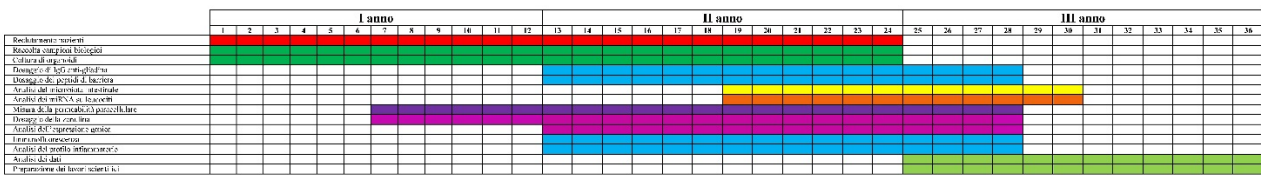
- Identificazione di possibili marcatori per la diagnosi di NCGS.
- Impiego della tecnologia degli organoidi per lo studio dei disturbi glutine-correlati. Gli organoidi potrebbero rappresentare un'alternativa alla ricerca animale: sono infatti generati da cellule umane e perciò mostrano un metabolismo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

Bibliografia:

1. Balakireva AV, Zamyatnin AA. *Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities*. *Nutrients* 2016; 8(10):644. doi: 10.3390/nu8100644.
2. Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. *Celiac disease: an update for pathologists*. *J Clin Pathol* 2006; 59(10):1008-16. doi: 10.1136/jcp.2005.035345.
3. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrero A, Fasano A. *Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity*. *Nutrients* 2015; 7(3):1565-76. doi: 10.3390/nu7031565.
4. Lammers KM, Khandelwal S, Chaudhry F, Kryszak D, Puppa EL, Casolaro V, Fasano A. *Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with celiac disease*. *Immunology* 2011; 132(3):432-40. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03378.x.
5. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. *Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in celiac disease*. *Gut*. 2006; 55(4):469-77. doi: 10.1136/gut.2005.068684.
6. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppa E, Sferruzza A, Fasano A. *Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974*. *Ann Med* 2010; 42(7):530-8. doi: 10.3109/07853890.2010.514285.
7. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. *Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric celiac disease*. *J Clin Pathol* 2009; 62(3):264-9. doi: 10.1136/jcp.2008.061366.
8. Cukrowska B, Sowińska A, Bierta JB, Czarnowska E, Rybak A, Grzybowska-Chlebowczyk U. *Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease*. *World J Gastroenterol* 2017; 23(42):7505-7518. doi: 10.3748/wjg.v23.i42.7505.
9. Pinto-Sanchez MI, Verdu EF. *Non-celiac gluten or wheat sensitivity: It's complicated!* *Neurogastroenterol Motil* 2018; 30(8):e13392. doi: 10.1111/nmo.13392.
10. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, Fiorini E, Caio G. *Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance)*. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46(8):680-5. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182372541.
11. Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. *Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity*. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(6):1587-94. doi: 10.1038/ajg.2009.188.
12. Shepherd SJ, Halmos E, Glance S. *The role of FODMAPs in irritable bowel syndrome*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014; 17(6):605-9. doi: 10.1097/MCO.000000000000116.
13. Vazquez-Roque MI, Camilleri M, Smyrk T, Murray JA, Marietta E, O'Neill J, Carlson P, Lamsam J, Janzow D, Eckert D, Burton D, Zinsmeister AR. *A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: effects on bowel frequency and intestinal function*. *Gastroenterology* 2013;144(5):903-911.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.049.
14. Gibson PR, Shepherd SJ. *Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach*. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(2):252-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06149.x.
15. Gibson PR, Shepherd SJ. *Food choice as a key management strategy for functional gastrointestinal symptoms*. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(5):657-66; quiz 667. doi: 10.1038/ajg.2012.49.
16. Caio G, Volta U, Tovoli F, De Giorgio R. *Effect of gluten free diet on immune response to gliadin in patients with non-celiac gluten sensitivity*. *BMC Gastroenterol* 2014; 14:26. doi: 10.1186/1471-230X-14-26.

17. Uhde M, Caio G, De Giorgio R, Green PH, Volta U, Alaedini A. *Subclass Profile of IgG Antibody Response to Gluten Differentiates Nonceliac Gluten Sensitivity From Celiac Disease*. *Gastroenterology* 2020; S0016-5085(20)34992-1. doi: 10.1053/j.gastro.2020.07.032.
18. Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E. *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells*. *Nat Med* 2011; 17(10):1225-7. doi: 10.1038/nm.2470.
19. Senger S, Ingano L, Freire R, Anselmo A, Zhu W, Sadreyev R, Walker WA, Fasano A. *Human Fetal-Derived Enterospheres Provide Insights on Intestinal Development and a Novel Model to Study Necrotizing Enterocolitis (NEC)*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018; 5(4):549-568. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.01.014.
20. Wallach TE, Bayrer JR. *Intestinal Organoids: New Frontiers in the Study of Intestinal Disease and Physiology*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 64(2):180-185. doi: 10.1097/MPG.0000000000001411.
21. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. *Nature* 2007; 448(7151):313-7. doi: 10.1038/nature05934.
22. Freire R, Ingano L, Serena G, Cetinbas M, Anselmo A, Sapone A, Sadreyev RI, Fasano A, Senger S. *Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease*. *Sci Rep* 2019; 9(1):7029. doi: 10.1038/s41598-019-43426-w.
23. Clemente E, Efthymakis K, Carletti E, Capone V, Sperduti S, Bologna G, Marchisio M, Di Nicola M, Neri M, Sallèse M. *An explorative study identifies miRNA signatures for the diagnosis of non-celiac wheat sensitivity*. *PLoS One*. 2019 Dec 13;14(12):e0226478. doi: 10.1371/journal.pone.0226478.
24. Dieterich W, Neurath MF, Zopf Y. *Intestinal ex vivo organoid culture reveals altered programmed crypt stem cells in patients with celiac disease*. *Sci Rep*; 10(1):3535. doi: 10.1038/s41598-020-60521-5.

Timeline (Gantt chart)



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

Responsabile: dott. Francesco Dituri

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

Introduzione

I tumori epatici figurano come la seconda causa di morte correlata al cancro a livello globale. Circa il 90% di queste neoplasie è rappresentato dal carcinoma epatocellulare (HCC)¹. L’HCC si sviluppa generalmente come conseguenza di una patologia cronica infiammatoria/cirrotica a carico del fegato, a sua volta scatenata da agenti eziologici di natura virale (HBV, HCV, HDV), alterazioni dello stesso organo legate a malattie metaboliche (come NASH o NAFLD), ingestione di alimenti contenenti l’aflatossina B1, o eccessivo consumo di alcool^{2,3}. Nell’arco degli ultimi decenni sono stati compiuti studi clinici per testare la tollerabilità e/o l’efficacia di farmaci di nuova introduzione, spesso in combinazione, per il targeting di molecole chiave delle vie del segnale intracellulare. Tali agenti appartengono alla classe delle piccole molecole inibitrici (come sorafenib, regorafenib, cabozantinib e galunisertib), o anticorpi monoclonali umanizzati (come bevacizumab e ramucirumab)^{4,5}. Di quest’ultima categoria fanno parte gli anticorpi “checkpoint inhibitors” ad azione immunoterapica di più recente introduzione (nivolumab, durvalumab)⁶. Sebbene molte di queste terapie abbiano trovato impiego nella pratica clinica, la loro efficacia complessiva risulta purtroppo limitata. L’HCC inoltre mostra modesta responsività agli agenti chemoterapici comunemente in uso nel trattamento di altri tumori solidi. L’approccio chirurgico (mediante resezione, termoablazione o chemoembolizzazione) costituisce in effetti l’opzione terapeutica di maggior impatto sul tasso di sopravvivenza complessiva dei pazienti con HCC⁷. Le ragioni dello scarso effetto curativo dei farmaci disponibili dipendono almeno in parte dall’elevata complessità biologica a livello cellulare e molecolare dell’HCC. Le cellule trasformate di questo cancro mostrano molteplici tratti di malignità. A livello genico sono state caratterizzate alterazioni geniche di vario tipo ed entità (come mutazioni puntiformi e aberrazioni cromosomiche), che concorrono a determinare l’over-espressione di oncogeni e al contempo la soppressione dell’espressione di geni onco-soppressori⁸. Il microambiente tumorale ha un ruolo notevole nell’accrescere la malignità e l’eterogeneità intra-tumorale (nello stesso paziente) e inter-tumorale (tra pazienti diversi). Tale componente include molteplici tipi cellulari, come le cellule stromali (fibroblasti), endoteliali vascolari e immunitarie (come diverse sottoclassi linfocitarie e macrofagi), e le molecole della matrice extracellulare (come collagene, fibronectina, laminina ecc.) e si sviluppa in concomitanza con l’instaurarsi delle condizioni pre-neoplastiche associate all’epatopatia cronica, ossia l’infiammazione e la degenerazione fibrotica/cirrotica^{9,10}. Le cellule del microambiente interagiscono mutuamente ed in modo complesso con le cellule tumorali, sia per interazione diretta, che tramite secrezione di molecole solubili (fattori di crescita, citochine, chemochine ecc.), macro, microvescicole e nanovescicole (esosomi), o della matrice¹¹⁻¹³. L’architettura del tipico microambiente tumorale è composta da fibroblasti associati al cancro (CAF), cellule endoteliali, periciti, cellule adipose, cellule del sistema immunitario tra cui i macrofagi associati al tumore (TAM) ed elementi della matrice extracellulare (ECM)¹⁴⁻¹⁶. Esso è anche arricchito con citochine diffuse, chemochine o enzimi che vengono secreti dalle cellule cancerose e non cancerose^{17,18}. Queste interazioni sono mediate e si evolvono costantemente attraverso la segnalazione paracrina e juxtacrina utilizzata da molti pathway. Tra questi, vi è la

segnalazione di Notch che ha un ruolo importante nella regolazione del *crosstalk* tra cellule tumorali e i componenti del microambiente indotta dal contatto cellula-cellula, tra una cellula che invia ed una che riceve il segnale^{19,20}. Più dettagliatamente, la segnalazione avviene quando uno dei quattro recettori 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. Dopo l'attivazione, si ha la scissione proteolitica da parte del complesso γ -secretasi che rilascia il dominio intracellulare di Notch (NICD) dalla membrana plasmatica. In seguito, NICD trasloca nel nucleo e si associa con l'effettore nucleare RBP-1 κ /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 (e.g. HES, HEY)²¹. I segnali scambiati tra le cellule attraverso queste interazioni determinano così i destini delle cellule stesse, mentre la disfunzione della via di segnalazione di Notch interessa diversi aspetti della biologia del tumore, come l'angiogenesi, il mantenimento delle cellule staminali del cancro, l'infiltrato immunitario o la resistenza alla terapia^{22,23}.

Molti studi che propongono un carattere di promozione del tumore da parte di Notch, hanno riscontrato che i recettori della famiglia Notch sono sovraespressi in campioni di HCC umano e hanno parzialmente associato la loro espressione a prognosi infausta^{24,25}. Inoltre, il 30% dei pazienti con HCC presenta una segnalazione Notch iperattivata associata al tumore e l'attivazione specifica di Notch1 è aumentata negli HCC più aggressivi^{26,27}. *In vivo* è stato anche osservato che la segnalazione di Notch2 attivata porta alla formazione di HCC²⁸. Ulteriormente, Notch1 attivato insieme alla segnalazione AKT ha portato alla formazione di colangiocarcinoma intraepatico (iCCA), che è il secondo tipo più diffuso di cancro al fegato^{29,30}.

Nel contesto del microambiente tumorale in cui l'infiammazione cronica è il principale fattore trainante per lo sviluppo di HCC, l'elevata densità di macrofagi associati al tumore (TAM) è proporzionale alla grandezza del tumore, stadio TNM avanzato, metastasi intraepatica, recidiva della malattia e scarsa in generale sopravvivenza nei pazienti con HCC³⁰. In questo scenario, la segnalazione di Notch gioca un ruolo critico nella differenziazione e plasticità funzionale di TAM in vari modelli di tumore che nell'HCC accelerano l'angiogenesi e l'epatocarcinogenesi³¹⁻³³. Per molto tempo, si è pensato che i macrofagi fossero cellule mittenti che esprimono solo ligandi di Notch e attivano la segnalazione di Notch nelle cellule riceventi eterotipiche. Tuttavia, di recente sono stati pubblicati evidenti risultati che hanno portato a queste comprensioni. Ad esempio, diversi studi hanno riportato l'espressione dei recettori Notch 1-4 e dei ligandi in macrofagi primari di origine umana e murina³⁴⁻³⁶. Di conseguenza, i macrofagi possono agire come induttori del segnale Notch e/o cellule riceventi per rispondere ai segnali microambientali esterni. È stato inoltre dimostrato che la segnalazione Notch favorisce il microambiente infiammatorio e guida le risposte pro-infiammatorie dei macrofagi in diversi contesti infiammatori^{37,38}. Nonostante questi progressi, i meccanismi con cui l'interazione bidirezionale della segnalazione di Notch nei macrofagi e l'infiammazione e l'infezione è poco chiaro.

Nel 2010, Akira e colleghi hanno dimostrato che uno step fondamentale per attivare qualsivoglia risposta infiammatoria, da parte del sistema immunitario innato, è rappresentato dal riconoscimento di molecole prodotte e secrete dai microorganismi da parte di recettori presenti sulle cellule appartenenti al sistema stesso³⁹. Un pathway fondamentale in questo contesto è rappresentato dall'inflammasoma, descritto per la prima volta nel 2002⁴⁰, e che, soprattutto nell'ultimo decennio, sta emergendo essere il mediatore principale dell'interazione tra organismo ospite e patogeno. L'inflammasoma è un complesso multi-proteico che si assembla in risposta ad un ampio spettro di patogeni culminando con l'attivazione di proteine, quali caspasi-1 e gasdermina D, che garantiscono rispettivamente la maturazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, interleuchina (IL) IL-1 β e IL-18, in circolo da un lato e la morte cellulare dall'altro, in un processo chiamato piroptosi, il quale contribuisce alla propagazione dell'infiammazione stessa⁴¹⁻⁴³. 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 metastasi⁴⁴. Ad oggi, quattro inflammasomi *bona fide* sono stati descritti: 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)⁴⁵; tra questi, NLRP3, che risponde a molteplici

stimoli, tra cui tossine batteriche (ad esempio lipopolisaccaride (LPS) e nigericina), adenosina trifosfato (ATP), RNA microbico, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e materia particolata, risulta essere il più studiato^{46,47}. La sua completa attivazione avviene in due fasi temporalmente distinte. La prima fase, anche chiamata *priming* step, prevede l'attivazione del Toll-like Receptor (TLR), da parte di LPS, e del signaling pathway sottostante, che mediante NF- κ B, aumenta le concentrazioni citoplasmatiche delle proteine coinvolte. La seconda fase, *activation* step, prevede l'oligomerizzazione dei monomeri di NLRP3 in una struttura sferica ad anello, in grado di reclutare una proteina scaffold, chiamata Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC), che a sua volta polimerizza in un filamento di dimensioni comprese fra 2 e 5 μ m. Tale filamento rappresenta la base per il reclutamento delle pro-caspasi-1 e per il loro successivo processamento nella forma matura. Infine, le caspasi-1 attive tagliano le citochine pro-infiammatorie nella loro forma biologicamente attiva e, parallelamente, le gasdermine D, il cui frammento N-terminale, il frammento attivo, forma dei pori sulla membrana citoplasmatica, promuovendo il rilascio delle citochine neoformate, nonché la piroptosi⁴⁸. Attraverso metodiche di microscopia ottica, si evince che l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, comporta la formazione di un singolo speck (o punctum) perinucleare per cellula al quale convogliano tutte le molecole facenti parte del pathway al fine di potenziarne l'azione⁴⁹. Il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nell'infiammazione dell'apparato gastrointestinale, nonché nella tumorigenesi, sta emergendo negli ultimi anni. Ad esempio, alcuni studi hanno evidenziato che topi knockout per NLRP3, per caspasi-1 o per IL-1 β sviluppano coliti o infiammazioni intestinali con una incidenza significativamente ridotta rispetto ai corrispettivi wild-type^{50,51}. 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 immunosoppressive⁵². Tumori xenograft che overesprimono IL-1 β evidenziano accumuli di MDSC ed una progressione più rapida del tumore stesso⁵³. 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 tumorale⁵⁴. 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 tumori⁵⁵. 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)⁵⁶. Diventa fondamentale, quindi, riuscire a prevenire, o convertire, un'over-attivazione di NLRP3 nel microambiente tumorale al fine di sollecitare il sistema immunitario verso un fenotipo più marcatamente anti-tumorale che pro-tumorale. Per far sì che questo possa avvenire efficacemente ed in modo tessuto-cellula-specifico, quindi interessando solo il tessuto tumorale e il microambiente ad esso correlato, di cui fa parte anche la componente infiammatoria, diversi studi si stanno orientando sull'utilizzo di nanoparticelle di natura organica e/o inorganica, da far giungere per via sistemica al sito di trattamento. L'utilizzo delle nanoparticelle infatti, nell'ambito medico è oramai sdoganato anche in Italia, in tabella 1 sono riportati alcuni farmaci oramai in commercio a base di liposomi⁵⁷⁻⁶² (doi: 10.1016/j.mmcr.2020.10.002; doi: 10.1016/j.idc.2020.05.003; doi: 10.1111/jog.14558; doi: 10.3390/ijms21218184).

prodotto	titolare AIC	farmaco	indicazioni
Abelcet®	Janssen-Cilag SpA	amfoterina B	antifungino
AmBisome®	Gileas Sciences s.r.l.	amfoterina B	antifungino

Pevaryl® lipogel	Janssen-Cilag SpA	econazolo	antifungino
Epaxal Berna®	Istituto Sieroterapico Berna	vaccino	epatite A
DauXonome®	Gilead Science srl	daunorubicina	sarcoma di Kaposi
Caelyx®	SP Europe	doxorubicina	sarcoma di Kaposi
Myocet®	Cephalon Europe	doxorubicina	tumore polmonare
Visudyne®	Novartis Europharm Ltd	veterporfina	degenerazione maculare senile

Tabella 1: farmaci registrati in Italia veicolati da liposomi.

La particolarità di queste composizioni liposomali in commercio, però è di contenere liposomi non coniugati con molecole quali recettori, anticorpi, peptidi, in grado di riconoscere strutture cellulari peculiari delle cellule patologiche. Questa struttura permette loro di essere considerati tra i farmaci di tipo sistemico e non tessuto-specifici, rendendoli sicuramente più efficaci delle somministrazioni di farmaci liberi, ma probabilmente meno efficaci di liposomi che coniugati con molecole funzionali riconoscerebbero solo le cellule tumorali e non le normali. In nostri recenti lavori, effettuati su cellule di carcinoma del colon, abbiamo dimostrato infatti che nel caso di liposomi potenziati nella struttura delle membrane mediante coniugazioni di anticorpi che riconoscono un recettore di membrana della cascata del Wnt, si è aumentata l'efficienza di rilascio, l'efficacia della somministrazione, diminuendo notevolmente le concentrazioni del farmaco, migliorando *in vitro* il trattamento con il chemioterapico 5-FU⁶³. Perseguendo lo studio per l'utilizzo dei liposomi, della loro funzionalizzazione per rendere le terapie più efficienti, nell'ambito delle terapie dell'HCC, contemporaneamente al trattamento dell'infiammazione insita in ogni sviluppo della carcinogenesi, abbiamo pensato di funzionalizzare con anticorpi specifici le nostre nanoparticelle sfruttando come targets i recettori del Wnt quali FZD1 che risulta sovraespressa nei macrofagi in caso di infiammazione e FZD9, sovraespressa in HCC ed epatociti tumorali^{64,65}. Inoltre, alcuni studi effettuati nei nostri laboratori, ci consentono di indicare come farmaci da veicolare nei nostri nanocostrutti, sia inibitori della carcinogenesi epatobiliare, basati sull'inibizione della γ -secretasi (GSI) che bloccano la scissione proteolitica dei recettori di Notch al fine di inibire il processo di segnalazione a valle, sia inibitori delle molecole attivatrici dell'inflammasoma, quali il MMC950 che inibisce NLRP3^{66,67}. Oltre ciò, per potenziare la capacità epatoprotettiva, verso le cellule sane presenti nell'ambito dell'organo epatico ove persistono dei noduli neoplastici, ai liposomi veicolanti gli inibitori per γ -secretasi ed inflammasoma, aggiungeremo una molecola nutraceutica con proprietà epatoprotettive, cioè la Silimarina⁶⁸. La Silimarina, è una molecola naturale, (doi: 10.1080/03639045.2020.1843474), contenuta nel cardo mariano, che oggi viene usata principalmente come integratore nella prevenzione dell'evoluzione della steatosi epatica nei pazienti NAFLD⁶⁹. E' stato inoltre ampiamente dimostrato che durante l'utilizzo di chemioterapici, nelle terapie oncologiche, non soltanto epatiche, somministrandola ai pazienti, riduce l'effetto citotossico sugli epatociti sede principale del metabolismo dei farmaci, riducendo la produzione di radicali liberi, e aumentando l'efficacia dei trattamenti^{70,71}.

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

In **Figura 1**, riportiamo schematicamente lo scopo del progetto.

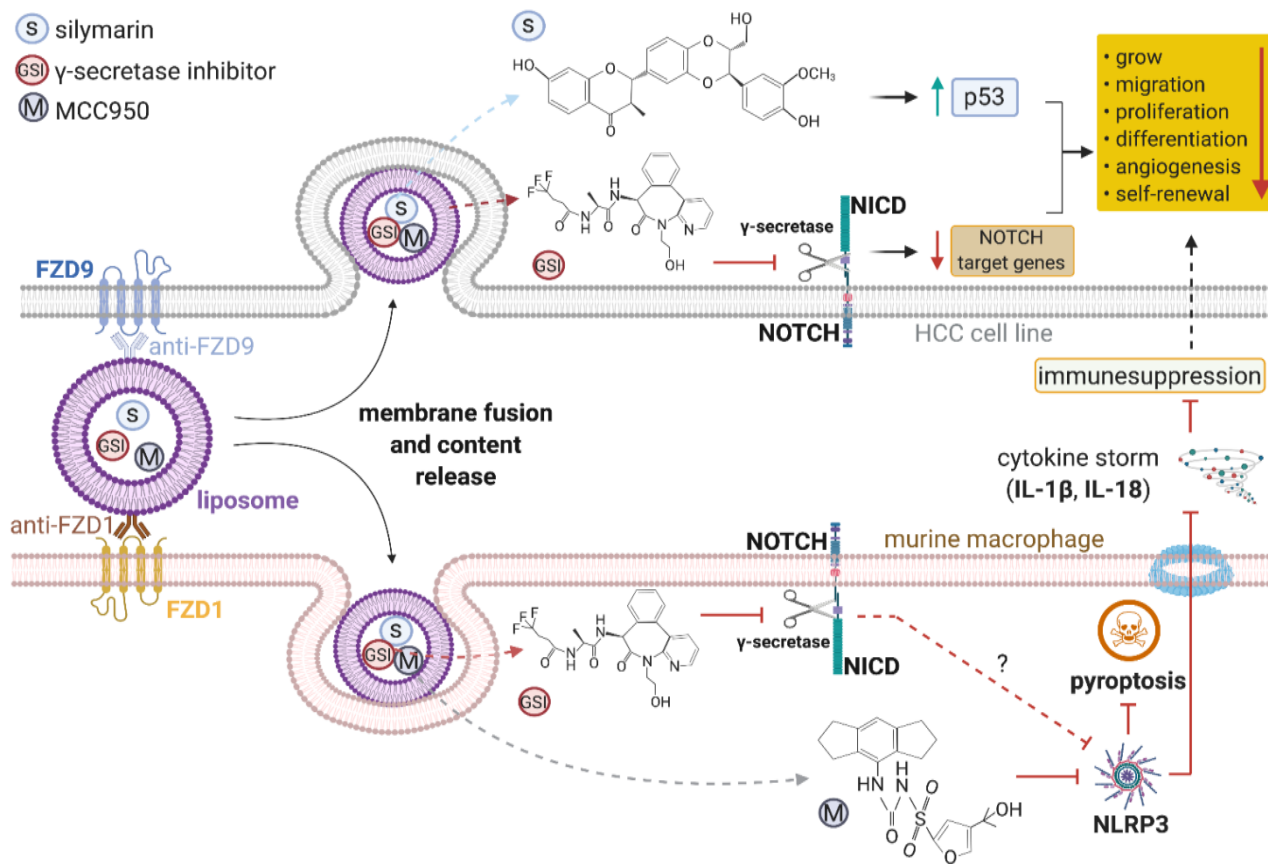


Figura 1: Schema dello scopo del progetto.

Obiettivi specifici dello studio:

Gli studi effettuati fino ad oggi nell'ambito dell'utilizzo della nanomedicina, hanno consentito di aumentare l'efficacia dei trattamenti, nelle varie patologie oncologiche, sfruttando le affinità molecolari fra i costrutti da somministrare e le stesse cellule tumorali. Inoltre, l'utilizzo di alcune molecole come gli inibitori della γ -secretasi, l'MCC950 e la Silimarina, nelle terapie classiche delle patologie epatiche e nell'infiammazione ad esse correlate, ci spinge ad esplorare quello che potrebbe essere l'utilizzo e l'efficacia di queste molecole incapsulate in nanovesicole organiche come i liposomi. La nostra proposta quindi sarà articolata distribuendo la progettualità in due fasi; una prima fase, che avrà come obiettivo quello di preparare liposomi funzionalizzati con anticorpi che riconoscono le proteine recettoriali FZD1 e FZD9, rispettivamente sui macrofagi e sulle cellule di HCC, la caratterizzazione delle nanoparticelle e lo studio *in vitro* della citotossicità delle formulazioni proposte su diverse linee cellulari di HCC. La seconda fase sarà incentrata sull'utilizzo dei nanovettori risultati più idonei nello screening *in vitro*, su modello animale xenograft, in cui sarà impiantato tessuto biotico di HCC proveniente da paziente oppure verranno inoculate cellule di HCC.

Obiettivo specifico 1:

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

Obiettivo specifico 2:

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

Obiettivo 1:

Nella prima fase di studio, ci proponiamo di investigare l'efficacia antitumorale e antiinfiammatoria delle nanoparticelle coniugate con gli anticorpi e veicolanti i farmaci. I liposomi (in alcuni casi sperimentali resi fluorescenti) verranno utilizzati negli esperimenti *in vitro* sia su cellule componenti l'inflammasome, sia su cellule di HCC, per determinare l'efficacia delle combinazioni farmacologiche fra MCC950, Silimarina e Inibitore di γ -secretasi, da somministrare al modello animale. Essi saranno preparati e coniugati agli anticorpi seguendo protocolli standardizzati e prestabiliti in precedenti pubblicazioni dal nostro gruppo di ricerca⁶³ (**Figura 2**). Nello sviluppo degli esperimenti *in vitro*, verranno utilizzate 5 linee cellulari di HCC, nello specifico, PRF5, HEP3G, HUH7, HLF e HLE, scelte sulla base dell'aggressività tumorale, e gli esperimenti saranno condotti in triplicato, su culture cellulari in 2D e 3D (in questo caso dopo la maturazione dello sferoide), sulle quali verrà valutata la vitalità cellulare post trattamento mediante saggi di MTS, l'espressione di alcuni marcatori dell'EMT, mediante immunofluorescenza e saggi appropriati, dei geni target della segnalazione di Notch, mediante western blotting, e l'*uptake* dei liposomi nelle diverse linee cellulari. Per lo studio dell'inibizione dell'infiammazione, verranno utilizzati macrofagi murini, in cui verranno valutati sia l'*uptake*, la vitalità cellulare, l'attivazione dell'inflammasoma mediante immunofluorescenza per NLRP3 e ASC e western blotting sulla Caspasi-1 clivata, ed in fine rilascio delle citochine pro-infiammatorie (IL-1b e IL-18) mediante tests ELISA. La somministrazione dei liposomi avverrà dopo averli caratterizzati per dimensioni, potenziale zeta e indice di polidispersione (PDI), per efficienza di incapsulazione dei farmaci, e per capacità di rilascio dei farmaci incapsulati. Dopo aver individuato la nanoformulazione liposomale più consona al trattamento del modello animale, e dopo aver individuato la linea cellulare da iniettare, si procederà alla seconda fase del progetto.

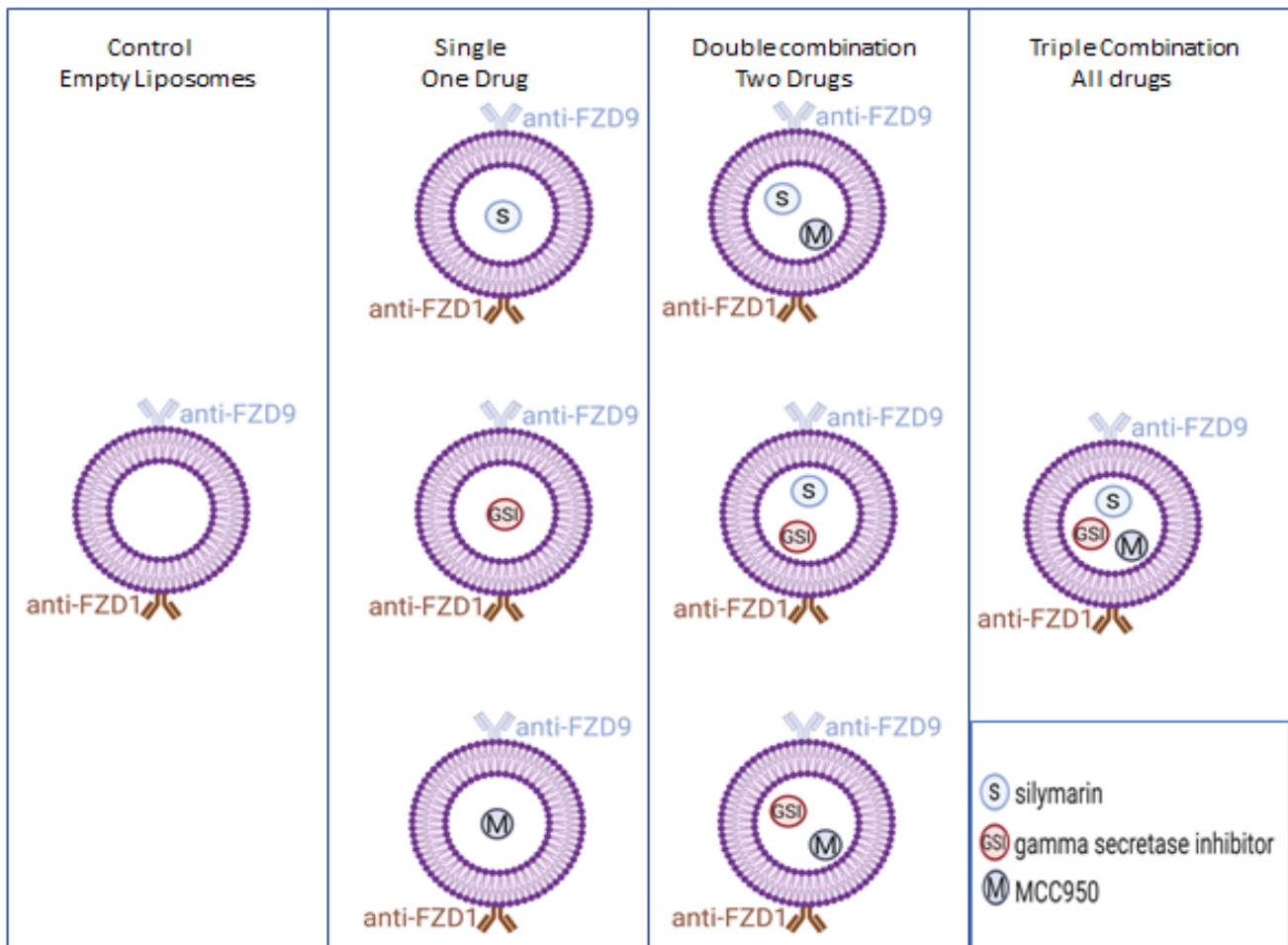


Figura 2: schema di preparazione dei liposomi

Obiettivo 2:

I modelli *xenograft* sono tra i modelli maggiormente utilizzati negli ultimi decenni nel campo della ricerca oncologica poiché di facile induzione e riproducibilità^{72,73}. Nell'ambito di questo progetto, il modello *xenograft* verrà generato utilizzando topi nudi atimici CD-1 inoculando nel sottocute linee cellulari di HCC di origine umana o frammenti di tessuto tumorale di HCC provenienti da pazienti per ottenere un modello PDX (*xenograft* derivato da paziente) (**Figura 3**) Quest'ultimo approccio traslazionale permetterà di aumentare la probabilità che la risposta terapeutica in questi **modelli** sia molto simile a quella reale nel corpo del paziente migliorando così la conoscenza dei meccanismi biologici con un altissimo grado di similitudine. Per cui, durante la sperimentazione animale, si andrà a valutare l'azione biologica e farmacologica della Silimarina, dell'Inibitore di γ -secretasi e MCC950, combinati in diverso modo 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 espanto delle masse tumorali su cui verranno eseguite analisi di tipo molecolare e biochimico.

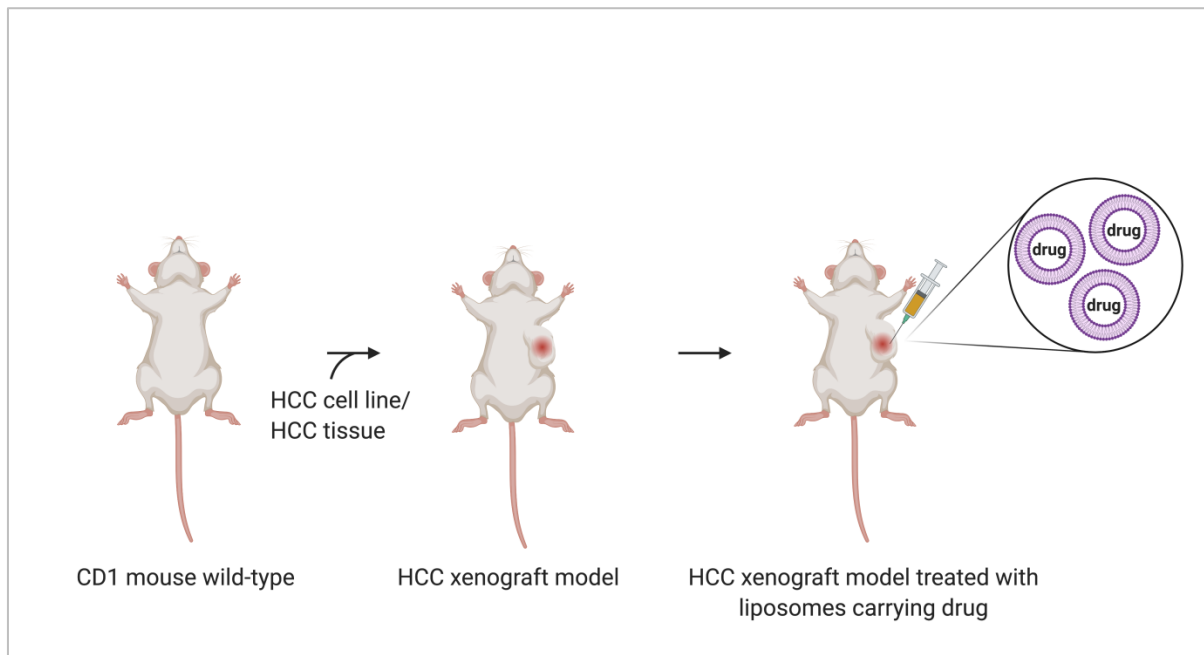


Figura 3: preparazione del modello animale e trattamento con le formulazioni liposomali

Dati preliminari:

Nell'ambito dei nostri studi sull'HCC, stiamo orientando la nostra attenzione alle interazioni esistenti fra l'attivazione dell'inflammasoma e evoluzione della carcinogenesi epatica, in cui è coinvolto il pathway di Notch, andando ad individuare nuove metodologie terapeutiche per arginare ed inibire lo sviluppo dei noduli neoplastici, mediante l'utilizzo di nanostrutture di natura liposomale veicolanti molecole inibitrici e coniugati con anticorpi specifici per le proteine target presenti sia sui macrofagi che sugli epatociti tumorali. Dati preliminari prodotti dal nostro laboratorio, su macrofagi murini, mostrano come sia possibile identificare l'attivazione dell'inflammasoma, quando le cellule sono state stimulate con LPS e Nigericina. In **Figura 4A** infatti, è ben evidenziata la formazione del punctum, dato dalla condensazione della proteina ASC nei macrofagi attivati, rispetto al controllo dove la distribuzione è diffusa a livello citoplasmatico. Sempre nell'ambito dei macrofagi, è stato possibile valutare anche la secrezione dell'interleuchina pro-infiammatoria IL-1 β , che risulta essere presente nel sovranatante delle cellule trattate con LPS e Nigericina rispetto al controllo non trattato (**Figura 4B**), dove la produzione di IL-1 β è del tutto assente. La secrezione dell'interleuchina proinfiammatoria, avviene a seguito dell'attivazione della caspasi-1, mediante il frammento attivo p-20. L'attivazione della caspasi-1 è dimostrata in **Figura 4C**, dove è osservabile un aumento dell'espressione della proteina clivata quando le cellule sono trattate con LPS e nigericina. Parallelamente l'attivazione della caspasi-1 causa il processo di piroptosi, fenomeno apoptotico, verificato in **Figura 4D**.

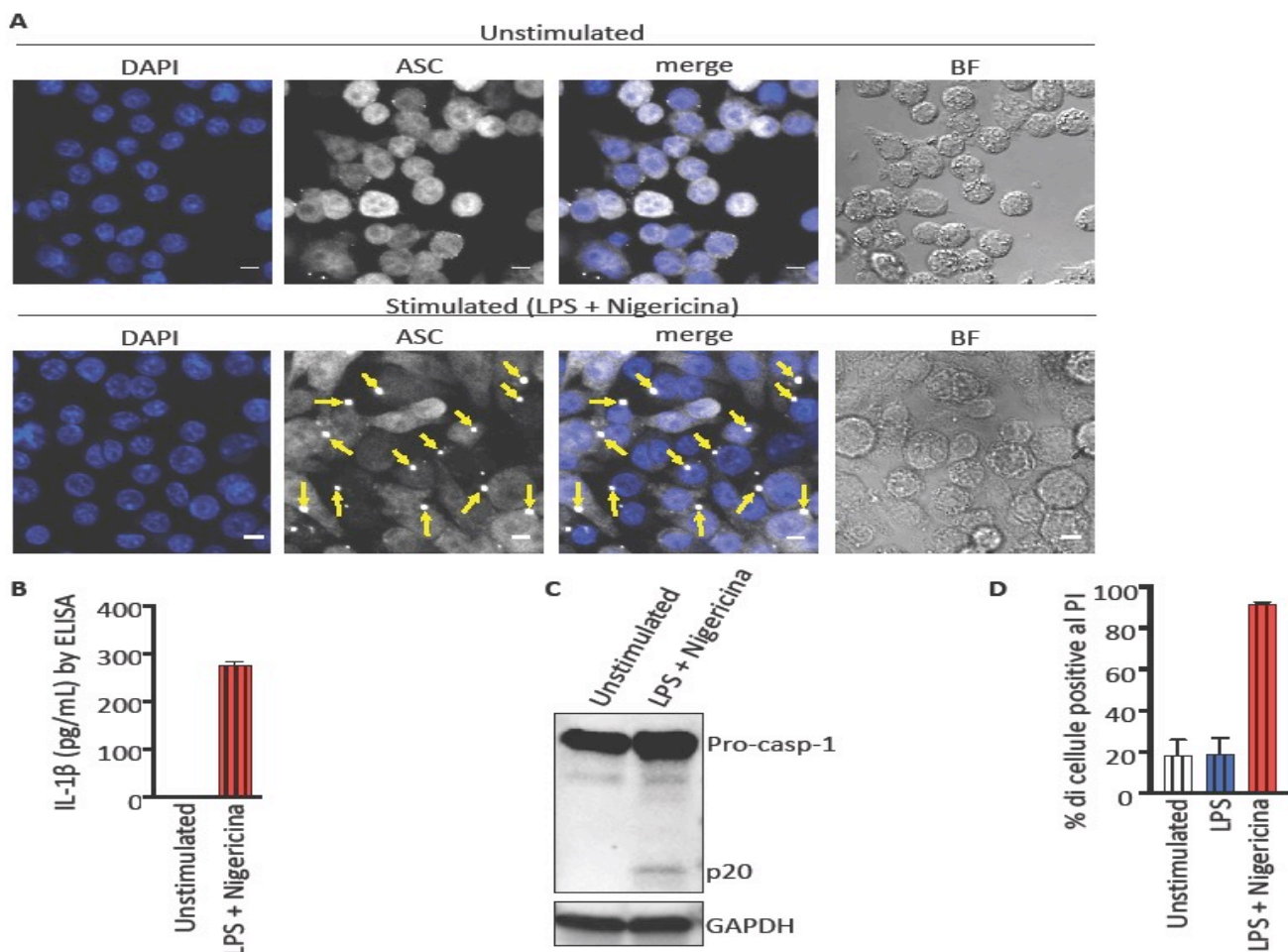


Figura 4: valutazione dell'attivazione dell'inflammasoma nei macrofagi murini.

Nella nostra esperienza di preparazione dei liposomi, riguardo questo progetto, stiamo procedendo oltre che alla caratterizzazione dei liposomi preparati, anche allo studio dell'*uptake* degli stessi sia sulle cellule di HCC che sui macrofagi. Abbiamo dimostrato, come si evince dalla **Figura 5**, utilizzando coloranti sia per le proteine veicolate nei liposomi, che coloranti che legano i lipidi di membrana, sia nel caso delle HLF, linea cellulare tumorale epatica ad alta aggressività, che nei macrofagi, dopo tre ore di incubazione delle linee cellulari prese in esame con i liposomi colorati, si ha la fusione delle membrane (il colorante verde, non penetra nella cellula ma rimane sulla membrana), con riversamento del contenuto delle vescicole, nel citoplasma cellulare, (spot puntiformi presenti all'interno delle cellule trattate). Il trattamento viene confermato con il secondo *time point*, a 6h sia nelle HLF che nei macrofagi; il materiale proteico veicolato, penetra completamente nella cellula, mentre le membrane fluorescenti dei liposomi restano e si fondono sulle membrane cellulari. Nei macrofagi è ben visibile a 6 ore sia l'ingresso delle proteine nelle cellule che si distribuiscono nel citoplasma cellulare, sia la fusione delle membrane dei liposomi con le membrane cellulari che acquisiscono la fluorescenza data dalle nanoparticelle. In questo modo, dimostriamo sia la fusione delle membrane dei liposomi, con le cellule, sia il riversamento del contenuto nella cellula, con conseguente inibizione e/o attivazione di target cellulari presenti nel citoplasma.

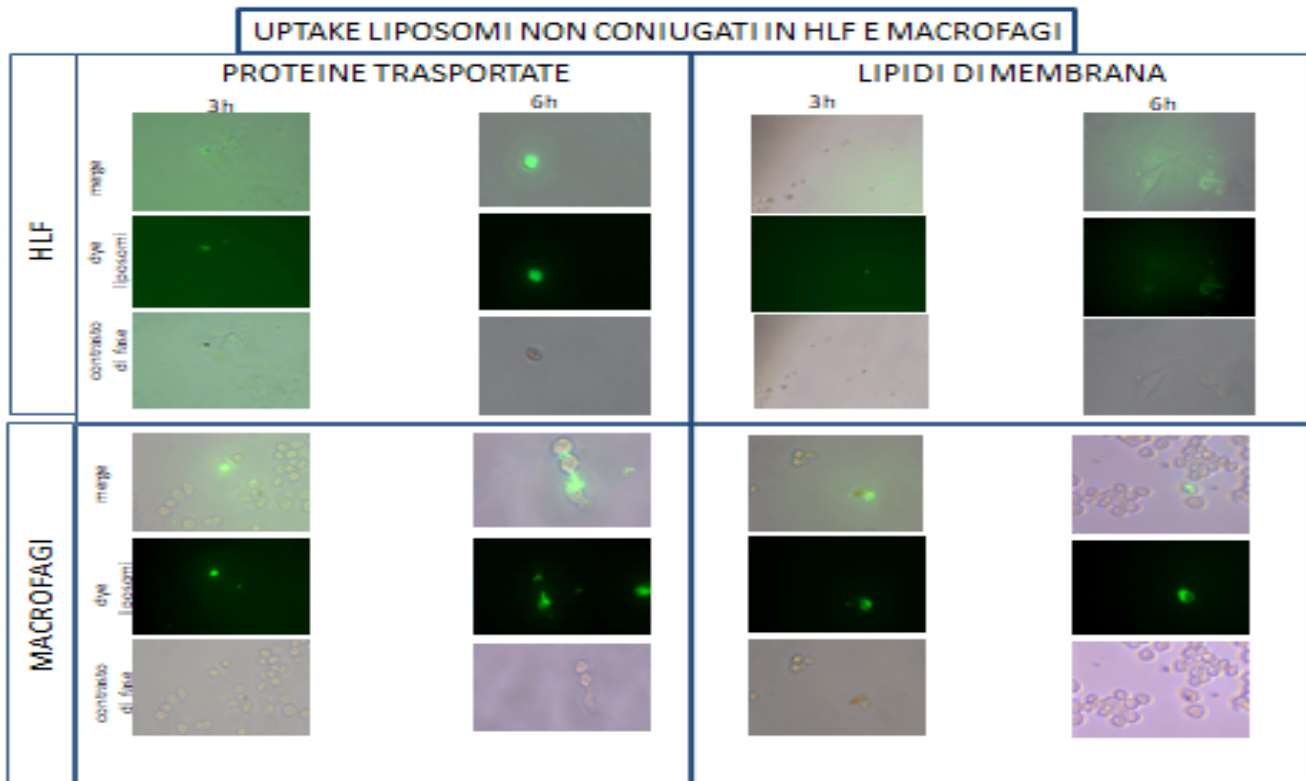
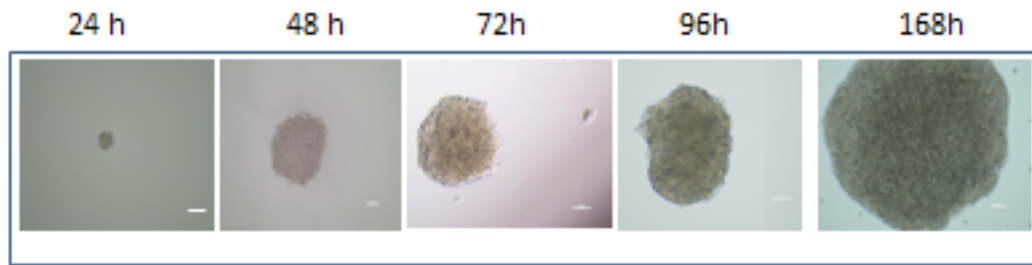


Figura 5: Uptake dei liposomi non coniugati in HLF e Macrofagi

In considerazione a quanto riportato nell'obiettivo 1, e cioè che tutte le preparazioni verranno testate non solo su colture cellulari in 2D ma anche in 3D, nel nostro laboratorio abbiamo standardizzato e caratterizzato la maturazione degli sferoidi prodotti da cellule tumorali, determinandone l'evoluzione con la formazione del caratteristico nucleo necrotico, dovuto all'immane ipossia che si verifica, durante il processo di formazione. Come evidenziato in **Figura 6**, abbiamo spinto la crescita dello sferoide fino a 168 ore, e valutato la necrosi, che come si può osservare risulta essere di tipo colliquativo (mancanza dei nuclei al centro della sfera cellulare). Inoltre, si può evidenziare che il marcatore di necrosi è ben distribuito al centro dello sferoide, a differenza del marcatore di proliferazione, che riscontriamo soltanto nella zona periferica.

Formazione dello sferoide, crescita, maturazione e caratterizzazione
Ingrandimento 10X



Caratterizzazione dello sferoide a 72 ore

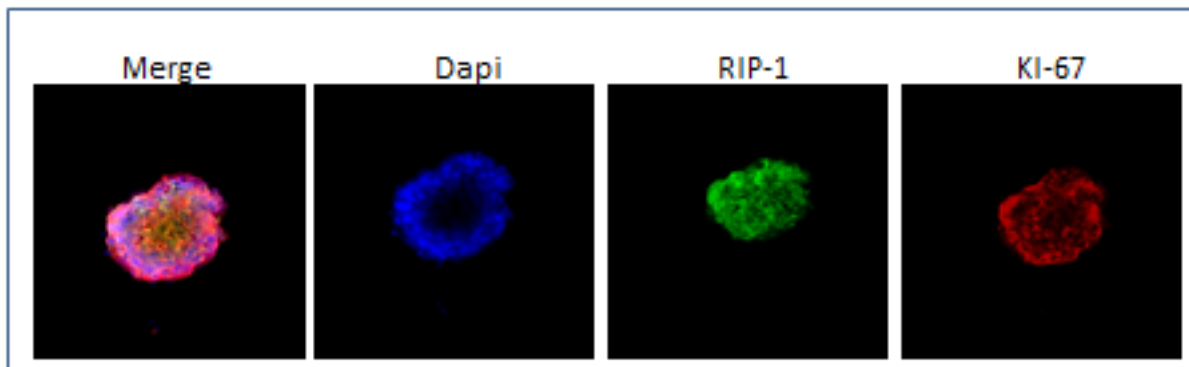


Figura 6: Caratterizzazione degli sferoidi tumorali

Successivamente allo studio di *uptake* nelle colture cellulari in 2D e dopo aver standardizzato la formazione e la maturazione degli sferoidi tumorali, abbiamo studiato *l'uptake* delle nanoparticelle anche negli sferoidi maturati a 72h. In **Figura 7** dimostriamo infatti che anche a 72h ore, le membrane liposomali, rimangono fuse con le membrane citoplasmatiche, creando un evidente limite fluorescente intorno alle cellule. A differenza dei lipidi della membrana liposomale invece, il contenuto dei liposomi, dopo 72 penetra all'interno delle cellule componenti lo sferoide, andando a delimitare il nucleo cellulare (figura riportata in rosso).

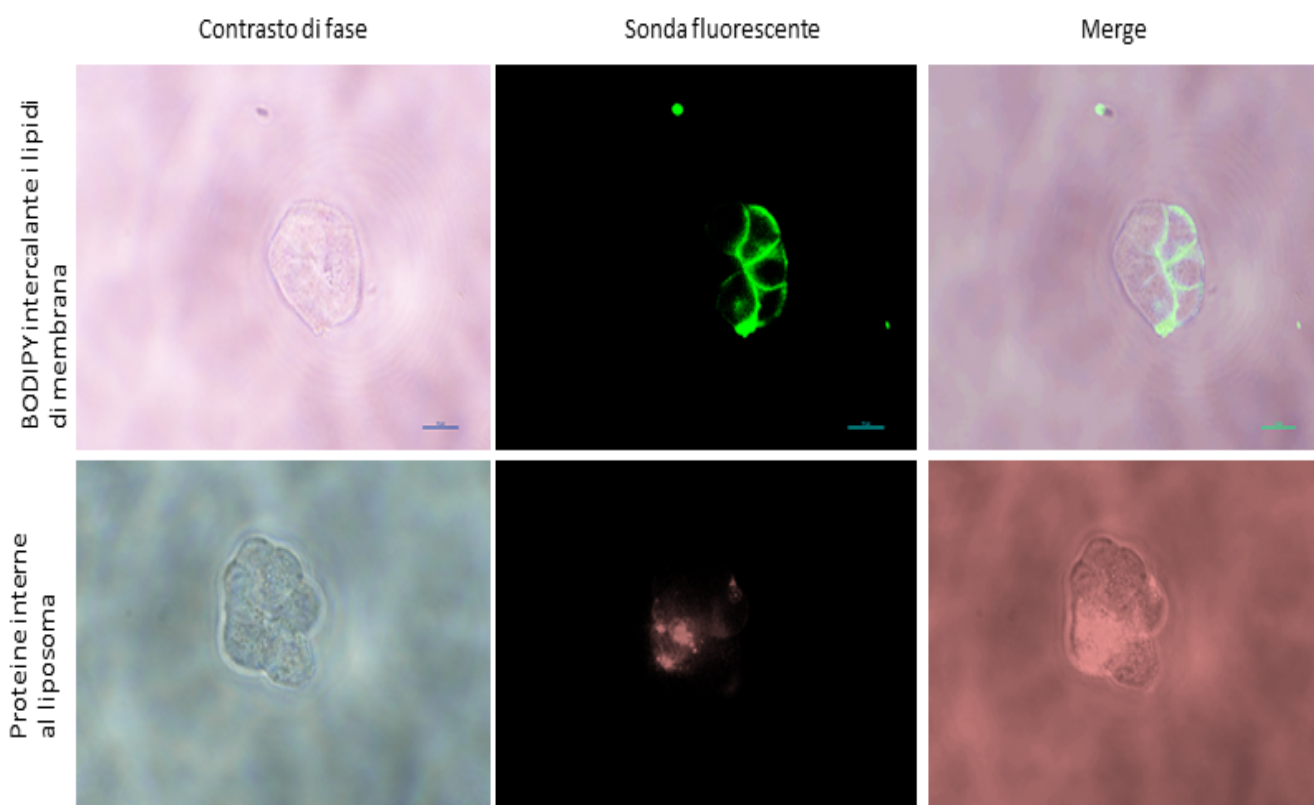


Figura 7: Uptake dei liposomi in sferoidi costituiti da cellule tumorali.

Metodologie e analisi statistiche:

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

I liposomi vuoti o carichi con i singoli farmaci Silimarina, inibitore di γ -secretasi e MCC950 (Sigma-Aldrich (Milan, Italy), e/o in combinazione tra loro verranno preparati seguendo il metodo dell'iniezione⁷⁴. Si procederà alla preparazione di una soluzione con volume di 0.274 mL di cloroformio contenente il mix lipidico di colesterolo, fosfatidilcolina e stearilamina (7:3:1 ratio molare) (Sigma-Aldrich (Milan, Italy)) e 11 μ L di una soluzione di cloroformio e DSPE-PEG2000 con una razió molare di 3:0.3. Quindi, 3 mL di soluzione acquosa contenente silimarina, e/o MCC950, e/o l'inibitore di gamma secretasi, vengono rapidamente aggiunti mediante siringa in vetro nella soluzione lipidica, in continua agitazione su piastra magnetica. I liposomi vuoti saranno ottenuti mediante lo stesso protocollo, ma senza l'aggiunta dei farmaci. Lasciamo evaporare il solvente organico, in modo da ottenere i liposomi con o senza farmaco, che saranno pronti per la coniugazione con gli anticorpi FZD1 e FZD9 (Abcam Cambridge, UK). Nella preparazione con gli anticorpi, la superficie dei liposomi verrà funzionalizzata con gruppi carbossilici COOH, mediante l'utilizzo di 3 μ L di soluzione in cloroformio di DSPE-PEG2000 (da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)) e 8 μ L di soluzione in cloroformio di DSPE-PEG2000-COOH (da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)). La concentrazione lipidica verrà mantenuta costante a 3 mM. Dopo le procedure di purificazione, i liposomi verranno dispersi in acqua distillata ultrapura sterile e i siti di legame verranno attivati con gruppi sulfo-NHS (11 mg) and EDC (9 mg) (Sigma-Aldrich (Milan, Italy)). Il mix di reazione verrà lasciato ad evaporare o.n. su piastra riscaldante, per poi procedere all'ultracentrifugazione a 10,000 \times g for 40 min at 4°C per rimuovere l'eccesso dei reagenti non legati. I liposomi attivati verranno risospesi in 300 μ L of PBS e incubati con 5 μ g di anticorpi anti-FZD1 e anti-FZD9. Il mix verrà lasciato in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte e successivamente,

si provvederà a ultracentrifugare, per eliminare l'anticorpo non legato. Tutte le formulazioni liposomali, saranno liofilizzate e ricostituite in PBS o acqua sterile all'occorrenza, per gli esperimenti successivi e per le caratterizzazioni e i farmaci all'interno saranno utilizzati ad una concentrazione finale in piastra di 5µM. Si procederà a valutare *in vitro* l'efficienza di incapsulazione del singolo farmaco o in combinazione con gli altri, il rilascio dei farmaci dalle varie nanoformulazioni liposomali e l'efficacia delle preparazioni, somministrando i liposomi contenenti i farmaci singoli o combinati, s diverse linee cellulari di epatocarcinoma, quali: PRF5, HEP3G, HUH7, HLF e HLE (ATCC). I liposomi saranno formulati così come riportato in **Tabella 1**.

Controllo: Liposomi Vuoti	Singolo farmaco	Combinazione 2 farmaci	Combinazione 3 farmaci
	Silimarina	Silimarina + MCC950	
Controllo	Inibitore di γ Secretasi	Silimarina + Inibitore di γ secretasi	Silimarina + Inibitore γ secretasi + MCC950
	MCC950	MCC950 + Inibitore di γ secretasi	

Valutazione dell'efficienza di incapsulazione (EE%).

L'efficienza di incapsulazione (EE%), di Silimarina, Inibitore di γ -secretasi e MCC950, saranno valutati mediante la seguente formula: $EE\% = Wt/Wi \times 100$ dove Wt è la quantità di farmaco effettivamente incorporato nella formulazione, Wi la quantità totale inizialmente aggiunta durante la preparazione. Per la valutazione del contenuto di farmaco il campione verrà liofilizzato e diluito in metanolo (1:100) e verranno effettuate le misurazioni alle varie lunghezze d'onda di assorbanza della soluzione contenente i liposomi con i farmaci, versus una soluzione di metanolo contenente il mix lipidico componente la preparazione liposomale⁷⁵.

Valutazione delle dimensioni, del potenziale zeta e del PDI.

Il diametro idrodinamico, il potenziale zeta e l'indice di polidispersione (PDI), delle varie lipofornulazioni sarà identificato mediante l'utilizzo dello Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK (DTS 5.00)⁶³. Verranno effettuate tre differenti misurazioni per ogni campione per tutti e tre i parametri valutabili.

Studio dei rilasci *in vitro*

In una membrana da dialisi verrà caricato 1 mL di ogni preparazione liposomale per un totale di 7 preparazioni, e verranno poste in 7 beakers contenenti ognuno 50 mL di PBS (10 mM e pH=7.4). La dialisi sarà condotta a 37°C in agitazione. Ad intervalli definiti, fino a 48 ore, 100 µL alla volta di soluzione esterna verranno prelevati e sostituiti con PBS sterile fresco. Ogni aliquota verrà liofilizzata e risolubilizzata in metanolo per la misurazione della concentrazione dei farmaci rilasciati. Le misurazioni verranno effettuate su 3 preparazioni analoghe.

Colture Cellulari. Diverse linee cellulari di HCC verranno utilizzate per gli esperimenti *in vitro*, in particolare procedendo dalle meno aggressive alle più aggressive: PRF5, HEP3G, HUH7, HLF e HLE (ATCC). Tutte le linee cellulari verranno coltivate come da protocollo in DMEM addizionato da 10% di FBS, 1% penicillina/streptomycin e 1% di glutamina (Gibco). Quando le cellule sono ad una confluenza del 70%, si procede al lavaggio dello strato cellulare e mediante l'utilizzo della tripsina, si procede a staccarle dalla piastra di cultura, per poi risospenderle in numero consono agli esperimenti di trattamento con i liposomi, per la valutazione della vitalità cellulare e del tempo di *uptake* dei liposomi nelle cellule. Le colture cellulari destinate all'*uptake* e allo studio di markers di EMT, verranno eseguite in 2D e in 3D, su sferoidi. Per i macrofagi murini, si procederà all'attivazione dell'inflammasoma mediante trattamento con LPS (10µg/mL), per 4 ore seguito da 30 minuti di incubazione con la nigericina a concentrazione finale di 20 µM. Si procederà all'attivazione dell'inflammasoma in presenza e assenza delle diverse preparazioni liposomali.

Test di proliferazione cellulare. Il test di proliferazione cellulare che verrà utilizzato è l'MTS, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), il cui principio è basato sulla determinazione dell'attività metabolica cellulare. Tutte 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 con le varie formulazioni:

- 1- CTR (non trattate)
- 2- Liposomi vuoti coniugati con gli anticorpi
- 3- Liposomi con Silimarina
- 4- Liposomi con MCC950
- 5- Liposomi con Inibitore γ secretasi
- 6- Liposomi con Silimarina e MCC950
- 7- Liposomi con Silimarina e Inibitore γ -secretasi
- 8- Liposomi con MCC950 e Inibitore γ -secretasi
- 9- Liposomi con la formulazione completa contenente i tre farmaci.

I farmaci verranno testati anche in formulazione libera, singolarmente o associati, rispettando gli stessi gruppi utilizzati nei tests delle nanoformulazioni.

I farmaci avranno una concentrazione finale di 5 μ M. I trattamenti verranno effettuati per 24, 48 e 72h. Dopo le cellule verranno trattate con MTS per 3 ore e si procederà a misurare l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 490nm.

Western, ELISA. I saggi di western blotting ed ELISA, verranno effettuati con protocolli standardizzati in precedenza, utilizzando sia anticorpi per Notch (Cell Signaling) e Caspasi-1 Clivata (Cell Signaling), mentre come proteina housekeeping, utilizzeremo la GAPDH (cell signaling)⁶⁶. 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 Nitrocellulosa, 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)⁷⁶. 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:

L'immunofluorescenza verrà eseguita per lo studio dei marcatori dell'EMT, secondo il protocollo riportato in precedenza⁷⁵, utilizzando come anticorpi utili a rilevare le proteine coinvolte nella transizione epitelio-mesenchimale, in modo da cogliere le variazioni di sovra-espressione o riduzione di espressione, nelle cellule di epatocarcinoma trattate con i liposomi, oppure per evidenziare modifiche delle proteine dell'inflammasoma quali NLRP3 e ASC. L'immunofluorescenza verrà effettuata sia su cellule che sui tessuti provenienti dai modelli animali trattati con i liposomi. A tal proposito, ricordiamo che tutti i tessuti da analizzare, saranno inclusi in paraffina tamponata e successivamente tagliati a 4 μ m 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.

Uptake dei liposomi nelle cellule di HCC e Macrofagi. Nelle linee cellulari considerate, verranno effettuati anche esperimenti di *uptake*, utilizzando intercalanti lipidici fluorescenti (BODIPY), che verranno caricati

nelle membrane dei liposomi, e che consentiranno di studiare le tempistiche di acquisizione delle vescicole da parte delle cellule. I gruppi di trattamento saranno gli stessi utilizzati nel test di proliferazione, e il monitoraggio avverrà a tempi prestabiliti T0, T3, T6 e T9. Per ogni punto verranno acquisite le immagini mediante microscopio confocale.

Sperimentazione *in vivo*. All'età di 4-6 settimane i topi CD-1 nudi verranno pesati ed in modo random separati in gruppi sperimentali. Gli animali saranno stabulati in di gabbie di polisulfone (33,2 x 15 x 13 cm), mantenuti nel numero di 3-4 topi per gabbia, riceveranno mangime standard autoclavato ed acqua sterilizzata, ad libitum e, verranno osservati e manipolati sempre sotto cappa sterile. 5×10^6 cellule o tessuti bioptici provenienti da pazienti verranno risospesi in un volume di 300 μ l di PBS:Matrigel 1:1 e inoculati nel sottocute del fianco destro dell'animale. 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 per due volte a settimana fino a quattro settimane. In particolare, ci sarà un gruppo controllo che riceverà per via intraperitoneale (i.p.) una soluzione di micelle lipidiche vuote mentre gli altri gruppi sperimentali riceveranno sempre per via i.p. una somministrazione della soluzione di micelle lipidiche contenente i singoli agenti biologici e farmacologici quali Silimarina, inibitore di γ -secretasi e MCC950 e la loro combinazione in base ai risultati ottenuti dagli stessi trattamenti *in vitro*. 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 $(length \cdot width^2) / 2^{77}$. 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.

Risultati attesi:

Nel progetto proposto indagheremo sulla funzionalità ed efficienza dei preparati liposomali come vettori di agenti terapeutici specificatamente in cellule di HCC e macrofagi, al fine di bloccare due pathways predominanti nella progressione tumorale, in particolare la proliferazione delle stesse cellule neoplastiche e l'infiammasoma NLRP3 nei macrofagi associati al microambiente tumorale. I risultati derivanti saranno determinanti per l'elaborazione di nuove soluzioni terapeutiche basate su GSI, inibitore di γ -secretasi, e silimarina, per l'arresto della proliferazione delle cellule di HCC e, parallelamente, su MCC950, inibitore di NLRP3, per il blocco del rilascio in circolo delle citochine pro-infiammatorie IL-1b e IL-18, rispettivamente, testati durante i nostri studi preliminari. In particolare, questi dati mettono in evidenza come i nostri preparati liposomali, seppur in assenza di anticorpi specifici per i nostri target cellulari e in assenza dei suddetti composti, siano in grado di fondersi con la membrana plasmatica di cellule di HCC e macrofagi, aprendo la strada alla preparazione di lisosomi più complessi strutturalmente, che prevedono non soltanto l'integrazione di anticorpi specifici per il riconoscimento delle proteine FZD1 sui macrofagi e FZD9 sugli epatociti tumorali, ma anche l'inserimento dei tre inibitori chiave. Dal nostro primo obiettivo ci aspettiamo, quindi, di osservare una duplice funzionalità di tali preparati *in vitro*, che saranno poi testati, con l'obiettivo 2, in modelli murini di HCC, al fine ultimo di bloccare la crescita tumorale andando a togliere segnali chiave autocrini e paracrini presenti nei noduli neoplastici di HCC.

Innovazioni:

L'inflammasoma insieme ai meccanismi di carcinogenesi, sono i due principali protagonisti insieme alla neovascolarizzazione, della degenerazione tissutale e della formazione delle masse tumorali, nei tumori solidi, e quindi anche nella formazione dei noduli neoplastici epatici. I due fenomeni, per azione autocrina e paracrina sono strettamente correlati fra loro, innescando un microambiente autonomo. Recentemente evidenze scientifiche ancora allo studio della comunità scientifica, pongono in relazione la proteina NOTCH con l'attivatore dell'inflammasoma NLRP3, soprattutto nell'ischemia e nei danni dovuti alla riperfusione epatica (EASL LiverTree™. Ke B. 04/15/16; 125609; FRI-215 Topic: Experimental), ma ancora è stato fatto nella correlazione dell'attivazione dell'inflammasoma con NOTCH, nell'ambito della carcinogenesi epatica. Nel nostro studio, andremo ad osservare quali sono i meccanismi che si attivano e/o che vengono silenziati quando andremo a somministrare due inibitori, rispettivamente MCC950, inibitore di NLRP3 e l'inibitore della γ secretasi, inibitore di NOTCH, contemporaneamente o singolarmente. In questo modo si potranno definire effettivamente i ruoli molecolari di entrambi i meccanismi, sia in vitro (mediante l'utilizzo di strutture cellulari miste in 3D) sia in vivo, direttamente sui modelli animali proposti. Inoltre l'utilizzo contemporaneo di nutraceutici come la silimarina, già utilizzato come epatoprotettore, garantisce e preserva l'integrità dei tessuti sani. Un altro punto innovativo riguardo il nostro progetto è definito dall'uso della nanomedicina per la somministrazione di tutti i farmaci proposti, dopo un attento studio di bilanciamento e tollerabilità cellulare. Le nostre nanoparticelle saranno costituite da molecole organiche fisiologicamente compatibili, con cui costituiremo liposomi bilamellari, che a differenza di quelli fino ad ora in commercio che ancora hanno azione sistemica, avranno un'azione cellulo-tessuto-specifica, dovuta alla coniugazione delle nanoparticelle con anticorpi diretti verso alcune proteine sovra espresse sia sui macrofagi FZD1, che sugli epatociti tumorali FZD9, durante lo sviluppo dei noduli neoplastici.

La strategia di somministrazione farmacologica infatti rappresenta un approccio terapeutico innovativo per le ragioni seguenti: (1) La selettività. I liposomi funzionalizzati caricati con i farmaci legano e rilasciano il loro contenuto solo in cellule maligne e macrofagi, che esprimono i recettori FZD9 e FZD1, rispettivamente. In tale modo si può interferire con le attività cellulari che favoriscono la progressione della malattia, come proliferazione, invasione neoplastica e immunosoppressione, risparmiando al contempo le cellule normali, che non esprimono significativamente i recettori sopra citati; (2) Il rilascio controllato dei farmaci. Poiché somministrati attraverso la veicolazione in forma concentrata nei liposomi ad azione mirata sui bersagli patologici, è possibile limitare i dosaggi minimizzando gli eventuali effetti di citotossicità sistemica. (3) L'attacco simultaneo a pathway del segnale intracellulare che cooperano costruttivamente per aumentare l'aggressività del tumore promuovendo processi come migrazione/invasione e immunosoppressione; (4) L'introduzione di un nuovo target molecolare, NLRP3, che è oggetto di intensa investigazione nelle linee di ricerca più attuali dati gli importanti risvolti terapeutici che l'inibizione di tale recettore può determinare.

Bibliografia:

1. Llovet, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2016).

doi:10.1038/nrdp.2016.18

2. Llovet, J. M. *et al.* EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* (2012). doi:10.1016/j.jhep.2011.12.001
3. Omer, R. E. *et al.* Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutr. Cancer* (2004). doi:10.1207/s15327914nc4801_3
4. Kudo, M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Latest advances. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10110412
5. Giannelli, G., Villa, E. & Lahn, M. Transforming growth factor- β as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0243
6. El Dika, I., Khalil, D. N. & Abou-Alfa, G. K. Immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma. *Cancer* (2019). doi:10.1002/cncr.32076
7. Gui, C. H., Baey, S., D'cruz, R. T. & Shelat, V. G. Trans-arterial chemoembolization + radiofrequency ablation versus surgical resection in hepatocellular carcinoma – A meta-analysis: TACE+RFA vs Surgery in HCC – a Meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology* (2020). doi:10.1016/j.ejso.2020.01.004
8. Calderaro, J. *et al.* Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J. Hepatol.* (2017). doi:10.1016/j.jhep.2017.05.014
9. Birgani, M. T. & Carloni, V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2017). doi:10.3390/ijms18020405
10. Galun, D., Srdic-Rajic, T., Bogdanovic, A., Loncar, Z. & Zuvela, M. Targeted therapy and personalized medicine in hepatocellular carcinoma: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *J. Hepatocell. Carcinoma* (2017). doi:10.2147/jhc.s106529
11. Rani, B. *et al.* Role of the tissue microenvironment as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* (2014). doi:10.3748/wjg.v20.i15.4128
12. Wu, J. *et al.* M2 macrophage - derived exosomes facilitate hepatocarcinoma metastasis by transferring α M β 2 integrin to tumor cells . *Hepatology* (2020). doi:10.1002/hep.31432
13. Liu, G. *et al.* The miR-92a-2-5p in exosomes from macrophages increases liver cancer cells invasion via altering the AR/PHLPP/p-AKT/ β -catenin signaling. *Cell Death Differ.* (2020). doi:10.1038/s41418-020-0575-3
14. Fane, M. & Weeraratna, A. T. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer* (2020). doi:10.1038/s41568-019-0222-9
15. Rossi, G. R., Trindade, E. S. & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Tumor Microenvironment-Associated Extracellular Matrix Components Regulate NK Cell Function. *Frontiers in Immunology* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.00073
16. Dituri, F., Mancarella, S., Cigliano, A., Chieti, A. & Giannelli, G. TGF- β as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Semin. Liver Dis.* **39**, (2019).
17. Oya, Y., Hayakawa, Y. & Koike, K. Tumor microenvironment in gastric cancers. *Cancer Science* (2020). doi:10.1111/cas.14521
18. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2019). doi:10.3390/ijms20040840
19. Nowell, C. S. & Radtke, F. Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer* (2017). doi:10.1038/nrc.2016.145
20. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J. & Aifantis, I. From fly wings to targeted cancer therapies: A centennial for notch signaling. *Cancer Cell* (2014). doi:10.1016/j.ccr.2014.02.018

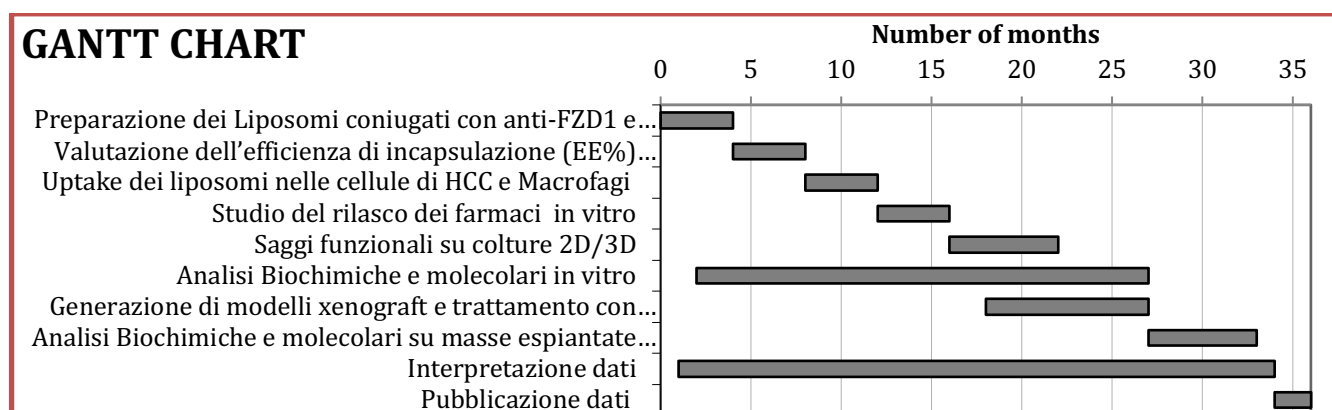
21. Strazzabosco, M. & Fabris, L. Notch signaling in hepatocellular carcinoma: Guilty in association! *Gastroenterology* (2012). doi:10.1053/j.gastro.2012.10.025
22. Meurette, O. & Mehlen, P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* (2018). doi:10.1016/j.ccell.2018.07.009
23. Meurette, O. Shaping of the Tumor Microenvironment by Notch Signaling. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2020). doi:10.1007/978-3-030-35582-1_1
24. Gramantieri, L. *et al.* Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* (2007). doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01544.x
25. Zhou, L. *et al.* The Significance of Notch1 Compared with Notch3 in High Metastasis and Poor Overall Survival in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0057382
26. Villanueva, A. *et al.* Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology* (2012). doi:10.1053/j.gastro.2012.09.002
27. Tschaharganeh, D. F. *et al.* Yes-associated protein up-regulates jagged-1 and activates the NOTCH pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2013). doi:10.1053/j.gastro.2013.02.009
28. Dill, M. T. *et al.* Constitutive Notch2 signaling induces hepatic tumors in mice. *Hepatology* (2013). doi:10.1002/hep.26165
29. Evert, M. *et al.* On the role of notch1 and adult hepatocytes in murine intrahepatic cholangiocarcinoma development. *Hepatology* (2013). doi:10.1002/hep.26411
30. Fan, B. *et al.* Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J. Clin. Invest.* (2012). doi:10.1172/JCI63212
31. Franklin, R. A. *et al.* The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (80-.). (2014). doi:10.1126/science.1252510
32. Wang, Y. C. *et al.* Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0269
33. Zhao, J. L. *et al.* Forced activation of notch in macrophages represses tumor growth by upregulating MIR-125a and disabling tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2019
34. Monsalve, E. *et al.* Notch-1 Up-Regulation and Signaling following Macrophage Activation Modulates Gene Expression Patterns Known to Affect Antigen-Presenting Capacity and Cytotoxic Activity. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.9.5362
35. Jnsson, J. I., Xiang, Z., Pettersson, M., Lardelli, M. & Nilsson, G. Distinct and regulated expression of Notch receptors in hematopoietic lineages and during myeloid differentiation. *Eur. J. Immunol.* (2001). doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3240::AID-IMMU3240>3.0.CO;2-E
36. Singh, N., Phillips, R. A., Iscove, N. N. & Egan, S. E. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* (2000). doi:10.1016/S0301-472X(00)00146-6
37. Fung, E. *et al.* Delta-like 4 induces Notch signaling in macrophages: Implications for inflammation. *Circulation* (2007). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675462
38. Levi, B. Macrophages take rheumatoid arthritis up a Notch. *Science Translational Medicine* (2017). doi:10.1126/scitranslmed.aan3022
39. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
40. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* (2002). doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
41. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology* (2016). doi:10.1038/nri.2016.58
42. Baroja-Mazo, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that

- amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* (2014). doi:10.1038/ni.2919
43. Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology* (2009). doi:10.1038/nrmicro2070
 44. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
 45. Rathinam, V. A. K. & Fitzgerald, K. A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* (2016). doi:10.1016/j.cell.2016.03.046
 46. Karki, R. & Kanneganti, T. D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nature Reviews Cancer* (2019). doi:10.1038/s41568-019-0123-y
 47. Stutz, A. *et al.* NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J. Exp. Med.* (2017). doi:10.1084/jem.20160933
 48. Wang, L., Negro, R. & Wu, H. TRPM2, linking oxidative stress and Ca²⁺ permeation to NLRP3 inflammasome activation. *Current Opinion in Immunology* (2020). doi:10.1016/j.coi.2020.01.005
 49. Magupalli, V. G. *et al.* HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science (80-.)*. (2020). doi:10.1126/SCIENCE.AAS8995
 50. Bauer, C. *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* (2010). doi:10.1136/gut.2009.197822
 51. Coccia, M. *et al.* IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4 + Th17 cells. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20111453
 52. Marvel, D. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: Expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation* (2015). doi:10.1172/JCI80005
 53. Song, X. *et al.* CD11b + /Gr-1 + Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 β -Secreting Cells. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.175.12.8200
 54. Bunt, S. K. *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* (2007). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2354
 55. Voigt, C. *et al.* Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1705165114
 56. Terme, M. *et al.* IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* (2011). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0993
 57. Dinevska, M. *et al.* Inhibition of radiation and temozolomide-induced glioblastoma invadopodia activity using ion channel drugs. *Cancers (Basel)*. (2020). doi:10.3390/cancers12102888
 58. Chappuis, F. *et al.* Immunogenicity and estimation of antibody persistence following vaccination with an inactivated virosomal hepatitis A vaccine in adults: A 20-year follow-up study. *Vaccine* (2017). doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.031
 59. Allen, T. M. & Martin, F. J. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.001
 60. Krown, S. E., Northfelt, D. W., Osoba, D. & Stewart, J. S. Use of liposomal anthracyclines in Kaposi's sarcoma. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.003
 61. Markman, M., Gordon, A. N., McGuire, W. P. & Muggia, F. M. Liposomal anthracycline treatment for ovarian cancer. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.004
 62. Rose, P. G. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer. *Oncologist* (2005). doi:10.1634/theoncologist.10-3-205
 63. Scavo, M. P. *et al.* Effectiveness of a controlled 5-fu delivery based on fzd10 antibody-conjugated liposomes in colorectal cancer in vitro models. *Pharmaceutics* (2020). doi:10.3390/pharmaceutics12070650

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

Timeline (Gantt chart)

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



Progetto 07/2019: "Nuovi bersagli terapeutici nella terapia personalizzata del cancro del colon-retto (CCR): manipolazione farmacologica dell'asse MAPK-FoxO3A e medicina mitocondriale"

Responsabile: Prof. Cristiano Simone

Background:

L'esistenza di vie di segnalazione cancro-specifiche e di deregolazioni molecolari uniche da paziente a paziente sottolinea l'importanza strategica della caratterizzazione genomica per sviluppare terapie personalizzate più efficienti.

I recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento del DNA hanno permesso di identificare in breve tempo ed in maniera completa alterazioni dei geni e delle vie di segnalazione coinvolte nel processo tumorigenico, aumentando la possibilità

che terapie mirate contro i target molecolari scatenanti del cancro possano essere estese ad una più ampia casistica per formulare strategie terapeutiche sempre più personalizzate [1]. Nei prossimi anni, si prevede che la caratterizzazione genomica completa dei pazienti rivoluzionerà la terapia del cancro, diventando uno strumento ordinario nella diagnostica clinica, per garantire diagnosi sempre più precoci, e soprattutto terapie mirate. Il cancro del colon-retto (CCR) rappresenta una sfida formidabile per i ricercatori di tutto il mondo, non solo dal punto di vista dell'incidenza epidemiologica, ma anche per la sua eterogeneità molecolare. Infatti, è noto che le mutazioni molecolari associate al cancro del colon retto possono essere uniche determinando diversi fenotipi della patologia [2]. Per tale ragione un numero sempre crescente di pazienti affetti da CCR viene selezionato nei trials clinici per essere sottoposto a trattamenti anticancro personalizzati. In particolare, il 15% di oltre 25.000 pazienti oncologici testati al centro Sloan Kettering potrebbero avere accesso ad uno dei farmaci approvati dalla FDA, e il 10% a farmaci attualmente in uso nei trials clinici. Un'altra parte, il 10-15%, presenta alterazioni del DNA che li rendono potenzialmente candidati per farmaci testati sugli animali. Tuttavia va sottolineato che la regressione del tumore è stata osservata solo nel 6,6% dei pazienti eleggibili. Infatti, in molti pazienti si verifica recidiva dopo un paio di anni di trattamento [3]. L'insorgere della chemioresistenza è responsabile del limitato successo di vari farmaci. In effetti, il blocco di una via di segnalazione, come quella di RAS, può indurre solo un effetto citostatico, mentre l'inibizione di più vie di segnalazione coinvolte nella chemioresistenza induce chemiosensibilità al farmaco e quindi un effetto citotossico finale [4]. Queste considerazioni evidenziano la rilevanza della caratterizzazione genetico-molecolare del tipo di tumore e dell'indagine preclinica, al fine di stabilire nuovi approcci terapeutici basati sull'uso di farmaci più specifici, mirati contro le molecole cruciali delle vie di segnalazione cancro-specifiche. Un recente studio ha mostrato un'interessante caratterizzazione delle alterazioni somatiche in CCR. Oltre alle attese mutazioni in APC, TP53, SMAD4, PIK3CA e KRAS, sono state trovate aberrazioni genomiche significative in IGF2, IGFR, ERBB2, ERBB3, MEK, AKT, MTOR e SRC e queste convergono tutte sul fattore di trascrizione FoxO3A, suggerendo che diverse proteine coinvolte nelle più critiche vie di segnalazione correlate al cancro, come le vie RTK-RAS e PI3K, possano essere oggetto dell'inibizione [5, 6]. La regolazione dell'attività di FoxO3A in risposta a stimoli extracellulari gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare, essendo un fattore di trascrizione cruciale nel meccanismo molecolare che guida le cellule verso la sopravvivenza o la morte. Infatti, FoxO3A è controllato da una vasta gamma di stimoli esterni, che non solo influenzano la sua attività trascrizionale, ma influenzano anche la sua localizzazione subcellulare. Questi meccanismi di regolazione sono mediati da vie di segnalazione correlate alla cancerogenesi, che alla fine determinano modifiche post-traduzionali (PTM) di FoxO3A (come ad esempio la fosforilazione). I nostri recenti risultati hanno dimostrato che FoxO3A si localizza nei mitocondri di cellule tumorali e tessuti non tumorali sottoposti a stress metabolico e a chemioterapici (CHT) [7]. Abbiamo identificato due residui di serina di FoxO3A, la S12 e la S30 (entrambi fosforilate in cellule tumorali umane) [7]. In risposta allo stress metabolico, queste serine sono fosforilate rispettivamente dalla MAP chinasi ERK nella via di MEK/ERK e dalla chinasi AMPK. Questo doppio segnale fosforilativo su FoxO3A comporta la traslocazione di questa proteina nei mitocondri, dove si lega al DNA mitocondriale formando un complesso con TFAM, mtRNAPOL e SIRT3. La formazione di tale complesso permette l'espressione del genoma mitocondriale soprattutto di quei geni responsabili del metabolismo ossidativo del mitocondrio. L'effetto finale della traslocazione mitocondriale di FoxO3A è quello di sostenere funzionalmente il ritmo metabolico mitocondriale nelle cellule tumorali metabolicamente stressate e/o trattate con CHT. La correlazione tra le vie a cascata di MEK/ERK e di AMPK (che convergono in specifiche fosforilazioni del dominio N-terminale di FoxO3A), rappresenta solo il primo capitolo del "codice mitocondriale" di FoxO3A, suggerendo l'ipotesi che le cellule cancerose siano altamente suscettibili all'inibizione della fosforilazione ossidativa, e che gli inibitori della traduzione mitocondriale possano agire come sensibilizzanti per le (chemio) terapie anticancro [8, 9]. Il piano sperimentale previsto in questo progetto mira a caratterizzare i meccanismi coinvolti nella chemioresistenza mediata dalla forma mitocondriale di FoxO3A (mtFoxO3A) impiegando cellule di CCR mutate stabilmente per il gene FoxO3A. Tali cellule sono generate attraverso trasfezioni stabili di costrutti mutanti e deleti di FoxO3A in cellule KO per il gene FoxO3A. Ripristinando stabilmente la funzione di FoxO3A in cellule di CCR FoxO3A KO andremo a manipolare la localizzazione di FoxO3A, mediante la modulazione di vie di segnalazione correlate al cancro. Questo meccanismo potrebbe rivelarsi molto promettente per contrastare la resistenza della cellula tumorale alla chemioterapia tradizionale.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1:

Caratterizzazione del meccanismo di chemioresistenza mediato da mtFoxO3A in cellule di CCR mutate stabilmente e trattate con farmaci a bersaglio molecolare e agenti antineoplastici.

Obiettivo specifico 2:

Caratterizzazione degli eventi molecolari coinvolti nella chemioresistenza mediata da mtFoxO3A in modelli di CCR sottoposti a terapie combinate.

Obiettivo specifico 3:

Determinazione dell'impatto fisiologico della manipolazione di mtFoxO3A nelle colture 3D ex vivo di CCR sottoposte a trattamenti combinati con CHT.

Obiettivo 1:

Questa fase del progetto è stata strutturata in modo da confermare il ruolo di mtFoxO3A nei modelli di CCR, in risposta a farmaci a bersaglio molecolare e CHT. A tal fine, partendo da cellule di CCR HCT116-FoxO3A -/- otterremo linee cellulari di CCR che esprimono stabilmente FoxO3A-S12A (costruito con la sostituzione serina-alanina in posizione 12 per abrogare la fosforilazione di ERK), FoxO3A-S30A (costruito con la sostituzione serina-alanina in posizione 30 per abrogare la fosforilazione di AMPK), FoxO3A-S12A/S30A (sostituzione concomitante di entrambe le serine per abrogare completamente la localizzazione mitocondriale FoxO3A) e infine FoxO3A-d242-271 (deleto privo della sequenza di localizzazione nucleare, NLS). Le cellule knock-out e le cellule mutanti stabili saranno quindi sottoposte a una vasta caratterizzazione funzionale degli effetti della mancanza di mtFoxO3A rispetto a FoxO3A nucleare in risposta a stress metabolico (LG, 2-DG, metformina) e/o a stress genotossico (CDDP, CPT). -11, 5-FU, VP-13) e/o a trattamento con inibitori della chinasi (CC, trametinib). Al fine di definire i meccanismi molecolari di resistenza alle terapie attuali (approvate dalla FDA e/o in fase di sviluppo), prevediamo anche il trattamento di cellule con anticorpi anti-EGFR (Cetuximab, Panitumumab), anti-VEGF (Bevacizumab) e anti-BRAF (Vemurafenib), con inibitori della multi-chinasi (Sorafenib), con composti anti-IGF1/IGF2 (Afatinib), che utilizzeremo come monoterapie o in combinazione con CHT e/o stimoli metabolici. Dal punto di vista procedurale, dopo i trattamenti delle cellule valuteremo la localizzazione subcellulare di FoxO3A mediante immunofluorescenza (IF), frazionamento subcellulare e immunoblot (IB). Successivamente, la funzione mitocondriale di FoxO3A sarà analizzata mediante immunoprecipitazione della cromatina, PCR quantitativa in tempo reale (QPCR) e analisi per IB delle proteine codificate da geni mitocondriali. Inoltre, eseguiremo test specifici per valutare la vitalità cellulare, la morte cellulare, la proliferazione cellulare e per analizzare la presenza o meno di funzione mitocondriale. Come controllo, intendiamo sensibilizzare le cellule tumorali bloccando la traduzione mitocondriale con la tigeciclina [11]

Obiettivo 2:

Questa fase del progetto ci consentirà di definire meglio i meccanismi dipendenti da mtFoxO3A, di resistenza ai farmaci ed alle terapie mirate che ad oggi risultano inefficienti nei pazienti con CCR. Per confermare il ruolo della forma mitocondriale di FoxO3A nel destino cellulare e nella chemioresistenza in diversi background genetici, tratteremo varie linee cellulari di CCR (HT29, LS174T, CaCO2, DLD1, LoVo, SW480) caratterizzate da differenti contesti mutazionali in risposta ai composti indicati nell'obiettivo 1, in monoterapia o terapia combinata.

Ciascuno di questi approcci sperimentali può fornire informazioni cruciali sulla possibile efficacia nel modulare la localizzazione subcellulare di FoxO3A attraverso l'inibizione di MEK con trametinib in sinergia con inibitori di AMPK per essere certi di indurre citotossicità nelle cellule tumorali di CCR.

A tal proposito, diversi studi clinici in corso stanno valutando l'efficacia della metformina in associazione con CHTs anche nella sua attività antitumorale e chemiopreventiva se viene utilizzato come agente singolo [12]. La localizzazione e la funzione subcellulare di FoxO3A saranno valutate come descritto nell'obiettivo 1. Questi esperimenti chiariranno il ruolo di FoxO3A e delle vie di segnalazione coinvolte nella resistenza ai farmaci in CCR. I risultati potrebbero suggerire nuovi protocolli basati su terapie combinate più efficaci nel migliorare la risposta del paziente al trattamento terapeutico.

Obiettivo 3:

Per approfondire il ruolo dei cambiamenti molecolari e fenotipici indotti dalla manipolazione della forma mitocondriale di FoxO3A, studieremo le risposte delle cellule al trattamento cellulare combinato di CHT e farmaci a bersaglio molecolare. Tale studio sarà condotto utilizzando colture cellulari 3D (modelli preclinici con organoidi) a partire da linee isogeniche di HCT116 e modelli precedentemente descritti che hanno risposto alle terapie testate (obiettivo 1-2).

Utilizzeremo queste linee cellulari di CCR in grado di generare sfere non-aderenti che assicurano una maggiore corrispondenza fisiologica rispetto alle colture monostrate.

Le culture in 3D trattate saranno caratterizzate dal punto di vista molecolare e fenotipico mediante la valutazione della morte cellulare (conta cellulare e morte cellulare), valutazione della vitalità della cripta tramite saggio MTT, colorazione vive/morte mediante microscopia confocale, IF e immunohistochimica, saggi di funzionalità mitocondriale, QPCR e analisi di IB di proteine codificate da geni mitocondriali. In questi modelli preclinici, la localizzazione e la funzione subcellulare di FoxO3A saranno valutate come descritto nell'obiettivo 1. Questi esperimenti serviranno a validare la rilevanza clinica di potenziali terapie multi-farmaco in grado di guidare il destino delle cellule cancerogene attraverso la regolazione di mtFoxO3A e delle vie di segnalazione cancro-specifiche.

Dati preliminari:

Recentemente abbiamo dimostrato che nelle cellule tumorali metabolicamente stressate, il fattore di trascrizione FoxO3A viene importato nei mitocondri a seguito di una fosforilazione specifica mediata dalle chinasi MEK/ERK ed AMPK. Una volta attivato, FoxO3A mitocondriale induce l'espressione di quei geni mitocondriali atti a supportare il metabolismo ossidativo (fosforilazione ossidativa) e la sopravvivenza di cellule sottoposte a stress metabolico. Inoltre, abbiamo osservato che l'accumulo di FoxO3A mitocondriale favorisce la sopravvivenza in maniera MEK/ERK-dipendente di cellule tumorali sottoposte a trattamento con CHT. Nel tentativo di analizzare le funzioni di FoxO3A nelle cellule di CCR, abbiamo generato una linea di cellule HCT116-FoxO3A $-/-$ con il sistema CRISPR/Cas9. In tali cellule abbiamo osservato una maggiore sensibilità allo stress metabolico e ai CHT rispetto alle HCT116 wt, suggerendo che FoxO3A promuova la chemioresistenza e la sopravvivenza delle cellule tumorali, mentre le cellule HCT116-FoxO3A $+/+$ erano più sensibili al trattamento con metformina (Fig1a). Successivamente, abbiamo sottoposto varie linee cellulari umane e le cellule HEK293 a restrizione calorica (bassi livelli di glucosio, LG) e abbiamo scoperto che maggiore è la quantità di mtFoxO3A, e maggiore è il tasso di sopravvivenza cellulare (Fig. 1b). Tale evidenza ci suggerisce che mtFoxO3A potrebbe essere un fattore di sopravvivenza cellulare allo stress metabolico. Per testare questa ipotesi, abbiamo trasfettato le HCT116-FoxO3A $-/-$ con vettori codificanti FoxO3A-wt (con tag FLAG), il doppio mutante non fosforilabile FoxO3A-S12A/S30A (incapace di localizzare nel mitocondrio, ma in grado di localizzarsi nel nucleo, NLS) o FoxO3A-d242-271 (privo del NLS, ma in grado di entrare nei mitocondri) in condizione di LG.

La ricostituzione di FoxO3Awt ha comportato un aumento della sopravvivenza cellulare, e il mutante FoxO3A-d242-271 era ancora in grado di proteggere le cellule dalla morte cellulare dipendente da stress metabolico; mentre il mutante S12A/S30A non era in grado di fare ciò (Fig1c). Inoltre, sia la forma wt che il mutante d242-271 attivavano la trascrizione mitocondriale, mentre il mutante S12A/S30A contribuiva all'induzione dell'apoptosi promuovendo la trascrizione del gene BIM (Fig. 1d). Successivamente, abbiamo trasfettato le cellule HCT116-FoxO3A $-/-$ con costrutti codificanti FoxO3A-wt, FoxO3A-S12A/S30A e FoxO3A-d242-271 (con GFP tag) e trattato tali cellule con 2-DG per indurre uno stress metabolico.

La colorazione con TMRE ha indicato che mtFoxO3A è necessario per mantenere il potenziale di membrana nei mitocondri funzionalmente attivi anche se sottoposti a stress metabolico, mentre la colorazione è persa nei mitocondri di cellule KO trasfettate con il mutante S12A/S30A (Fig1e). Questi risultati hanno sottolineato l'importanza cruciale del segnale fosforilativo sulle serine 12 e 30 di FoxO3A (Fig1c) nella resistenza delle cellule tumorali allo stress metabolico, spingendoci a valutare l'inibizione della via di MEK/ERK e/o della via di AMPK nelle cellule HCT116-FoxO3A $+/+$ sottoposte a restrizione calorica (LG). Il trattamento combinato di Trametinib (un inibitore MEK) e CC (un inibitore AMPK) hanno mostrato un effetto citotossico sinergico in cellule metabolicamente stressate (Fig. 1f). Per confermare questi risultati *in vivo*, abbiamo iniettato cellule HCT116-FoxO3A $+/+$ in topi nudi ed abbiamo trattato i tumori in crescita con 2-DG. I nostri dati hanno evidenziato che l'attivazione di entrambi le vie di segnalazione MEK/ERK ed AMPK è indotta nei tumori dopo stress metabolico, insieme con l'accumulo di mtFoxO3A (Fig. 1g). Per indagare il ruolo del mtFoxO3A nella risposta delle cellule tumorali ai CHT, abbiamo trasfettato le cellule HCT116-FoxO3A $-/-$ con i costrutti sopra indicati (con tag FLAG). Tali cellule sono state poi trattate con irinotecano (CPT-11), cisplatino (CDDP), 5-fluorouracile (5-FU) o etoposide (VP-13). La ricostituzione di FoxO3A wtha comportato un incremento della sopravvivenza (Fig2a), mentre il doppio mutante S12A/S30A non era in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi indotta da CHT (Fig2a) attivando la trascrizione di BIM e contribuendo alla risposta apoptotica (Fig2a, b). I mutanti d242-271 e FoxO3A-wt attivano entrambi l'espressione del genoma mitocondriale (Fig2a, b). L'analisi molecolare delle cellule HCT116-FoxO3A $-/-$ transfettate ha mostrato l'attivazione della sola via di segnalazione di MEK/ERK, (non della via di AMPK) in risposta alla chemioterapia (Fig2a), in quanto solo la fosforilazione sulla S12 di FoxO3A era richiesta per l'induzione della chemioresistenza (Fig2c). Coerentemente con questi dati, nei tumori xenotrapianti con HCT116-FoxO3A $+/+$, trattati con CDDP, abbiamo rilevato l'attivazione della sola via di segnalazione di MEK/ERK, (non di AMPK) e accumulo di mtFoxO3A, (Fig2d). In aggiunta, va sottolineato che trametinib e CPT-11 hanno mostrato un effetto citotossico sinergico nelle cellule HCT116-FoxO3A $+/+$ (Fig2e). Un effetto opposto è stato osservato con la metformina, che ha attivato solo la via di AMPK ed ha indotto l'apoptosi delle cellule (Fig. 2f). La ricostituzione di FoxO3A

con la forma wte/o con il mutante d242-271 ha aumentato significativamente la morte cellulare (Fig. 2g), mentre con il mutante S30A si è osservata una riduzione della morte cellulare fino a livelli analoghi al controllo. Questo dato ci suggerisce che la metformina può indurre apoptosi attraverso l'asse AMPK-mtFoxO3A. In accordo con tutti i nostri dati, la metformina ha mostrato un effetto citotossico sinergico con CPT-11 nelle cellule HCT116FoxO3A +/+ (Fig2h).

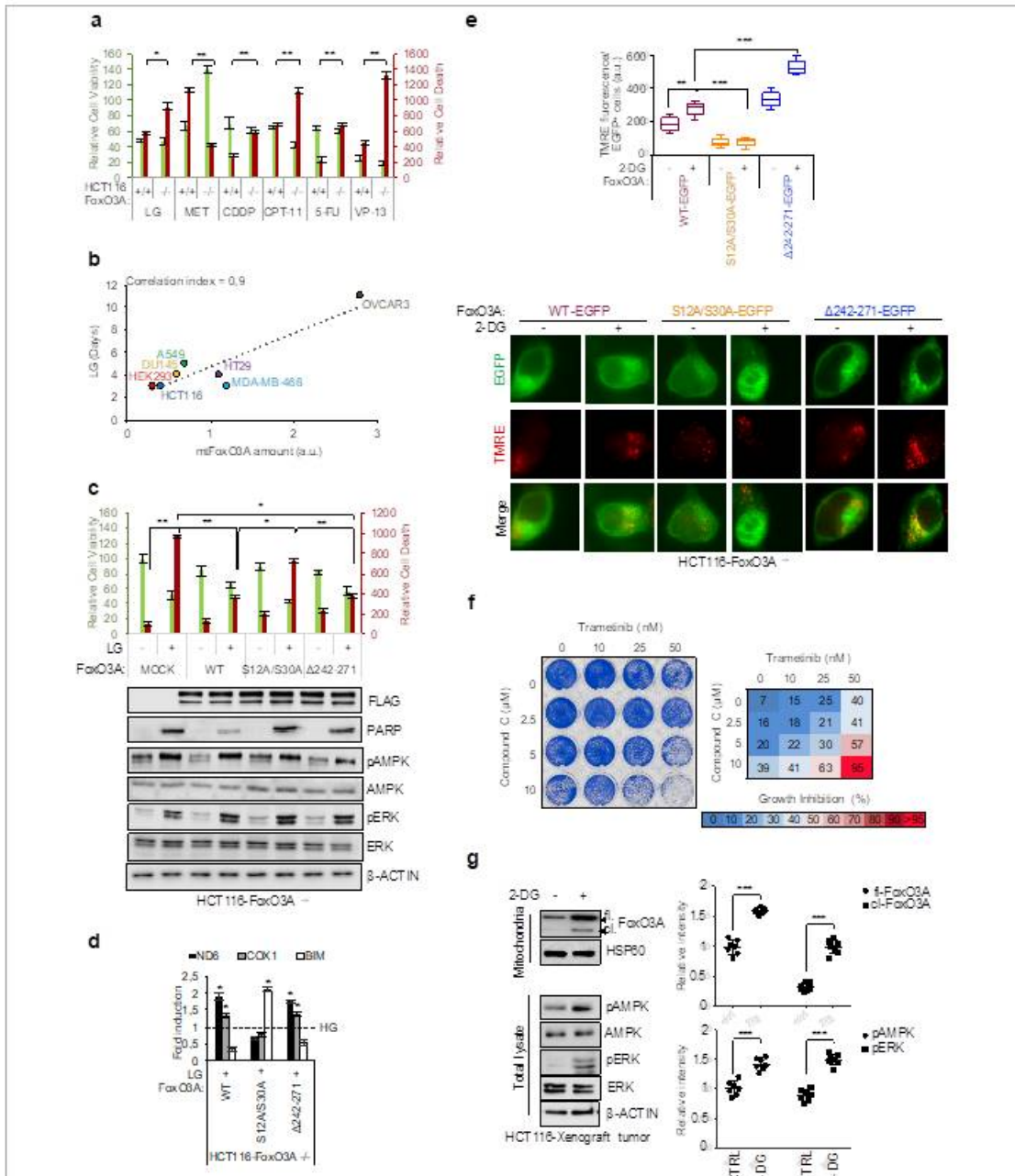


Figure 1. mtFoxO3A is involved in cancer cell response to metabolic stress. (a) HCT116-FoxO3A^{+/+} and HCT116-FoxO3A^{-/-} cells were subjected to different treatments: glucose restriction (LG, 0.75 mM glucose, 24h), metformin (MET, 10 μ M, 72h), cisplatin (CDDP, 30 μ M, 48h), irinotecan (CPT-11, 30 μ M, 24h), 5-fluorouracil (5-FU, 2 μ M, 24h) and etoposide (VP-13, 40 μ M, 24h). Relative cell viability and relative cell death were calculated. (b) Correlation between LG-resistance (days) and mitochondrial-FoxO3A (mtFoxO3A) protein levels in different human cell lines (HCT116 and HT29 colorectal cancer cells, HEK293 embryonic kidney cell, DU145 prostate cancer cells, A549 lung cancer cells, MDA-MB-468 breast cancer cells and OVCAR3 ovarian cancer cells). a.u.: arbitrary units. (c) HCT116-FoxO3A^{-/-} cells were transfected with the indicated plasmids (48h) and subjected to LG (24h). *Upper panel*: relative cell viability and relative cell death. *Lower panel*: immunoblot analysis of total proteins. b-ACTIN: loading control. (d) Transcription analysis of selected mitochondrial (*ND6*, *COX1*) and nuclear (*BIM*) genes by RT-PCR in HCT116-FoxO3A^{-/-} cells transfected with the indicated plasmids (48h) and subjected to LG (24h). (e) HCT116-FoxO3A^{-/-} cells, transfected with the indicated plasmids (48h), were subjected to metabolic stress with 2-DG (1 mM, 6h). The graph reflects the quantification of tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) fluorescence of active mitochondria in transfected cells. (f) Clonogenic assay on HCT116-FoxO3A^{+/+} cells cultured in LG (24h) and treated with increasing concentrations of trametinib and/or compound C, as indicated, for 24h. Cell growth percent inhibition at each drug concentration is presented. (g) *Left panel*: immunoblot analysis of total and mitochondrial proteins isolated from tumors ($n \geq 7$ for each group) derived from HCT116-xenografted nude mice subjected to 2-DG treatment (100 mg/kg, 6 days). b-ACTIN and HSP60 were used as total and mitochondrial loading control, respectively. *Right panel*: densitometric analysis of full-length and cleaved-FoxO3A normalized against the mitochondrial loading control and the results of the densitometric analysis of the phosphorylated-AMPK and ERK normalized against total-AMPK and ERK, respectively, and the loading control. Data are presented as mean \pm SEM and significance was calculated with Student's t test; *p value < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

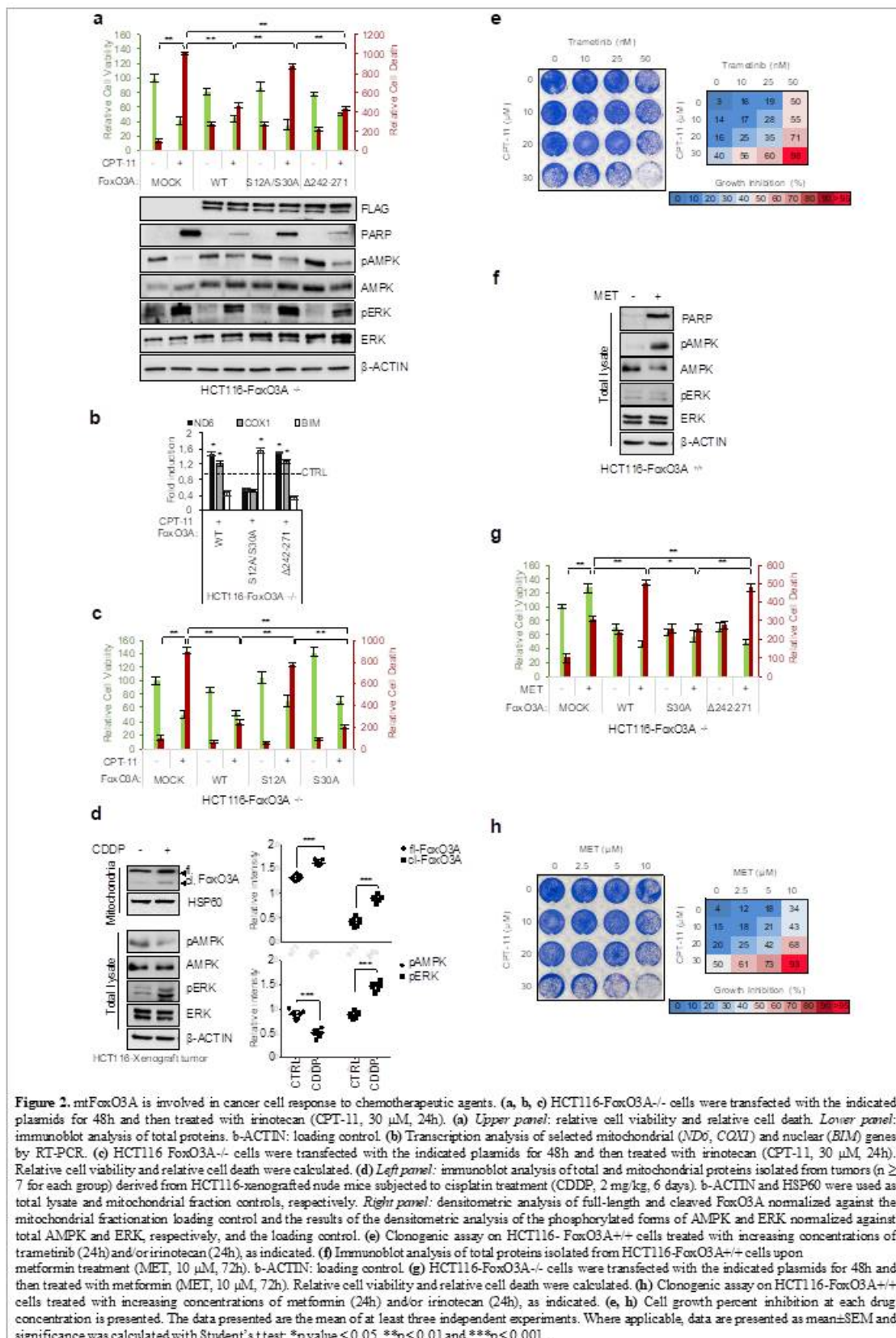


Figure 2. mtFoxO3A is involved in cancer cell response to chemotherapeutic agents. (a, b, c) HCT116-FoxO3A^{-/-} cells were transfected with the indicated plasmids for 48h and then treated with irinotecan (CPT-11, 30 μM, 24h). (a) *Upper panel*: relative cell viability and relative cell death. *Lower panel*: immunoblot analysis of total proteins. β-ACTIN: loading control. (b) Transcription analysis of selected mitochondrial (*ND6*, *COXI*) and nuclear (*BIM*) genes by RT-PCR. (c) HCT116 FoxO3A^{-/-} cells were transfected with the indicated plasmids for 48h and then treated with irinotecan (CPT-11, 30 μM, 24h). Relative cell viability and relative cell death were calculated. (d) *Left panel*: immunoblot analysis of total and mitochondrial proteins isolated from tumors (n ≥ 7 for each group) derived from HCT116-xenografted nude mice subjected to cisplatin treatment (CDDP, 2 mg/kg, 6 days). β-ACTIN and HSP60 were used as total lysate and mitochondrial fraction controls, respectively. *Right panel*: densitometric analysis of the phosphorylated forms of AMPK and ERK normalized against total AMPK and ERK, respectively, and the loading control. (e) Clonogenic assay on HCT116-FoxO3A^{+/+} cells treated with increasing concentrations of trametinib (24h) and/or irinotecan (24h), as indicated. (f) Immunoblot analysis of total proteins isolated from HCT116-FoxO3A^{+/+} cells upon metformin treatment (MET, 10 μM, 72h). β-ACTIN: loading control. (g) HCT116-FoxO3A^{-/-} cells were transfected with the indicated plasmids for 48h and then treated with metformin (MET, 10 μM, 72h). Relative cell viability and relative cell death were calculated. (h) Clonogenic assay on HCT116-FoxO3A^{+/+} cells treated with increasing concentrations of metformin (24h) and/or irinotecan (24h), as indicated. (e, h) Cell growth percent inhibition at each drug concentration is presented. The data presented are the mean of at least three independent experiments. Where applicable, data are presented as mean±SEM and significance was calculated with Student's t test; *p value < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

Metodologie e analisi statistiche:

Il ruolo di mtFoxO3A in risposta a terapie multi-farmaco sarà analizzata *in vitro* in cellule HCT116 FoxO3A^{-/-} e in cellule trasfettate stabilmente con un pattern di costrutti mutanti e trattate con composti e farmaci già indicati sopra nel piano sperimentale.

Successivamente, le cellule saranno valutate per vitalità, morte cellulare e attività bioenergetica mitocondriale. Dopo i trattamenti, la vitalità cellulare sarà valutata indirettamente monitorando l'apoptosi attraverso i seguenti test: MTT/proliferazione, dosaggio SRB, analisi di crescita clonogenica, analisi FACS (Annessina V/PI), IB (FoxO3A N-terminale, FoxO3A C-terminale, Bid, caspasi 3, LC3, fosfo-ERK, fosfo-MEK, caspasi 8, caspasi 3 clivata e PARPclivata) e IF (TMRE-potenziale di membrana mitocondriale e Mitotracker Red), Q-PCR e IB analisi dei geni codificati a livello mitocondriale. La bioenergetica mitocondriale sarà caratterizzata analizzando i livelli di ATP, di NAD/NADH e la produzione di ROS (DCF, DHE). Per valutare l'effetto della localizzazione subcellulare di FoxO3A nel superare la chemioresistenza in modelli preclinici di coltura cellulare 3D di CCR, tratteremo le cellule con gli agenti chemioterapici e i composti indicati nel piano sperimentale. Quindi, eseguiremo analisi tipiche della tumorigenesi (Matrigel, formazione di colonie, MTT e WST), Q-PCR e IB dei geni coinvolti nella morte e nella sopravvivenza cellulare, così come test cellulari per la risposta apoptotica, l'induzione dell'autofagia e la sopravvivenza cellulare (es. FoxO3A N-terminale, FoxO3A C-terminale, clivaggio delle caspasi, conversione LC3, formazione di colonie, microscopia confocale e analisi biochimiche). Per l'analisi statistica dei dati sarà utilizzato il test del t Student per definire i valori p. Un valore $p < 0,05$ sarà considerato statisticamente significativo.

Risultati attesi:

La nostra proposta progettuale evidenzia l'importanza della caratterizzazione genomica e dell'indagine preclinica finalizzata ad ideare nuovi approcci terapeutici basati su farmaci diretti contro i principali fattori responsabili dell'attivazione delle vie di segnalazione cancro-specifiche. Questo progetto ci permetterà non solo di approfondire la nostra conoscenza su questo nuovo meccanismo di chemioresistenza mediato da mtFoxO3A ma anche di caratterizzare altre vie di segnalazione che potrebbero regolare meccanismi di sensibilizzazione ai farmaci.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Il piano sperimentale qui proposto comprende un'ampia gamma di tecniche e approcci sperimentali versatili e differenti (procedure molecolari, biochimiche, genetiche, farmacologiche, di colture cellulari 3D ed ex-vivo) che ci consentiranno di ovviare eventuali problemi attraverso piani sperimentali alternativi. Inoltre, abbiamo individuato, in aggiunta alle attese mutazioni di APC, TP53, SMAD4, PIK3CA e KRAS, aberrazioni genomiche di altre cruciali vie di segnalazione cancro-specifiche che convergono su FoxO3A e che includono IGFR, ERBB2, ERBB3, AKT, MTOR e SRC. Queste vie di segnalazione saranno ampiamente investigate.

Innovazioni:

Sebbene le migliori risposte terapeutiche siano state associate a marcatori genomici specifici, per la maggior parte dei casi clinici l'associazione ai trattamenti terapeutici mirati appare per lo più empirica o correlativa. Al fine di esplorare la specificità delle combinazioni dei farmaci a bersaglio molecolare, le terapie devono essere adattate al circuito cellulare di ogni paziente e i protocolli clinici devono essere disegnati sulla base dei profili molecolari di ogni tumore.

I nostri dati preliminari sottolineano il potenziale terapeutico dei cocktail inibitori e suggeriscono che le vie di crosstalk possono giocare un ruolo compensatorio nella progressione del CCR. Questa proposta, basata sulla ricerca di nuove associazioni più specifiche tra terapia e paziente, mira non solo a sensibilizzare le cellule tumorali alla chemioterapia attraverso la modulazione della chemioresistenza dipendente da mtFoxO3A, ma anche a fornire ulteriori informazioni sui geni e sulle vie di segnalazione coinvolte nella chemioresistenza del tumore, offrendo quindi nuove opportunità per lo sviluppo di diagnosi più accurate e quindi interventi terapeutici più personalizzati nei pazienti affetti da CCR.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

I profili professionali del nostro gruppo di ricerca spaziano dalla ricerca di base alla clinica e forniscono una solida base per l'esecuzione di alta qualità di tutte le fasi sperimentali contemplate nella presente proposta progettuale. Inoltre, la multidisciplinarietà tecnico-sperimentale del nostro gruppo è tale da assicurare differenti approcci alternativi e complementari per i possibili problemi tecnici che possono insorgere durante il progetto. In particolare, il nostro team è composto da dottori di ricerca, biologi e biotecnologi con variegate competenze che comprendono procedure di biologia molecolare, colture cellulari (comprese le metodiche per le colture cellulari 3D), biochimica, genetica molecolare, genetica medica, (epi)genomica, trascrittomica e proteomica.

Il PI ha una validata competenza nella gestione dei progetti oltre che una comprovata esperienza tecnico-scientifica nell'organizzazione e nella gestione dei flussi di lavoro sperimentali riguardanti diverse branche della biologia molecolare e

della genetica. Inoltre, come attesta la qualità e il numero di pubblicazioni del gruppo di ricerca il PI del progetto presenta una validata abilità nell'elaborazione di manoscritti scientifici adatti per la pubblicazione su riviste scientifiche internazionali di medio-elevato impatto scientifico.

Bibliografia:

1. Garraway LA, Lander ES. Cell. 2013 Mar 28;153(1):17-37.
2. Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, Vermeulen L. Cancer Res. 2015 Jan 15;75(2):245-9. 3. Marquart J, Chen EY, Prasad V. JAMA Oncol. 2018 Apr 17.
4. Chiacchiera F, Grossi V, Cappellari M et al., Cancer Lett. 2012 Nov 1;324(1):98-108.
5. Cancer Genome Atlas Network. Nature. 2012 Jul 18;487(7407):330-7.
6. Zhang B, Wang J, Wang X et al., NCI CPTAC. Nature. 2014 Sep 18;513(7518):382-7.
7. Celestini V, Tezil T, Russo L, et al., Cell Death Dis. 2018 Feb 14;9(2):231.
8. Kuntz EM, et al. Nat. Med. 2017;23:1234-1240.
9. Tan J, Song M, Zhou M, Hu Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017;483:17-23.
10. Evans JM., Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al., BMJ 330, 1304-1305 (2005).
11. Martin TD, Cook DR, Choi MY, et al., Cell Rep. 2017 Jul 11;20(2):427-438.
12. Chae, Y. K. et al. Oncotarget 7, 40767-40780 (2016).
13. Perera-Bel J, Hutter B, Heining C et al. Genome Med. 2018 Mar 15;10(1):18.

Timeline/Prodotti finali:

Timeline Obiettivo 1: Gli esperimenti previsti in questa prima fase del progetto saranno avviati nel primo anno e completati entro i sei mesi del secondo anno di progetto.

Timeline Obiettivo 2: Gli esperimenti della seconda fase di progetto saranno avviati all'inizio del secondo anno e completati entro il secondo anno di progetto.

Timeline Obiettivo 3: Gli esperimenti di quest'ultima fase di progetto saranno avviati all'inizio del terzo anno e completati entro l'anno.

Prima metà del progetto:

Nei primi 18 mesi di progetto intendiamo realizzare il primo obiettivo progettuale e iniziare a lavorare sul secondo obiettivo.

Seconda metà del progetto:

Negli ultimi 18 mesi di progetto intendiamo completare il secondo e il terzo obiettivo progettuale.

Progetto 08/2019: "Sviluppo di una piattaforma di nanomedicina nelle malattie neoplastiche ed infiammatorie gastrointestinali"

Responsabile: Prof. Gianluigi Giannelli

Partecipanti: Mauro Mastronardi, Claudio Lotesoriere, Francesco Dituri

Background:

L'impiego delle nanotecnologie, applicate alle scienze mediche (nanomedicina) rappresenta un approccio fondamentale per la realizzazione della Medicina di Precisione che ha ispirato la redazione delle recenti linee di Ricerca dell'IRCCS "S. de Bellis". In particolare, la possibilità di ridurre di alcuni ordini di grandezza la concentrazione di farmaci altresì tossici mediante il loro trasporto in nanovettori di varia natura che venendo in contatto con i tessuti interessati dalla patologia in atto rilasciano soltanto "in loco" il farmaco, raggiungendo di fatto concentrazioni terapeutiche soltanto nella sede interessata consentono di ridurre gli effetti collaterali sistemici. Questa strategia consente quindi di mantenere in trattamento molti più pazienti per i quali la somministrazione di farmaci non rappresenterà più un fattore limitante la qualità di vita. Il razionale di questo approccio si applica quindi alle neoplasie, ma anche a tutte quelle patologie che richiedono l'uso di chemioterapici o di farmaci biologici con molteplici effetti collaterali come, ad esempio, le malattie infiammatorie croniche intestinali. Un altro esempio è dato dall'impiego di tale approccio per lo studio dei meccanismi che regolano lo sviluppo e la progressione delle patologie infiammatorie croniche, degenerative e neoplastiche consentendo di fatto nuove acquisizioni per lo sviluppo di nuovi farmaci.

I nanovettori per il trasporto di farmaci *sensibili* quali proteine ed ormoni devono soddisfare numerosi requisiti. Devono resistere alle grandi variazioni di pH che intercorrono tra stomaco (pH 1) e intestino (pH 8); devono proteggere il carico dagli enzimi digestivi lungo il transito nell'apparato digerente, e devono superare la barriera costituita dallo strato mucoso per poter raggiungere le cellule malate. Questi vettori presentano una piattaforma di nanomedicina che può essere esportata a numerose patologie di interesse gastroenterologico. Ad esempio, tumori del colon, o a malattie infiammatorie croniche intestinali come Morbus Crohn o altre.

La nanoformulazione potrà essere usata per trasportare localmente steroidi, altri farmaci, e per ripristinare il microbiota locale e bilanciare le condizioni ambientali al sito patologico.

Recentemente, diversi studi hanno investigato sistemi nanoparticolati per il trasporto di farmaci peptidici. Questi approcci hanno dimostrato che sistemi di piccole dimensioni e sistemi a pH controllabile attraversano più facilmente lo strato mucoso; al contrario, sistemi a base di chitosano, con note proprietà muco-adesive, aderiscono allo strato mucoso e rilasciano il farmaco prima di attraversare questa barriera. Inoltre, questi studi hanno mostrato che le molecole costituenti i sistemi nanoparticolati devono presentare specifiche proprietà di carica netta neutra o caratteristiche idrofobiche.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Sviluppare nanovettori per il trasporto di farmaci

Obiettivo specifico 2: Testare in modelli sperimentali la terapia con nanocarriers in IBD

Obiettivo 1:

Questo obiettivo si propone di sviluppare nanovettori per il trasporto di farmaci a base di molecole biologiche quali proteine del latte o mucine, che verranno formulate, via crosslinking chimico, allo stato di nanoparticelle per poter incapsulare i farmaci di interesse. Questo processo chimico incrementa la stabilità del costrutto a base di molecole biologiche nei

confronti della digestione enzimatica e crea una struttura reticolare in grado di intrappolare e proteggere le molecole farmacologiche.

Obiettivo 2:

Questo approccio sarà testato in primis come trattamento per il Morbo di Crohn. Normalmente, un trattamento sistemico con farmaci anti-TNF migliorano i sintomi della patologia; tuttavia, trattamenti prolungati hanno effetti collaterali severi. Per questo intendiamo sviluppare un trattamento che può essere somministrato oralmente e quindi agire direttamente al sito d'interesse, garantendo alte concentrazioni dal lato luminale dell'intestino. Ipotizziamo che in questo modo si riducano gli effetti collaterali, poiché il farmaco si accumula al sito di azione a concentrazioni sufficientemente elevate a livello locale senza accumulo sistemico in altri organi.

Metodologie e analisi statistiche:

Nanoparticelle.

Le nanoparticelle verranno sviluppate a partire da diverse mucine, lectine o altre molecole biodegradabile e biocompatibile disponibili commercialmente con procedure di crosslinking chimico o condensazione ionica. Inoltre, verranno testate anche diverse lectine, poiché entrambe le tipologie di proteine (lectine e mucine) possono fornire addizionali proprietà di targeting ai tessuti patologici. Il range di dimensione di queste nanoparticelle sarà compreso fra 100-300 nm, range identificato in letteratura come compromesso ottimale per garantire l'attraversamento dello strato mucoso e sufficiente volume di carico per i farmaci. Queste particelle verranno caratterizzate in termini di dimensione, indice di polidispersività, carica superficiale, capacità di carico, stabilità in condizioni ambientali differenti e *shelf-life* (stabilità di conservazione).

Test in vitro

Le particelle saranno testate per le loro interazioni in vitro con sistemi 2D e 3D di colture cellulari da linee in grado di esprimere muco (per esempio la linea HT29) o organoide da tessuti di biopsia dei pazienti, in modo da garantire un modello di studio della penetrazione dello strato mucoso delle particelle. Si testeranno diverse condizioni ambientali, poiché è noto che il pH del lume intestinale prossimale dei pazienti affetti da morbo di Crohn è diverso da quello dei pazienti sani (tra 2.3 – 5.5 rispetto ad un valore medio di 6-6.7). Anche altre malattie gastrointestinale si presentano con cambiamenti sia nel pH sia nella composizione della mucina. Inoltre, le nanoparticelle verranno testate per la capacità di agire come sistemi tampone in grado di bilanciare e ripristinare il normale pH dell'intorno. Conseguenza attesa di tale ripristino del pH è il conseguente impatto sul microbiota. L'effetto delle nanoparticelle e delle condizioni ambientali sul microbiota intestinale saranno oggetto di studio dettagliato in un sottoprogetto dedicato. Un altro sottoprogetto è la comunicazione della biota con le cellule intestinale via esosomi o in generale via vescicole extracellulari.

Test in vivo

Modelli animali sani verranno impiegati per lo studio delle interazioni tra le nanoparticelle sviluppate e il microbiota. Inizialmente verranno caratterizzati i ceppi che sono solitamente sovrarappresentati o alterati nei pazienti affetti da Morbo di Crohn, quali *Bacteroides*, *Eubacteria* and *Peptostreptococcus* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.018>), prestando particolare attenzione all'*uptake* e all'attività antibiotica delle nanoparticelle. Perciò, le nanoparticelle verranno marcate con una sonda fluorescente per poi procedere alla somministrazione agli animali, che verranno sacrificati a diversi tempi di esposizione (*time-points*) per rilevare la presenza delle nanoparticelle nello strato mucoso, nelle cellule epiteliali e nei batteri del microbiota. Questa analisi servirà a determinare un potenziale meccanismo di feedback da parte del microbiota sulle cellule affette dalla patologia.

Per ciò che concerne gli effetti diretti delle nanoparticelle e la loro biodistribuzione, verranno utilizzati modelli murini della patologia ben caratterizzati (DOI:[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00052-2)). Verrà inizialmente caratterizzato il microbiota e le sue modifiche concentrandosi sui ceppi che sono notoriamente alterati nei pazienti affetti da Morbo di Crohn. In seguito, nanoparticelle marcate con sonda fluorescente verranno somministrate ai modelli murini, per poi studiare la biodistribuzione e la localizzazione delle nanoparticelle nelle aree infiammate. Infine, studi a lungo termine permetteranno di seguire l'andamento della patologia nell'animale a seguito di trattamenti ripetuti con le nanoparticelle.

Risultati attesi:

Si prevede di ottimizzare la terapia di alcune neoplasie GI e delle IBD mediante un approccio farmacologico controllato e personalizzato in base alle caratteristiche molecolari che

Innovazioni:

Lo sviluppo di una piattaforma di nanomedicina rappresenta una risorsa estremamente funzionale per la ricerca attualmente in atto presso l'Istituto de Bellis, considerando l'inserimento dell'Istituto nella rete ACC. Infatti, lo scorso anno è stato sviluppato un progetto di genomica in modo da sfruttare al meglio le potenzialità derivanti proprio dal network ACC, quest'anno l'idea è quella di implementare la ricerca in campo traslazionale sulle neoplasie del tratto gastroenteriche aggiungendo il contributo fornito da una piattaforma di nanomedicina, che nel nostro caso è fruibile anche nel campo delle malattie infiammatorie croniche intestinali, che rappresentano anche come impatto clinico una importanza fondamentale all'interno dell'Istituto. La personalizzazione della medicina passa quindi attraverso la scelta del protocollo terapeutico più adatto alle caratteristiche molecolari della patologia di ogni singolo paziente ma anche attraverso l'ottimizzazione dell'aderenza alla terapia mediante la riduzione degli effetti collaterali e migliorando la qualità di vita. Tutto questo è possibile veicolando i farmaci e controllandone il rilascio degli stessi attraverso nanovettori.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Si prevede una complementarità con il gruppo di colleghi dell'Oncologia per quanto concerne l'impiego sperimentale delle nanoparticelle in neoplasie del tratto gastroenterico e con colleghi dell'endoscopia per quanto riguarda l'utilizzo sperimentale delle nanoparticelle nelle IBD. Si prevede inoltre anche la collaborazione con l'UOC di Anatomia Patologica per la valutazione della progressione del danno tumorale tessutale.

Bibliografia:

1. Quantification of BSA-loaded chitosan/oligonucleotide nanoparticles using reverse-phase high-performance liquid chromatography. Wong CY, Martinez J, Al-Salami H, Dass CR. *Anal Bioanal Chem.* 2018 Sep 11. doi: 10.1007/s00216-018-1319-9.
2. Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. Rodriguez Amado JR, Prada AL, Duarte JL, Keita H, da Silva HR, Ferreira AM, Sosa EH, Carvalho JCT. *Saudi Pharm J.* 2017 Dec;25(8):1158-1168. doi: 10.1016/j.jsps.2017.07.008.
3. Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery. Voza G, Danish M, Byrne HJ, Frías JM, Ryan SM. *Int J Pharm.* 2018 Aug 25. pii: S0378-5173(18)30628-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.050.
4. Redox sensitive lipid-camptothecin conjugate encapsulated solid lipid nanoparticles for oral delivery. Du Y, Ling L, Ismail M, He W, Xia Q, Zhou W, Yao C, Li X. *Int J Pharm.* 2018 Oct 5;549(1-2):352-362. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.010.
5. Oral Nanoparticles Exhibit Specific High-Efficiency Intestinal Uptake and Lymphatic Transport. Kim KS, Suzuki K, Cho H, Youn YS, Bae YH. *ACS Nano.* 2018 Aug 8. doi: 10.1021/acsnano.8b04315.
6. Advances in Plant-derived Edible Nanoparticle-based lipid Nano-drug Delivery Systems as Therapeutic Nanomedicines. Yang C, Zhang M, Merlin D. *J Mater Chem B.* 2018 Mar 7;6(9):1312-1321. doi: 10.1039/C7TB03207B.
7. Advancements in the oral delivery of Docetaxel: challenges, current state-of-the-art and future trends. Sohail MF, Rehman M, Sarwar HS, Naveed S, Salman O, Bukhari NI, Hussain I, Webster TJ, Shahnaz G. *Int J Nanomedicine.* 2018 Jun 8;13:3145-3161. doi: 10.2147/IJN.S164518. eCollection 2018.
8. Biopharmaceutical characters and bioavailability improving strategies of ginsenosides. Pan W, Xue B, Yang C, Miao L, Zhou L, Chen Q, Cai Q, Liu Y, Liu D, He H, Zhang Y, Yin T, Tang X. *Fitoterapia.* 2018 Sep;129:272-282. doi: 10.1016/j.fitote.2018.06.001.
9. Delivery of tacrolimus with cationic lipid-assisted nanoparticles for ulcerative colitis therapy. Wang JL, Gan YJ, Iqbal S, Jiang W, Yuan YY, Wang J. *Biomater Sci.* 2018 Jun 25;6(7):1916-1922. doi: 10.1039/c8bm00463c.

10. Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid. Lima IA, Khalil NM, Tominaga TT, Lechanteur A, Sarmiento B, Mainardes RM. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018 May 29:1-10. doi: 10.1080/21691401.2018.1477788

Timeline / Prodotti finali:

Mesi 1-6: realizzazione delle nanoparticelle

Mesi 7-12: Validazione delle nanoparticelle in vitro

Mesi 13-18: Validazione dell'efficacia delle nanoparticelle in vitro

Mesi 19-30: Trattamento con nanoparticelle di patologie GI in modelli sperimentali in vivo

Mesi 31-36: Validazione della terapia con nanoparticelle in vivo

Prima metà del progetto:

Definire il disegno e la realizzazione delle nanoparticelle.

Validare l'upload del farmaco

Validare il rilascio del farmaco in vitro

Validare in vitro l'efficacia delle nanoparticelle

Verificare la tossicità delle nanoparticelle in vitro

Verificare la tossicità delle nanoparticelle in vivo

Seconda metà del progetto:

Validare l'efficacia del trattamento con nanoparticelle in vivo

Definire i target della risposta alla terapia con nanoparticelle

LINEA 2

MEDICINA PREVENTIVA/PREDITTIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 2 "Medicina preventiva/predittiva in Gastroenterologia", i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell'anno 2021 sono i seguenti:

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

Responsabile: dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: Elisabetta Cavalcanti, Grazia Serino, Sergio Coletta, Rossella Donghia

Introduzione

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

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

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

precise. Attualmente nonostante la loro nuova classificazione (WHO 2010/2017), il comportamento clinico dei NET è altamente imprevedibile ed al momento è difficile definire le caratteristiche biologiche, patologiche o cliniche che potrebbero essere in grado di caratterizzare il tumore e di definire la prognosi e la risposta ai trattamenti nei tre gruppi G1, G2 e G3.

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

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

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

dello studio del profilo di espressione genica e molecolare la messa appunto della biopsia liquida per i NET sarebbe utile per seguire l'evoluzione della malattia e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Nel primo anno è stata allestita la casistica dei casi NET pervenuti all'IRCCS de Bellis dal gennaio 2006 a dicembre 2019, sono stati arruolati 90 pazienti: 48 M e 42 F e comprendono NET dell'apparato GEP: 27.7% stomaco, 14.4 % fegato, 2 % colecisti, 7.8 % colon, 12.2 % pancreas, 26.7% piccolo intestino, 7.78 % appendice e 3.33 % ampolla di Vater. Tutti i casi sono stati rivisti e classificati secondo la WHO 2017 e su tutti è stato rivalutato il Ki 67. Di questi pazienti è stato anche valutato l'infiltrato perineurale, la permeazione vascolare, la necrosi e i linfonodi metastatici.

Successivamente sono stati selezionati i campioni prelevati da pazienti con GEP-NET ben differenziati (grado G1 e G2) e si è proceduto con l'estrazione dei campioni di miRNA dai blocchetti inclusi in paraffina utilizzando il miRNeasy FFPE kit (Qiagen). La concentrazione del campione estratto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop.

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

È in corso la validazione dei dati ottenuti da microarray mediante l'utilizzo della Real-Time PCR.

Obiettivi specifici dello studio:

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

Obiettivo specifico 1:

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

Obiettivo specifico 2:

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

Obiettivo specifico 3:

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

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

Responsabile: dott.ssa Grazia Serino

Partecipanti: Viviana Scalavino, Giusy Bianco, Angela Tafaro, Raffaele Armentano, Sergio Coletta

Introduzione

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

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

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

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

L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50µm (3). È stato dimostrato che una alterazione dell'integrità della barriera intestinale comporta

una cascata di eventi quali: passaggio indiscriminato di contenuto luminale attraverso le giunzioni epiteliali, insorgenza di infiammazione e danno tissutale (4).

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

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

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

Recentemente, abbiamo studiato il profilo di espressione dei miRNAs nelle cellule epiteliali di colon isolate da topi con colite ulcerosa (modello Winnie), comparandolo con quello delle cellule epiteliali isolate da topi Wild-type. Nello specifico, sono stati individuati 4 miRNAs che sono coinvolti nella fisiopatologia delle cellule epiteliali intestinali.

Scopo di questo progetto sarà validare biologicamente la funzione dei 4 miRNAs individuati mediante esperimenti *in vitro* e *in vivo* al fine di identificare nuovi target terapeutici che potrebbero migliorare la comprensione della patogenesi delle IBD e quindi rendere più specifica la terapia.

Obiettivi specifici dello studio:

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

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

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

Obiettivo 1:

WP1. Studi funzionali in vitro

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

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

Obiettivo 2:

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo 3:

WP3. Validazione dei risultati ottenuti nel modello murino in pazienti affetti da colite ulcerosa Allo scopo di verificare se i risultati ottenuti nel modello murino possono essere traslati nell'uomo, andremo a valutare l'espressione dei miRNA validati biologicamente nel modello murino in campioni biotipici fissati in formalina o inclusi in paraffina ottenuti da pazienti con colite ulcerosa e cancro coloretale archiviati nel Dipartimento di Anatomia Patologica dell'IRCCS "Saverio de Bellis". In questi tessuti la rilevazione dei miRNA avverrà sia tramite Real-Time PCR dopo aver effettuato la

microdissezione laser dell'epitelio e sia tramite ibridazione in situ che permetterà una determinazione semi-quantitativa dei miRNA e la loro localizzazione nel tessuto in toto. I livelli di espressione saranno inoltre correlati con i parametri clinici (tissutali e laboratoristici) dei pazienti presi in esame.

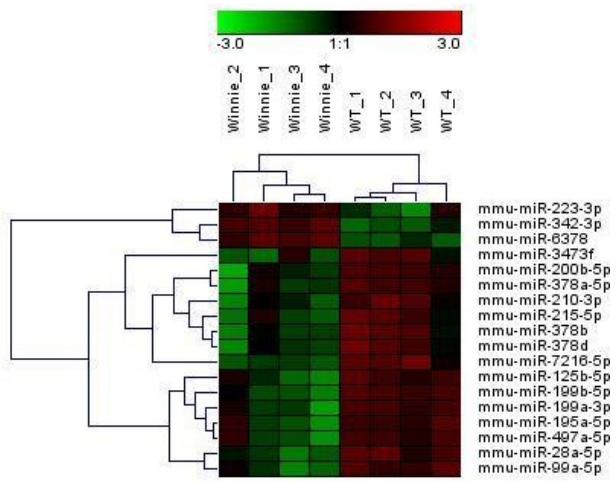
Dati preliminari:

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

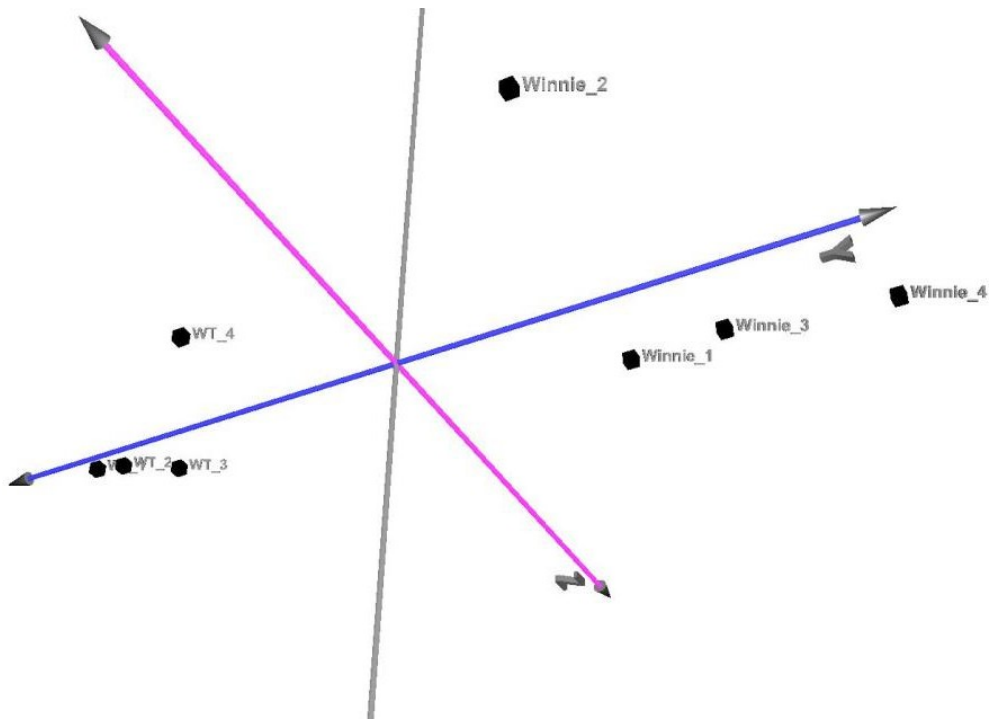
I pezzi di colon sono stati prelevati da 4 topi Winnie e 4 topi wild-type e sottoposti a digestione meccanica con il gentleMACS™ Dissociator ed enzimatica utilizzando il kit Lamina Propria Dissociation kit per topo (Miltenyi Biotec). La sospensione cellulare è stata in seguito utilizzata per selezionare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

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

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

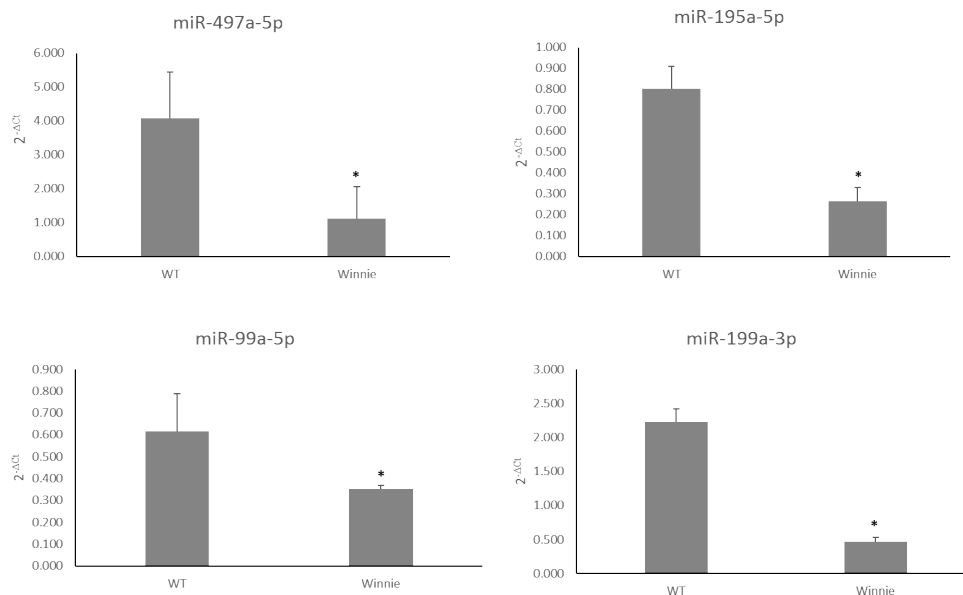


Hierarchical clustering



Principal Component Analysis

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



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

Metodologie e analisi statistiche:

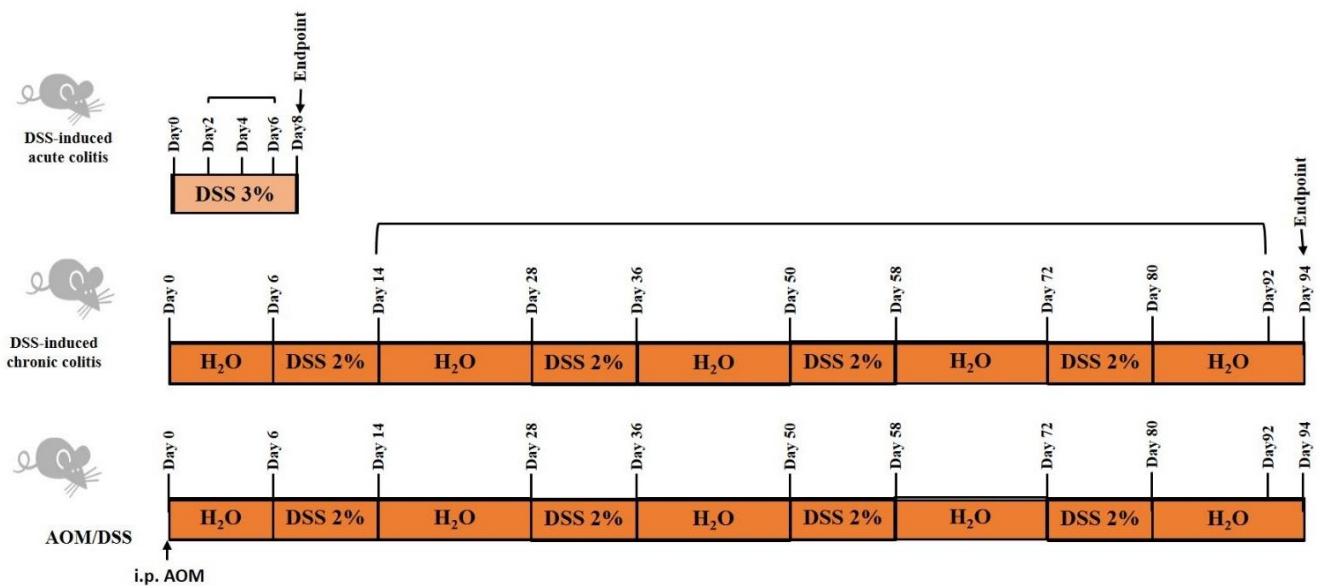
Gli esperimenti di transfezione sulle cellule epiteliali del colon a linea continua quali Caco-2 e HT-29 saranno effettuati utilizzando molecole di miRNA mimic. Queste molecole vanno ad aumentare i livelli del miRNA endogeno. Si utilizzerà un metodo di transfezione transiente a base di liposomi cationici.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

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

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

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

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



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

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

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

Risultati attesi:

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

Innovazioni:

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

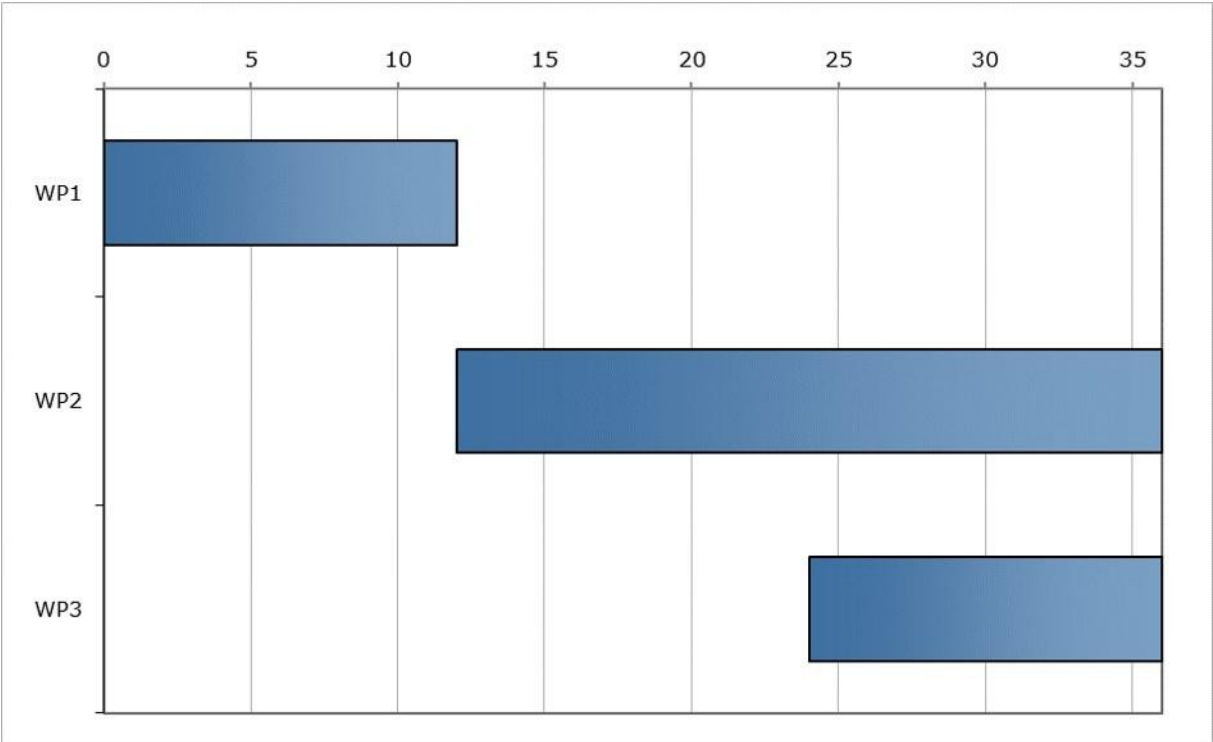
A causa della natura evolutivamente conservata del miRNA, i nostri studi su modelli preclinici potrebbero essere potenzialmente traslati per il trattamento del paziente con IBD. Da notare che i costi di produzione limitati di tali molecole rispetto ai farmaci attualmente in uso potrebbero avere un impatto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

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

Bibliografia:

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 369(9573):1627-40, 2007.
2. Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 16(34):4264-71, 2010
3. Dharmani P, Srivastava V, Kisson-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*. 1(2):123-35, 2009.
4. Ahmad R., Sorrell MF, Batra SK, Dhawan P & Singh AB. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol* 10, 307–317, 2017.
5. Hanahan D, Weinberger RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5):646-674, 2011.
6. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454(7203) :436-444, 2008.
7. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 372 (15):1441-1452, 2015.
8. Chiranjib Chakraborty, Ashish Ranjan Sharma, Garima Sharma, C. George Priya Doss, Sang-Soo Lee. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*. 8: 132–143, 2017.
9. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, Satsangi J. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*. 64(3):504-17, 2015.
10. Van der Goten J, Vanhove W, Lemaire K, Van Lommel L, Machiels K, Wollants WJ, De Preter V, De Hertogh G, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, Schuit F, Vermeire S, Arijis I. Integrated miRNA and mRNA expression profiling in inflamed colon of patients with ulcerative colitis. *PLoS One*. 9(12):e116117, 2014.

Timeline (Gantt chart)



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

Responsabile: dott.ssa Anna Maria Valentini

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

Introduzione

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

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

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

Obiettivo 1:

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

Obiettivo 2:

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

Obiettivo 3:

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

Metodologie e analisi statistiche:

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

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

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

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

I risultati ottenuti saranno sottoposti ad adeguate indagini statistiche

Risultati attesi:

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

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

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

Bibliografia:

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

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

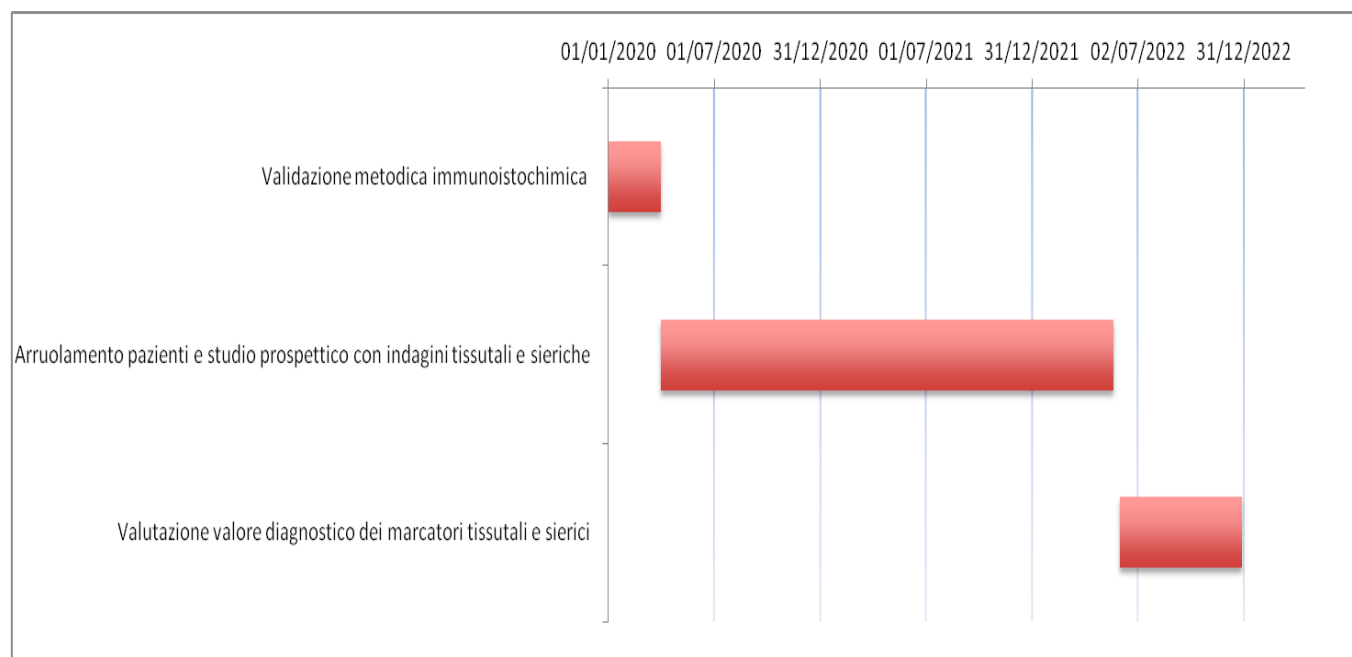
Aksoy-Altinboga A, Baglan T, Umudum H et al. Diagnostic value of S100p, IMP3, Maspin, and pVHL in the differential diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and normal/chronic pancreatitis in fine needle aspiration biopsy. *J Cytol* 35: 247-51.2018

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

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

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

Timeline (Gantt chart)



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

Responsabile: dott.ssa Rosalba Dalessandro

Partecipanti: Claudio Lotesoriere, Caterina Messa, Maria Grazia Refolo, Giampiero De Leonardis, Domenico Mavilio, Joanna Mikulak, Raffaele Armentano, Annamaria Valentini

Introduzione

Il cancro gastrico (GC) è il quinto tumore più comune al mondo e la prognosi dei pazienti affetti da GC è infausta nelle forme più avanzate [1]. Le crescenti conoscenze sulla sua patogenesi molecolare hanno dimostrato che il GC non è una singola entità, ma una costellazione di diverse malattie, ognuna con le proprie caratteristiche molecolari e cliniche. La classificazione molecolare operata grazie al lavoro del "Genome Atlas" (TCGA) ha definitivamente chiarito che le differenze cliniche e prognostiche osservate tra i due tipi istologici, intestinale e diffuso, hanno basi molecolari molto peculiari, con specifiche implicazioni cliniche [2,3]. Attualmente, la chirurgia con linfadenectomia D2, (rimozione di almeno 25 linfonodi) e senza residui macro o microscopici (cosiddetta resezione R0), rappresenta l'unico approccio curativo per GC localizzato [4], ma solo il 20% dei pazienti presenta una malattia resecabile alla diagnosi e, anche in caso di resezione curativa, la prognosi rimane infausta a causa dell'alto tasso di recidiva della malattia. In questo contesto, diversi approcci peri-operatori sono stati sviluppati nei

paesi occidentali e orientali al fine di diminuire i tassi di ricaduta e migliorare la sopravvivenza. Il recente studio di fase III FLOT4 ha rappresentato un progresso sostanziale nel trattamento peri-operatorio del carcinoma gastrico localmente avanzato e dell'adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea (GEJ). Lo schema FLOT, che prevede la combinazione di fluorouracile, leucovirin, 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 sembra essere più efficace in caso di istotipo intestinale, ma ci sono indicazioni recenti di una sua efficacia anche in presenza di GC diffuso. Ulteriori ricerche circa i fattori predittivi e prognostici, come il ruolo della valutazione precoce, la definizione della positività per EBV, MMRD (MismatchRepairDeficiency) e lo stato dei microsatelliti (MSI) alla diagnosi, così come il ruolo dell'istologia o della risposta patologica del tumore, potrebbero aiutare nella selezione dei pazienti da candidare alla chirurgia con eventuali terapie peri-operatorie [8]. Per quanto attiene alla classificazione molecolare come fattore predittivo nella valutazione del trattamento peri-operatorio, grande interesse è rappresentato dai pazienti con elevato grado di MSI e MMRD, i quali beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento peri-operatorio, come è risultato dagli studi clinici effettuati in caso di cancro del colon-retto prima [9] e poi da due recenti analisi retrospettive, gli studi MAGIC [10] e CLASSIC [11], su pazienti con GC resecabile. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento peri-operatorio. Le alterazioni molecolari riscontrate consistono in un'espansione o contrazione dei microsatelliti innescata da una disfunzione degli enzimi DNA-MMR a causa di una mutazione in uno dei diversi geni che codificano per questa classe di proteine. In GC, una delle mutazioni più ricorrente è rappresentata dall' ipermetilazione di MLH1. L'effetto delle mutazioni in questa classe di geni è un elevato tasso di mutazioni TMB ("high tumormutationalburden") durante la sintesi del DNA. Le mutazioni somatiche che ne derivano amplificano il numero di neo-antigeni stimolando il sistema immunitario e determinando un'attivazione dei linfociti T. Pertanto, i tumori MSI sono associati a elevata percentuale di infiltrato linfocitario (TILs) nel loro microambiente. Diversi studi hanno correlato nelle forme di GC metastatico lo stato dei MSI, l'espressione di PD-L1 e l' infiltrazione dei TILs con le caratteristiche clinico-patologiche dell'adenocarcinoma gastrico. In tumori di grandi dimensioni è stata trovata un'associazione significativa tra l'espressione di PD-L1, carenza di proteine di riparazione del DNA ed elevata presenza di TILs. I tumori gastrici positivi per EBV (EBVaGC) presentano un'alta espressione di EBV nelle cellule tumorali e immunitarie e specifiche caratteristiche clinico-patologiche e molecolari. Questo sottotipo mostra mutazioni PIK3CA ricorrenti, elevata ipermetilazione del DNA e amplificazione dei geni JAK2, PD-L1 e PD-L2. Circa il 65% dei casi di EBVaGC è caratterizzato da un microambiente con un elevato infiltrato linfocitario (Linfociti CD8+) che indica un' attiva risposta immunitaria nonostante la concomitante espressione di PD-L1. Questo si traduce in una maggiore probabilità di risposta positiva alla immunoterapia [12]. Sulla base di queste caratteristiche ben note e grazie ai risultati di numerosi studi effettuati sulla malattia metastatica, sempre maggior interesse è rivolto alla possibilità di integrare, nelle terapie peri-operatorie, lo schema FLOT con farmaci immunoterapici in una coorte selezionata di pazienti in cui venga riscontrato un elevato grado di MSI (rinvenuto in una percentuale di casi compresa tra 8-22%) o positività per EBV [13]. Alla luce di ciò, lo studio di fase III KEYNOTE-585 (NCT03221426) sta indagando l'efficacia del pembrolizumab (anti-PD-1 Ab) in combinazione alla chemioterapia. Inoltre, lo studio ICONIC di fase I/II (NCT03399071), sta invece considerando la somministrazione di avelumab (anti-PD-L1 Ab) in combinazione con FLOT [14-16].

Un altro campo d'interesse nella sperimentazione di possibili approcci terapeutici integrati peri-operatori nelle forme di GC resecabile è rappresentato da farmaci diretti verso specifici bersagli molecolari, che per la loro natura sembrano avere un ruolo cruciale nell'insorgenza e sviluppo del carcinoma gastrico. In molti casi non si conosce ancora se e come cambia l'attività di questi marcatori nelle diverse fasi dello sviluppo del GC. Sebbene alcuni studi già conclusi indicano che non sempre i

risultati ottenuti in caso di malattia avanzata siano riproducibili nelle forme meno avanzate, alcuni degli studi clinici tuttora in corso stanno dando indicazioni incoraggianti [17, 18]. Particolare attenzione deve essere rivolta al ruolo dei farmaci anti-angiogenici nel trattamento integrato del GC resecabile. Due condizioni principali sono necessarie per consentire lo sviluppo di un tumore: la formazione di nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e l'immunosoppressione dei processi svolti dall'organismo per la riparazione del danno tissutale. Questi due eventi, strettamente interconnessi in quanto guidati dall'attivazione di percorsi molecolari spesso sovrapposti, agiscono in modo sincrono modificando le condizioni del microambiente tumorale. I processi sopra menzionati sono supportati dall'integrazione degli effetti di componenti cellulari e mediatori molecolari. Le cellule mieloidi e linfoidi sono riconosciute come capaci di effetti pro-angiogenetici e immunosoppressori. Tra gli attori cellulari, le Myeloid-DerivedSuppressorCells (MDSC) sono deputate a inibire l'attivazione delle cellule T e Natural Killer (NK) [19] e promuovere l'espansione della popolazione di Treg [20]. Si ritiene inoltre che le MDSC possano secernere fattori pro-angiogenici come VEGFA e MMP9 [21]. Le cellule dendritiche (DC) e i macrofagi associati al tumore (TAM) sono in grado di modificare le loro caratteristiche assumendo un profilo pro-angiogenetico, supportato dalla secrezione di VEGFA, bFGF, CXCL8 e cicloossigenasi-2 (COX2) [22], e proprietà soppressive volte alla regolazione dell'espressione di ILS cruciali [23]. Allo stesso modo, tra le sottopopolazioni linfocitarie assumono un'importanza rilevante le cellule Treg, soppressori delle cellule T effettrici in grado di stimolare il processo di angiogenesi. Le cellule tumorali nelle suddette condizioni di ipossia sono in grado di reclutare cellule Treg CD4+CD25+FOXP3+ dal sangue periferico nel distretto tumorale dove contribuiscono a formare un ambiente immunosoppressore allo stesso tempo ricco di VEGFA secreto dagli stessi linfociti [24]. In questo scenario sono presenti anche cellule stromali, come CAF (Cancer-AssociatedFibroblasts) capaci di secernere fattori di crescita pro-angiogenici (bFGF e VEGFA) e promuovere il reclutamento di cellule con funzione immunosoppressiva come TAM e MDSC. Da quanto descritto, il VEGFA è un fattore molecolare che gioca un ruolo primario nel processo di angiogenesi tumorale ed è anche in grado di entrare in diverse fasi del ciclo immunitario del cancro, producendo modifiche sostanziali che alla fine contribuiscono a creare un microambiente tale da consentire al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. Si ritiene che il VEGFA oltre ad essere in grado di alterare il processo di presentazione dell'antigene, compromettendo la maturazione delle DC possa indurre dell'espressione di PD-L1 nelle DC mieloidi associate al tumore [25]. Il priming e l'attivazione degli APC e dei linfociti T possono essere influenzati dal VEGFA che, essendo in grado di compromettere la corretta emopoiesi e rendere i timociti più suscettibili alla morte per apoptosi, esprime il suo effetto sulla soppressione dello sviluppo e delle funzioni dei linfociti T [26, 27]. Si sta anche dimostrando la relazione diretta tra la secrezione di VEGFA da parte delle cellule tumorali e l'aumento della quantità di Treg nel sito tumorale [28]. Inoltre, è stata rilevata una sovraespressione di NRPI (recettore che lavora in sinergia con VEGFR1-2) in queste cellule e tale aumento è ritenuto responsabile dell'interazione con le DC e dell'aumentata attivazione dei Treg [29]. Nel complesso, queste scoperte suggeriscono che agire su più fattori chiave offre maggiori possibilità di ottenere un intervento terapeutico più efficace. Per quanto riguarda gli studi volti ad esplorare il ruolo di farmaci anti-angiogenetici nelle terapie peri-operatorie integrate, i più promettenti sono quelli in cui si utilizza il Ramucirumab che ha già dimostrato di migliorare l'OS e la PFS nel trattamento di seconda linea in pazienti con GC metastatico, come riportato negli studi REGARD [30] e RAINBOW [31]. Sulla base di questi risultati, lo studio RAMSES (NCT02661971) sta attualmente valutando il ruolo dello schema FLOT con o senza Ramucirumab nel trattamento peri-operatorio degli adenocarcinomi gastrici Her-2 negativi e GEJ. In questo studio di fase II, l'aggiunta di Ramucirumab allo schema FLOT peri-operatorio ha migliorato significativamente i tassi di resezione R0, rispondendo così in modo positivo all' end-point della fase II dello studio. Una delle sfide principali che la ricerca clinica deve affrontare è rappresentata dalla selezione dei pazienti candidabili ad un dato regime terapeutico pre-operatorio. La valutazione dell'espressione di fattori anti-angiogenici eseguita prima dell'inizio del trattamento potrebbe fornire una possibilità di selezionare una coorte di pazienti suscettibili all'azione

del trattamento stesso, migliorando così le possibilità di sopravvivenza [32]. Su queste basi, lo scopo del presente studio è quello di indagare le relazioni tra microambiente tumorale e risposta immunitaria avvalendosi delle conoscenze acquisite sulla patogenesi del GC e sull'immunologia del tumore insieme alla possibilità di accedere ad una coorte di pazienti affetti da GC resecabile e trattabili con terapia peri-operatoria.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1:

Il nostro studio si propone di valutare l'espressione dei principali fattori angiogenici, con particolare riferimento all'asse VEGF/VEGFR, in pazienti con GC elegibili a trattamento chirurgico ed a possibile trattamento peri-operatorio. Nei pazienti sottoposti a trattamento peri-operatorio secondo lo schema FLOT sarà considerata l'espressione della TUBBIII.

Obiettivo specifico 2:

Il nostro studio si propone altresì di caratterizzare, negli stessi pazienti, le popolazioni linfocitarie isolate dal sangue periferico sia dal punto di vista numerico che fenotipico. Tale caratterizzazione riguarderà anche i linfociti infiltranti il tumore. Verrà poi effettuato un confronto tra le diverse classi linfocitarie presenti nei due diversi distretti al fine di rilevare possibili clusters di popolazioni correlabili alle caratteristiche del tumore o alla terapia in atto.

Obiettivo specifico 3:

Lo studio si propone di caratterizzare i tumori gastrici per quanto riguarda l'instabilità dei microsatelliti (MSI) e la positività al virus EBV. E' noto, infatti, che i tumori gastrici resecabili con elevato grado di MSI e MMRD beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento peri-operatorio. Nostro obiettivo sarà quello di correlare lo stato dei microsatelliti con il profilo immuno-fenotipico.

Obiettivo 1:

Il nostro studio si propone di valutare l'espressione dei principali fattori angiogenici, con particolare riferimento all'asse VEGF/VEGFR, in pazienti con GC resecabile. Di particolare interesse saranno i casi sottoposti a trattamento peri-operatorio secondo lo schema FLOT. L'analisi in oggetto verrà eseguita attraverso una determinazione quantitativa di specifici bio-marcatori presenti nel siero dei pazienti e dei donatori sani. Tali valutazioni verranno eseguite al momento della diagnosi e ad ogni intervento terapeutico. L'analisi degli stessi analiti verrà effettuata anche nel tessuto tumorale rispetto alla controparte sana dello stesso paziente. Di particolare interesse sarà la contemporanea valutazione della Tubulina β III (TUBBIII) la cui over espressione è legata a fenomeni di resistenza ai taxani. Tale analisi verrà correlata alle caratteristiche clinico patologiche nonché alle caratteristiche molecolari ed al profilo immunitario del microambiente tumorale, secondo quanto descritto negli obiettivi 2 e 3 rispettivamente. Tali correlazioni saranno supportate da esperimenti *ex vivo* in cui cellule tumorali isolate dal tessuto tumorale verranno messe in co-coltura con linfociti isolati dal microambiente tumorale o dal sangue periferico. Gli stessi esperimenti si eseguiranno anche con cellule di linee tumorali gastriche (AGS, N87, HGC-27) e con linee cellulari gastriche rese resistenti all'azione di un

taxano (paclitaxel). I risultati di questi studi ci permetteranno di approfondire la reciproca relazione tra cellule tumorali e cellule immunitarie.

Obiettivo 2:

Il nostro studio si propone altresì di caratterizzare negli stessi pazienti le popolazioni linfocitarie isolate dal sangue periferico dal punto di vista numerico, fenotipico e funzionale utilizzando citofluorimetria a flusso multi-parametrica. Tale caratterizzazione riguarderà anche i linfociti infiltranti il tumore. Verrà, inoltre, effettuato un confronto tra le diverse classi presenti nei due diversi distretti 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⁺ αβT. Le specifiche funzioni delle sottopopolazioni del sistema immunitario ed i complessi meccanismi molecolari che regolano i loro profili attivatori e inibitori svolgono un ruolo critico nella risposta tumorale. Particolare interesse verrà indirizzato ad una popolazione di linfociti γδT e NK che svolgono un ruolo cruciale nell'immunità innata contrastando le cellule tumorali attraverso la loro azione citotossica e grazie alla secrezione di specifiche citochine quali ad esempio l' IFNγ ed il TNFα. Inoltre, queste classi di linfociti regolano processi di differenziamento e attivazione dei linfociti αβT e contribuiscono ad abrogare l'immunosoppressione operata dalle cellule Treg.

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

1. Nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti αβT (CD4, CD8, T_{reg}), γδT (Vδ1, Vδ2) e NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione così come si attuano 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. Nel nostro studio le terapie che verranno prese in considerazione saranno la possibile terapia neo-adiuvante (FLOT), quella chirurgica, e quella adiuvante (FLOT).
4. La caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti αβT, γδT 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 3:

Lo studio si propone di caratterizzare i tumori gastrici per quanto riguarda l'instabilità dei microsatelliti (MSI) e la positività al virus EBV. E' noto infatti che i tumori gastrici resecabili con elevato grado di MSI e MMRD beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento peri-operatorio. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento peri-operatorio. Inoltre, lo stato dei microsatelliti così come la positività per EBV, sono associati ad un specifico profilo immunitario nel microambiente tumorale. In particolare, tumori gastrici con elevato grado di MSI o EBV+ sono considerati immuno-permissivi e sono quelli che potrebbero beneficiare delle terapie peri-operatorie integrate con farmaci immunoterapici. Pertanto, il nostro studio si prefigge di caratterizzare il profilo immuno-fenotipico dei tumori gastrici MSI ed EBV positivi.

Dati preliminari:

La proposta progettuale si basa su alcune evidenze sperimentali che i due gruppi di ricerca (IRCCS “ S. de Bellis” e “Humanitas Clinical and Research Center”) hanno raccolto negli ultimi anni nei rispettivi campi di interesse. Il nostro gruppo di ricerca sta svolgendo da qualche anno degli studi volti all’analisi delle variazioni di diversi fattori di crescita pro-angiogenici nel siero di pazienti con carcinoma gastrico metastatico e sottoposti ad una terapia di seconda linea con Paclitaxel e Ramucirumab. Il Paclitaxel è un anti-mitotico, il Ramucirumab un anticorpo monoclonale contro il VEGFR2. Diversi fattori di crescita, con particolare riferimento a quelli dell’asse VEGF/VEGFR, sono stati dosati prima dell’inizio della terapia e nel corso della stessa. Abbiamo, inoltre, effettuato un’analisi immunoistochimica su reperti biotici degli stessi pazienti per rilevare l’espressione VEGF/VEGFR, nonché della TUBBIII, la cui over-espressione è indice di resistenza alla terapia con taxani. Sebbene i dati di queste analisi siano ancora in fase di studio, si può affermare che la terapia con Ramucirumab determina un aumento sostanziale dei livelli sierici di VEGFA e di altri fattori di crescita angiogenici. E’ di grande interesse studiare la relazione di questi fattori angiogenici con il profilo immuno-fenotipico. Nel presente progetto le nostre analisi saranno condotte su una coorte più ampia di pazienti con GC resecabile e candidabili a trattamento chirurgico con possibile chemioterapia peri-operatoria che ad oggi prevede come schema di elezione il FLOT. Come abbiamo sottolineato c’è grande interesse rispetto alla possibilità di integrare questo schema terapeutico con farmaci anti-angiogenici o immunoterapici. Il gruppo dell’Unità di immunologia clinica e sperimentale diretto dal professor Mavilio ha messo a punto metodologie in grado di caratterizzare dal punto di vista fenotipico e funzionale numerose sub-popolazioni di cellule immunitarie. In uno studio recente, il gruppo del professor Mavilio ha identificato una sottopopolazione di linfociti V δ 1 presenti nell’epitelio intestinale e caratterizzati dall’espressione di un recettore citotossico (NKp46) che conferisce a questa popolazione di linfociti un’elevata attività antitumorale, rappresentando una prima linea di difesa simile a quella dell’immunità innata [33]. La caratterizzazione delle sub-popolazioni di linfociti $\gamma\delta$ T (V δ 1, V δ 2) potrebbe essere di grande interesse anche nel carcinoma gastrico.

Metodologie e analisi statistiche:

Pazienti e Campioni

Verranno reclutati pazienti con diagnosi di carcinoma gastrico, afferenti all’UO di Oncologia del nostro Istituto, per i quali è previsto l’intervento chirurgico e che potranno essere sottoposti a terapia peri-operatoria secondo lo schema FLOT. E’ previsto, inoltre, che linfociti di sangue periferico isolati da Buffycoats di donatori sani presso il centro Humanitas saranno usati come controlli e selezionati per età omogenea a quella dei pazienti.

Trattamento e conservazione dei campioni ematici

Previo consenso informato e somministrazione della scheda informativa, verranno effettuati prelievi ematici prima che i pazienti vengano sottoposti all’intervento, al termine della terapia neo-adiuvante nei casi in cui questa sia prevista, dopo l’intervento chirurgico e al termine della terapia adiuvante post operatoria.

Dal campione ematico di ciascun paziente e dei donatori sani verranno ricavate aliquote di siero e di plasma che saranno conservate a -80°C e di linfo-monociti che saranno isolati mediante gradiente di densità Ficoll-Paque e conservati in FBS+10% DMSO in azoto liquido per preservarne la vitalità.

Reperti biotici

I reperti biotici verranno fissati in formalina ed inclusi in paraffina per le successive analisi di immunohistochimica.

Reperti operatori

Verrà sottoposto ad analisi sia il tessuto tumorale che il tessuto circostante sano esente da neoplasia. 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, possono essere messe in coltura o isolate.

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)).

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.

Isolamento delle cellule tumorali

Seguendo il protocollo indicato per il Tumor Cell Isolation Kit human (MiltenyiBiotec), le cellule non tumorali saranno marcate magneticamente con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con micro beads. In seguito, la sospensione cellulare verrà caricata su una colonna posta nel campo magnetico di un separatore MACS. Le cellule non tumorali marcate verranno trattenute all'interno della colonna, al contrario le cellule tumorali prive di marcatura attraverseranno la colonna. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule non tumorali trattenute magneticamente saranno eluite. Le cellule tumorali così ottenute saranno messe in coltura in flask T25 in numero di 5X10⁶ cellule/ml, in RPMI-1640 con 20% FBS, 1% Pen-Strept, 1% glutammina e 1% di aminoacidi 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.

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*.

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).

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

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

Per valutare la produzione di citochine verrà usata la marcatura intracellulare. Dopo la marcatura della membrana cellulare, le cellule saranno trattate con l'inibitore del trasporto proteico Golgi Plug. Dopo 4

ore di incubazione, in atmosfera umidificata a 37°C con 5% di CO₂, le cellule verranno raccolte e lavate con HBSS^{-/-}. La colorazione intracellulare sarà eseguita utilizzando i kit Cytofix/Cytoperm e Perm/Wash come descritto nei protocolli di esecuzione e utilizzando mAbs anti-umani specifici per le citochine e i fattori di crescita di interesse. In alternativa, la secrezione dei fattori solubili nel medium di co-cultura con le cellule target sarà misurata tramite saggi immuno-enzimatici ELISA.

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 un 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.

Estrazione e quantificazione di RNA

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

Western-blotting (WB)

Le cellule tumorali utilizzate negli esperimenti di co-cultura saranno impiegate in tecniche di WB al fine di esplorare come le cascate fosforilative di alcune vie del segnale implicate nei processi cellulari di proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione si modificano in un ambiente condizionato dalla presenza dei linfociti. Saranno studiate le vie delle MAPK e di PI3K/Akt, in particolare sarà analizzata l'espressione dei principali marcatori a valle del complesso mTORC1 come S6, p70S6, 4EBP1, nella loro forma fosforilata e non, nonché delle proteine responsabili della sua regolazione come PI3K/Akt/TSC2. In modo simile, saranno poi analizzati i principali bersagli di mTORC2 come Akt, GSK3b, PKC. Questi studi saranno condotti anche in seguito a trattamento con inibitori dei componenti al crocevia delle diverse vie del segnale.

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 biomarkers sarà refertata come fenotipo instabile

(MSI-H), l'assenza di mutazione o soltanto la mutazione in un singolo biomarker sarà refertato come fenotipo stabile (MSS).

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.

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'immunocoloratore 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+.

Analisi Statistica

L'analisi statistica sarà ottimizzata grazie alla collaborazione con esperti in statistica presenti nel nostro istituto. In base al numero di variabili, al tipo di variabili, all'adattamento atteso tra le ipotesi parametriche e l'ipotesi da testare, verrà utilizzato il miglior test statistico includendo approcci parametrici non accoppiati o accoppiati (Studentttest, ANOVA, correlazione di Pearson) e non parametrici (correlazione Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal Wallis, Spearman). Una volta scelto e applicato il test statistico, i risultati verranno interpretati e rappresentati con un grafico o una tabella contenente il numero di esperimenti e il valore P. Valori di P statisticamente significativi > 0,05 saranno considerati non statisticamente significativi.

Risultati attesi:

La presente proposta progettuale ci permetterà di analizzare i seguenti risultati:

- 1- l'espressione di selezionati marcatori angiogenici nel siero dei pazienti affetti da GC ad ogni trattamento terapeutico a partire dal momento della diagnosi. Questi valori saranno confrontati nel tempo o rispetto a quelli derivanti da donatori sani.
- 2- Di particolare interesse sarà seguire l'andamento della TUBBIII in quei pazienti che verranno sottoposti al trattamento peri-operatorio secondo lo schema FLOT, che prevede la somministrazione di un taxano. Aumenti dell'espressione di questo marcatore dopo il trattamento, potranno essere messi in relazione a fenomeni di resistenza allo stesso.
- 3- Eventuali variazioni di marcatori angiogenici verranno correlate con la loro espressione nel distretto tumorale e nelle aree adiacenti non tumorali.

- 4- Inoltre, le variazioni di tali marcatori verranno correlate con il profilo immuno-fenotipico al fine di stabilire se ad aumenti dei marcatori angiogenici (VEGF, FGF, Angiopoietina, PDGF) corrisponda un aumento di linfociti con caratteristiche di immuno-soppressione, come le cellule Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nell'infiltrato linfocitario nel tumore (TILs), rispetto alle aree adiacenti non tumorali.
- 5- Saranno di grande interesse i risultati relativi dal confronto del profilo linfocitario derivante dal tessuto tumorale e da eventuali linfonodi positivi rispetto a quello derivante dalle aree circostanti non tumorali. In particolare, saranno confrontate le popolazioni di cellule CD4⁺ e CD8⁺ αβT e le popolazioni γδT e NK. Questo perché nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti αβT (CD4, CD8, T_{reg}), γδT (Vδ1, Vδ2) e NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione così come nello stesso microambiente si attuano 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.
- 6- Dal confronto delle sub popolazioni presenti nel distretto tumorale e nel sangue periferico sarà interessante individuare popolazioni di linfociti il cui aumento nel distretto tumorale corrisponda ad un aumento della loro presenza in circolo. Una caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti αβT, γδT e NK nel sangue periferico sarà utile alla definizione di nuovi bio-marcatori 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.
- 7- Ci aspettiamo, inoltre, che pazienti con elevato grado di MSI o in cui venga riscontrata positività per EBV siano caratterizzati da un elevato grado di infiltrazione linfocitaria nel tessuto. Definire le popolazioni presenti risulterà di grande interesse.
- 8- Gli studi funzionali ci permetteranno di definire le relazioni tra cellule immunitarie e cellule tumorali, in quanto queste ultime dovrebbero inibire l'espansione di popolazioni linfocitarie anti-tumorali e stimolare il rilascio di particolari classi di citochine. Ci aspettiamo risultati diversi a seconda che le cellule gastriche derivino dal tumore o da aree circostanti non tumorali o ancora da cellule gastriche immortalizzate, così come potranno cambiare a seconda che i linfociti utilizzati derivino da infiltrato tumorale, aree sane o sangue periferico.

Innovazioni:

Lo studio dei fattori di crescita angiogenici e del profilo immuno-fenotipico nel microambiente tumorale di pazienti con carcinoma gastrico resecabile è considerato di grande interesse al fine di selezionare una coorte di pazienti da indirizzare ad uno specifico piano terapeutico. Le terapie peri-operatorie attualmente considerate come standard (FLOT) potranno essere integrate con farmaci anti-angiogenici o immunoterapici per migliorare la sopravvivenza globale e ridurre la percentuale di recidive. Inoltre, una caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti αβT, γδT e NK nel sangue periferico sarà utile a definire nuovi biomarcatori circolanti importanti per il follow-up dei pazienti affetti da GC dopo l'intervento chirurgico e l'eventuale trattamento chemioterapico adiuvante.

Bibliografia:

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394–424.
2. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1965, 64, 31–49.
3. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014, 513, 202–209.
4. Smith, D.D.; Schwarz, R.R.; Schwarz, R.E. Impact of Total Lymph Node Count on Staging and Survival After Gastrectomy for Gastric Cancer: Data from a Large US-Population Database. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 7114–7124.
5. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable 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. A. Petrillo, L. Pompella, G. Tirino, A. Pappalardo, M.M. Laterza, M. Caterino, M. Orditura, F. Ciardiello, E. Lieto, G. Galizia, C. Castoro and F. De Vita. Perioperative Treatment in Resectable Gastric Cancer: Current Perspectives and Future Directions. *Cancers* 2019, 11, 399.
9. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(11): 863–875.
10. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol* 2017; 3(9): 1197–1203.
11. Choi YY, Kim H, Yang H-K et al. Clinical Impact of Microsatellite Instability in Patients with Stage II and III Gastric Cancer: Results from the CLASSIC Trial. Alexandria: American Society of Clinical Oncology 2017.
12. M. G. Refolo C. Lotesoriere C. Messa M.G. Caruso R. D'Alessandro. Integrated immune gene expression signature and molecular classification in gastric cancer: New insights. *J Leukoc Biol.* 2020 Aug;108(2):633-646.
13. V. Aggelis, D. Cunningham, F. Lordick & E. C. Smyth. Peri-operative therapy for operable gastroesophageal adenocarcinoma: past, present and future. *Annals of Oncology* 29: 1377–1385, 2018.
14. Kang YK, Boku N, Satoh T et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10111): 2461–2471.
15. Fuchs CS, Doi T, Jang RW et al. KEYNOTE-059 cohort 1: efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *JAMA Oncol* 2018; 4(5): e180013.
16. Le DT, Durham JN, Smith KN et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017; 357(6349): 409–413.
17. Rivera, F.; Jimenez-Fonseca, P.; Alfonso, P.G.; Gallego, J.; Limon, M.L.; Alsina, M.; Lopez-Gomez, L.; Galan, M.C.; Falco, E.; Manzano, J.L.; et al. NEOHX study: Perioperative treatment with trastuzumab in combination with capecitabine and oxaliplatin (XELOX-T) in patients with HER 2 resectable stomach

- or esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma—18 m DFS analysis. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33 (Suppl. 3).
- 18.** Hofheinz, R.; Hegewisch-Becker, S.; Thuss-Patience, P.; Kunzmann, V.; Fuchs, M.; Ullrich Graeven, U.; Homann, N.; Heinemann, V.; Pohl, M.; Tannapfel, A.; et al. HER-FLOT: Trastuzumab in combination with FLOT as perioperative treatment for patients with HER2-positive locally advanced esophagogastric adenocarcinoma: A phase II trial of the AIO Gastric Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2014, 32, 4073.
- 19.** Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006;116:2777-2790.
- 20.** Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66: 1123-1131.
- 21.** Bo Huang Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:409-421.
- 22.** Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *NatRevCanc.* 2008;8: 618-631.
- 23.** Sica A, Saccani A, Bottazzi B, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J. Immunol.* 2000;164:762-767.
- 24.** Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 2011;475:226-230.
- 25.** Curiel TJ, Wei S, Dong H, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature Med.* 2003;9: 562-567.
- 26.** Ohm JE, Gabilovich DI, Sempowski GD, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood.* 2003;101:4878-4886.
- 27.** Huang Y, Chen X, Dikov MM, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood.* 2007;110:624-631.
- 28.** Li B, Lalani AS, Harding TC, et al. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6808-6816.
- 29.** Sarris M, Andersen KG, Randow F, et al. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity.* 2008;28:402-413.
- 30.** Fuchs, C.S.; Tomasek, J.; Yong, C.J.; Dumitru, F.; Passalacqua, R.; Goswami, C.; Safran, H.; Dos Santos, L.V.; Aprile, G.; Ferry, D.R.; et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014, 383, 31–39.
- 31.** Wilke, H.; Muro, K.; Van Cutsem, E.; Oh, S.C.; Bodoky, G.; Shimada, Y.; Hironaka, S.; Sugimoto, N.; Lipatov, O.; Kim, T.Y.; et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): A double-blind, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014, 15, 1224–1235.
- 32.** H. Nienhüser and T. Schmidt. Angiogenesis and Anti-Angiogenic Therapy in Gastric Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 43.
- 33.** J. Mikulak, F. Oriolo, E. Bruni, A. Roberto, F.S. Colombo, A. Villa, M. Bosticardo, I. Bortolomai, E. Lo Presti, S. Meraviglia, F. Dieli, S. Vetrano, S. Danese, S. Della Bella, M.M. Carvello, M. Sacchi, G. Cugini, G. Colombo, M. Klinger, P. Spaggiari, M. Roncalli, I. Prinz, S. Ravens, B. di Lorenzo, E. Marcenaro, B. Silva-Santos, A. Spinelli, and D. Mavilio. NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial Vδ1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. *JCI Insight.* 2019;4(24):e125884.

Timeline (Gantt chart)

PRIMO ANNO

Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Isolamento PBMCs e siero	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Analisi FACS									Purple	Purple		
Analisi fattori angiogenici									Red	Red		
Analisi MSI/EBV	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Sperimentazione in vitro	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
Elaborazione dati											Dark Blue	Dark Blue

SECONDO ANNO

Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Isolamento PBMCs e siero	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Analisi FACS									Purple	Purple		
Analisi fattori angiogenici									Red	Red		
Analisi MSI/EBV	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Sperimentazione in vitro	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	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	Red	Red	Red	Red	Red	Red					
Isolamento PBMCs e siero	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange					
IsolTILs e Cell. tumorali	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue					
Analisi FACS								Yellow	Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici								Red	Red	Red		
Analisi MSI/EBV	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red					
Sperimentazione in vitro	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue		
Elaborazione dati									Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue

Progetto 13/2021: “Valutazione retrospettiva per l’individuazione di biomarcatori predittivi dell’efficacia del trattamento con Vedolizumab.”

Responsabile: dott. Mauro Mastronardi

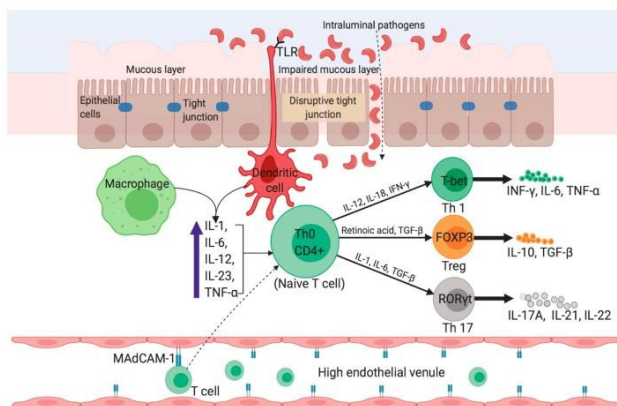
Partecipanti: Margherita Curlo, Raffaele Armentano, Elisabetta Cavalcanti, Antonio Lippolis, Marcello Chieppa, Marina Liso, Rossella Donghia, Rodolfo Sardone, Lantone Giulio

Introduzione

La colite ulcerosa (UC) ed il morbo di Crohn (Crohn’s Disease – CD) sono patologie severe del tratto gastro intestinale caratterizzate da andamento progressivo e recidivante. Sono distinguibili per localizzazione e diverse caratteristiche infiammatorie [1]. A differenza della UC che colpisce la mucosa del colon, il CD può interessare l’intero tratto gastrointestinale (bocca-ano). Nel CD sono comuni fistole, patologie perianali e ostruzioni del lumen intestinale, mentre nella UC è più comune riscontrare una compromissione severa dell’architettura delle cripte.

Il CD colpisce più di frequente l’ileo terminale, il cieco e l’area perianale del colon. I sintomi sono: frequenti episodi di diarrea anche notturna, dolori addominali, ostruzione intestinale, perdita di peso, febbre e sudorazioni notturne. Quando questa sintomatologia viene riscontrata, è necessaria una valutazione endoscopica e morfologica che confermi l’iniziale valutazione. Diagnosi tardive comportano il peggioramento del quadro clinico, danno intestinale ed aumento della fibrosi. Biomarkers fecali e sierici sono importanti sia nella fase di diagnosi sia nella fase di valutazione della risposta clinica. Tra questi, la calprotectina fecale e la lattoferrina sono i più utilizzati, ma numerosi altri sono in fase di valutazione [2].

Il nostro team di ricerca si trova in prima linea per l’identificazione di biomarkers predittivi in grado di indirizzare il trattamento farmacologico personalizzato per i pazienti affetti da UC o CD.



Pathophysiology in Crohn’s disease. The uptake of luminal microflora stimulates APCs (e.g., dendritic cells and macrophages) which in turn produce proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-23. Activated APCs facilitate subsequent differentiation of naïve CD4⁺ Th cells into Th1 and Th17 via expression of master transcription factors. Inside the high endothelial venule, binding of $\alpha_4\beta_7$ -bearing lymphocytes to MAdCAM-1 causes entry of more T cells into the lamina propria. IFN- γ , interferon-gamma; FOXP3, Forkhead box protein 3; ROR γ t, retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma. [4]

Il CD è una patologia mediata dalle cellule T ed in particolare dalle cellule Th1 (produttrici di IFN γ) e Th17 (produttrici di IL-17A). Nei tessuti dei pazienti affetti da CD si rilevano elevati livelli di espressione di STAT4, T-bet e IL-12R β 2 che promuovono la polarizzazione Th1.

Inoltre le APCs producono citochine infiammatorie che, a loro volta, inducono la polarizzazione Th1 (IL-12) e Th17 (IL-6 ed IL-23) [3].

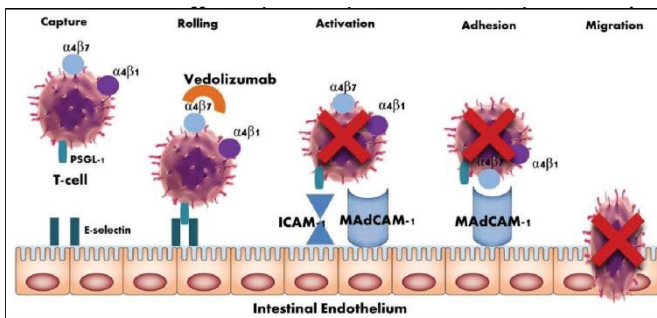
Per pazienti affetti da CD che non rispondono efficacemente alla somministrazione di farmaci immunosoppressori o steroidei, il protocollo clinico attualmente in uso nel nostro IRCCS prevede la somministrazione di Infliximab (Remicade[®], anti-TNF) come primo farmaco biologico e Vedolizumab (Entyvio[®], anti- α 4 β 7) per i pazienti che non hanno avuto risposta clinica indotta da Infliximab.

Vedolizumab è il primo farmaco anti-integrine approvato basato sul legame con l'integrina α 4 β 7 presente sulla superficie delle cellule T, che previene la migrazione dei leucociti nell'intestino inibendo l'interazione con le cellule endoteliali.

Nel nostro IRCCS, la remissione clinica osservata dopo il ciclo di induzione (in fase di mantenimento) è del 40% superiore se osservata al termine del ciclo di induzione rispetto a quello osservato da numerosi altri studi riportati in letteratura [4].

Il presente progetto proposto vuole rispondere alla richiesta di indicatori predittivi in grado di individuare i pazienti che risponderanno al trattamento con Vedolizumab e differenziarli da quelli che invece dovranno indirizzarsi verso strategie terapeutiche differenti.

Mediante un approccio multiomico valuteremo parametri sierici, immunologici, metabolomici e metagenomici, utilizzando il materiale biologico raccolto dai pazienti arruolati nello studio.



Mechanism of action of vedolizumab. Vedolizumab prevents binding of α 4 β 7-integrin to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) ligand, blocking the activation, adhesion, and migration of T cells into the intestinal mucosa [5].

Inoltre verrà introdotto uno studio preliminare di confronto pre e post intervento dei biomarcatori retinici, legati alle alterazioni microvascolari della retina. Il CD è caratterizzato da frequenti alterazioni extraintestinali, alcune delle quali interessano il sistema vascolare della retina. Alcune recenti evidenze hanno infatti dimostrato come la retina sia un modello in vivo estremamente sensibile alle variazioni della densità e conformazione microvascolare in seguito ad insulti infiammatori. La regressione o l'aumento delle alterazioni microvascolari, modulate dai processi fisiopatologici alla base delle IBD, potrebbero essere un pattern essenziale nella distinzione precoce del responder rispetto ai non responder oltre che a definire indicazioni sulla traiettoria della patologia stessa. Confronteremo tutti i valori dei pazienti responder e non responder individuando un massimo di 10 indicatori dal valore predittivo positivo e negativo utilizzando anche algoritmi di classificazione automatica o semi- automatica basati su reti di intelligenza artificiale.

Presso l'ambulatorio IBD vengono ogni anno reclutati 50 nuovi pazienti affetti da CD, tra questi l'85% non risponde a trattamenti farmacologici standard e passa al trattamento con il farmaco biologico Infliximab. La percentuale di non responder a questa prima linea di intervento biologico è del 30%. Questi pazienti rappresentano il campione arruolato per lo studio, che stimiamo si aggiri intorno a n. 15- 20/anno.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Creazione di una biobanca biologica di pazienti CD non-responder al INFLIXIMAB e passati al VEDOLIZUMAB come seconda linea di intervento (Sieri, feci e materiale bioptico).

Obiettivo specifico 2: Valutazione comparativa del materiale raccolto mediante screening dei sieri e delle feci. La creazione dei gruppi responder/non-responder verrà accompagnata dalla valutazione istologica dell'infiltrato e della architettura dei vasi. Dal materiale bioptico, processato immediatamente dopo il prelievo, verrà creata una banca di HIBEC (Human intestinal blood endothelial cells) per valutazioni in vitro della risposta al farmaco o agli insulti infiammatori. L'approccio principale sarà la valutazione comparativa del pathway molecolare mediante RNAseq.

Obiettivo specifico 3: Individuazione dei biomarkers predittivi della risposta clinica alla somministrazione di VEDOLIZUMAB. Individuazione e classificazione tramite pattern recognition analysis in deep-machine learning.

Obiettivo 1: Creazione di una biobanca biologica di pazienti CD non-responder all'INFLIXIMAB passati al VEDOLIZUMAB come seconda linea di intervento (Sieri, feci e materiale bioptico)

Presso l'ambulatorio IBD vengono reclutati ogni anno circa 50 nuovi pazienti affetti da CD. Vista la natura del nostro ospedale, la maggior parte di questi pazienti arriva in condizioni di gravità medio alta che richiede l'utilizzo di Infliximab come prima linea di intervento. Una percentuale vicina al 40% non risponde a questa strategia terapeutica; viene quindi utilizzato il Vedolizumab come seconda strategia terapeutica per i non-responder.

A tutti i nuovi pazienti affetti da CD verrà prelevato un campione di siero prima della somministrazione dell'Infliximab. I sieri verranno analizzati presso i laboratori di patologia clinica del nostro IRCCS. Una seconda aliquota verrà anonimizzata e conservata in biobanca. Ai pazienti verrà inoltre richiesto di portare un campione di feci raccolte la mattina prima dell'infusione. Anche questo campione verrà conservato in biobanca. Un campione di sangue circolante verrà utilizzato per analisi citofluorimetriche. Utilizzeremo un kit validato per la clinica in grado di identificare e determinare le percentuali e la conta assoluta di T, B, e NK. Così come CD4 e CD8 nel sangue periferico. Valuteremo inoltre la percentuale di cellule T circolanti polarizzate verso Th1, Th2, Th17 e Treg.

Dopo 22 settimane (5° infusione) i pazienti verranno nuovamente valutati mediante visita endoscopica. Lo score CDAI (Crohn's Disease Activity Index) verrà utilizzato per la valutazione della risposta all'Infliximab insieme alla valutazione del gastroenterologo e a quella dell'anatomopatologo. Un campione di materiale bioptico verrà conservato in RNAlater per 24 ore, successivamente congelato in Trizol® a -80°C per future analisi molecolari, mentre un numero compreso tra 3 e 5 biopsie verrà prelevato per permettere l'isolamento e la coltura delle cellule endoteliali intestinali (Obiettivo 2).

Nel caso di una valutazione negativa, i pazienti entreranno nel gruppo di seconda linea di intervento con Vedolizumab. Prima della somministrazione del Vedolizumab procederemo ad una nuova raccolta di materiale biologico ed analisi laboratoristiche. La somministrazione di Vedolizumab avverrà con la tempistica standard (T0 seguito da Settimana 2, 6, 10, 14).

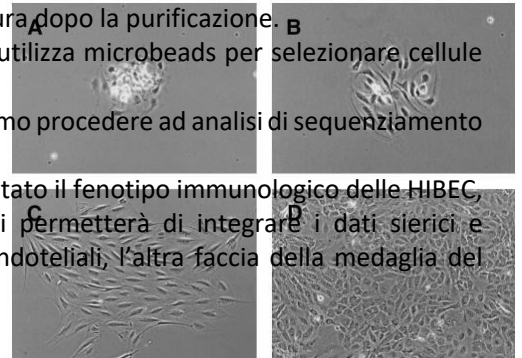
La valutazione del CDAI avverrà alla 14esima settimana corrispondente alla V infusione.

A questo score verrà associata la valutazione endoscopica ed anatomopatologica effettuata subito dopo la V infusione di Vedolizumab. Un campione di materiale bioptico verrà conservato in RNAlater e successivamente congelato in Trizol® per future analisi molecolari, mentre un numero compreso tra 3 e 5 biopsie verrà prelevato per permettere l'isolamento e la coltura delle cellule endoteliali intestinali (Obiettivo 2).

Obiettivo 2: Creazione di una banca di cellule endoteliali intestinali per valutazioni in vitro

Sull'intera coorte di pazienti reclutati per lo studio, verranno effettuate valutazioni morfologiche dell'espressione di ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, MMPs e della gut-vascular barrier (GVB). Dalle biopsie prelevate dai pazienti trattati con Vedolizumab (T0 e T5) durante visita endoscopica di controllo, otterremo le HIBEC. In breve, il protocollo prevede la dissezione della biopsia e la sua successiva digestione con collagenasi fino ad ottenere una single cell suspension. Dopo una breve coltura su piastre rivestite al momento con fibronectina, vengono isolate le cellule endoteliali con biglie magnetiche anti-CD31 e rimesse in coltura dopo la purificazione. Il kit commerciale per tale purificazione è prodotto dalla Miltenyi ed utilizza microbeads per selezionare cellule CD31⁺, CD105⁺, CD146⁺ e CD144 (VE-Cadherin)⁺.

Dopo aver isolato le cellule endoteliali ed averle messe in coltura, potremo procedere ad analisi di sequenziamento molecolare paragonando HIBEC isolate da 10 pazienti responder con 10 non responder. Prima del sequenziamento, sarà valutato il fenotipo immunologico delle HIBEC, mediante analisi in citofluorimetria. Questo approccio innovativo ci permetterà di integrare i dati sierici e citofluorimetrici che hanno come target le cellule T, con le cellule endoteliali, l'altra faccia della medaglia del meccanismo di azione del Vedolizumab.



Obiettivo 3: Individuazione dei biomarker predittivi della risposta clinica alla somministrazione di VEDOLIZUMAB

Mediante analisi statistiche individueremo biomarkers dal valore predittivo e li valideremo su una popolazione più ampia di pazienti. Confronteremo tutti i valori dei pazienti responder e non responder individuando un massimo di 10 indicatori dal valore predittivo positivo e negativo utilizzando anche algoritmi di classificazione automatica o semi-automatica basati su reti di intelligenza artificiale. Punteremo inoltre ad applicare i pattern individuati sull'intera popolazione di pazienti CD afferenti all'ambulatorio, ancor prima del passaggio alla seconda linea di intervento.

Dati preliminari:

Al momento non abbiamo dati preliminari se non l'osservazione di una netta differenza tra pazienti responder al trattamento con Vedolizumab ed altri non-responder. La percentuale sembrerebbe del 50%, ma non abbiamo dati per discriminare gli uni dagli altri in partenza.

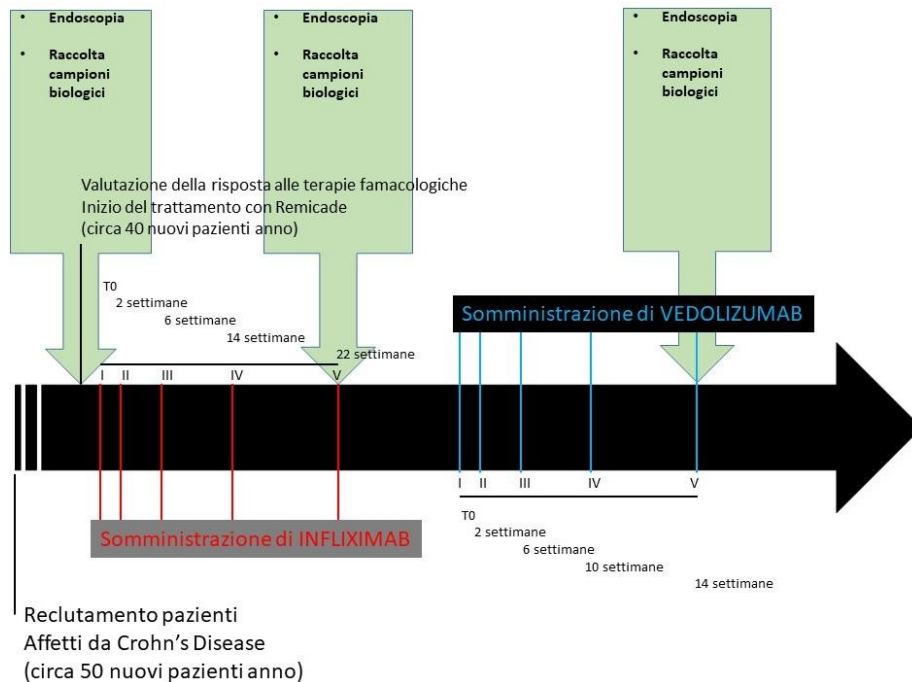
Metodologie e analisi statistiche:

Per le valutazioni delle relazioni tra i pazienti responder e non responder al Vedolizumab (outcome primario) e le variabili raccolte mediante l'approccio multiomico si utilizzerà il test del chi-quadrato o il test esatto di Fisher quando necessario, per le variabili categoriche; mentre per le variabili continue, in riferimento alla loro distribuzione e alla numerosità dei soggetti, si utilizzeranno test parametrici o non parametrici, quando necessario. Per le analisi statistiche sull'associazione tra l'outcome primario e le variabili predittive si utilizzeranno modelli di regressione logistica multivariata con eventuali covariate.

Inoltre, avendo a disposizione un gran numero di variabili derivanti dall'approccio multiomico, unitamente alle variabili cliniche, sarà opportuno l'utilizzo di tecniche di Machine Learning (ML) per la selezione ed individuazione di set di variabili predittive eventualmente associate all'outcome di interesse (Random Forest, Cluster Analisi etc).

Il valore soglia per la significatività tra le misure effettuate sarà definito con un p-value inferiore a 0.05 ed un test a due code.

Le analisi verranno eseguite con STATA 16.0 (StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC.)



Risultati attesi:

Con il presente studio contiamo di individuare dei biomarcatori in grado di aiutare la scelta terapeutica discriminando i pazienti responder dai non-responder alla seconda linea di intervento con Vedolizumab. Inoltre, mediante la scrupolosa raccolta di dati potremmo migliorare i processi di selezione e monitoraggio dei pazienti. Come nel caso di precedenti studi traslazionali, ci aspettiamo di poter

individuare possibili terapie personalizzate per sottopopolazioni di pazienti caratterizzati da uno specifico pattern infiammatorio.

La selezione dei pazienti rappresenta un enorme vantaggio per il paziente, ma anche per la sanità pubblica che potrà utilizzare le risorse per terapie efficaci anziché procedere per tentativi per mancanza di marcatori specifici.

Innovazioni:

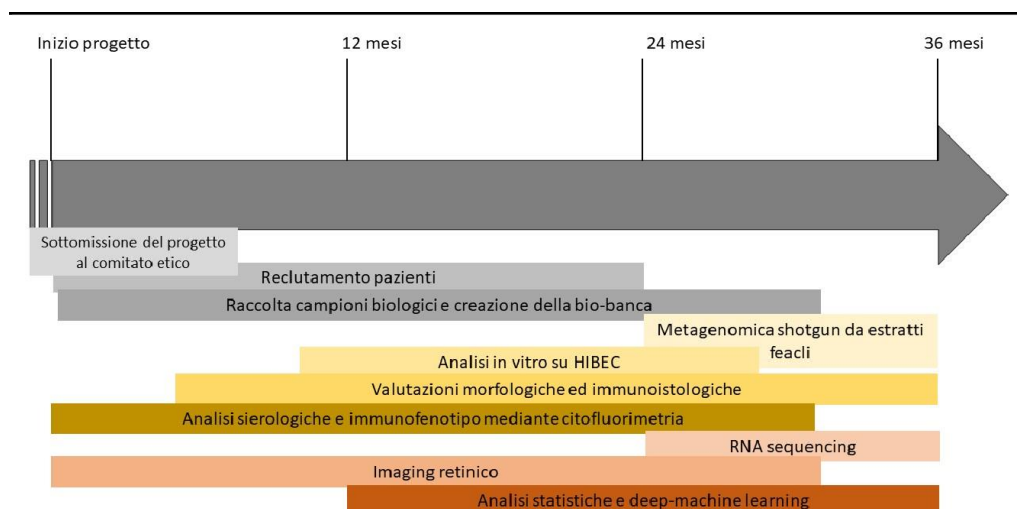
Il presente progetto rappresenta una importante innovazione per il nostro IRCCS in quanto mette in rete numerosi reparti che contribuiranno con pari impegno e responsabilità al successo della ricerca proposta. Questo spirito di collaborazione rappresenta il modello verso il quale vogliamo indirizzare i nostri sforzi.

Dal punto di vista clinico, il continuo affinamento delle analisi immunoistologiche, l'introduzione di immunofenotipo mediante citofluorimetria, l'utilizzo di -omiche complesse associate alle analisi retiniche rappresenta un grande sforzo di coordinamento che porterà ad una profonda conoscenza del paziente e sarà il punto di partenza per studi futuri.

Bibliografia:

1. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S; IBD Section of the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2011 May;60(5):571-607.
2. Novel Pharmacological Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: Beyond Anti-Tumor Necrosis Factor. Pagnini C, Pizarro TT, Cominelli F. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 18;10:671.
3. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):992-1006.
4. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products.
5. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. *J Clin Med*. 2020 Apr 28;9(5):1273. Vedolizumab: A New Opponent in the Battle Against Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Poulakos M, Machin JD, Pauly J, Grace Y. *J Pharm Pract*. 2016 Oct;29(5):503-15.
6. Use of Vedolizumab for the Treatment of Crohn's Disease. Bressler B. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2019 Apr;15(4):204-206.

Timeline (Gantt chart)



Progetto 14/2019: "Malattia infiammatoria intestinale cancro del colon-retto e microbiota intestinale, quali correlazioni"

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Grazia Serino, Angela Tafaro, Marcello Chieppa, Mauro Mastronardi

Background:

I tumori del colon-retto rappresentano, nel mondo, la seconda causa di morte. In Italia ogni anno circa 34 000 persone si ammalano (1). E' stato ormai definito che i fattori di rischio includono la dieta, l'obesità, il fumo, l'alcool e una scarsa attività fisica (2). Un altro fattore di rischio è rappresentato dalle malattie infiammatorie croniche intestinali che comprendono la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (3, 4). E' riportato infatti che circa l'1% dei pazienti con CRC ha una storia clinica di rettocolite ulcerosa ed il rischio di sviluppare CRC è direttamente connesso con la gravità del danno della mucosa intestinale e con l'estensione del processo infiammatorio, tuttavia il rischio di sviluppare CRC nei soggetti con la malattia di Crohn risulta minore rispetto ai soggetti con rettocolite ulcerosa (5, 6).

Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi intestinale. Dati metagenomici recenti hanno dimostrato che la maggior parte delle specie componenti non è presente nello stesso tempo e nella stessa persona, ma, alcune specie sono abbondanti in individui sani, mentre altre sono meno rappresentate (7, 8).

Il microbiota intestinale inoltre influenza la proliferazione delle cellule epiteliali e l'apoptosi delle cellule ospiti. Sebbene le interazioni intime tra microbiota e cellule ospiti non siano del tutto chiare, un meccanismo importante sembra implicare acidi grassi a catena corta (SCFA), derivanti dalla fermentazione di polisaccaridi indigeribili (fibre), come butirrato, acetato e propionato con un importante ruolo antinfiammatorio. Gli SCFA supportano anche l'omeostasi intestinale nel colon normale, aiutando la riparazione intestinale attraverso la promozione della proliferazione e differenziazione cellulare. Tuttavia, gli SCFA sembrano inibire la proliferazione delle cellule cancerogene (9). Inoltre, il microbiota intestinale stimola lo sviluppo di componenti del sistema immunitario aspecifico e specifico, subito dopo la nascita e durante l'intera vita e agisce da barriera anti-infettiva inibendo l'adesione dei patogeni e successiva colonizzazione del substrato cellulare e dalla produzione di batteriocine e di altri metaboliti tossici.

Negli ultimi anni, però, si è fatta avanti l'idea che la flora batterica intestinale possa svolgere un ruolo importante nello sviluppo di diverse malattie e nella cancerogenesi. La disbiosi è stata dimostrata essere associata alla tumorigenesi intestinale (10, 11).

L'alterazione della complessità e dello stato eubiotico del microbiota potrebbe promuovere disordini autoimmuni e infiammatori intestinali ed extraintestinali (diabete di tipo I, artrite reumatoide, spondilosi anchilosante, IBD, malattia polmonare, atopia, steatosi epatica non alcolica, obesità, aterosclerosi, carcinogenesi, ecc.) sebbene i meccanismi coinvolti non siano ben compresi.

Tuttavia, la correlazione tra microbiota intestinale, malattie intestinali autoimmuni / infiammatorie deve essere ancora approfonditamente indagata (12).

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di valutare tramite l'utilizzo di modelli murini di trapianto fecale (FMT) le correlazioni tra microbiota intestinale, cancerogenesi del tumore del colon-retto e patologia infiammatoria intestinale. Nello studio proposto utilizzeremo diversi modelli murini: topo APC^{min}/+ che contiene una mutazione puntiforme nel gene della poliposi adenomatosa coli (Apc) e sviluppa solo lesioni precancerose intestinali (adenomi benigni) che fornisce un eccellente sistema in vivo per indagare gli eventi molecolari coinvolti nel processo infiammatorio che possono contribuire alla tumorigenesi simultanea e alla carcinogenesi (13); topo Winnie -/- topo con la mutazione omozigote, modelli murini di Colite Ulcerosa, topo Winnie-APC^{min} che combina entrambe le mutazioni e presenta lesioni pre-cancerose a partire dalle 5 settimane di età (manoscritto in sottomissione), e topi wild-type (WT) che rappresenteranno il controllo. In particolare effettueremo trapianti fecali da topo donatore Winnie-APC^{min} in topi Winnie e topi normali. Valuteremo quindi una serie di markers della

cancerogenesi e dell'infiammazione intestinale al fine di chiarire quali sono i pathways attivati e disattivati in seguito al transfer fecale sia nel modello di controllo che nel modello indicato come Winnie.

In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per lo studio dell'associazione tra tumori intestinali ed il microbiota. Gli esperimenti vedranno impiegati modelli murini di trapianto fecale di microbiota come fase pre-clinica per futuri approcci clinici sperimentali.

Parte della ricerca è inoltre già un processo in corso e siamo intenzionati a rafforzare le collaborazioni con altri centri di ricerca in particolare con la Western University of Cleveland (Ohio).

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale di feci provenienti da topi Winnie-APC^{min}.

Obiettivo specifico 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale al fine di individuare biomarkers specifici della patologia e della risposta immunitaria.

Obiettivo specifico 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD che hanno sviluppato un tumore del colon-retto.

Obiettivo 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale di feci provenienti da topi Winnie-APC^{min}.

Obiettivo specifico 1: Lo studio prevede la caratterizzazione e l'isolamento del microbiota intestinale in forma di sospensione liquida dai topi donatori Winnie-APC^{min} e la somministrazione in topi precedentemente sottoposti a terapia antibiotica stringente utile a depletare completamente l'ospite ricevente della flora batterica residente. Il trattamento ha già dimostrato di non comportare effetti avversi o sofferenza negli animali trattati. I topi verranno pesati giornalmente, verrà valutata la presenza di sangue nelle feci insieme alla valutazione di benessere generale. Alla fine del trattamento i topi saranno sacrificati, l'intestino verrà rimosso e ne verrà studiata la morfologia per valutare i cambiamenti indotti nei topi controllo e nei Winnie dal trapianto fecale. Verranno isolati tratti intestinali dal colon mediale per permettere analisi molecolari ed i linfonodi mesenterici per le analisi della attivazione del sistema immunitario adattativo.

Il nostro studio permetterà di valutare la capacità di attecchimento del microbiota selezionato nei topi controllo e nei topi Winnie inoltre si valuteranno gli eventuali effetti del trapianto selezionato nei topi controllo e nei topi Winnie.

Obiettivo 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta immunitaria.

Obiettivo specifico 2: Il profilo di espressione genica del colon mediale ottenuto dai Winnie- e delle linee murine controllo prima e dopo il trapianto fecale da donatore Winnie-APC^{min} (WT prima e dopo trapianto e Winnie prima e dopo trapianto) verrà analizzato mediante RNAseq. Dagli stessi campioni utilizzati per la valutazione del profilo di espressione genica, valuteremo il profilo di espressione dei miRNA, in modo tale da poter individuare miRNAs coinvolti nello sviluppo della patologia intestinale associata al cambiamento del microbiota. L'eventuale

identificazione di miRNA coinvolti nella risposta al trapianto fecale nei topi trattati potrà consentire la nascita di nuove linee sperimentali.

Obiettivo 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD che hanno sviluppato un tumore del colon-retto

Eventuali risultati positivi ottenuti dalla sperimentazione su modello animale saranno alla base dell'analisi sistematica della banca di siero di pazienti che hanno sviluppato malattia infiammatoria intestinale e/o successivamente cancro del colon-retto. Si dovrà procedere alla richiesta al comitato etico del permesso a conservare i sieri dei pazienti appartenenti a questi sottogruppi.

Dati preliminari:

Il progetto di ricerca si basa sull'utilizzo del modello sperimentale del trapianto di feci. Allo scopo di valutare i cambiamenti istologici, dei livelli di espressione di alcuni marker della progressione infiammatoria e neoplastica oltre che di varie citokine, modulatori della risposta infiammatoria si utilizzeranno come donatori topi Winnie-APC^{min} e come riceventi topi Winnie e WT. I Topi Winnie-APC^{min} presentano missense mutation nel gene APC e vengono utilizzati come modello sperimentale di cancerogenesi del tumore coloretale, e si è potuto osservare che differenze significative anche a livello del microbiota intestinale (16, 17). Per quanto riguarda i topi riceventi invece, la sperimentazione prevede che il trapianto fecale sia effettuato sia su topi di controllo WT che su topi Winnie dopo terapia antibiotica. Il punto chiave di questo approccio sta nel fatto che grazie ai precedenti studi effettuati nel settore dell'immunopatologia molto si conosce circa la caratterizzazione dei topi Winnie identificati come modelli di malattia infiammatoria.

Come si può osservare nel grafico sottostante la caratterizzazione dei topi Winnie è stata condotta anche a livello del microbiota intestinale. Importanti sono le differenze nel microbiota intestinale dei topi Winnie rispetto ai WT come si osserva nella FIG.1 (manoscritto in sottomissione).

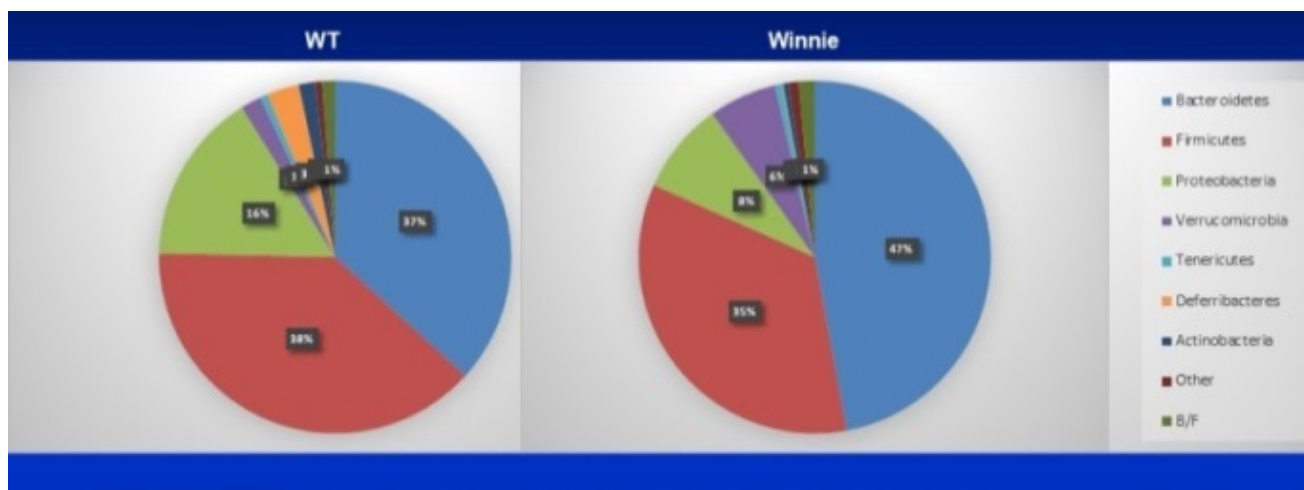


FIG.1: Differenze del microbiota intestinale tra topi WT e Winnie. Le principali differenze si osservano per i Phyla *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Deferribacteres*.

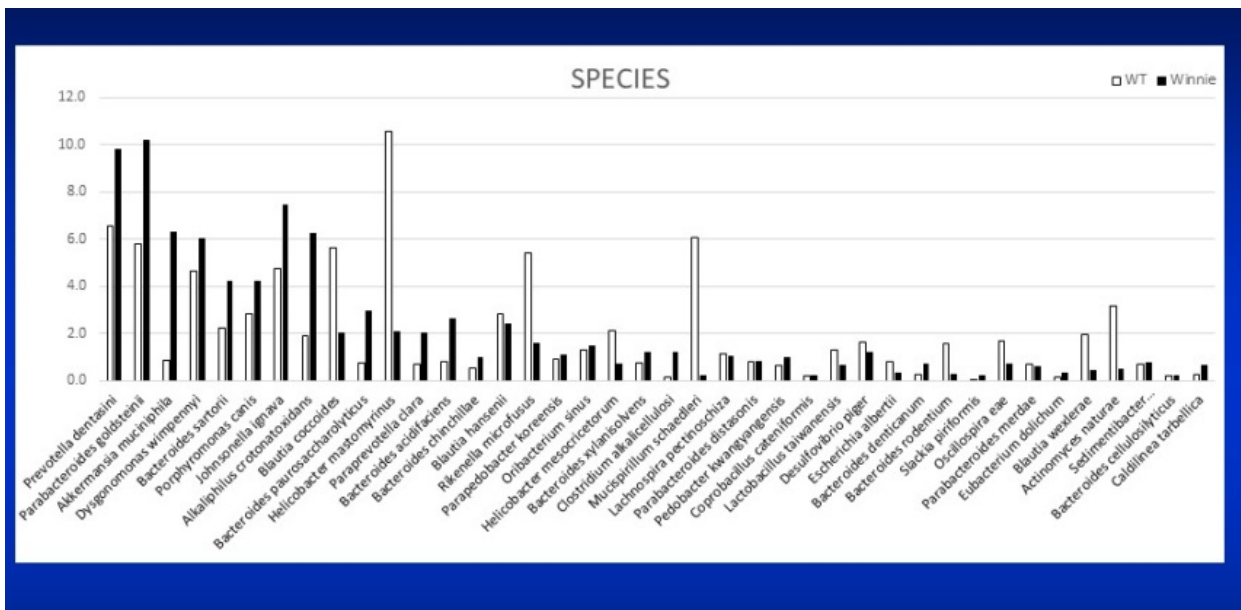


FIG.2: Differenze relative alle specie costituenti il microbiota intestinale dei topi WT dei topi Winnie.

La caratterizzazione del microbiota intestinale dei topi Winnie è stata recentemente condotta. Come si può osservare dai grafici riportati le differenze rispetto ai topi WT riguardano non solo il genere ma anche la specie dei batteri che lo costituiscono.

Metodologie e analisi statistiche:

Generazione di topi abiotici secondari (Gnotobiotici) e ricostituzione del microbiota commensale intestinale mediante trapianto fecale: Al fine di esaurire virtualmente il microbiota intestinale, topi di 8-10 settimane saranno trasferiti in gabbie sterili e sottoposti a trattamento antibiotico quintuplo per 8 settimane (18). Tre giorni prima della FMT orale, il cocktail antibiotico sarà sostituito con acqua potabile sterile. Il successo dell'eradicazione del microbiota intestinale coltivabile sarà confermato mediante analisi molecolare e culturale. La preparazione del campione fecale per il trapianto avverrà come di seguito descritto: campioni fecali murini freschi saranno raccolti da topi Winnie-APC^{min}, disciolti in 10 ml di soluzione salina tamponata con fosfato sterile e il surnatante sarà somministrato mediante sonda gastrica (in 0,3 ml di PBS) per ricostituire nei topi abiotici secondari il microbiota intestinale complesso. Per controllare lo stato di colonizzazione intestinale dei topi, saranno prelevati campioni fecali singoli una volta alla settimana e al momento del sacrificio. I campioni saranno incubati in BHI e in brodi di tioglicolato per almeno 1 settimana a 37 ° C e la crescita batterica sarà monitorata giornalmente mediante valutazione di torbidità. Aliquote da brodi torbidi saranno coltivate su terreno solido in condizioni aerobiche e anaerobiche e i batteri saranno identificati microbiologicamente e biochimicamente.

Valutazione morfologiche: Gli animali verranno sacrificati secondo la tempistica stabilita, il colon espantato e fissato. Mediante colorazione con ematossilina-eosina dei campioni istologici procederemo alla valutazione del danno intestinale presente nei topi WT e Winnie dopo trapianto fecale.

Valutazione del profilo di espressione: Gli animali verranno sacrificati secondo la tempistica stabilita, il colon espantato ed immerso in RNAlater prima di essere congelato. Successivamente procederemo all'estrazione dell'RNA (o dei miRNA) che verranno sequenziati dai nostri collaboratori a presso l'Università degli Studi di Salerno.

Valutazione dei miRNA: Il profilo dei miRNA verrà valutato utilizzando i campioni di colon dei topi WT e dei topi Winnie. Eventuali miRNA associati alla risposta anti-infiammatoria potrebbero essere candidati come target terapeutici nel controllo della progressione della malattia verso la cancerogenesi.

Protocollo sperimentale di somministrazione dei miRNA: In seguito all'analisi del profilo di espressione dei miRNA dei topi trapiantati, valuteremo i miRNA principalmente coinvolti nella risposta immunitaria.

Valutazione del microbiota: Sarà condotta la valutazione del microbiota intestinale proveniente dai topi Winnie-APC^{min}, e dei topi sottoposti al trapianto fecale mediante analisi colturale e analisi molecolare della microflora ileale

Risultati attesi:

Dal presente progetto è possibile attendersi l'individuazione di una sottopopolazione di pazienti IBD nei quali si potrebbe osservare una progressione della malattia verso la cancerogenesi. In questi pazienti sospettiamo che il microbiota possa avere un ruolo fondamentale e per tale motivo ci aspettiamo che l'individuazione dei pattern molecolari alla base di un cambiamento del microbiota possa rappresentare una svolta per l'identificazione della progressione della patologia. Per verificare tale ipotesi utilizzeremo il nostro modello sperimentale Winnie nel quale è presente la malattia infiammatoria intestinale e valuteremo il cambiamento del microbiota dovuto al trapianto fecale.

Mediante gli esperimenti su questo modello animale confidiamo di poter individuare biomarker predittivi del rischio di sviluppare carcinoma del cancro del colon retto (specie batteriche) entro la fine del secondo anno di sperimentazione. I risultati ottenuti verranno validati utilizzando le feci dei pazienti affetti da colite ulcerosa e che hanno sviluppato cancro colon-rettale.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Possibilità che il trapianto non abbia successo.

Nel caso di un fallimento del trapianto valuteremo la possibilità di sopperire a questa mancanza mediante un protocollo basato sull'infezione dei topi riceventi mediante singole specie batteriche patogene associate con lo sviluppo di processi infiammatori e di cancerogenesi e che hanno mostrato maggiore rappresentatività nel microbiota dei topi Winnie-APC^{min}.

Innovazioni:

La medicina personalizzata e di precisione è considerata il nuovo standard per il trattamento clinico dei pazienti. Le nuove tecnologie a nostra disposizione e l'avvento delle multi-omiche permettono analisi che pochi anni fa erano impensabili. Nel nostro ospedale i singoli gruppi hanno provato ad innalzare gli standard delle analisi preliminari sui pazienti in modo da meglio disegnare la terapia scelta sulle esigenze dei pazienti. Questo progetto si basa sullo studio dell'interazione tra microbiota cancerogenesi e malattie infiammatorie dell'apparato digerente. Sulla base dei nostri dati preliminari, riteniamo di poter contribuire alla conoscenza dei meccanismi alla base di questa interazione.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

I gruppi di ricerca coinvolti nel presente progetto sono quasi esclusivamente parte dell'IRCCS "S.de Bellis". Le interazioni per progetti di ricerca sono state frequenti in questi anni, come dimostrano le prime pubblicazioni prodotte in collaborazione. La novità rappresentata dal nostro progetto è una interazione sistematica ed organizzata per far sì che i dati clinici e sperimentali confluiscono in un solo progetto che avrà rilevanza clinica e scientifica.

Formazione e attività tutoriali:

Per la formazione dei contrattisti coinvolti nel progetto, contiamo sulla crescita legata alle attività sperimentali necessarie per lo svolgimento del progetto ed alla presentazione dei risultati ottenuti durante il corso di almeno un congresso internazionale.

Bibliografia:

- 1) Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, Mangiola F, Sinagra E, Hold G, Maida C, Cammarota G, Gasbarrini A, Scarpulla G. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017 Dec;17(12):1131-1146.
- 2) Mendonça LABM, Dos Santos Ferreira R, de Cássia Avellaneda Guimarães R, de Castro AP, Franco OL, Matias R, Carvalho CME. The Complex Puzzle of Interactions Among Functional Food, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2018 Sep 5;8:325.
- 3) Rescigno M, Chieppa M. Gut-level decisions in peace and war. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):254-5. Colorectal cancer prevention in patients with ulcerative colitis.
- 4) Olson TS et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):541-52.
- 5) Lopez A, Pouillon L, Beaugier L, Danese S, Peyrin-Biroulet L. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2018 Feb - Apr;32-33:103-109.
- 6) Kameyama H, Nagahashi M, Shimada Y, Tajima Y, Ichikawa H, Nakano M, Sakata J, Kobayashi T, Narayanan S, Takabe K, Wakai T. Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2018 Jul 2;16(1):121.
- 7) Stidham RW, Higgins PDR. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018 May;31(3):168-178. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease.
- 8) Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium., Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 Mar 4; 464(7285):59-65
- 9) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Human Microbiome Project Consortium. *Nature.* 2012 Jun 13; 486(7402):207-14.
- 10) Scheppach W Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994 Jan; 35(1 Suppl):S35-8
- 11) Akin H, Tözün N. Diet, microbiota, and colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Nov-Dec;
- 12) Mandal P.. Molecular mechanistic pathway of colorectal carcinogenesis associated with intestinal microbiota. *Anaerobe.* 2018 Feb;49:63-70.
- 13) Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, Picu A, Petcu L, Chifiriuc MC. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol.* 2018 Aug 15;9:1830.
- 14) Cao H 1, 2, Xu M 1, 3, Dong W 1, Deng B 1, Wang S 1, Zhang Y 4, Wang S 1, Luo S 1, Wang W 1, Qi Y 5, Gao J 5, Cao X 1, Yan F 1, 2, Wang B 1. Secondary bile acid-induced dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2017 Jun 1;140(11):2545-2556.
- 15) Holen I. et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget.* 2016 Nov 15;7(46):75571-75584.
- 16) Lim WK. et al. Suppression of immune-mediated ocular inflammation in mice by interleukin 1 receptor antagonist administration. *Arch Ophthalmol.* 2005 Jul;123(7):957-63.
- 17) Altered Interactions between the Gut Microbiome and Colonic Mucosa Precede Polyposis in APCMin/+ Mice. Son JS, Khair S, Pettet DW 3rd, Ouyang N, Tian X, Zhang Y, Zhu W, Mackenzie GG, Robertson CE, Ir D, Frank DN, Rigas B, Li E. *PLoS One.* 2015 Jun 29;10(6):e0127985.

18) Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, et al. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* (2006) 177(12):8785–95. doi:10.4049/jimmunol.177.12.8785

Timeline / Prodotti finali:

Il fine ultimo del progetto proposto è la valutazione degli effetti del transfer fecale da topi Winnie-APC^{min} in topi WT e Winnie al fine di valutare le correlazioni tra microbiota ed evoluzione della malattia infiammatoria intestinale.

- individuare un pannello di miRNA al fine di individuare patterns predittivi di evoluzione della malattia infiammatoria verso carcinogenesi
- individuare possibili miRNA-Based Therapeutic Strategies
- validare l'asse microbiota malattia infiammatoria e cancerogenesi

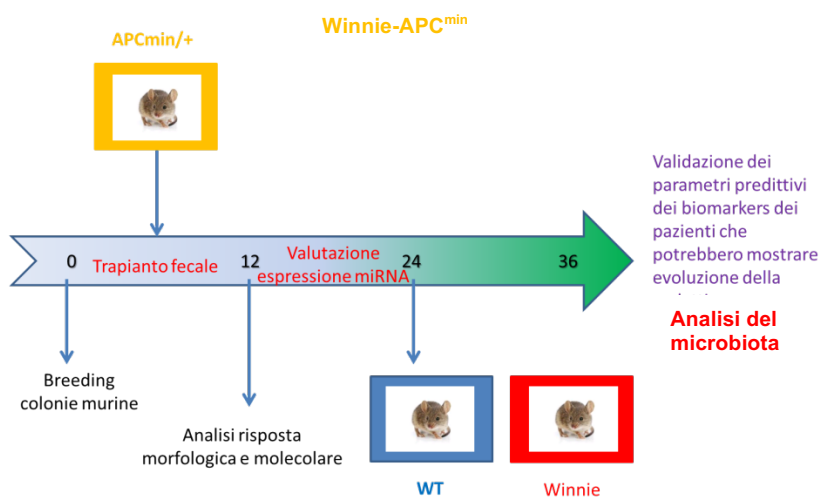
Prima metà del progetto:

0-6 mesi: Breeding delle colonie murine e trapianto.
 0-12 mesi: Analisi morfologiche e molecolari

Seconda metà del progetto:

12-24 mesi: Individuazione dei miRNA espressi durante il trattamento
 24 mesi: Report dei risultati mediante meeting presso il nostro centro congressi
 24-36 mesi: Validazione dei precedenti risultati, validazione dei biomarker utilizzando siero di pazienti IBD con / senza evoluzione della malattia.
 34-36 mesi: Presentazione dei risultati, eventuale preparazione di un trial multicentrico

Gantt chart



Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

La spesa per il trattamento dei pazienti con IBD è di 2.000.000/anno solamente per quel che riguarda il nostro ospedale. Alcuni dei pazienti inoltre hanno mostrato una evoluzione della malattia infiammatoria verso processi

neoplastici. In questa sottopopolazione potrebbe essere utile indagare il rapporto microbiota- evoluzione della malattia. Chiarire queste interrelazioni mediante modelli sperimentali potrebbe aiutare a prevenire l'evoluzione della malattia mediante la creazione di un pannello di biomarkers specifici che potrebbero guidare i clinici nello screening dei pazienti a rischio e nella scelta delle tappe del controllo. Il progetto proposto è di enorme rilevanza per il SSN essendo le IBD un insieme di patologie croniche con un'incidenza sempre maggiore sulla popolazione e rappresentando il tumore del colon-retto una importante patologia.

Progetto 15/2019: "Studio degli effetti di polifenoli estratti da due varietà di uva sul profilo lipidomico cellulare e sulle diverse frazioni delle LDL sieriche; possibili applicazioni nella sindrome metabolica"

Responsabile: dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Giampiero De Leonardis, Maria Gabriella Caruso, Francesco Russo, Antonella Orlando, Nicola Veronese, Rosa Anna Milella, Mario Colucci

Background:

L'alimentazione occupa un ruolo centrale nel contrastare le malattie legate al metabolismo e la Dieta Mediterranea si pone in prima fila come un modello equilibrato di alimentazione, capace di prevenire l'insorgenza della sindrome metabolica (1), una condizione caratterizzata dalla coesistenza di diversi fattori di rischio (obesità, ipertensione, ipercolesterolemia, insulino-resistenza) che predispongono a malattie cardiovascolari e al diabete. Diete come quella Mediterranea, ricche di flavonoidi e composti polifenolici sono in grado di esercitare un'elevata azione anti-infiammatoria, antitrombotica ed antiproliferativa.

I polifenoli sono gli antiossidanti più abbondanti nella nostra dieta e studi epidemiologici, clinici e sugli animali sostengono il loro ruolo nella prevenzione di molte malattie cronico-degenerative. Tra la frutta con un elevato contenuto di polifenoli ritroviamo l'uva, importante pilastro della Dieta Mediterranea, la cui produzione si concentra prevalentemente nella regione Puglia e che fa dell'Italia uno dei principali produttori di uva da tavola al mondo. Numerosi sono gli studi che dimostrano come i polifenoli dell'uva esercitano un'importante azione di protezione dall'insorgenza delle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e dal cancro (2). Poche informazioni si hanno invece sugli effetti sulla salute derivanti dal consumo di uva da tavola.

Per molto tempo gli effetti benefici dei polifenoli sulla salute sono stati attribuiti esclusivamente alla loro azione antiossidante diretta, tuttavia, negli ultimi anni è emerso che i polifenoli possono interagire con i meccanismi di segnalazione intracellulare, possono modulare l'attività dei fattori di trascrizione e conseguentemente influenzare l'espressione dei geni. Questi composti bioattivi, inoltre, producono maggiori effetti quando sono presenti insieme rispetto ai singoli composti, mostrando un importante effetto sinergico. Recenti ricerche, inoltre, aprono la strada ad un interessante scenario, ipotizzando un nuovo possibile meccanismo alla base dei benefici di una

alimentazione ricca di frutta e verdura. Tale meccanismo vede come protagonisti i microRNA prodotti dalle piante, un gruppo di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento (ss) identificati in molti organismi e formati da 18-22 nucleotidi. Tali miRNA una volta assunti con la dieta, sono in grado di regolare l'espressione dei geni umani potendo inoltre avere anche importanti effetti terapeutici (3-5). Per tale ragione è di grande interesse per il mondo scientifico approfondire la conoscenza di queste molecole di RNA derivanti dal mondo vegetale fornendo ulteriori evidenze scientifiche sui loro effetti una volta assunti con la dieta (6).

Il tipo di alimentazione è anche in grado di influenzare la composizione degli acidi grassi contenuti nelle membrane cellulari (7,8), suggerendo che lo studio delle molecole lipidiche nelle membrane cellulari (analisi lipidomica) può essere considerato un valido approccio per valutare lo stato nutrizionale di un individuo. La lipidomica, infatti, studia le molecole dei lipidi in modo "dinamico", ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il "metabolismo cellulare", in condizioni fisiologiche o patologiche, e definendone i ruoli nell'ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente (9,10). La lipidomica è in grado di monitorare i cambiamenti delle molecole dei fosfolipidi di membrana, dovuti per cause metaboliche, intrinseche ed estrinseche, quali l'infiammazione, lo stress o l'alimentazione. Dalla valutazione della composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana eritrocitaria e nel plasma e degli effetti che questi cambiamenti possono esercitare sul potenziale protrombotico cellulare e plasmatico, è possibile sviluppare strategie di intervento a livello alimentare e nutraceutico, in modo da armonizzare i cambiamenti per mantenere l'equilibrio cellulare. Il controllo omeostatico della composizione dei fosfolipidi di membrana è essenziale per la funzione e la sopravvivenza della cellula ed è finemente regolato da enzimi, noti per la loro capacità di modulare le proprietà biofisiche e biochimiche delle membrane.

Recentemente è stato osservato, in pazienti con CRC, che la presenza delle metastasi al momento della chirurgia era associata ad un alterato profilo degli acidi grassi nella membrana delle cellule del tessuto colico (11). L'analisi lipidomica è quindi in grado di selezionare i pazienti neoplastici a più alto rischio di metastatizzazione. Inoltre, alti livelli del rapporto tra acido arachidonico/acido eicosapentanoico (AA/EPA) sono associati alla presenza di steatosi e alto BMI (12), due parametri caratteristici della sindrome metabolica. L'attività fisica e una dieta a basso indice glicemico sono in grado di ridurre il rapporto AA/EPA e migliorare i parametri legati all'infiammazione e lo score del danno epatico in tutti i soggetti studiati (12).

Inoltre, molte sono le evidenze scientifiche che dimostrano come la dieta o gli alimenti funzionali sono in grado di modificare l'assetto lipido sierico di un soggetto. Un ruolo importante nell'insorgenza di malattie dismetaboliche è sicuramente svolto dalle diverse frazioni delle Lipoproteine a Bassa Densità (LDL). La presenza, nel siero, delle frazioni più piccole delle LDL, come la frazione 3 e la frazione 4, è stata associata all'insorgenza di patologie cardiovascolari e all'infarto del miocardio (13,14), la cui eziopatogenesi vede come principale fattore un aumento del potenziale protrombotico ematico. Studi in corso nel nostro laboratorio hanno dimostrato la presenza di alti livelli di LDL piccole e dense (frazione 3 e 4) nel siero di pazienti operati per carcinoma colo-rettale con metastasi sincrone. Pertanto, comprendere i meccanismi molecolari che sottendono gli effetti dei nutraceutici è indispensabile nell'ottica di sviluppare strategie di prevenzione e di intervento sui soggetti a rischio. Attraverso la dieta e il cambiamento delle abitudini alimentari è possibile prevenire o ridurre l'insieme dei fattori di rischio che portano alla sindrome metabolica.

Obiettivi specifici dello studio:

Il principale obiettivo dello studio è valutare gli effetti di una miscela di polifenoli estratti dall'uva sul profilo lipidomico di membrana, sul potenziale protrombotico cellulare e plasmatico e sui livelli delle diverse frazioni di LDL. A tale scopo, lo studio si articolerà in 2 fasi: una prima fase "in vitro" che permetterà di valutare gli effetti anti-infiammatori, anti-trombotici ed anti-proliferativi di una miscela di polifenoli, estratti da almeno 2 varietà di uva, su linee cellulari umane in coltura. Lo studio "in vitro" consentirà anche di valutare, mediante analisi lipidomica, la possibile variazione del profilo degli acidi grassi della membrana cellulare dopo trattamento con polifenoli.

Nella seconda fase si condurrà uno “studio clinico” per valutare gli effetti dell’assunzione d’uva sulla variazione del profilo lipidomico e protrombotico e sul pattern sierico delle LDL di soggetti con sindrome metabolica. Inoltre, lo studio intende valutare la presenza di miRNA dell’uva nel plasma dei soggetti che hanno assunto uva.

Dati preliminari:

Recentemente uno studio su 20 volontari sani ha dimostrato come il consumo giornaliero di 5g/Kg di uva per 4 settimane causava un effetto anti-trombotico attraverso l’aumento della capacità fibrinolitica del plasma (15). Inoltre gli approfondimenti di nutrigenomica hanno permesso di osservare che l’espressione di più di 1000 geni viene influenzata dall’assunzione di uva e che tra questi geni molto importanti sono quelli dell’infiammazione, della riparazione del DNA, della coagulazione e dell’autofagia (dati in corso di pubblicazione). Questo studio pilota, che ha utilizzato una varietà di uva nera da tavola con un livello ben bilanciato di anti-ossidanti, micronutrienti e polifenoli, suggerisce che il consumo di uva potrebbe avere potenziali benefici sulla salute dell’uomo.

Metodologie e analisi statistiche:

Studio *in vitro*

Colture cellulari: Le linee cellulari di carcinoma colo rettale umano a differente grado di differenziazione (Caco-2, DLD-1 and SW620) saranno coltivate utilizzando un terreno di coltura specifico arricchito di siero fetale bovino (10%), glutammina 2mM, penicillina 100U/ml, streptomycina 100µg/ml ed incubate a 37°C e in presenza del 5% di CO₂.

Vitalità cellulare: La citotossicità delle sostanze saggiate negli esperimenti viene 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 della miscela di polifenoli estratti dalle 2 varietà di uva da testare. Dopo 24 ore e 48 ore di trattamento le cellule verranno pellettate per le analisi di espressione genica e proteica, nonché per valutare la risposta pro-coagulante e fibrinolitica.

Preparazione degli estratti di polifenoli dall’uva e loro caratterizzazione

I campioni di uva da utilizzare nello studio saranno forniti dal CREA-Centro di Ricerca in Viticoltura ed Enologia di Turi (BA). Dopo un’attenta analisi delle varietà di uva da tavola presenti nel vigneto sperimentale del centro, tra le più interessanti sotto il profilo nutraceutico ne verranno selezionate due che saranno oggetto di studio in questo progetto. In particolare, dai grappoli raccolti saranno prelevati 30 acini, pesati, lavati e successivamente prelevate le bucce e i vinaccioli. Le bucce e i vinaccioli saranno sottoposti ad estrazione assistita da ultrasuoni con una soluzione di etanolo cloridrico (60:30:1/acqua:etanolo:acido cloridrico) per 80 minuti. Gli estratti polifenolici così preparati verranno filtrati con filtri di cellulosa rigenerata da 0,45 mm e conservati a -20 °C. Gli estratti polifenolici preparati dall’uva saranno caratterizzati mediante analisi HPLC-DAD per la determinazione del loro profilo chimico e verrà valutata la loro capacità antiossidante mediante differenti test: ORAC, ABTS, DPPH.

Caratterizzazione della composizione dell’uva utilizzata nello studio clinico (parametri qualitativi, composti bioattivi, attività antiossidante e identificazione miRNA)

Dell’uva utilizzata per lo studio verranno determinati: i parametri qualitativi (pH, acidità titolabile, contenuto in solidi solubili); i composti bioattivi (dosaggio dei polifenoli totali e determinazione delle singole molecole mediante analisi in HPL; valutazione dell’attività antiossidante (test orac, ABTS, DPPH). Inoltre, i miRNA della varietà selezionata per lo studio clinico verranno estratti dagli acini di quattro repliche biologiche utilizzando il mirVana

miRNA Isolation Kit (Ambion, Life technologies). I miRNA estratti verranno valutati spettrofotometricamente per quantità e qualità e poi inviati al service per il sequenziamento (Small RNA-Seq).

Espressione genica e proteica: Sulle linee cellulari sottoposte ai diversi tipi di trattamento, 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 Blot.

L'RNA totale cellulare viene estratto usando il Tri-Reagent (Mol. Res. Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA). Due µg di RNA totale, estratto sia dalle cellule controllo che trattate, vengono usati per la sintesi del cDNA. La trascrizione inversa (RT) è effettuata in 20 µl di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNASynthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). La real-time PCR viene effettuata in 25 µl di volume finale contenente 2 µl di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green SupermixBio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisenso di ogni gene. Il gene della β-actina viene utilizzato come controllo interno e come gene di riferimento in quanto housekeeping. La Real-time PCR viene effettuata in un CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Milano, Italia) usando il seguente protocollo: 45 cicli a 95°C per 3', 95°C per 10s, 55°C per 30s seguiti da un melting curve step a 65-95°C con una velocità di riscaldamento di 0.5°C per ciclo per 80 cicli. I prodotti della PCR sono quantizzati con curve di calibrazione esterne, una per ogni gene testato, ottenute con diluizioni seriali di un numero noto di molecole (10²-10⁷ molecole). Tutti i dati sono poi normalizzati, dividendo la quantità target per la quantità di β-actina usata come controllo interno per ciascun campione. La specificità del prodotto della PCR è confermata da una gel elettroforesi. Per quanto riguarda l'analisi di Western Blot, le cellule sono raccolte e lisate in ghiaccio in RIPA buffer (Pierce Ripa buffer, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Dopo l'omogenizzazione e la centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C, la concentrazione delle proteine viene misurata tramite dosaggio Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia). Aliquote di 50 µg di proteine totali sono separate in un 4-12% pre-cast gel di poliacrilammide (Invitrogen, Life Technologies, OR, USA) e trasferite su una membrana PVDF (Bio-Rad, Milano, Italia) mediante il Transblot Turbo (Bio-Rad, Milano, Italia). L'espressione di tutte le proteine da testare viene valutata con anticorpi specifici (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Dopo un incubazione overnight, le membrane sono poi incubate con lo specifico anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. Le proteine sono rilevate mediante chemiluminescenza (ECL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA) e l'analisi densitometrica di ogni proteina viene effettuata usando il Molecular Imager Chemidoc (Bio-Rad, Milano, Italia) e normalizzata vs l'espressione della β-actina.

Analisi per potenziale protrombotico cellulare e plasmatico (effetto antitrombotico)

La capacità delle cellule di promuovere la coagulazione sarà valutata con un test funzionale in grado di monitorare l'intera cinetica di generazione di trombina, inclusa la sua inattivazione da parte degli inibitori fisiologici plasmatici. In questi esperimenti, le cellule in esame fungeranno da attivatori ed amplificatori della coagulazione. Nello studio clinico, invece, si valuterà il potenziale protrombotico plasmatico usando un test simile al precedente in cui la coagulazione viene attivata da tissue factor purificato (15)

Studio 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 in sovrappeso. I criteri di esclusione includono: malattie cardiovascolari; ictus; trattamento con insulina o farmaci ipoglicemizzanti orali; glucosio a digiuno > 126 mg / dl, o glicemia casuale > 200 mg/dl; più di 20 g/die di assunzione di alcol; gravi condizioni mediche che possono compromettere la partecipazione al trial; persone che seguono una dieta speciale o sono coinvolte in un programma dimagrante o che hanno subito una recente perdita di peso e incapacità 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 per 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.

Dopo 1 mese di trattamento dietetico, tutti i soggetti dello studio saranno invitati a una nuova visita medica e verrà loro richiesto di fornire un altro campione di sangue per le analisi biochimiche richieste dal progetto. Dopo un mese dalla fine dell'assunzione di uva i soggetti saranno sottoposti ad un terzo prelievo per valutare gli eventuali effetti nel tempo del consumo di uva.

Analisi lipidomica

L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane dei globuli rossi che, avendo una emivita di 4 mesi, sono lo specchio dello stile di vita alimentare di un soggetto. Tutti i soggetti arruolati nello studio saranno sottoposti a prelievo ematico al baseline (tempo 0), dopo 4 settimane di dieta e dopo un mese dalla fine dell'assunzione di uva. Il campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA sarà sottoposto ad un estrattore automatizzato di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

Dosaggio delle LDL piccole e dense

Il dosaggio delle LDL piccole e dense verrà effettuato mediante il Sistema Quantimetrix Lipoprint che consente di separare le frazioni e le sottofrazioni delle lipoproteine sieriche per elettroforesi su gel di acrilamide. Per l'analisi saranno utilizzati tubi di gel di poliacrilammide al 3%, caricati con 25 µL di siero. I tubi saranno sottoposti a fotopolimerizzazione a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente sottoposti a corsa elettroforetica. Dopo la corsa, i campioni saranno incubati per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di aumentare l'uniformità delle bande. La quantizzazione delle bande delle lipoproteine avverrà mediante scansione ed analisi, utilizzando il software Lipoware.

Valutazione della biodisponibilità dei miRNA di uva nel plasma dei soggetti

Dal siero o dal plasma (200µL) dei soggetti coinvolti nello studio, verrà estratto l'RNA totale incluso gli Small RNA utilizzando il miRNeasy Mini Kit (QIAGEN). Dopo aver controllato al Nanodrop concentrazione (10-30ng/µL) e qualità ($A_{260}/A_{280} \approx 1.5$, $A_{260}/A_{230} \approx 0.5$) si procederà alla verifica dell'effettiva presenza di miRNA mediante una retrotrascrizione con un kit specifico per miRNA (TaqMan miRNA Reverse Transcription kit – Life Technologies) utilizzando come primer quello per un miRNA (es. miR34) sicuramente presente nel nostro campione e successiva Real Time (TaqMan SmallRNA) con la sonda corrispondente.

Gli RNA estratti verranno poi utilizzati in saggi di Real Time con il StepOnePlus Real-Time PCR System della Life Technologies per la ricerca dei miRNA di uva rilevati mediante il sequenziamento dei miRNA della varietà utilizzata nello studio clinico.

Valutazione dello stato antiossidante

Lo stato antiossidante sarà valutato determinando la capacità antiossidante plasmatica (PAC), i livelli di composti antiossidanti endogeni (albumina, bilirubina, acido urico, glutatione). La PAC sarà valutata mediante i saggi ORAC e ABTS. Il saggio ORAC sarà eseguito secondo Ou et al. diluendo campioni di plasma (1: 1000) in tampone fosfato (75 mM, pH 7,4), mentre il saggio ABTS sarà eseguito usando il kit in commercio ZENBIO-AOX-1.

End-point primario: variazione del profilo lipidomico di membrana, del potenziale protrombotico e dello score delle LDL piccole e dense, alla fine del periodo di trattamento rispetto ai valori basali. Valutazione dello stato antiossidante del plasma dei soggetti dopo l'assunzione di uva e ricerca nel plasma di miRNA di uva

End point secondari: valutazione degli effetti anti-infiammatori, anti-trombotici ed anti-proliferativi di una miscela di polifenoli, estratti da almeno 2 varietà di uva, su linee cellulari umane in coltura.

Analisi statistica: I dati saranno presentati come media (SD), salvo diversa indicazione. Le variabili categoriche saranno confrontate con il test di X^2 . I valori di $P < 0.05$ a due code saranno considerati statisticamente significativi. Il metodo Generalized Estimating Equation (GEE) verrà utilizzato per confrontare i dati alla fine del periodo di intervento rispetto al baseline e sarà effettuato considerando solo coloro che hanno completato lo studio. Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software STATA 13.

Calcolo della potenza dello studio: Per pianificare la dimensione del campione, il calcolo di potenza si basa sulla capacità di rilevare una variazione delle LDL score di almeno 10 punti tra prima e dopo il trattamento. Prevedendo l'80% di potenza e un $\alpha = 0.05$ si calcola che dovranno essere reclutati almeno 30 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 sul metabolismo lipidico e sul potenziale protrombotico.
- Informazioni utili per elaborare un possibile intervento dietetico mirato.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

- Le criticità del progetto potrebbero derivare dalla compliance al trattamento dietetico dei soggetti inclusi nel trial. Tuttavia, per assicurare la compliance, i ricercatori coinvolti nel progetto saranno impegnati in una sorveglianza attenta e costante sull'aderenza al disegno dello studio mediante l'uso di un questionario di valutazione somministrato ai soggetti alla fine del trattamento
- Il forte rationale dello studio e l'organizzazione ben strutturata dei nostri laboratori rappresentano una buona base di partenza per ridurre gli aspetti critici e raggiungere gli obiettivi del progetto.

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 il sovrappeso, l'obesità e le patologie ad esse correlate. Inoltre, l'identificazione e la produzione di nutraceutici con proprietà anti-infiammatorie ed ipocolesterolemizzanti possono portare alla formulazione di protocolli dietetici personalizzati.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il progetto tende alla creazione di un gruppo multidisciplinare ben strutturato, le cui competenze permetteranno il raggiungimento degli obiettivi previsti dal progetto.

Formazione e attività tutoriali:

Attività di tutor per borsa di studio e/o tesisti.

Bibliografia:

1. Li B et al. [Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis](#). Can J Gastroenterol Hepatol. 2018 Jul 2;2018:2784537
2. Rasines-Perea Z et al. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. Molecules. 2017;22:68.
3. Yu-Chen Liu et al. Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi. BMC Genomics 2017, 18 (Suppl 2):11

4. Mlotshwa, S. et al. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants. *Cell Res* 2015; 25, 521–524
5. Yang, J. et al. Detection of dietary plant-based small RNAs in animals. *Cell Res* 2015; 25, 517–520
6. Lin Zhang, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 2012; 22:107-126.
7. Galbete C. et al. [Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: an umbrella review of meta-analyses](#). *Eur J Epidemiol.* 2018 Jul 20. doi: 10.1007/s10654-018-0427-3
8. Notarnicola M et al. Increased serum levels of lipogenic enzymes in patients with severe liver steatosis. *Lipids Health Dis.* 2012 Oct 30;11:145.
9. Coviello G et al. Erythrocyte Membrane Fatty Acids Profile in Colorectal Cancer Patients: A preliminary Study. *Anticancer Res.* 2014;34(9): 4775-9.
10. Notarnicola M et al. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease* (2017) 16:160
11. Notarnicola M et al. Differential tissue fatty acids profiling between colorectal cancer patients with and without synchronous metastasis. *Int J Molecular Sciences* 2018;19(4)
12. Tutino V et al. Aerobic physical activity and a low glycemic diet reduce the AA/EPA ratio in red blood cell membranes of patients with NAFLD. *Nutrients* 2018, 10: 1299
13. Gentile M et al. [Association between Lp\(a\) and small dense LDL in menopausal women without metabolic syndrome](#). *Acta Cardiol.* 2018 doi:10.1080/00015385.2018.1481599
14. Gentile M et al. [Association between body shape index and small dense LDL particles in a cohort of mediterranean women: findings from Progetto ATENA](#). *J Clin Biochem Nutr.* 2017 Sep;61(2):130-134. doi: 10.3164/jcbtn.17-13. Epub 2017 Aug 11.
15. Ammollo CT et al. Grape intake reduces thrombin generation and enhances plasma fibrinolysis. Potential role of circulating procoagulant microparticles. *J Nutr Biochem* 2017;50:66-73

Gantt chart

Attività	I anno												II anno												III anno											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	36
Studi <i>in vitro</i>																																				
Arruolamento ed attivazione del TRIAL																																				
Analisi Lipidomica																																				
Analisi del pattern delle LDL																																				
Analisi potenziale protrombotico																																				
Analisi dei dati																																				
Preparazione lavori scientifici																																				

Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

L'identificazione e la produzione di nutraceutici con proprietà anti-infiammatorie ed ipocolesterolemizzanti sono della massima importanza per gli interventi pubblici volti a prevenire le malattie legate al metabolismo e per la formulazione di protocolli dietetici personalizzati.

LINEA 3

MEDICINA PARTECIPATIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 3 “Medicina Partecipativa in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto nell’anno 2021 sono i seguenti:

Progetto 16/2021: “Valutazione di approcci alternativi per il miglioramento del profilo sintomatologico e la qualità della vita in pazienti con Sindrome dell’Intestino Irritabile (Irritable Bowel Syndrome - IBS)”

Responsabile: dott. Francesco Russo

Partecipanti: Riezzo Giuseppe, Linsalata Michele, Orlando Antonella, Prospero Laura, D’Attoma Benedetta, Martulli Manuela, Notarnicola Maria, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Osella Alberto, Franco Isabella, Bianco Antonella, Chimienti Guglielmina, Monaci Linda

Introduzione

La terapia della sindrome del colon irritabile (irritable bowel syndrome - IBS) è tuttora prevalentemente di carattere sintomatico e non potrebbe essere altrimenti, dato che ancora non sono del tutto conosciute le cause scatenanti. Se la terapia è sintomatica, gli obiettivi terapeutici saranno, principalmente, la riduzione della sintomatologia e il miglioramento della qualità di vita dei pazienti. Sulla scelta dei trattamenti adottati incide molto la gravità della condizione. Infatti, nei casi clinici meno gravi, i medici ritengono siano sufficienti: il ricorso a un’efficace terapia antistress, la pratica costante di esercizio fisico, un riposo notturno appropriato e l’adozione di un piano dietetico, che escluda tutti quei cibi sospettati di causare la comparsa dei sintomi tipici del colon irritabile. Nei casi clinici moderati-gravi, invece, diventa indispensabile l’aggiunta ai suddetti rimedi, di una terapia farmacologica ad hoc e, talvolta, di supporto psicoterapeutico [1].

Negli ultimi anni il nostro gruppo di studio si è concentrato sull’approccio dietetico che rappresenta sicuramente quello con maggiore compliance da parte del paziente. L’utilizzo infatti di integratori probiotici e prebiotici non può che prevedere una assunzione limitata nel tempo, solitamente quello necessario affinché la dieta specifica faccia effetto. Una dimostrazione della bontà di tale approccio è stata fornita da un nostro recente studio sugli effetti di una dieta low-FODMAPs (Frutto-Oligosaccaridi, Disaccaridi, Monosaccaridi e Polioli) nella gestione clinica del paziente con IBS variante diarrea (IBS-D) [2].

Al di là della dieta a basso contenuto in FODMAPs, si ritiene che altri approcci dietetici possano essere efficaci, e tra questi sembra dare dei buoni risultati l’impiego di grani alternativi [3]. Il Tritordeum è un grano monococcico caratterizzato dalla bassa immunogenicità della gliadina in esso contenuta. Quindi può trovare una logica collocazione ed impiego in pazienti con IBS caratterizzati da intolleranze al grano [4]. Questi pazienti lamentano soprattutto gonfiore addominale e traggono vantaggio dall’eliminazione del grano, proprio a causa sia del contenuto di glutine sia di fruttani.

Un altro approccio al trattamento dell’IBS può essere rappresentato dal movimento fisico, allo scopo di migliorare la funzionalità del colon agendo, questa volta non a livello del lume intestinale, ma dall’“esterno”, sempre con l’obiettivo di migliorare la funzionalità del grosso intestino. È stato dimostrato che l’attività fisica regolare comporta un netto miglioramento della sintomatologia IBS. Infatti, la mancata attività fisica impedisce una stimolazione adeguata della muscolatura intestinale. La sedentarietà è un fattore determinante che porta, ad

esempio, a un indebolimento, a una scarsa funzionalità del diaframma e dei muscoli addominali. Questi muscoli, se allenati, contribuiscono a un miglioramento dei valori pressori con miglioramento della defecazione. Fare quotidianamente esercizio fisico, oltre alla prevenzione delle malattie cardiovascolari, può dare grossi benefici al tratto gastrointestinale (GI), contrastando disturbi comuni come il reflusso gastrico e la sindrome del colon irritabile. E' stato dimostrato infatti che il movimento favorisce e/o regolarizza la motilità gastro-intestinale (peristalsi) e il transito intestinale [5].

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Condurre un trial controllato randomizzato in pazienti ambulatoriali affetti da IBS-D per confrontare l'effetto sui sintomi IBS di differenti approcci (diete o attività fisica).

Obiettivo specifico 2: Prima e dopo i vari trattamenti, valutare mediante l'impiego di test non invasivi, la funzionalità e l'integrità dell'epitelio lungo tutto il tratto GI. Oggetto di studio sarà anche l'associazione tra alterazioni della permeabilità intestinale (PI) e i livelli circolanti di zonulina e i markers di danno epiteliale cellulare [fatty-acid binding protein (I-FABP), claudina-3, diamine oxidase (DAO)]. Infine si considereranno anche eventuali differenze concernenti la popolazione microbica intestinale (indolo, scatolo, D-lattato) in relazione alla PI.

Obiettivo specifico 3: Dosare i livelli ematici di somatostatina, motilina, serotonina, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prima e dopo i diversi trattamenti al fine di valutare le eventuali influenze dei differenti approcci sulla secrezione di questi peptidi e la loro correlazione con la sintomatologia IBS.

Obiettivo specifico 4: Valutare gli outcomes dei suddetti approcci anche attraverso lo studio di profili metabolici, individuati al fine di comprendere quali deficit, carenze o componenti nutrizionali possono essere associate alla sindrome IBS. I risultati dello studio potrebbero essere utili a studiare strategie di intervento per riequilibrare i cambiamenti metabolici ritrovati.

Dati preliminari:

Il progetto di ricerca si basa sulle conoscenze finora acquisite dalle figure professionali dell'istituto, coinvolte in un gruppo di studio multidisciplinare con un notevole know-how nel campo di diagnosi, terapia e di conoscenze dei meccanismi fisiopatologici di quei quadri nosologici caratterizzati da alterazioni della funzionalità di barriera intestinale (nello specifico la malattia celiaca e, più in generale, i disturbi glutine-correlati) nonché nelle patologie funzionali GI quali l'IBS. Tutte queste patologie, a vario titolo, sono caratterizzate da modificazioni della PI e per le stesse un approccio dietetico nonché fisico possono rappresentare una valida strategia. Tali aspetti sono stati già affrontati in parte in precedenti progetti di ricerca, dando vita a pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con I.F. [2].

Metodologie e analisi statistiche:

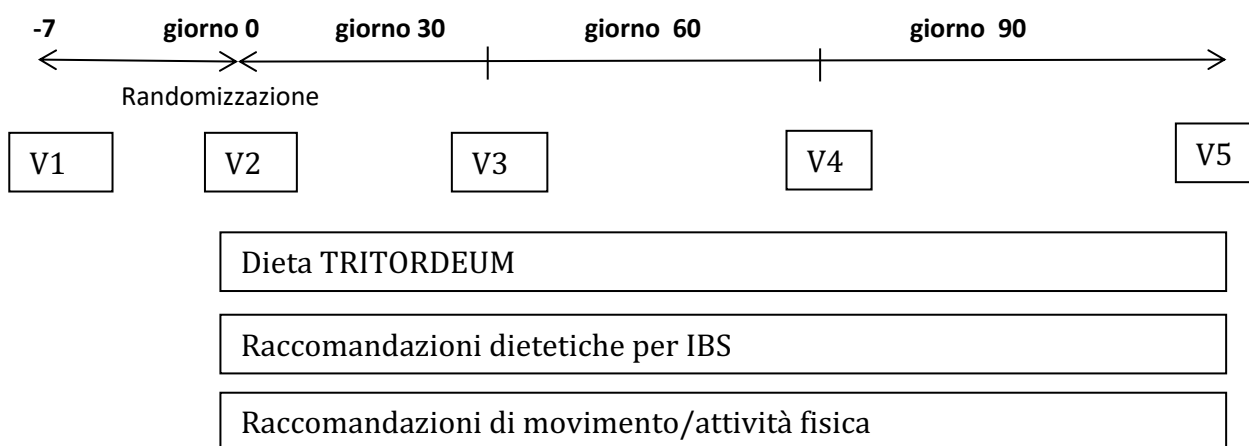
Reclutamento Pazienti: Per questo studio randomizzato, controllato, singolo cieco, si recluteranno pazienti adulti (18-65 anni) afferenti all'“**Ambulatorio di Celiachia e disturbi funzionali**” che soddisfino i criteri di Roma III-IV per IBS-D.

I criteri di esclusione saranno: la presenza di gravi patologie cardiache, epatiche, neurologiche o psichiatriche o di malattie GI diverse da IBS (ad esempio, malattia infiammatoria intestinale, malattia celiaca) che potrebbero spiegare i sintomi attuali. Inoltre, saranno esclusi quei pazienti che hanno precedentemente seguito una dieta a basso contenuto di particolari sostanze (ad esempio, basso contenuto di FODMAPs, dieta vegana, dieta priva di glutine). Questa ultima categoria di soggetti potrà rientrare nello studio a patto di sospendere la dieta priva di glutine fino alla ricomparsa dei sintomi.

La dieta a ridotto contenuto di lattosio è consentita, purché i pazienti accettino di mantenere costante questa assunzione durante il periodo di studio. I pazienti devono anche essere disposti a modificare la loro dieta attuale

per partecipare alla ricerca. L'uso di prodotti probiotici è consentito, e i pazienti che consumano prodotti probiotici devono essere istruiti a continuare ad assumere per tutto il periodo di studio la stessa quantità precedentemente assunta.

I farmaci utilizzati per il trattamento dell'IBS, compresi gli antidepressivi, NON saranno ammessi; nel caso, vanno sospesi 15 giorni prima di entrare nello studio. Tutti i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte specifiche per lo studio prima di dare il loro consenso scritto. Il reclutamento dei pazienti sarà articolato nelle seguenti fasi:



V1. (Screening). Durante la visita, i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte sullo studio e sottoscriveranno il loro consenso informato. I pazienti saranno inoltre informati sull'obiettivo dello studio che è quello di confrontare diversi approcci terapeutici con potenziali benefici per la loro condizione. Tali benefici saranno valutati sulla scorta di un miglioramento dei sintomi dell'IBS. Inoltre, i pazienti saranno informati sul fatto che sinora nessun specifico trattamento si è dimostrato in grado di curare definitivamente l'IBS o di controllare completamente tutti i sintomi. Durante i successivi 7 giorni, i partecipanti completeranno un diario quotidiano sulle caratteristiche delle feci basato sulla scala di Bristol e sulla valutazione delle abitudini intestinali, nonché un diario alimentare.

V2. (Giorno 0). Randomizzazione. Sette giorni dopo la visita di screening, i pazienti torneranno per la visita ambulatoriale. In tale occasione i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS Symptom Severity Scale - IBS-SSS e Gastrointestinal Symptom Rating Scale – GSRS) (vedi allegati).

Per entrare nella fase di randomizzazione sarà necessario che lo score IBS-SSS sia maggiore o uguale a 175 (ovverosia, i sintomi IBS dovranno risultare da moderati a gravi). I criteri di inclusione e di esclusione saranno nuovamente esaminati, incluse le abitudini alimentari. Se i pazienti saranno ritenuti idonei alla randomizzazione, uno specifico programma provvederà all'assegnazione a uno dei bracci dello studio. Nel corso della visita, i pazienti completeranno anche i questionari relativi alla qualità della vita (Quality of Life - QoL) (IBS QoL e i questionari SCL-90 e SF-36) (vedi paragrafo) e riceveranno 4 dispense, una per ogni settimana d'intervento, contenenti i questionari e i diari che i pazienti dovranno completare durante lo studio (Diario sintomatologico, diario alimentare e Bristol Stool Form da compilare ogni giorno - vedi allegato, nonché l'IBS-SSS da compilare ogni 15 giorni).

In occasione di tale visita, sarà eseguito un prelievo ematico e prelievo dei campioni biologici (urine, feci) necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio.

I differenti approcci Dieta/Attività fisica saranno somministrati random e avranno lo scopo di alleviare i sintomi relativi all'IBS.

I pazienti saranno istruiti, con il supporto di personale specializzato in nutrizione ed attività motoria, ad assumere una dieta a base di TRITORDEUM (**approccio A**), oppure una specifica dieta per IBS (consigli dietetici) (**approccio B**) o a partecipare ad uno specifico schema di attività fisica (**approccio C**) nonché a seguire tali regimi durante le successive 12 settimane (controlli nutrizionali intermedi ogni 4 settimane per le diete; controllo dopo 12 settimane per il braccio con attività fisica) prima di tornare alla visita finale prevista dallo studio.

Il paziente sarà sottoposto a un colloquio atto a valutare lo stile di vita, le abitudini alimentari, le condizioni fisiologiche e, eventualmente, quelle patologiche. Sarà, inoltre, effettuata una valutazione antropometrica (peso, altezza, circonferenze) nonché un'analisi bio-impedenziometrica con successiva consegna del diario alimentare, da compilare e consegnare ad ogni visita di controllo, insieme a tutto il materiale informativo necessario alla corretta adesione allo studio.

V3. (giorno 30): Visita intermedia (per pazienti approccio A e B). Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IBS diet adherence Report Scale – IDARS) (vedi allegato). L'adesione alla dieta sarà, inoltre, oggetto dell'incontro con il nutrizionista che effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento.

V4. (giorno 60): Come V3.

V5 (giorno 90): Visita di fine trattamento. Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IDARS). Inoltre, saranno somministrati i questionari relativi alla qualità della vita (QoL) (IBSQoL, SCL-90 e SF-36 – vedi paragrafo). Si effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e un'analisi bioimpedenziometrica, e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento. Saranno, infine, eseguiti prelievi ematici e dei campioni biologici necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio.

Approccio A. La dieta TRITORDEUM è una dieta in cui i prodotti a base di grano sono sostituiti da prodotti a base di Tritordeum. I pazienti che saranno randomizzati in questo braccio di intervento avranno una fornitura di prodotti a base di TRITORDEUM tale da garantire la dieta per 90 gg. Nello specifico, i pazienti saranno istruiti ad evitare altri cereali come il frumento, la segale, l'orzo, ecc. Sono consentite le fibre, ma distribuite uniformemente durante il giorno.

Approccio B. La dieta specifica per IBS implica una maggiore attenzione su come e quando mangiare, piuttosto che su quali alimenti assumere. La dieta è basata sulle raccomandazioni alimentari dell'AIGO. In particolare, i partecipanti saranno istruiti a: mangiare regolarmente 3 pasti e 3 spuntini al giorno, mai troppo o troppo poco ogni volta, non avere mai fame o sentirsi troppo pieni; mangiare con calma e in silenzio e masticare accuratamente; ridurre l'assunzione di alimenti grassi o piccanti, caffè, alcool, cipolle, cavoli e fagioli. Evitare bevande analcoliche e bevande gassate, gomme da masticare e dolcificanti. Sono consentite le fibre, ma distribuite uniformemente durante il giorno.

Approccio C. L'attività fisica sarà organizzata in "Gruppi di Cammino" e utilizzerà il Fitwalking come strumento di intervento relativo all'attività fisica [6]. Il Fitwalking è una modalità di cammino con determinati accorgimenti tecnici che permettono di camminare correttamente, per poi procedere più efficacemente, anche più velocemente, in modo tale da poter produrre effetti metabolici e di miglioramento dell'efficienza fisica. Il Fitwalking è un'attività aerobica di intensità moderata in cui il carico di lavoro produce adattamenti progressivi e permette nel tempo un miglioramento del recupero e l'incremento del carico stesso. L'intensità del lavoro, attraverso la metodologia di allenamento, assume molta importanza perché solo attraverso un graduale adattamento agli stimoli allenanti, i miglioramenti saranno duraturi. Anche il Fitwalking, come tutti i gesti motorio-sportivi, ha bisogno di allenare, seppur con intensità e tempi diversi: la resistenza, la forza, la velocità, la flessibilità e la coordinazione. I carichi di lavoro e l'intensità devono essere equilibrati e inseriti in progressione in modo da permettere l'adattamento fisico. Il Fitwalking, offre una vasta gamma di benefici fisici e mentali, come dimostrato da numerosi studi scientifici [7]:

- Riduce lo stress, migliora l'umore, migliora l'autostima, migliora la qualità del sonno;
- Ottimizza la funzionalità cardio-vascolare, polmonare e la pressione sanguigna;
- Mantiene efficienti ossa e muscoli;
- Riduce i fattori di rischio per infarto, ictus e osteoporosi e alcuni tipi di displasie;
- Previene e cura il diabete di tipo II;
- Aiuta a controllare il peso e ridurre il sovrappeso;
- Aumenta l'aspettativa di vita.

Protocollo Intervento approccio C

Frequenza. L'attività fisica (camminata) sarà effettuata all'aperto, con un percorso urbano per 3 volte a settimana, in giorni non consecutivi, per 12 settimane.

Intensità. L'intensità dell'attività fisica (50/75% della Fc max) sarà monitorata attraverso l'uso del cardiofrequenzimetro e sarà personalizzata attraverso la formula di Tanaka [8]. Inoltre, per misurare il ritmo useremo il TALK TEST [9] e per misurare la percezione della fatica useremo la scala di BORG [10].

Tipo. Il tipo di attività fisica è aerobico moderato con una velocità che varia dai 5 ai 10 km/h. La singola uscita della durata di 60' sarà così strutturata:

- Riscaldamento: 5'
- Camminata normale: 10'
- Camminata sostenuta: 30'
- Camminata veloce: 10'
- Defaticamento: 5'

Tempo. Ogni Camminata avrà la durata di 60' per un totale di 180' settimanali, così come consigliato dall'ACSM (The American College of Sports Medicine) in materia di prevenzione sanitaria [11].

Tutta l'attività sarà supervisionata da personale con Laurea Magistrale in Scienze Motorie.

Prima di iniziare il protocollo d'intervento, saranno effettuati dei test da campo per valutare lo stato di forma fisico dei soggetti:

- Walking test: per valutare la capacità cardio-respiratoria [12];
- Hand Gripp Test: per valutare la forza isometrica massima dei muscoli dell'avambraccio [13];
- Sit and Reach Test: per valutare la flessibilità [14].

I Test da campo verranno ripetuti al termine delle 12 settimane.

Valutazione dei sintomi: Per valutare l'effetto degli interventi dietetici, tutti i pazienti compileranno gli stessi questionari durante il periodo di intervento. IBS-SSS è specifico per valutare la gravità dei sintomi dell'IBS. Il questionario deve essere completato nei giorni 0, 30, 60 e 90 per le diete e 0 e 90 per il gruppo attività fisica [15]. I pazienti devono registrare l'alvo in un diario utilizzando la scala di Bristol durante il periodo di intervento, nonché durante il periodo di screening di 7 giorni [16].

Valutazione antropometrica: utile per misurare le caratteristiche fisiche del soggetto (peso corporeo, altezza, circonferenze) [17].

Valutazione bioimpedenziometrica: è un esame di facile esecuzione, rapido, non invasivo, che trova indicazione elettiva per la misurazione dello stato nutrizionale (massa magra, grassa, massa cellulare e muscolare), dello stato di idratazione (ritenzione idrica, gonfiore, iper-idratazione, infiammazione), del metabolismo basale e del "peso ideale" [18].

Valutazione psicologica: Il profilo psicologico viene valutato attraverso una serie di questionari validati [19]. Innanzitutto, viene somministrata una scheda anamnestica volta ad individuare la presenza di disturbi psicopatologici pregressi o familiarità degli stessi. Inoltre, vengono individuati i fattori di stress di 1° e 2° livello, strettamente connessi alla sintomatologia GI. Nelle stesse visite (tempo 0 e 90), i soggetti compilano una serie di questionari psicologici somministrati ex ante ed ex post che valutano diversi aspetti. Nello specifico vengono utilizzati:

- Eating Attitude Test (EAT)- 26 (somministrato una sola volta), volto a valutare la presenza di rischio di contrarre disturbi dell'alimentazione;
- Scheda 6 del Cognitive Behavioural Assessment (CBA), volta a valutare i livelli di stress e la presenza di disturbi psico-fisiologici;
- Scala di autovalutazione dell'ansia (Zung);
- Scala di autovalutazione della depressione (Zung);
- QoL Short Form (36) Health Survey SF-36, volto a valutare la qualità della vita correlata alla salute;
- Symptom Checklist (SCL)-90, per valutare presenza e gravità dei sintomi di disagio psichico;
- IBS-QoL, volto a valutare l'impatto dell'IBS sulla qualità della vita.

Valutazione della permeabilità gastrointestinale: La permeabilità GI sarà valutata al tempo 0 e 90, somministrando una miscela di saccarosio-lattulosio-mannitolo-sucralosio e misurando il loro assorbimento GI per mezzo dell'escrezione urinaria di tali zuccheri. Dopo il digiuno notturno e la raccolta di un campione di urina basale,

i soggetti berranno 100 ml di una soluzione contenente 40 gr di saccarosio, 10 g di lattulosio, 5 g di mannitolo, 1g di sucralosio. Le urine saranno raccolte nel corso delle successive 5 ore, in contenitori in cui è aggiunto clorexidina (500 µL) come conservante. Il volume totale delle urine sarà misurato, e campioni da 10 ml saranno conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei diversi zuccheri nelle urine sarà effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri saranno separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati saranno espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata [20].

Dosaggio peptidi di barriera: I dosaggi di Zonulina, I-FABP, DAO e D-lattato saranno effettuati al tempo 0 e 90 utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio [20].

Dosaggio della Claudina-3: La valutazione dei livelli urinari della proteina Claudina-3 sarà effettuata mediante Western Blotting al tempo 0 e 90. Ciascun campione di urine verrà opportunamente diluito sulla base dei livelli di creatinina, considerata un indice specifico del grado di diluizione urinaria. Le urine così diluite verranno sottoposte a SDS-PAGE gel elettroforesi e successivo trasferimento su un filtro di polyvinylidifluoride (PVDF). La membrana sarà poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario specifico (Rabbit policlonal anti-Claudina-3). Il dosaggio dell'espressione proteica sarà effettuato con l'utilizzo di anticorpi secondari e lettura in chemiluminescenza [21].

Analisi del Microbiota Intestinale: La valutazione di eventuali differenze nella popolazione microbica intestinale nei diversi quadri patologici considerati, sarà effettuata su campioni di feci prelevati al tempo 0 e 90, mediante appropriate indagini genetiche e molecolari (Illumina/Solexa Genetic Analyzer HiSeq) [22].

Dosaggio Indolo e Scatolo: L'indolo è dosato con una metodica analitica colorimetrica, mentre lo scatolo è determinato con una raffinata metodica cromatografica con rivelazione fluorimetrica. Valori urinari di indolo e scatolo normali sono inferiori a 20mg/l e 20 µg/l, rispettivamente. Quando superano questa soglia esprimono un'anomala attività intestinale di tipo fermentativo o putrefattivo [23]. Tale indagine sarà effettuata al tempo 0 e 90.

Valutazione ormonale: I peptidi (somatostatina, motilina, serotonina, BDNF,) saranno dosati su campioni ematici prelevati al tempo 0 e 90, mediante metodiche Elisa/Eia utilizzando Kit commerciali [24].

Determinazione del profilo lipidico di membrana: L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane dei globuli rossi che, avendo una emivita di 4 mesi, sono lo specchio dello stile di vita alimentare di un soggetto. Tutti i pazienti arruolati nello studio saranno sottoposti a prelievo ematico al tempo 0 e dopo 3 mesi di trattamento. Il campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA sarà sottoposto ad un estrattore automatizzato di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi-metil esteri, usati come standards [2].

End-point primario: Variazione dello score del questionario IBS-SSS alla fine del periodo di trattamento rispetto allo score basale, ovvero la proporzione di pazienti che otterranno un miglioramento dello score sintomatologico dopo dieta relativo a IBS-SSS ≥ 50 , valore che è considerato come miglioramento clinicamente significativo.

End point secondario: Effetti degli interventi sui singoli elementi di IBS-SSS e di GSRS, così come sulle caratteristiche dell'alvo valutate attraverso la somministrazione dei diari. L'adesione alla dieta sarà valutata tramite apposito questionario. Potenziali predittori di efficacia (riduzione IBS-SSS alla fine del periodo di intervento) saranno valutati confrontando le variabili di base tra i pazienti che hanno risposto con una riduzione dei sintomi e i non-responders.

Analisi statistica. I dati saranno presentati come media (SD), salvo diversa indicazione. Le variabili categoriche saranno confrontate con il test di X^2 . I valori di $P < 0.05$ a due code saranno considerati statisticamente significativi. Tutti i pazienti che saranno randomizzati e che riceveranno istruzioni dietetiche, saranno inclusi nell'analisi statistica di confronto dei dati alla fine del periodo di trattamento e i drop-out catalogati come non-responders (*analisi Intention To Treat*).

Il confronto tra i dati alla fine del periodo di intervento rispetto al basale sarà effettuato considerando solo coloro che hanno completato l'intervento (*analisi per-protocol*). Tutte le analisi statistiche saranno eseguite utilizzando il pacchetto statistico SPSS, versione 19.0 (2010, IBM Corp, Armonk, NY). I dati dei questionari e quelli relativi ai diari degli alimenti, saranno inseriti in un database da una persona non coinvolta nello studio.

Calcolo della potenza dello studio: Per pianificare la dimensione del campione, il calcolo di potenza si basa sulla capacità di rilevare una riduzione di IBS-SSS di almeno 50 punti score tra le due diete. Prevedendo l'80% di potenza e un $\alpha = 0.05$, e assumendo una SD di 70, si calcola che dovranno essere reclutati almeno 31 pazienti per ciascun gruppo che abbiano completato lo studio.

Risultati attesi:

- Informazioni circa i meccanismi di regolazione della barriera intestinale.
- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari alla base di una patologia funzionale GI quale l'IBS e utili per elaborare un possibile intervento non farmacologico mirato.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

Innovazioni:

- Formulazione di protocolli dietetici personalizzabili per pazienti con disturbi funzionali GI.

Progetto 17/2020: "Valutazione dell'indice glicemico ed insulinemico di varie tipologie di pasta con diversi formati e con diverse tipologie di farina, utili nella prevenzione e nella terapia della sindrome metabolica."

Responsabile: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: Cisternino Anna Maria, Reddavid Rosa, Mastrosimini Anna Margherita, Lanzilotta Elsa, Mancini Francesco Saverio, Donghia Rossella, Vito Guerra, Angelo Campanella

Introduzione

L'indice glicemico è un indice della risposta glicemica indotta, nello stesso soggetto, da una quantità specifica di carboidrati in rapporto ad un'equivalente quantità di carboidrati proveniente da un alimento standard (in questo caso glucosio). Formalmente, l'IG misura l'area sotto la curva della risposta glicemica conseguente al consumo di una quantità di carboidrati provenienti dall'alimento in esame, in rapporto all'area sotto la curva della risposta glicemica conseguente al consumo della stessa quantità di carboidrati contenuti nell'alimento standard. La determinazione dell'indice glicemico permette una classificazione dei carboidrati alimentari più accurata perché basata sull'effetto fisiologico degli stessi e non semplicemente sulla loro struttura chimica. Numerosi studi dimostrano come il consumo regolare di pasti a basso indice glicemico riduca il rischio di sviluppare diabete, insulino-resistenza, malattie cardiovascolari e neoplastiche. Il concetto di indice glicemico è stato originariamente sviluppato per rispondere all'esigenze di soggetti con insulino-resistenza. Una maggiore stabilità dei livelli di zucchero nel sangue è fondamentale per le persone con diabete e pre-diabete, ma la ricerca ha ripetutamente dimostrato che mantenere i livelli di zucchero stabili nel sangue è utile anche per la popolazione generale. Diete basate su alimenti a basso IG hanno dimostrato di:

- stabilizzare i livelli di zucchero nel sangue;

- migliorare il peso corporeo;
- controllare meglio l'appetito;
- migliorare la memoria;
- ridurre il rischio di malattie cardiovascolari;
- ridurre il rischio di alcune forme di tumore.

Secondo Walter Willet, nutrizionista e ricercatore dell'Università di Harvard "Un eccesso di zuccheri e amidi raffinati, ad alta densità calorica, stimola l'ipersecrezione dell'insulina, gli attacchi di fame e il bisogno continuo di piluccare, e ciò contribuisce a rallentare il metabolismo lipidico e glucidico e a rendere l'individuo fisicamente meno attivo".

Obiettivi specifici dello studio:

Tale progetto si propone di valutare l'indice glicemico di diversi tipi di pasta con diversi formati e con diverse tipologie di farina. In particolare, si vuole conoscere l'effetto del formato e della diversa tipologia di farina sulla risposta glicemica ed insulinemica.

Obiettivo specifico 1: determinazione dell'indice glicemico del prodotto in esame.

Obiettivo specifico 2: determinazione dell'indice insulinemico del prodotto in esame.

Obiettivo specifico 3: determinazione del formato di pasta e della tipologia di farina con minore indice glicemico e insulinemico.

Obiettivo 1:

I soggetti reclutati (20) verranno sottoposti alla somministrazione dell'alimento standard (una soluzione di glucosio) e dell'alimento test (le diverse tipologie di pasta). Ciascuna somministrazione, sia dell'alimento test che dello standard, avrà luogo in una giornata diversa. L'alimento standard consiste in 50 g di glucosio sciolto in acqua oligominerale, l'alimento test consiste in una porzione di pasta contenente 50 g di carboidrati disponibili. Campioni ematici per la determinazione della glicemia saranno prelevati al tempo 0, e poi a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti dall'inizio dell'assunzione di alimento test o standard. Su ogni soggetto verranno eseguite tre curve di risposta al glucosio (ciò consente di avere un valore medio della risposta del soggetto al glucosio nel tempo), ed un'unica prova con l'alimento da testare. I valori risultanti di glucosio verranno utilizzati per calcolare l'indice glicemico di ciascun prodotto.

Obiettivo 2:

I soggetti reclutati (20) verranno sottoposti alla somministrazione dell'alimento standard (una soluzione di glucosio) e dell'alimento test (le diverse tipologie di pasta).

Ciascuna somministrazione, sia dell'alimento test che dello standard, avrà luogo in una giornata diversa. L'alimento standard consiste in 50 g di glucosio sciolto in acqua oligominerale, l'alimento test consiste in una porzione di pasta contenente 50 g di carboidrati disponibili. Campioni ematici per la determinazione dell'insulinemia saranno prelevati al tempo 0, e poi a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti dall'inizio dell'assunzione di alimento test o standard. Su ogni soggetto verranno eseguite tre curve di risposta al glucosio (ciò consente di avere un valore medio della risposta del soggetto al glucosio nel tempo), ed un'unica prova con l'alimento da testare. I valori risultanti di insulina verranno utilizzati per calcolare l'indice insulinemico di ciascun prodotto.

Obiettivo 3:

Per ogni tipologia di pasta testata verrà redatta una relazione dettagliata, completa di grafici relativi alla risposta glicemica per ciascun soggetto. Ogni relazione includerà i valori di indice glicemico ed insulinemico del prodotto in esame.

Ciò permetterà di determinare quale formato di pasta e quale tipologia di farina possiede il minor indice glicemico ed insulinemico.

Dati preliminari:

Diete basate su alimenti a basso IG hanno dimostrato di:

- stabilizzare i livelli di zucchero nel sangue;
- migliorare il peso corporeo;
- controllare meglio l'appetito;
- migliorare la memoria;
- ridurre il rischio di malattie cardiovascolari;
- ridurre il rischio di alcune forme di tumore.

Metodologie e analisi statistiche:

Ogni fase esecutiva del progetto avverrà in modo conforme al protocollo di Jenkins e Wolever (WHO-FAO 1998). Verranno reclutati 12 soggetti sani, di età compresa tra i 18 ed i 65 anni. I soggetti, organizzati in gruppi di due o tre persone, dopo digiuno notturno di 10-12 ore, si recheranno presso gli ambienti dedicati all'analisi per sottoporsi alla somministrazione dell'alimento standard (una soluzione di glucosio) e dell'alimento test (le diverse tipologie di pasta).

Saranno prelevati campioni ematici per la determinazione della glicemia e dell'insulinemia al tempo 0, e poi a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti dall'inizio dell'assunzione di alimento test o standard.

Risultati attesi:

Realizzare sinergie con le industrie agroalimentari del territorio, offrendo una tecnologia avanzata per la caratterizzazione e valutazione dell'IG di prodotti a base cerealicola.

Creare prodotti innovativi a basso indice glicemico.

Innovazioni:

Creare un'unità operativa in Puglia dedicata alla valutazione dell'IG di prodotti a base cerealicola che si affiancherebbe all'altra già esistente ad Avellino (CNR) e quindi competitiva sul mercato.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il gruppo di ricerca ha già sperimentato sinergie nell'attività di ricerca, stante le pubblicazioni scientifiche prodotte. Lavorare in gruppo in questo specifico progetto ha lo scopo di valutare l'IG di prodotti di largo consumo nella nostra popolazione, come la pasta, al fine di raggiungere risultati che siano in linea nell'ambito della prevenzione delle comuni malattie cronico-degenerative nonché del benessere generale dei consumatori.

Bibliografia:

- Kusnadi DTL, Barclay AW, Brand-Miller JC, Louie JCY. [Changes in dietary glyceic index and glyceic load in Australian adults from 1995 to 2012](#). Am J Clin Nutr. 2017 May 31.
- Wolever TM, Augustin LS, Brand-Miller JC, Delpont E, Livesey G, Ludwig DS, Sievenpiper JL. [Glyceic index is as reliable as macronutrients on food labels](#). Am J Clin Nutr. 2017 Mar;105(3):768-769.
- Kizirian NV, Markovic TP, Muirhead R, Brodie S, Garnett SP, Louie JC, Petocz P, Ross GP, Brand-Miller JC. [Macronutrient Balance and Dietary Glyceic Index in Pregnancy Predict Neonatal Body Composition](#). Nutrients. 2016 May 6;8(5).
- Sieri S, Brighenti F, Agnoli C, Grioni S, Masala G, Bendinelli B, Sacerdote C, Ricceri F, Tumino R, Giuridanella MC, Pala V, Berrino F, Mattiello A, Chiodini P, Panico S, Krogh V. [Dietary glyceic load and glyceic index and risk of cerebrovascular disease in the EPICOR cohort](#). PLoS One. 2013 May 23;8(5):e62625.
- Sieri S, Pala V, Brighenti F, Pellegrini N, Muti P, Micheli A, Evangelista A, Grioni S, Contiero P, Berrino F, Krogh V. [Dietary glyceic index, glyceic load, and the risk of breast cancer in an Italian prospective cohort study](#). Am J Clin Nutr. 2007 Oct;86(4):1160-6.
- Brand-Miller J, McMillan-Price J, Steinbeck K, Caterson I. Dietary glyceic index: health implications. J Am Coll Nutr. 2009;28 Suppl:446S-449S
- Liu S, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB, Franz M, Sampson L, Hennekens CH, Manson JE. A prospective study of dietary glyceic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women. Am J Clin Nutr. 2000; 71:1455-61.

Timeline (Gantt chart)

Fasi del progetto	Attività	Anno	G e n	Fe b	Ma r	Apr	Ma g	Gi u	Lu g	A go	Sett	Ot t	Nov	Di c
Fase 1	Contatto con Industrie agroalimentari interessate alla valutazione dell'IG su loro prodotti tipo pasta	Primo												
	Reclutamento soggetti	Primo												
	Prelievi con determinazione curve glicemiche ed insulinemiche	Primo												
	Valutazione Indice Glicemico													
Fase 2	Integrazione dei risultati ed analisi dei dati e pubblicazioni scientifiche	Secondo												

Progetto 18/2020: "Trattamenti dietetici personalizzati ed attività fisica adattata per giovani adulti in sovrappeso: effetti sul profilo lipidomico, stato infiammatorio, sistema immunitario e permeabilità intestinale"

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Maria Notarnicola, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Francesco Russo, Giuseppe Riezzo, Michele Linsalata, Caterina Clemente, Antonella Orlando, Laura Prospero, Benedetta D'Attoma, Manuela Martulli, Maria Gabriella Caruso, Anna Maria Cisternino, Maria Principia Scavo, Mirizzi Antonella, Procino Filippo, Campanella Angelo, Bonfiglio Caterina, Franco Isabella, Bianco Antonella, Sorino Paolo, Cavalcanti Elisabetta, Palmitessa Valeria

Introduzione

L'infiammazione è una componente centrale dell'immunità innata (aspecifica) e quindi un meccanismo essenziale nella preservazione dello stato di salute. Al contrario, uno stato di infiammazione cronica di basso grado è una caratteristica patologica comune a molte condizioni croniche come sindrome metabolica, epatosteatosi non alcolica (NAFLD), diabete tipo 2 e patologie cardiovascolari.

Numerosi studi hanno osservato un'associazione tra stato di infiammazione cronica di basso grado, obesità e sovrappeso, disbiosi intestinale ed alterata permeabilità intestinale.

Il sovrappeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 30 \text{ Kg/m}^2$) è una condizione di eccesso ponderale molto comune e preoccupante in quanto rappresenta un fattore di rischio rilevante per diverse malattie croniche e risulta correlato ad una riduzione dell'aspettativa di vita e ad un sostanziale peggioramento della sua qualità. I dati del Sistema di Sorveglianza PASSI hanno rilevato che il 31.6% della popolazione italiana risulta essere in sovrappeso. La Puglia risulta tra le regioni a più alto tasso di sovrappeso (33.3%) superata solamente dalla Calabria (34%) dalla Campania (36.7% e dalla Basilicata (36.9%). La condizione di eccesso ponderale è una caratteristica maggiormente presente negli uomini rispetto alle donne e più frequente al crescere dell'età. Ciononostante, anche nella popolazione di giovani adulti (18-35 anni) si registra un'alta percentuale di soggetti in sovrappeso (19.5% Italia e 21.6% Puglia) Per quanto riguarda la popolazione di Castellana Grotte la prevalenza del sovrappeso è 55% mentre quella dell'obesità è del 16%.

Alle condizioni di eccesso ponderale spesso è associato uno stato infiammatorio cronico di basso grado, un'alterata permeabilità intestinale, disequilibri a carico del microbiota intestinale ed alterazione dell'equilibrio Th1/Th2/Th17

Lo stile di vita e l'alimentazione in particolare sono in grado di esercitare un ruolo importante nella modulazione di questi squilibri. L'influenza di alcuni modelli dietetici sullo stato di infiammazione cronica è stata oggetto di numerosi lavori scientifici che hanno illustrato il ruolo che alcuni nutrienti, come gli acidi grassi, hanno nel sostenere o modulare l'infiammazione cronica di basso grado. È noto che una dieta ricca in grassi saturi (SFA) e acidi grassi trans (TRANS) risulta essere pro-infiammatoria, così come una dieta ricca in alcuni acidi grassi polinsaturi della serie omega 6, come l'acido Linoleico (LA, C18:2n6) e l'acido Arachidonico (ARA, C20:4n6). Al contrario, una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA), come l'acido Palmitoleico (C16:1n7), l'acido Vaccenico (C18:1n7) e l'acido Oleico (C18:1n9), e una dieta ricca in acidi grassi della serie omega 3, come l'acido α -linolenico (ALA, C18:3n3), l'acido Eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C20:6n3), risulterebbe avere un ruolo anti-infiammatorio. Tra le varie indagini biochimiche disponibili, l'analisi lipidomica effettuata sulle membrane dei globuli rossi, si è rivelata utile nell'individuare il legame tra squilibri nutrizionali e stato infiammatorio. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico.

Tra le varie indagini biochimiche disponibili, le analisi di lipidomica (sangue o membrana dei globuli rossi) si sono rivelate utili nell'individuare il legame tra squilibri nutrizionali e l'infiammazione di basso grado. Studi di lipidomica hanno dimostrato che i soggetti con stato di infiammazione di basso grado possono presentare alterazioni del profilo lipidomico. In questi ultimi anni, sono stati effettuati studi mediante l'utilizzo di vescicole extracellulari che trasportando DNA, RNA, proteine e lipidi, sembrano essere coinvolte nell'infiammazione piuttosto che nella carcinogenesi dei tessuti del tratto gastroenterico. Alla famiglia delle vescicole extracellulari appartengono anche gli esosomi, vescicole di grandezza variabile dai 50 ai 150 nm; mediante indagini preliminari effettuate proprio sugli esosomi, è stato evidenziato come anche per le membrane di queste vescicole extracellulari possa variare la composizione in termini di acidi grassi, in base alla gravità della patologia epatica, con un incremento degli acidi grassi pro-infiammatori in presenza di steatosi moderata o grave rispetto ai soggetti controllo. Inoltre, sempre mediante indagini biochimiche preliminari di comparazione fra esosomi estratti da plasma di pazienti affetti da NAFLD con steatosi moderata o grave ed esosomi estratti da soggetti controllo, si è potuto osservare una diversa espressione delle proteine coinvolte nel WNT pathway, in particolare i recettori di membrana Frizzled-7 e Frizzled-9 (rispettivamente FZD-7 e FZD-9), non che la loro presenza che in condizioni normali è quasi trascurabile a livello

esosomiale. Le proteine FZD, infatti, sono coinvolte nell'infiammazione e nella carcinogenesi di diversi organi in condizioni patologiche, mentre in condizioni normali sono coinvolte nell'embriogenesi e nella regolazione della cascata apoptotica.

Le proteine FZD, infatti, sono coinvolte nell'infiammazione e nella carcinogenesi di diversi organi in condizioni patologiche, mentre in condizioni normali sono coinvolte nell'embriogenesi e nella regolazione della cascata apoptotica. E' stato ampiamente dimostrato che nell'ambito della carcinogenesi coloretale e gastrica ad esempio, la FZD-10 ha un ruolo preponderante nel differenziamento cellulare in senso neoplastico e nella proliferazione incontrollata, con conseguente incremento della carcinogenesi

Un aspetto non ancora ben chiaro è se la somministrazione di una dieta specifica sia in grado di migliorare, in maniera selettiva, un profilo lipidomico inizialmente alterato o una condizione di alterata permeabilità pregressa e quindi per questa via uno stato di infiammazione cronica di basso grado.

Un altro aspetto da valutare è la stretta connessione tra l'alimentazione ed il sistema immunitario: da un lato la fame e la malnutrizione proteica sopprimono le funzioni immunitarie e aumentano la suscettibilità alle infezioni, dall'altro l'ipernutrizione e l'obesità determinano un'attività immunitaria aberrante che favorisce la comparsa di malattie infiammatorie croniche come il diabete, l'aterosclerosi, le broncopneumopatie croniche, la steatosi epatica non alcolica, e vari tumori. La differenziazione dei linfociti T helper in Th1 o Th2 è fortemente influenzata da fattori genetici, tra cui la differenza di sesso, ma anche fattori ambientali, terapeutici e nutrizionali è stato visto infatti uno stretto legame tra variazioni dello stato Th1/Th2, dieta o stato ormonale. In ogni individuo può verificarsi pertanto, un'eccessiva polarizzazione su un tipo di risposta piuttosto che sull'altra, sebbene ciò sembri, in determinate circostanze modificabile. Ulteriore diretta conseguenza di questo disequilibrio della sorveglianza immunitaria è sempre l'instaurarsi di uno stato infiammatorio. Lo sbilanciamento Th1/Th2 pone infatti il sistema immunitario in una situazione di allerta continua e innesca una risposta infiammatoria cronica, costante e silente, conseguente all'allerta immunitaria. Le cellule immunitarie dipendono dai nutrienti assunti, e possono venire danneggiate dall'esposizione ai radicali liberi. Un apporto adeguato di alimenti antiossidanti può aiutare a prevenire questi danni e regolare la funzione delle cellule immunitarie. Pertanto, lo studio dello stato immunitario cellulare mediante analisi delle sottopopolazioni linfocitarie dei pazienti con infiammazione cronica di basso grado può essere di aiuto nel follow-up dei trattamenti dietetici personalizzati a cui questi pazienti sono sottoposti.

Altro aspetto importante da considerare è rappresentato dalla permeabilità intestinale (PI) e dai parametri biochimici e molecolari preposti al suo funzionamento in risposta ai nutrienti. L'integrità dell'epitelio GI è essenziale per il mantenimento dello stato di salute e la prevenzione di numerose patologie e, recentemente, una particolare attenzione è stata proprio rivolta alle alterazioni della PI in relazione anche alla flogosi cronica. La PI si riferisce alla proprietà dell'epitelio di lasciare passare molecole di diversa grandezza, forma e carica mediante diffusione non mediata attraverso lo spazio transcellulare (endocitosi) e paracellulare (tight junctions, TJs). Una PI più pronunciata e associata ad una ipermotilità ed ipersensibilità viscerale, lascia ipotizzare che alterazioni della barriera epiteliale possano rappresentare un evento precoce nella promozione di infiammazioni mucosali di basso grado. Sicuramente un qualsiasi approccio dietetico, seppur su una base di suscettibilità genetica dell'ospite, può condizionare la funzione di barriera intestinale attraverso diversi meccanismi (ad es. modulazione del microbiota, rilascio di peptidi GI, attivazione dei mediatori di flogosi, alterazione del "brain-gut axis"). In tale ottica, un aspetto non completamente chiarito è se la somministrazione di una dieta specifica sia in grado di migliorare non solo un profilo lipidomico inizialmente alterato, ma anche eventuali alterazioni pregresse della PI, entrambe condizioni legate ad uno stato di flogosi di basso grado.

Obiettivi specifici dello studio:

Lo studio prevede l'arruolamento di una popolazione di giovani adulti (18-35 anni) sani, in sovrappeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ Kg/m}^2$), caratterizzati da squilibrio nel profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi.

Verranno create diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 1: Creare diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 2: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sul profilo lipidomico di soggetti con squilibrio della composizione lipidica della membrana dei globuli

rossi, rispetto ad una dieta di controllo. Stimare gli stessi effetti sul profilo lipidomico e proteico degli esosomi estratti dal plasma dei soggetti inclusi nello studio rispetto ai controlli, sottoposti o meno a dieta di controllo.

Obiettivo specifico 3: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla permeabilità intestinale e microbiota intestinale, rispetto alla dieta di controllo.

Obiettivo specifico 4: Stimare gli effetti dell'intervento dietetico sulla differenziazione dei linfociti T helper in Th1, Th2 o TH17 mediante caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie secondo analisi dei "cluster of differentiation" (CD).

Obiettivo specifico 5: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, sul Dispendio Energetico a Riposo (REE) sul metabolismo basale e sul Dietary Inflammatory Index (DII) prima e dopo l'intervento dietetico in tutti i soggetti arruolati

Obiettivo 1:

Stimare l'effetto di diete a composizione adattata sugli squilibri del profilo lipidomico. Creare diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Caratteristiche nutrizionali delle diete-intervento:

- a. **basso tenore di**
 - i. ac. grassi saturi (**SFA**)
 - ii. ac. grassi trans (**TRANS**)
 - iii. ac. Linoleico (LA, C18:2n6) e acido Arachidonico (ARA, C20:4n6) (**PUFA Ω6 pro-infiammatori**).

- b. **alto tenore di:**
 - i. ac. Palmitoleico (C16:1n7), ac. Vaccenico (C18:1n7) e ac. Oleico (C18:1n9) (**MUFA anti-infiammatori**)
 - ii. ac. α-linolenico (ALA, C18:3n3), ac. Eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) e ac. docosaesaenoico (DHA, C20:6n3) (**PUFA Ω3 anti-infiammatori**)
 - iii. nutrienti capaci di incrementare i livelli circolanti/di membrana di questi ac. grassi

Obiettivo 2:

Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sul profilo lipidomico di soggetti con squilibrio della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi, rispetto ad una dieta di controllo.

- 1) Analisi del profilo lipidomico (delle membrane eritrocitarie e degli esosomi) e proteico (degli esosomi rispetto alle proteine FZD) di giovani adulti (18-35anni) in sovrappeso.
- 2) Valutazione degli effetti dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete adattate, a contenuto lipidico modificato, sulla composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi di giovani adulti in sovrappeso e con squilibrio lipidomico, rispetto ad una dieta di controllo, a parità di apporto calorico e livello di attività fisica (fitwalking).
 - a. Allo scopo di annullare tutte le eventuali differenze legate ai livelli di attività fisica, tutti i partecipanti al progetto (gruppo di intervento e gruppo di controllo) verranno inseriti in percorsi di attività fisica adattata omogenei (Fitwalking).
- 3) (NB. Allo scopo di annullare tutte le eventuali differenze legate ai livelli di attività fisica, tutti i partecipanti al progetto (gruppo di intervento e gruppo di controllo) verranno inseriti in percorsi di attività fisica adattata omogenei - fitwalking).

Obiettivo 3:

Stimare l'effetto dei trattamenti dietetici personalizzate sui biomarcatori umorali di infiammazione

Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sul profilo lipidomico di soggetti con squilibrio della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi, rispetto ad una dieta di controllo.

- 1) Analisi del profilo lipidomico (delle membrane eritrocitarie e degli esosomi) e proteico (degli esosomi rispetto alle proteine FZD) di giovani adulti (18-35anni) in sovrappeso.
- 2) Valutazione degli effetti dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete adattate, a contenuto lipidico modificato, sulla composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi di giovani adulti in sovrappeso e con squilibrio lipidomico, rispetto ad una dieta di controllo, a parità di apporto calorico e livello di attività fisica (fitwalking).
 - a. Allo scopo di annullare tutte le eventuali differenze legate ai livelli di attività fisica, tutti i partecipanti al progetto (gruppo di intervento e gruppo di controllo) verranno inseriti in percorsi di attività fisica adattata omogenei (Fitwalking).
- 3) (NB. Allo scopo di annullare tutte le eventuali differenze legate ai livelli di attività fisica, tutti i partecipanti al progetto (gruppo di intervento e gruppo di controllo) verranno inseriti in percorsi di attività fisica adattata omogenei - fitwalking).

Obiettivo 4:

Stimare gli effetti del trattamento dietetico antiossidante personalizzato sulla differenziazione dei linfociti T helper in Th1, Th2 o TH17.

- 1) Analisi dello stato immunitario di base di giovani adulti in sovrappeso
- 2) Valutazione degli effetti sullo stato immunitario dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete antinfiammatorie

Obiettivo 5:

Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla permeabilità intestinale e microbiota intestinale, rispetto alla dieta di controllo.

- 1) Analisi della permeabilità intestinale di giovani adulti (18-35anni) in sovrappeso.
- 2) Valutazione degli effetti dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete adattate, a contenuto lipidico modificato, sulla permeabilità intestinale di giovani adulti in sovrappeso e con squilibrio lipidomico, rispetto ad una dieta di controllo, a parità di apporto calorico e livello di attività fisica (fitwalking).
- 3) Analisi della disbiosi intestinale di giovani adulti (18-35anni) in sovrappeso.
- 4) Valutazione degli effetti dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete adattate, a contenuto lipidico modificato, sul microbiota intestinale di giovani adulti in sovrappeso e con squilibrio lipidomico, rispetto ad una dieta di controllo, a parità di apporto calorico e livello di attività fisica (fitwalking).

Obiettivo 6:

Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, rispetto alla dieta di controllo.

- 1) Analisi della composizione corporea mediante Bioimpedenziometria e del metabolismo basale mediante Calorimetria indiretta di giovani adulti (18-35 anni) in sovrappeso.
 - 2) Analisi del Dispendio Energetico a Riposo (REE) mediante Calorimetria Indiretta di giovani adulti (18-35 anni) in sovrappeso.
- 2) Valutazione degli effetti dopo 4 mesi di trattamento personalizzato con diete adattate, a contenuto lipidico modificato, sulla variazione del Dietary Inflammatory Index (DII) in tutti i soggetti arruolati

Metodologie e analisi statistiche:

1 – popolazione di studio

La popolazione di studio sarà composta da soggetti in sovrappeso con squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi, selezionata per i seguenti criteri di inclusione ed esclusione, randomizzata e distribuita in un gruppo di intervento ed un gruppo di controllo.

Criteri di inclusione:

- Età: 18-35 anni
- BMI compreso tra 25 e 29.9 Kg/m²
- Apparente stato di buona salute
- Squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi

Criteri di esclusione:

- Patologie infiammatorie croniche e/o autoimmuni
- Patologie acute
- Diabete in trattamento farmacologico
- Dislipidemia in trattamento farmacologico (compresi nutraceutici a base di Monacolina K)
- Patologie cardiovascolari in atto
- Terapie interferenti con lo stato infiammatorio (cortisonici, FANS ecc.)

Tutti i soggetti arruolati al baseline saranno sottoposti ad anamnesi medica, nutrizionale e di attività fisica. Sarà effettuata la valutazione antropometrica e bioimpedenziometrica mediante analisi BIA (AKERN) al baseline e a 30, 60, 90 e 120 giorni dall'inizio del trattamento dietetico. La Calorimetria indiretta sarà effettuata al baseline e al 120° giorno. Sarà anche raccolto un campione d'urine al momento dell'effettuazione della Calorimetria al baseline per la determinazione dell'azoto urinario.

•

2 - Valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi plasmatici

La valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi verrà effettuata con le seguenti metodiche e tempistica:

Composizione Lipidica della Membrana dei Globuli Rossi:

- preliminarmente, prima del reclutamento, al fine di individuare i soggetti da includere nella popolazione di studio;
- dopo 120gg di intervento, nei soggetti reclutati.

Valutazione semi-quantitativa delle proteine FZD-7 e FZD-9 degli esosomi plasmatici

- La quantificazione delle proteine presenti negli esosomi plasmatici verrà effettuata dopo isolamento degli esosomi mediante ultracentrifugazione ed estrazione delle proteine totali con RIPA buffer. Le proteine di interesse verranno individuate e valutate mediante western-blotting.
- preliminarmente, prima del reclutamento, al fine di individuare i soggetti da includere nella popolazione di studio;
- dopo 120gg di intervento, nei soggetti reclutati.

3 – Analisi della permeabilità intestinale

La valutazione della permeabilità intestinale verrà effettuata con test allo xilitolo-mannitolo in tutti i soggetti reclutati, al reclutamento e dopo 120gg dall'inizio dell'intervento.

4 – Analisi della condizione di eubiosi/disbiosi intestinale

La valutazione della condizione di eubiosi/disbiosi intestinale verrà effettuata con dosaggio di indolo e scatolo urinari in tutti i soggetti reclutati, al reclutamento e dopo 120gg dall'inizio dell'intervento.

5 – attività fisica

I soggetti assegnati ad entrambi i gruppi, intervento e controllo, verranno avviati ad un'attività fisica adattata (Fitwalking), omogenea per entrambi i gruppi istruita e sorvegliata da laureati esperti in chinesiologia e scienze motorie, per l'intero periodo dello studio (4 mesi).

6 – intervento dietetico

L'intervento dietetico sarà caratterizzato dalla durata di 120gg con una o più diete indirizzate al dimagrimento dei soggetti in studio.

L'apporto calorico in entrambi i gruppi sarà omogeneo, determinato sulla base delle caratteristiche antropometriche dei soggetti in studio, dei risultati della Calorimetria indiretta, ed adattato alle esigenze energetiche derivanti dall'attività fisica programmata.

Tutti i pazienti verranno monitorati da un dietista o altro operatore sanitario, esperto nella gestione di protocolli dimagranti:

- ogni 15gg (solo valutazioni antropometriche, valutazione dell'aderenza alla dieta mediante diario alimentare)
- ogni 30gg (valutazioni antropometriche, valutazione dell'aderenza alla dieta mediante diario alimentare, indagini biochimiche anche per le proteine esosomiali e lo stato immunitario).

6.1 – dieta intervento

Si provvederà alla creazione di una o più diete (basate su evidenze scientifiche) ricche o povere in nutrienti capaci di modulare selettivamente lo stato di infiammazione cronica di basso grado.

Caratteristiche nutrizionali delle diete-intervento:

- a. **basso tenore di**
 - iv. ac. grassi saturi (**SFA**)
 - v. ac. grassi trans (**TRANS**)
 - vi. ac. Linoleico (LA, C18:2n6) e acido Arachidonico (ARA, C20:4n6) (**PUFA Ω6 pro-infiammatori**).
- b. **alto tenore di:**
 - vii. ac. Palmitoleico (C16:1n7), ac. Vaccenico (C18:1n7) e ac. Oleico (C18:1n9) (**MUFA anti-infiammatori**)
 - viii. ac. α-linolenico (ALA, C18:3n3), ac. Eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) e ac. docosaesaenoico (DHA, C20:6n3) (**PUFA Ω3 anti-infiammatori**)
 - ix. nutrienti capaci di incrementare i livelli circolanti/di membrana di questi ac. grassi

Integreremo queste diete con alimenti ricchi o poveri di nutrienti capaci potenzialmente di migliorare lo stato disbiosi e di permeabilità intestinale.

6.2 – dieta di controllo

La dieta di controllo sarà una dieta "prudente" standard (INRAN).

Analisi lipidomica

L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane dei globuli rossi che, avendo una emivita di 4 mesi, sono lo specchio dello stile di vita alimentare di un soggetto. Tutti i soggetti arruolati nello studio saranno sottoposti a prelievo ematico al baseline (tempo 0) e dopo 4 settimane di trattamento. Il campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA sarà sottoposto ad un estrattore automatizzato di acidi grassi. Gli acidi grassi così

ottenuti saranno derivatizzati e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

L'analisi lipidomica sugli esosomi plasmatici verrà effettuata in concomitanza dell'analisi lipidomica delle membrane eritrocitarie, con la stessa tempistica. Da un campione di sangue periferico, si isolerà prima il plasma e dal plasma per ultracentrifugazione gli esosomi che verranno in parte immediatamente trattati per l'estrazione automatizzata degli di acidi grassi. Gli acidi grassi così ottenuti saranno analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti saranno analizzati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.

Analisi delle proteine esosomiali

Da un campione di sangue periferico, procederemo all'estrazione del plasma e successivamente per ultracentrifugazione all'isolamento degli esosomi. Gli esosomi estratti verranno risospesi in acqua ultrapura e sottoposti ad estrazione delle proteine totali. Le proteine verranno quantificate e valutate mediante analisi di Western Blotting, per la presenza delle proteine FZD-7 e FZD-9 oltre che per le proteine Housekeeping tipiche degli esosomi, HSP-70, ALIX e CD-63, ed i profili proteici dei singoli soggetti verranno comparati ai soggetti sani controllo.

Valutazione dello stato immunitario

Lo stato immunitario di base sarà valutato mediante analisi citofluorimetrica. su sangue intero con EDTA di pazienti al baseline (tempo 0) ed ogni 4 settimane di trattamento fino alla fine dello stesso. I risultati ottenuti in ciascun timing saranno comparati con gruppi controllo. Nello specifico si procederà all'analisi dei profili indicati in tabella:

Stato immunitario di base	Cellule T CD3, CD4 e CD8, quoziente CD4/CD8, cellule B CD19, NK CD56/16, cellule T attivate da HLA-DR.
Equilibrio TH1-TH2- TH17	Sottopopolazioni CD4: TH1 (CD183/CXCR3+; CD196/CCR6-) TH2 (CD183/CXCR3-; CD194/CCR4+; CD196/CCR6-) Quoziente TH1/TH2 TH17(CD183/CXCR3-; CD194/CCR4+; CD196/CCR6+) TH17-1 (CD183/CXCR3+; CD196/CCR6+)
Immunocompetenza infiammazione cellule T naive/memory	Cellule T memory/naive CD45RA+/-, cellule T CD38 CD8

Valutazione della permeabilità intestinale.

L'integrità dell'epitelio GI è essenziale per il mantenimento dello stato di salute e la prevenzione di numerose patologie^{Errore. Il segnalibro non è definito.} e, recentemente, una particolare attenzione è stata proprio rivolta alle alterazioni della permeabilità intestinale (PI). La PI si riferisce alla proprietà dell'epitelio di lasciare passare molecole di diversa grandezza, forma e carica mediante diffusione non mediata attraverso lo spazio transcellulare (endocitosi) e paracellulare (tight junctions, TJs). Una permeabilità intestinale più pronunciata e associata ad una ipermotilità ed ipersensibilità viscerale, lascia ipotizzare che alterazioni della barriera epiteliale possano rappresentare un evento precoce nella sua patogenesi, promuovendo lo sviluppo di infiammazioni mucosali di basso grado. La PI può essere valutata "in vivo", con metodi non invasivi, attraverso la misura dell'escrezione urinaria di "sostanze-test" incapaci, in condizioni d'integrità, di superare la barriera intestinale, e somministrate al paziente per via orale. Gli zuccheri saccarosio, mannitolo, lattulosio e sucralosio sono le molecole più utilizzate per tali test.

La barriera intestinale può essere considerata un sistema dinamico che risponde anche a segnali umorali e una pletora di differenti molecole è stata, a vario titolo, chiamata in causa. La zonulina è un peptide GI in grado di modulare la funzionalità delle TJs. E' stato dimostrato che i livelli di zonulina sierica correlano con l'entità della compromissione della barriera mucosale. Il danno cellulare e/o delle TJs può avere un notevole impatto sulla corretta funzione della PI. Le I-FABP (intestinal-fatty acid binding proteins) sono proteine citosoliche presenti nelle

cellule epiteliali deputate al trasporto degli acidi grassi. Possono essere rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana e sono rapidamente eliminate con le urine; pertanto, rappresentano markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell'epitelio intestinaleⁱ Allo stesso modo, la 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 intestinaleⁱⁱ Le claudine sono una famiglia di proteine che costituiscono le TJs e pertanto possono essere impiegate come markers non invasivi di danno a carico delle TJsⁱⁱⁱ. Insieme a tali biomarkers che valutano la funzione e l'integrità della barriera intestinale, è anche possibile una valutazione indiretta attraverso il dosaggio di composti intraluminali che giungono nel circolo ematico in situazioni di alterata PI. Tra tali sostanze si annovera il D-lattato, un prodotto di fermentazione di diversi batteri, compresi quelli presenti nel tratto GI, che negli ultimi anni ha assunto un ruolo come marcatore indiretto di alterazione della barriera intestinale.

Test di permeabilità intestinale a tre zuccheri: La permeabilità GI sarà valutata, somministrando una miscela di saccarosio-lattulosio-mannitolo e misurando il loro assorbimento gastrointestinale per mezzo dell'escrezione urinaria di tali zuccheri. Dopo il digiuno notturno e la raccolta di un campione di urina basale, i soggetti berranno 100 ml di una soluzione contenente 40 gr di saccarosio, 10 g di lattulosio, 5 g di mannitolo, 1g di sucralosio. Le urine saranno raccolte nel corso delle successive 5 ore, in contenitori in cui è aggiunto clorexidina (500 microlitri) come conservante. Il volume totale delle urine sarà misurato, e campioni da 10 ml saranno conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. La determinazione dei diversi zuccheri nelle urine sarà effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri saranno separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati saranno espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata

Dosaggio peptidi di barriera: I dosaggi della Zonulina, delle I-FABP, della DAO e del D-lattato saranno effettuati utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio.

Dosaggio della Claudina-3: La valutazione dei livelli urinari della proteina Claudina-3 sarà effettuata mediante Western Blotting. Ciascun campione di urine verrà opportunamente diluito sulla base dei livelli di creatinina, considerata un indice specifico del grado di diluizione urinaria. Le urine così diluite verranno sottoposte a SDS-PAGE gel elettroforesi e successivo trasferimento su un filtro di polyvinildifluoride (PVDF). La membrana sarà poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario specifico (Rabbit policlonal anti-Claudina-3). Il dosaggio dell'espressione proteica sarà effettuato con l'utilizzo di anticorpi secondari e lettura in chemiluminescenza.

Dosaggio Indolo e Scatolo: L'indolo è dosato con una metodica analitica colorimetrica, mentre lo scatolo è determinato con una più elaborata metodica cromatografica con rivelazione fluorimetrica. Valori urinari normali sono inferiori a 20mg/dl, quando superano questa soglia esprimono un'anomala putrefazione intestinale. Valori elevati di indolo sono indicativi di una disbiosi fermentativa del piccolo intestino. Alti livelli di scatolo suggeriscono una disbiosi putrefattiva del grosso intestino.

Valutazione Composizione Corporea e DII

La composizione corporea sarà valutata mediante Analisi Bioimpedenziometrica utilizzando il software Body Gram dell'Akern, mentre la valutazione del Dispendio Energetico a Riposo (REE) sarà valutata mediante Calorimetria Indiretta utilizzando Vmax Encore. L'assunzione dietetica sarà valutata utilizzando il questionario di frequenza alimentare (FFQ) al baseline, adattato per l'uso nella popolazione italiana. FFQ include settanta, tra cibi e bevande, assunti dall'individuo nell'ultimo anno. La frequenza di consumo sarà distribuita su nove livelli di assunzione da "mai" a "ogni giorno". Questo questionario è stato già stato validato nella popolazione italiana e i dati per il calcolo Dietary Inflammatory Index (DII) sono stati estratti utilizzando il database di composizione alimentare per gli studi epidemiologici in Italia. I dettagli dello sviluppo del DII sono descritti.

Quarantacinque parametri alimentari, compresi alimenti, nutrienti e altri composti bioattivi, sono stati identificati in base al loro effetto infiammatorio su sei marcatori infiammatori specifici, tra cui hs-CRP, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, fibrinogeno, omocisteina, TNF α , etc etc.

Risultati attesi:

- 1) Miglioramento della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi nel gruppo di intervento maggiormente apprezzabile rispetto al gruppo di controllo.
- 2) Miglioramento della composizione lipidica degli esosomi plasmatici nel gruppo di intervento maggiormente apprezzabile rispetto al gruppo di controllo.
- 3) Variazione significativa della concentrazione delle proteine FZD-7 e FZD-9 nei gruppi trattati con dieta rispetto al controllo non trattato e sano.
- 4) Riduzione dei livelli di infiammazione di basso livello, valutati sia alla luce dei parametri biochimici infiammatori che sul DII, maggiormente apprezzabile nel gruppo di intervento rispetto al gruppo di controllo
- 5) Miglioramento della permeabilità intestinale maggiormente apprezzabile nel gruppo di intervento rispetto al gruppo di controllo.
- 6) Riequilibrio dello stato immunitario nel gruppo trattato con dieta rispetto al gruppo controllo.

Innovazioni:

- Creazione di un nuovo modello terapeutico-nutrizionale, personalizzato, capace di modulare favorevolmente e selettivamente la composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e di ridurre lo stato di infiammazione di basso livello.
- Introduzione dell'utilizzo di nuovi markers proteici (FZD-7 e FZD-9), nel follow-up della patologia, da associare ad indagini di imaging.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il progetto tende alla creazione di un gruppo multidisciplinare che possa condurre in contemporanea un trial clinico con impiego di diverse metodiche laboratoristiche in un approccio integrato al problema sovrappeso nella popolazione adulto e con il coinvolgimento di diversi medici specialisti, nutrizionisti, dietisti, biologi ed operatori del benessere.

Dimensione del Campione e Analisi Statistica

La stima della dimensione del campione è stata effettuata prendendo in considerazione la varianza tra soggetti in funzione della variazione che si otterrebbe con la applicazione della terapia dietetica. Sono stati considerati diversi valori degli errori probabilistici tipo I (0.01 e 0.001) e II (0.10 e 0.05) per una potenza dello studio pari a 0.90 e 0.95; inoltre si è considerato che la correlazione delle misurazioni tra soggetti ripetute per tre volte sia pari a 0.30 per misure. E' stato stimato un campione $n_1=n_2=28$ per un effetto pari al 40% della varianza.

Figura 1. Stima della dimensione del campione

Progetto 19/2019: “Confronto di una dieta Mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) con una dieta mediterranea a basso indice glicemico e a km0 con basso indice infiammatorio(LGIMD2.0). Valutazione dell’aderenza e valutazione degli effetti sull’infiammazione di basso grado e sul profilo biochimico- metabolico.”

Responsabile: dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Antonio Lippolis, Marilena Notarnicola, Catia Bonfiglio

Background:

Dai dati Istat emerge che i pazienti cronici in Puglia hanno un impatto sul Sistema Sanitario Regionale pari a circa 3,1 miliardi di euro all'anno. La Puglia risulta così essere terza in Italia (dopo Sardegna e Calabria) per numero di abitanti con tre o più cronicità gravi e seconda (dopo la Sardegna) per numero di abitanti con una cronicità grave. Tra i fattori di rischio delle patologie croniche c'è l'infiammazione di basso grado, caratterizzata da un'augmentata concentrazione di marcatori infiammatori in assenza di sintomi evidenti. Recenti studi associano questa condizione allo sviluppo del cancro, delle malattie cardiovascolari e del diabete di tipo 2 e gli stessi suggeriscono che l'infiammazione di basso grado è mitigata da comportamenti di promozione della salute come abitudini alimentari sane, attività fisica, mantenimento del peso corporeo. (1) (2) (3)

Da sempre la dieta mediterranea viene studiata per la prevenzione e il trattamento delle malattie croniche. In questo senso l'esperienza maturata nel Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica tramite la progettazione e conduzione di più trial clinici con diversi tipi di diete che includevano la Dieta Mediterranea a basso Indice Glicemico (LGIMD) senza restrizione calorica costituisce un importante punto di partenza per la ricerca dell'effetto globale della dieta sulle malattie croniche. La LGIMD confezionata dal laboratorio ha un Indice Glicemico minore di 50. Inoltre, non più del 10% delle calorie giornaliere totali provengono da grassi saturi. Le caratteristiche della dieta soddisfano i criteri accettati dalla letteratura come ottimali sia per la struttura della Dieta Mediterranea sia come supporto terapeutico nutrizionale. Tuttavia, i dati sulla bassa aderenza della popolazione allo schema dietetico portano a riflettere: i soggetti sanno di dover cambiare abitudini alimentari ma non agiscono con scelte e comportamenti coerenti.

La LGIMD, spesso risulta troppo restrittiva, poco aperta alle innovazioni in campo alimentare e poco legata ai nuovi modelli di produzione e di consumo. Inoltre, alcuni dei prodotti accostati a questo modello alimentare negli ultimi anni sono oggetto di grandi produzioni industriali con ingredienti di bassa qualità e provenienza non sempre specificata. Per il consumatore medio risulta difficile scindere gli alimenti virtuosi da quelli di bassa qualità, soprattutto in condizioni socio-economiche più basse.

La Dieta Mediterranea deve essere intesa come alimentazione basata su alimenti tipici del bacino Mediterraneo, ovvero prodotti naturali e non raffinati. Una dieta così concepita può contribuire a modulare l'infiammazione. La ricerca negli ultimi anni ha dimostrato che ci sono alimenti in grado di stimolare uno stato infiammatorio, e altri che possono contribuire a ridurlo. (4) In particolare, esistono numerose prove sulla relazione tra la dieta mediterranea e un'infiammazione di basso grado sia negli studi osservazionali che di intervento. Una recente review e una meta-analisi di studi randomizzati controllati hanno dimostrato che un modello alimentare mediterraneo riduce l'infiammazione e migliora la funzione endoteliale (5). Uno studio di 12 mesi su soggetti ad alto rischio di malattia cardiovascolare che hanno aderito allo studio PREDIMED ha mostrato che i biomarcatori infiammatori correlati all'instabilità della placca, come la proteina C-reattiva e l'interleuchina-6, erano ridotti nei gruppi assegnati a un MD rispetto al basso contenuto di grassi gruppo dieta (6) .

Obiettivi specifici dello studio:

Lo studio si propone di creare uno schema con indicazioni nutrizionali che siano più sostenibili e di somministrare tali indicazioni alla popolazione di riferimento per favorire l'aderenza alla dieta. Punto di partenza del lavoro è

l'esperienza maturata dal laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica sullo schema del semaforo LGIMD senza restrizione calorica, modificandolo e migliorandolo; alla luce delle ultime evidenze e innovazioni in campo alimentare verranno favoriti gli alimenti stagionali e a km0, non raffinati, con indice infiammatorio più basso e rapporto densità nutrienti/costo migliore.

Obiettivo specifico 1: quantificare l'aderenza alla dieta mediterranea attraverso una matrice per l'aderenza alla dieta mediterranea di facile lettura che tenga conto oltre che delle frequenze di assunzione degli alimenti tipici mediterranei anche della stagionalità della biodiversità e del ciclo produttivo degli alimenti.

Obiettivo specifico 2: stimare la riduzione del grado infiammatorio delle due diete LGIMD e LGIMD2.0 (il 2 indica il miglioramento della LGIMD e lo 0 la predilezione per i prodotti del territorio)

Obiettivo specifico 3: stimare le variazioni degli altri parametri biochimici, metabolici e infiammatori

Obiettivo 1:

Negli anni '90 Alberti – Fidanza A. et al. hanno messo a punto l'Indice di Adeguatezza Mediterranea (IAM), uno strumento utile per valutare il livello di aderenza di una qualsiasi dieta a quella tradizionale mediterranea.

Lo IAM si ottiene dividendo la percentuale delle calorie fornite da gruppi di cibo di tipo "mediterraneo" (pane, cereali, legumi secchi e freschi, patate, vegetali, frutta, pesce, vino, oli vegetali) per la percentuale delle calorie fornite da cibi di tipo "non mediterraneo" (latte, formaggio, carne, uova, grassi di origine animale, margarine, bevande zuccherate, biscotti, torte, zucchero). (7)

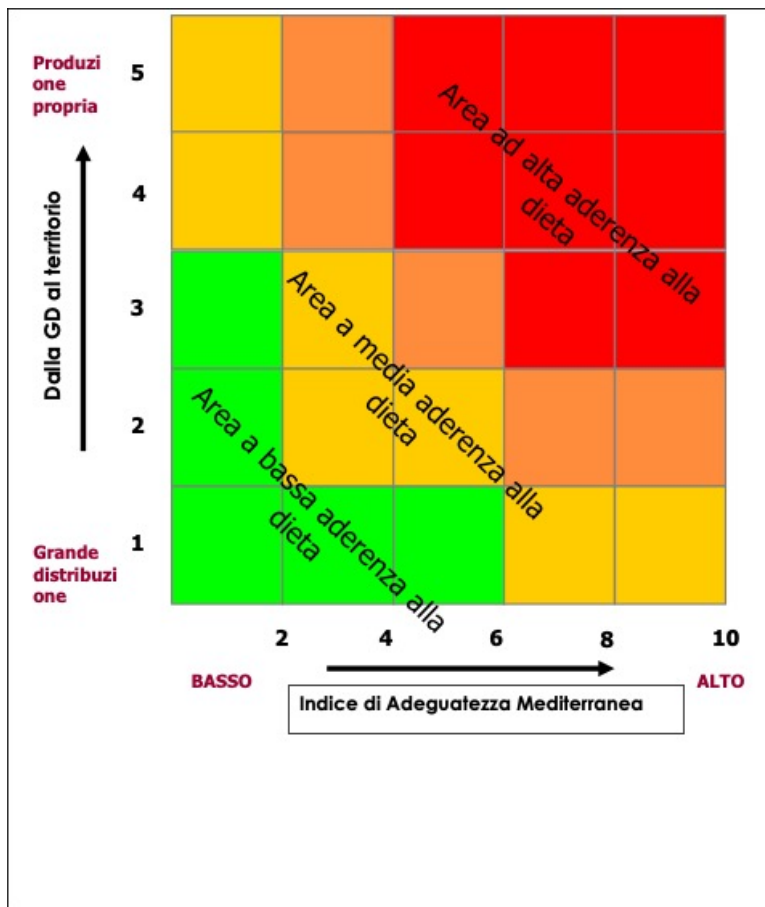
L'indice è tanto più elevato quanto più la dieta è mediterranea. Negli anni '60 lo IAM della popolazione di Nicotera, la prima corte italiana studiata Seven Countries Study, era mediamente di 7,2 (8) ; il valore accettabile è pari a 5. Uno studio presentato nel luglio del 2009 dall'Associazione Italiana Dietetica e Nutrizione Clinica e dall'Osservatorio Nutrizionale Grana Padano, conferma la tendenza all'allontanamento dalla Dieta Mediterranea. In Italia, infatti, l'Indice di Adeguatezza Mediterranea si attesta all'1,44. (9) In uno studio più recente su studenti siciliani i risultati hanno evidenziato un valore medio di 2,67 IAM per gli studenti con peso normale, mentre 1,27 IAM negli studenti in sovrappeso. (10)

L'indice di score Mediterraneo elaborato da Tricopoulou per la popolazione greca, individua dei gruppi di alimenti con nutrienti benefici e dei gruppi di alimenti caratterizzati da nutrienti che sarebbero dannosi per la salute . Quando il consumo dei cibi "buoni" non supera la mediana viene assegnato il valore di 0 altrimenti il valore di 1. Al contrario quando il consumo dei cibi cattivi non supera la mediana un valore di 1 altrimenti 0. Il range dello score va da 0 per una bassa aderenza a 9 per una elevata aderenza. (11)

Il nostro obiettivo è proporre una matrice mediterranea del grado di aderenza alla dieta mediterranea che tenga conto anche della stagionalità, della biodiversità, del ridotto consumo di sostanze chimiche e del ciclo produttivo del prodotto che nasce e si conclude sul territorio, e non meno del rapporto di relazione di fiducia con chi produce gli alimenti di cui ci nutriamo.

La nostra matrice sarà il risultato dell'incontro tra il valore dell'indice MAI e il valore 1 se gli alimenti provengono dal supermercato o mercato o generico, e il valore 2 se dal negozietto 3 dal negozio biologico legato alla grande distribuzione, 4 vendita diretta dei produttori, 5 produzione propria.

MATRICE MEDITERRANEA



Obiettivo 2:

I componenti dietetici sono importanti determinanti dell'infiammazione sistemica, un fattore di rischio per la maggior parte delle malattie croniche. Per stimare il potenziale infiammatorio delle diete LGIMD e LGIMD 2.0 verrà utilizzato l'indice dietetico infiammatorio (DII). (12) Inoltre, grazie alla stretta collaborazione con il gruppo della prof.ssa Aballay LR di Córdoba-Argentina, lo studio propone un confronto sul lavoro svolto per contribuire alla validazione di un nuovo score infiammatorio della dieta messo a punto dallo stesso gruppo di ricerca argentino. Dopo aver stimato il potenziale infiammatorio delle diete LGIMD e LGIMD 2.0 si procederà con il confronto della condizione di infiammazione sistemica dei soggetti partecipanti allo studio.

Ad oggi, ci sono molti studi che dimostrano che i modelli di consumo salutare sono inversamente correlati all'infiammazione di basso grado, una condizione in stretta connessione con una serie di malattie croniche e condizioni di salute.

Lo studio MOLI-SANI ha proposto e convalidato un punteggio sull'infiammazione di basso grado basato sull'uso di biomarcatori plasmatici (proteina C-reattiva) e cellulari (conta leucocitaria, conta piastrinica e granulociti: rapporto linfocitario).(13)

Conta piastrinica (PLT) e globuli bianchi (WBC) sono stati collegati al rischio di malattia cerebrovascolare e coronarica. Una dieta mediterranea (MD) è stata associata ad una riduzione dell'infiammazione e della mortalità per le principali malattie croniche. (14)

Obiettivo 3:

Con la dieta LGIMD2.0 si vuole comprendere come variano i parametri biochimici, metabolici e infiammatori nei soggetti presi in esame rispetto alla dieta abituale. Si auspica che i parametri, nel corso del progetto, risultino migliori rispetto ai parametri riscontrati al tempo 0.

In base al parametro da analizzare saranno attuati analisi di laboratorio specifiche.

Per stimare il metabolismo glico-lipidico verranno esaminate:

1. Il glucosio per misurare la concentrazione di glucosio nel sangue.
2. L'emoglobina glicata, indicatore del compenso glico-metabolico e parametro più attendibile nelle diagnosi del diabete, poiché rappresenta il valore della glicemia su un periodo di 3-4 mesi.
3. L'insulina, l'ormone proteico ad azione ipoglicemizzante anabolico che stimola il trasporto del glucosio, attiva la sintesi del glicogeno, diminuisce la formazione di glucosio intracellulare, riduce la degradazione dei trigliceridi, azione lipogenetica, stimola la sintesi proteica, inibisce il catabolismo proteico e la gluconeogenesi.
4. I trigliceridi, un importante fattore di rischio per le malattie cardiache e il diabete e l'adiponectina, che promuove l'ossidazione degli acidi grassi nei muscoli e diminuisce la produzione di glucosio a livello epatico.
5. Il colesterolo (totale, HDL e LDL), un fattore di rischio per l'aterosclerosi e quindi per l'insorgenza di infarto cardiaco e malattie a carico dei vasi sanguigni.

Per stimare la funzionalità epatica saranno esaminate:

6. Le transaminasi (GOT, GPT), indicatori di danno epatocellulare.
7. La fosfatasi alcalina e la gammaGT, parametri di stasi biliare.
8. La bilirubina totale e frazionata, indicatori della funzione escrettrice e di detossificazione epatica.
9. L'albumina, uno dei principali controllori della pressione oncotica del plasma e parametro di capacità di sintesi epatica.
10. La ceruloplasmina, indicatore del processo di sintesi epatica.
11. L'alfa-1-antitripsina, indice di flogosi, è una proteina prodotta a livello epatico.
12. La ferritina, indice di epatopatia cronica.

Per stimare l'assetto marziale saranno esaminate:

13. Il ferro e la ferritina, per fornire informazioni sul metabolismo e sull'omeostasi del ferro nell'organismo.

Per stimare la funzionalità renale verranno esaminate:

14. La creatinina e l'urea, indicatori della funzione renale.

Per stimare la funzionalità tiroidea saranno esaminate:

15. Il TSH, l'FT3 e l'FT4, indici della funzionalità tiroidea.

Per stimare i parametri biochimici saranno esaminate:

16. L'emocromo, primo step per effettuare uno screening preliminare dello stato di salute di un individuo.
17. Il C – Peptide, indice della funzionalità delle beta cellule del pancreas.
18. Il cortisolo, ormone dello stress metabolico e psichico.
19. I folati e la vitamina B12, indispensabili per l'equilibrio di diversi processi metabolici.

Per stimare, infine, i parametri infiammatori saranno esaminate:

20. La velocità di sedimentazione degli eritrociti (VES), indice del processo infiammatorio.
21. La proteina C Reattiva (PCR), indicatore della presenza e dell'entità della risposta flogistica.
22. Il Fibrinogeno, proteina rilasciata durante la fase acuta del processo infiammatorio.

Dati preliminari:

Il primo trial condotto a Castellana Grotte (MediDiet) fu mirato a valutare l'effetto di quattro diete (controllo, Mediterranea, basso IG e Mediterranea a basso IG) sui parametri della SindMet. E' stato riscontrato un miglioramento di tutte le componenti della SindMet nelle diete Mediterranea e a basso IG, mentre l'effetto della dieta Mediterranea a basso IG era pari alla somma dell'effetto delle due diete. I dati di questo trial sono stati poi utilizzati sia per la costruzione dell'intervento, sia per il calcolo della dimensione del campione per il trial successivo (NutriEpa) sui soggetti NAFLD appartenenti alla coorte NutriEp. I soggetti in questo trial furono randomizzati a due interventi (controllo e dieta Mediterranea a basso IG) e seguiti per sei mesi. E' stato riscontrato una riduzione significativa dello score della NAFLD nel gruppo dieta Mediterranea a basso IG nel confronto della dieta controllo dopo 6 mesi così come su tutti i parametri metabolici. In seguito fu condotto un secondo trial sui soggetti

appartenenti alla coorte NutriEp che prevedeva due diversi programmi di attività fisica (aerobica e aerobica più resistenza muscolare). Il trial fu condotto con la collaborazione di quattro palestre di Putignano (Nadir, New Sporting House, IndaClub e Gym-Enjoy). Dopo sei mesi ci fu una significativa riduzione dello score della NAFLD in entrambi i gruppi di intervento con un effetto più intenso per il gruppo aerobico nei primi tre mesi e per il gruppo misto nella seconda parte del trial.

Nell'ultimo trial condotto dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS de Bellis di Castellana Grotte: lo studio Nutriatt ci siamo posti l'obiettivo di stimare l'effetto di due programmi di attività fisica di diversa intensità, della dieta mediterranea a basso indice glicemico e della loro interazione sullo score della NAFLD e sulla composizione quali-quantitativa della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi.

DISEGNO DELLO STUDIO

Setting:

Ospedaliero/ Ambulatori dei Medici di Medicina Generale

Criteri di Inclusione:

- IMC \geq 25.0
- NAFLD
- Età >30 e <60 anni
- Sindrome metabolica

Criteri di Esclusione:

- Malattia cardiovascolare conclamata (angor pectoris, infarto di miocardio, chirurgie rivascularizzanti)
- Ictus (ischemico o emorragico)
- Arteriopatia periferica clinicamente evidente
- Ogni condizione medica che possa diminuire l'abilità della persona a seguire una dieta
- Impossibilità di seguire la Dieta Mediterranea per motivi religiosi o altro.
- Terapia Insulinica

I soggetti che soddisferanno i criteri di ammissione verranno invitati a partecipare allo studio e firmeranno il consenso informato (in seguito alla lettura della lettera informativa) secondo la Dichiarazione di Helsinki e la legislazione vigente in Italia e dopo un'intervista con gli operatori sanitari dove verranno dettagliatamente spiegate le caratteristiche dell'intervento.

Dimensione del Campione

I trial MEDIDIET (Effetto della Dieta Mediterranea a Basso Indice Glicemico sulla Sindrome Metabolica condotto a Castellana Grotte) e NutriEpa (Effetto della Dieta Mediterranea a Basso Indice Glicemico sulla NAFLD condotto a Putignano) nonché risultati precedentemente pubblicati dal Dr. Misciagna (studio ideati e condotti dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS Saverio de Bellis) avevano messo in evidenza che lo score medio (SD) per la NAFLD Moderata e/o Severa era di 4.0(0.5) e 4.5 (1) nelle due categoria. L'errore probabilistico di tipo I è stato fissato a 0.05 (una coda) e la potenza statistica allo 0.9. E' stato considerato inoltre che la correlazione tra le misure fosse dello 0.4 e per ottenere una riduzione di un punto nello score della NAFLD in seguito alle 24 settimane di intervento la dimensione del campione per ognuno dei bracci paralleli è pari a 40 soggetti.

Misurazioni

Antropometriche

L' altezza verrà misurata usando uno stadiometro fisso con i soggetti in piedi sul pavimento. Per quanto riguarda il peso, il soggetto verrà posizionato al centro di una piattaforma meccanica indossando solo biancheria intima. Tutti i soggetti effettueranno bioimpedenziometria

Biochimiche

Un campione di sangue verrà prelevato a digiuno.

Sul campione biologico verranno effettuate le seguenti misurazioni:

Emocromo, Colesterolo totale, SGPT, SGOT, Bilirubina Totale e Diretta, Gamma-GT, Ferro, Ferritina, alfa-1 antitripsina, Ceruloplasmina, C-peptide, Cortisolo, Colesterolo HDL, Trigliceridi, Glicemia, Insulinemia, Azotemia, Creatinina, Vitamina B12, Folati, Funzionalità Tiroidea, Human High Molecular Weight (HMW) adiponectina, Lipidomica sulla membrana dei globuli rossi.

Emocromo, Colesterolo totale, SGPT, SGOT, Colesterolo-HDL, Trigliceridi, Glicemia, Emoglobina Glicata, Apo-B, Azotemia, Creatinina, Vitamina B12, Folati, Funzionalità Tiroidea, Bilirubina Totale e Diretta, Ferro, Ferritina, alfa-1 antitripsina, Ceruloplasmina, C-peptide, Cortisolo, HDL-Colesterolo e trigliceridi verranno determinati con le tecniche standard di laboratorio. L'insulina verrà misurata con il metodo ELISA mentre la Proteina C-reattiva di alta sensibilità sarà determinata con l'utilizzo della nefelometria. Human High Molecular Weight (HMW) adiponectina verrà misurata con la tecnica ELISA.

L' HOMA verrà utilizzato per valutare la resistenza all'insulina usando la seguente formula:

- $(\text{Livello di Insulina a digiuno (Microunits per Millilitro)} \times \text{Glicemia a digiuno (Milimole per Litro)}) / 22.5$.

La lipidomica funzionale verrà effettuata secondo la tecnica descritta in letteratura .

Interventi

Bracci Paralleli

- 1) **Controllo:** Dieta LGIMD già sperimentata in questo laboratorio.
- 2) Dieta Mediterranea a Basso Indice Glicemico 2.0

Metodologie e analisi statistiche:

La metodologia di lavoro includerà le seguenti tappe: 1) Raccolta dati; 2) Input dei dati; 3) Analisi statistica e presentazione dei risultati.

1) Raccolta dati: I soggetti arruolati verranno intervistati da un medico e da un nutrizionista; verrà effettuato un prelievo venoso ed un'ecografia epatica. Verranno inoltre compilati i questionari IPAQ, EPIC, abitudini consumi

alimentari, SAT-P, SF 32, un diario alimentare e l'atlante delle porzioni. Verranno inoltre raccolti dati relativi allo stato socio-economico del soggetto all'arruolamento.

2) Un software ad-hoc verrà disegnato per l'input dei dati. Il programma sarà in grado di identificare dati in un range logico e plausibile. Il personale tecnico del laboratorio di Epidemiologia effettuerà l'input ed il controllo dei dati mancanti.

L'analisi statistica includerà le seguenti tappe: 1) pulizia dei dati, 2) analisi statistica e 3) presentazione di risultati. Tutte le tappe saranno documentate e automatizzate allo scopo di ottenere risultati rintracciabili e riproducibili.

3) Analisi Statistica

Analisi Statistica: Ai dati verranno applicati il test del Chi-quadrato e il t-test per variabili discrete e continue rispettivamente.

Il metodo Generalized Estimating Equation (GEE) particolarmente adatto all'analisi di dati misurati ripetutamente sullo stesso soggetto verrà utilizzato per valutare l'effetto degli interventi sugli outcomes.

I registri alimentari saranno analizzati utilizzando il software MètaDieta® e i risultati espressi come percentuale dell'apporto calorico totale per ogni prodotto alimentare consumato. Per calcolare l'IMA, si considereranno i quattro mesi centrali della sperimentazione; sono stati scelti rispettivamente la prima, la seconda, la terza e la quarta settimana del secondo, terzo, quarto e quinto mese.

Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software Stata 15.1 tramite comandi ufficiali e routine scritte dagli utenti.

Risultati attesi:

- Ridurre il rischio di sviluppare patologie croniche non trasmissibili, in particolare malattie cardiovascolari, dislipidemia, ipertensione, diabete, ecc. confermando le evidenze sulla dieta mediterranea;
- Ridurre il grado di infiammazione sistemica attraverso la riduzione del potenziale infiammatorio della dieta;
- diffondere sul territorio un modello alimentare sostenibile di "Dieta Mediterranea 2.0" attraverso la promozione dei prodotti locali e di filiera corta e la conoscenza dei produttori locali con i quali interagire;
- Promuovere la cultura della prevenzione ed educazione alimentare, al fine di ottenere, nel lungo termine, una considerevole riduzione della spesa pubblica sanitaria;
- Istruire i partecipanti allo studio ad effettuare una generica analisi critica della presentazione pubblicitaria dei prodotti alimentari, attraverso il confronto tra messaggio pubblicitario e contenuto dell'etichetta.
- Costruzione di una matrice di aderenza alla dieta mediterranea di facile lettura che tenga in considerazione anche della provenienza del cibo oltre che della frequenza di assunzione degli alimenti tipicamente mediterranei.

Innovazioni:

La LGIMD 2.0 è l'evoluzione della LGMID in quanto tiene conto non solo delle chilocalorie provenienti da alimenti mediterranei ma anche della provenienza del cibo stesso e delle tecniche colturali e di distribuzione, guardando la nutrizione come pure un atto agricolo.

L'aderenza alla dieta mediterranea verrà in questo studio stimata non soltanto con un valore di score ma attraverso una matrice che vuole essere un modo innovativo e al tempo stesso molto semplice ed efficace, di

rappresentare anche graficamente l'aderenza alla dieta mediterranea e ad uno stile di consumo che tenga conto anche della provenienza del cibo.

L'area geografica di svolgimento del progetto diventa il punto di forza dello stesso. Tradizionalmente la dieta mediterranea era il modo più comune di alimentarsi; nonostante ciò, le nuove generazioni stanno abbandonando lentamente questa dieta. Il coinvolgimento dei produttori del territorio attraverso le associazioni di coltivatori e allevatori locali potrà favorire la conoscenza di come il territorio possa offrire un'opportunità per nutrirsi più consapevolmente.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica ha una consolidata esperienza di collaborazione con altre unità operative dell'IRCCS. In particolare, vanta un'intensa collaborazione con il Laboratorio di Biochimica Nutrizionale, l'UOC di Gastroenterologia I e il Laboratorio di Patologia Clinica. Sono in essere alcuni progetti di ricerca con i suddetti Laboratori che includono il trial clinico "Effetto della Dieta Mediterranea a basso indice glicemico, di due programmi di attività fisica e della loro interazione sullo score di steatosi epatica e sulla composizione lipidica della membrana del globulo rosso", il follow-up della coorte NutriEp di Putignano e più di recente il follow-up della coorte Micol di Castellana Grotte. In passato molti progetti di ricerca sono stati condotti in collaborazione con questi laboratori e sono stati pubblicati articoli su riviste internazionali.

- Chiloiro M, Caruso MG, Cisternino AM, Inguaggiato R, Reddavide R, Bonfiglio C, Guerra V, Notarnicola M, De Michele G, Correale M, Noviello MR, Misciagna G. Ultrasound evaluation and correlates of fatty liver disease: a population study in a Mediterranean area. *Metab Syndr Relat Disord*. 2013 Oct;11(5):349-58.
- Caruso MG, Gazzero P, Notarnicola M, Cisternino AM, Guerra V, Misciagna G, Laezza C, Bifulco M. Cannabinoid type 1 receptor gene polymorphism and macronutrient intake. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2012;5(6):305-13.
- Notarnicola M, Misciagna G, Tutino V, Chiloiro M, Osella AR, Guerra V, Bonfiglio C, Caruso MG. Increased serum levels of lipogenic enzymes in patients with severe liver steatosis. *Lipids Health Dis*. 2012 Oct 30;11:145.
- Reddavide R, Misciagna G, Caruso MG, Notarnicola M, Armentano R, Caruso ML, Pirrelli M, Valentini AM. Tissue expression of glycated apolipoprotein B in colorectal adenoma and cancer. *Anticancer Res*. 2011 Feb;31(2):555-9.
- Osella AR, Díaz Mdel P, Cozzolongo R, Bonfiglio C, Franco I, Abrescia DI, Bianco A, Giampiero ES, Petruzzi J, Elsa L, Mario C, Mastrosimni AM, Giocchino L; NUTRIHEP Collaborating Group. Overweight and Obesity in Southern Italy: their association with social and life-style characteristics and their effect on levels of biologic markers. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2014;71(3):113-24
- Misciagna G, María del Pilar Díaz, Donatella V Caramia, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Maria R Noviello, Marisa Chiloiro, Daniela I Abbrescia, Antonella Mirizzi, Matteo Tanzi, Maria G Caruso, Mario Correale, Rosa Reddavide, Rosa Inguaggiato, Anna M Cisternino and Alberto R. Osella. Effect of a low glycemic index Mediterranean diet on non-alcoholic fatty liver disease. A randomized controlled clinical trial. *J Nutrition Health and Aging* (2016) doi:10.1007/s12603-016-0809-8

Bibliografia:

(1) Centritto F, Iacoviello L, di Giuseppe R, De Curtis A, Costanzo S, Zito F, Grioni S, Sieri S, Donati MB, de Gaetano G, Di Castelnuovo A; Moli-sani Investigators. Dietary patterns, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in a healthy Italian population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 Dec;19(10):697-706. doi: 10.1016/j.numecd.2008.11.009. Epub 2009 Mar 19. PubMed PMID: 19303267.

(2) Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)*. 2006 Sep;30(9):1347-55. Epub 2006 Mar 14. PubMed PMID: 16534530.

(3) Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:109502. doi: 10.1155/2008/109502. Epub 2009 Jan 11. Review. PubMed PMID: 19148295; PubMed Central PMCID: PMC2615833.

(4) Ahluwalia N, Andreeva VA, Kesse-Guyot E, Hercberg S. Dietary patterns, inflammation and the metabolic syndrome. *Diabetes Metab*. 2013 Apr;39(2):99-110. doi: 10.1016/j.diabet.2012.08.007. Epub 2012 Oct 11. Review. PubMed PMID: 23062863.

(5) Schwingshackl L, Hoffmann G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Sep;24(9):929-39. doi: 10.1016/j.numecd.2014.03.003. Epub 2014 Apr 2. Review. PubMed PMID: 24787907.

(6) Casas R, Sacanella E, Urpí-Sardà M, Chiva-Blanch G, Ros E, Martínez-González MA, Covas MI, Rosa Ma Lamuela-Raventos, Salas-Salvadó J, Fiol M, Arós F, Estruch R. The effects of the mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *PLoS One* 2014; 9: e100084.

(7) Alberti – Fidanza A., Fidanza F., Chiuchiù M.P., Verducci G., Fruttini D. Dietary studies on two rural Italian population groups of the Seven Countries Study. 3. Trend of food and nutrient intake from 1960 to 1991. *Eur J. Clin Nutr*. 1999; 53: 854 – 860

(8) Alberti-Fidanza A, Fidanza F. Mediterranean Adequacy Index of Italian diets. *Public Health Nutr*. 2004 Oct;7(7):937-41. PubMed PMID: 15482621.

(9) <https://www.educazionenutrizionale.granapadano.it/it/area-stampa/comunicati-stampa/s-o-s---per-la-salute-dei-lombardi-sempre-piu-diffuse-le-cattive-abitudini-alimentari/pdf/>

(10) Metro D, Tardugno R, Papa M, Bisignano C, Manasseri L, Calabrese G, Gervasi T, Dugo G, Cicero N. Adherence to the Mediterranean diet in a Sicilian student population. *Nat Prod Res*. 2018 Aug;32(15):1775-1781. doi:10.1080/14786419.2017.1402317. Epub 2017 Nov 13. PubMed PMID: 29130340.

(11) Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003 Junm 26;348(26):2599-608. PubMed PMID: 12826634.

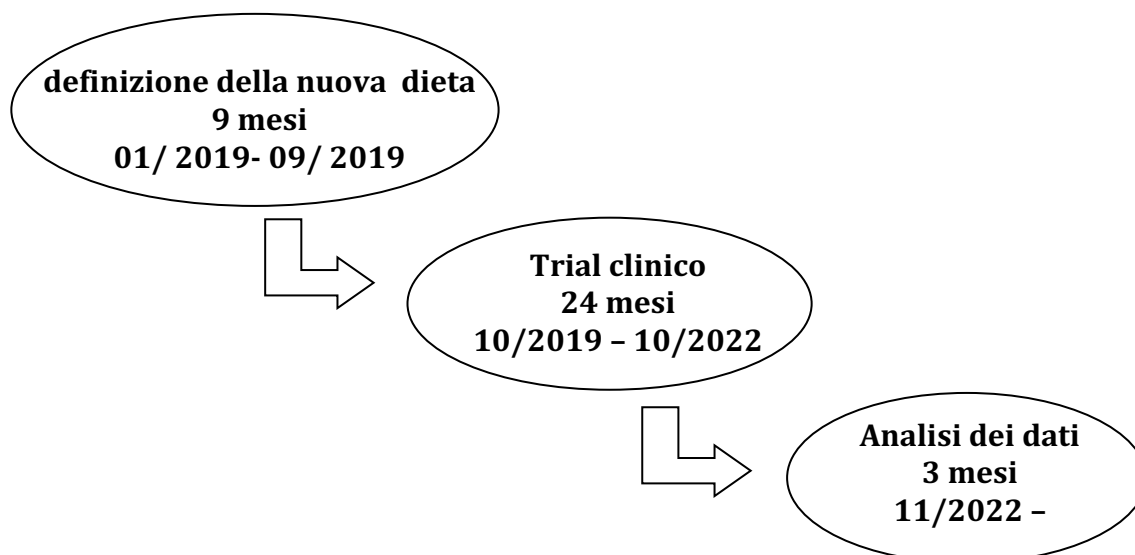
(12) Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Hébert JR. Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutr*. 2014 Aug;17(8):1689-96. doi: 10.1017/S1368980013002115. Epub 2013 14. PubMed PMID: 23941862; PubMed Central PMCID: PMC3925198.

(13) Bonaccio M, Pounis G, Cerletti C, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G; MOLI-SANI Study Investigators. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Jan;83(1):107-113. doi: 10.1111/bcp.12924. Epub 2016 May 3. Review. PubMed PMID: 26935858; PubMed Central PMCID: PMC5338145

(14) Bonaccio M, Di Castelnuovo A, De Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, Donati MB, Cerletti C, Iacoviello L, de Gaetano G; Moli-sani Project Investigators. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet

and leukocyte counts: results from the Moli-sani study. Blood. 2014 May 8;123(19):3037-44. doi: 10.1182/blood-2013-12-541672. Epub 2014 Mar 31. PubMed PMID: 24687087.

Timeline / Prodotti finali:



Prima metà del progetto:

Definire uno schema con indicazioni nutrizionali che siano più sostenibili in cui oltre alla tipologia di alimento e alla frequenza di assunzione si terrà conto anche degli aspetti legati alla stagionalità, biodiversità, alla territorialità e al non elevato grado di raffinazione degli alimenti.

Coinvolgere le associazioni di coltivatori e allevatori territoriali al fine di incontrare e conoscere le realtà produttive locali, e instaurare con loro rapporti “nutrienti”.

Seconda metà del progetto:

Arruolare i soggetti dello studio in due gruppi, somministrare le indicazioni nutrizionali per il gruppo LGIMD e LGIMD 2.0; programmare follow-up. Terminato il periodo di 24 mesi in cui verrà effettuato arruolamento dei soggetti, verrà effettuata nei tre mesi successivi la analisi dei dati antropometrici, nutrizionali, e dei parametri biochimici, metabolici e infiammatori.

Rilevanza traslazionale e impatto per l’SSN

L’esperienza sviluppata a livello sperimentale può essere immediatamente trasferita sul territorio per il trattamento integrale delle patologie cronico-degenerative. I risultati attesi potrebbero portare a una riformulazione dello schema terapeutico e a una notevole riduzione del costo della terapia con le dovute ricadute sullo SSN.

Castellana Grotte, 26 marzo 2022

Il Direttore Scientifico
IRCCS “Saverio de Bellis”


Prof. Gianluigi Giannelli

