



DIREZIONE GENERALE

## BILANCIO DI ESERCIZIO 2023

### RELAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE

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

#### PREMESSA

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

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

L'Istituto è in possesso della certificazione di qualità ISO 9001:2009 n°IQ-1208-14 a partire dal 24.12.2009 e della certificazione del Bilancio di Esercizio 2022.

Il Bilancio di Esercizio 2023 è stato redatto secondo i principi della Contabilità Economico-Patrimoniale in conformità agli artt. 2423 e seguenti del Codice Civile, tenuto conto del Decreto Interministeriale del 20.10.94 integrato dal D. Lg.vo n. 229 del 19.06.99, nonché del D. LGS. n. 118/2011 e ss. mm. e ii.

Il Presente Bilancio è predisposto e adottato vista la L. 27/04/2020 n. 27 e ss. mm e ii;

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

N. 106307 del 28/02/2024;

N. 154201 del 26/03/2024;

N. 153929 del 26/03/2024;

N. 173780 del 09/04/2024;

N. n. 202315 del 26/04/2024 "Notificazione DD n. 334/2024- Bilancio d'esercizio 2023. Assegnazioni definitive";

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



REGIONE PUGLIA



Determina Dirigenziale Dipartim. Promoz. Salute della Reg. Puglia n. 34/2024 avente a Oggetto “Riparto Provvisorio delle Risorse del Fondo Regionale per il bilancio d’esercizio 2023, in favore degli enti del SSR”, di presa d’atto della perdita di esercizio dell’Ente e stanziamento della relativa copertura.

**Visti:**

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

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

La relazione è predisposta al fine di porre in evidenza gli elementi principali che hanno caratterizzato la struttura dell’Ente, l’attività svolta e il Bilancio al 31 dicembre 2023.

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

- l’analisi degli scostamenti dei dati economici al 31.12.2023, raffrontati con il Bilancio di Previsione adottato con Deliberazione del Direttore Generale n. 693/2022;
- l’analisi degli scostamenti dei dati economici al 31.12.2023, raffrontati con il conto economico consuntivo al 31.12.2022.

Tutto ciò premesso, si relaziona quanto segue.

Il Bilancio di Esercizio 2023 rileva una perdita pari a € 5.581.082,13.

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



Nelle pagine che seguono sono fornite notizie generali sulle attività assistenziali e scientifiche dell'Istituto rendendo di agevole lettura l'analisi dei dati economici con i principali scostamenti rispetto al budget 2023 ed al conto economico consuntivo al 2022.

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

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

## DATI DI STRUTTURA E DI ATTIVITA'

Con deliberazione G.R. n. 528 del 11.04.2022 sono stati attribuiti all'Istituto n. 136 posti letto come di seguito rappresentato:

Reparto	PP.LL. DGR 528/2022	PP.LL. Attivi	Note
Chirurgia Generale 1 ad indirizzo del tubo gastroenterico	30	20	/
Chirurgia Generale 2 ad indirizzo epatobiliopancreatico	20	20	/
Chirurgia Bariatrica	10	4	/
Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva	20	20	/
Gastroenterologia - Epatopatie	12	12	/
Gastroenterologia - IBD	12	12	/
Malattie del Metabolismo - Nutr. Clin. - Centro Ricerca Obesit,	6	0	/
Oncologia	14	10	/
Anestesia e Rianimazione	12	12	/
<b>TOT</b>	<b>136</b>	<b>110</b>	

Questa Direzione ha operato una serie di azioni e di investimenti utili a potenziare le unità di chirurgia registrando incrementi significativi come si può apprezzare dalle tabelle che seguono. In particolare è stata potenziata l'attività di chirurgia oncologica, l'attività di chirurgia bariatrica per l'obesità, e la chirurgia dei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali che in precedenza si recavano fuori regione. L'incremento delle attività chirurgiche descritto ha determinato ad effetto domino la necessità di aumentare anche le unità di Oncologia, Gastroenterologia e Rianimazione

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



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

Tempo Indeterminato	SITUAZIONE AL 31.12.2022	Assunti dal 1 gennaio al 31 dicembre 2023	Cessati dal 1 gennaio al 31 dicembre 2023	TOTALE PERSONALE A TEMPO INDETERMINATO al 31/12/2023
<b>RUOLO SANITARIO</b>	<b>252</b>	<b>35</b>	<b>18</b>	<b>269</b>
Dirigenza	86	6	6	86
Comparto	166	29	12	183
<b>RUOLO SOCIO-SANITARIO</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>32</b>
Comparto	32	1	1	32
<b>RUOLO PROFESSIONALE</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Dirigenza	0	0	0	0
Comparto	0	0	0	0
<b>RUOLO TECNICO</b>	<b>45</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>39</b>
Dirigenza	2	0	0	2
Comparto	43	2	8	37
<b>RUOLO AMMINISTRATIVO</b>	<b>32</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>44</b>
Dirigenza	4	0	0	4
Comparto	28	14	2	40
<b>RUOLO RICERCA</b>	<b>30</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	<b>52</b>
Dirigenza (Tempo Determ.)	0	0	0	0
Comparto (Tempo Determ.)	30	26	4	52
<b>Totali</b>	<b>391</b>	<b>78</b>	<b>33</b>	<b>436</b>

Il totale dei dipendenti a Tempo Indeterminato dell'Istituto, nella presente esposizione, fa rilevare un incremento pari a 45 unità. L'andamento ha riguardato in termini di incremento il Ruolo Sanitario – per 36 unità, a fronte di cessati per 18 unità, il Ruolo Socio Sanitario, di nuova istituzione come da CCNL, pareggia la consistenza anno precedente mentre il Ruolo Tecnico si decrementa di 6 unità. Il Ruolo Amministrativo fa rilevare cessioni per due e nuove assunzioni per 14 unità e quello in carico alla Ricerca fa segnalare un salto di ben 22 unità, tutte a carico dei fondi ministeriali afferenti alla cosiddetta Piramide dei Ricercatori, vista la Legge 27/12/2017, Art. 1 c- 425. Su indicazioni del Ministero dell'Economia e Finanze le unità di che trattasi sono state inserite fra i dipendenti a Tempo Indeterminato.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Il numero dei dipendenti a Tempo Determinato dell'Istituto mostra un decremento di 11 unità rispetto all'esercizio precedente. Tale fotografia rispecchia le scelte compiute dall'Amministrazione nella direzione della stabilizzazione e dell'assunzione a T.I., come sopra commentato.

Tempo Determinato	SITUAZIONE AL 31.12.2022	Assunti dal 1 gennaio al 31 dicembre 2023	Cessati dal 1 gennaio al 31 dicembre 2023	TOTALE PERSONALE A TEMPO INDETERMINATO al 31/12/2023
<b>RUOLO SANITARIO</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>5</b>
Dirigenza	4	4	5	3
Comparto	10	1	9	2
<b>RUOLO SOCIO-SANITARIO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Comparto	0	0	0	0
<b>RUOLO PROFESSIONALE</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Dirigenza	0	1	0	1
Comparto	0	0	0	0
<b>RUOLO TECNICO</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Dirigenza	0	0	0	0
Comparto	1	0	1	0
<b>RUOLO AMMINISTRATIVO</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
Dirigenza	0	0	0	0
Comparto	2	0	2	0
<b>Totali</b>	<b>17</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>6</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





## ATTIVITA' ASSISTENZIALE

Nella tabella si riportano i principali dati indicatori delle attività dell'Istituto relativi agli anni 2023 con riferimento ad alcuni dati del 2022:

### Esercizio 2023

Reparti	Ricoveri Ordinari	Peso medio ponderato	GG. di degenza	Degenza media	Ricoveri Day Hospital	Peso medio
Chirurgia Gen. 1 (Tubo GastroEnt.)	1.286	1,97	10.065	7,83	1	0,89
Chirurgia Bariatrica	122	2,25	388	3,18		
Chirurgia Gen. 2 (EpatoBilioPancr.)	137	1,52	649	4,74		
Anestesia e Rianimazione	114	4,57	1.434	12,58		
Gastroenterologia - Epatopatie	473	1,13	4.743	10,03		
Gastroenterologia - Endoscopia	934	1,07	7.548	8,08		
Gastroenterologia - IBD	451	0,96	3.610	8,00		
Oncologia	360	1,35	2.465	6,85	345	0,75
<b>TOTALE</b>	<b>3.877</b>	<b>1,54</b>	<b>30.902</b>	<b>7,97</b>	<b>346</b>	<b>0,75</b>

### Confronto Attività 2023/2022

Reparti	Ricoveri Ordinari 2023	Ricoveri Ordinari 2022	Delta ricoveri 2023/2022	Ricoveri Day Hospital 2023	Ricoveri Day Hospital 2022	Delta DH/2023/2022
Chirurgia	1.545	938	607	1	4	-3
Anestesia e Rianimazione	114	89	25		6	-6
Gastroenterologia	1.858	1.692	166		256	-256
Oncologia	360	199	161	345	0	345
<b>Totale</b>	<b>3.877</b>	<b>2.918</b>	<b>959</b>	<b>346</b>	<b>266</b>	<b>80</b>

Remunerazione DRG – Confronto 2023/2022 – Dato espresso in €/000

Reparti	Ricoveri Ordinari 2023	Ricoveri Ordinari 2022	Delta 2023/2022
Chirurgia	10.437	5.548	4.889
Anestesia e Rianimazione	2.044	1.755	289
Gastroenterologia	5.927	5.496	430
Oncologia	2.642	1.787	855
<b>Totale</b>	<b>21.050</b>	<b>14.586</b>	<b>6.464</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



### Prestazioni specialistiche

Il dato 2023 mostra un incremento sostanziale rispetto agli anni precedenti dell'erogazione delle prestazioni sanitarie ambulatoriali specialistiche, con ricavi che si incrementano per €/000 932.

UNITA' OPERATIVE E SERVIZI	Esercizio 2023 €	Esercizio 2022 € *
AMBULATORIO CHIRURGIA I	268.506	420.385
U.O.S. CHIRURGIA PROCTOLOGICA	1.450	
AMBULATORIO GASTRO-ENDOSCOPIA	437.782	523.973
U.O.S. FISIOPATOLOGIA DIGESTIVA	40.006	31.170
U.O.S. ENDOSCOPIA	335.978	338.478
U.O.S. DISTURBI FUNZIONALI	15.001	9.511
CENTRO PRELIEVI	2.413.557	1.678.879
MICROBIOLOGIA-VIROLOGIA	226.863	117.941
CENTRO OBESITA'	62.716	53.250
AMBULATORIO ONCOLOGIA	273.338	242.496
AMBULATORIO IBD	173.182	7.915
AMBULATORIO REUMATOLOGIA CROSS	21.174	17.376
AMBULATORIO EPATOPATIE	176.116	147.430
ANESTESIA	109.615	73.899
RADIOLOGIA DIAGNOSTICA ED INTERVENTISTICA	943.028	1.050.674
GENETICA MEDICA	592.588	427.151
ANATOMIA PATOLOGICA	218.632	192.737
CARDIOLOGIA	69.338	114.065
<b>TOTALE</b>	<b>6.378.868</b>	<b>5.447.329</b>

\* Dato assestato

Le tabelle sopra riportate mostrano chiaramente un significativo incremento delle attività assistenziali che interessano quasi tutte le specialità sia in ambito di ricovero, dove si registra un marcato incremento di circa 1.000 ricoveri della chirurgia oncologica e bariatrica, della oncologia e della gastroenterologia, e sia delle attività ambulatoriali che coinvolge tutte le specialità.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



REGIONE PUGLIA



## ANALISI ECONOMICA

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

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

VOCI DI BILANCIO	VALORI IN BILANCIO			COMPOSIZIONE %		
	Bilancio al	Bilancio al	BUDGET	Bilancio al	Bilancio al	BUDGET
	31/12/2023	31/12/2022	2022	31/12/2023	31/12/2022	2023
<b>VALORE DELLA PRODUZIONE</b>	<b>62.862.404</b>	<b>50.021.106</b>	<b>57.060.000</b>	<b>99,43</b>	<b>99,20</b>	<b>100,00</b>
Contributi in c/esercizio	22.869.949	17.343.989	15.265.500	36,17	34,40	26,75
Proventi e ricavi diversi	35.271.990	27.535.733	36.370.000	55,79	54,61	63,74
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	333.264	1.253.639	79.000	0,53	2,49	0,14
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	1.061.823	807.254	800.000	1,68	1,60	1,40
Utilizzo fondi per quote inutilizzate contrib. Vincolati	199.850	392.947	2.055.500	0,32	0,78	3,60
Costi capitalizzati	3.125.528	2.687.545	2.490.000	4,94	5,33	4,36
<b>ALTRI PROVENTI</b>	<b>359.242</b>	<b>401.368</b>	<b>0</b>	<b>0,57</b>	<b>0,80</b>	<b>0,00</b>
Finanziari	589	42	0	0,00	0,00	0,00
Diversi	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Straordinari	358.654	401.326	0	0,57	0,80	0,00
<b>TOTALE RICAVI</b>	<b>63.221.647</b>	<b>50.422.474</b>	<b>57.060.000</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>COSTI OPERATIVI</b>	<b>66.380.059</b>	<b>58.279.937</b>	<b>61.209.230</b>	<b>96,48</b>	<b>96,57</b>	<b>97,01</b>
Personale	24.278.633	21.976.056	23.015.900	35,29	36,42	36,48
Materiali	15.221.992	13.340.206	13.593.500	22,12	22,11	21,55
Servizi e costi diversi	21.258.264	17.793.681	19.903.730	30,90	29,48	31,55
Ammortamenti	3.125.528	2.729.695	2.708.900	4,54	4,52	4,29
Accantonamenti	2.495.641	2.440.299	1.987.200	3,63	4,04	3,15
<b>ALTRI ONERI</b>	<b>2.422.843</b>	<b>2.068.375</b>	<b>1.883.730</b>	<b>3,52</b>	<b>3,43</b>	<b>2,99</b>
Finanziari	3.104	1.028	20.000	0,00	0,00	0,03
Diversi	0	0	0	0,00	0,00	0,00
Straordinari	621.637	418.605	0	0,90	0,69	0,00
Tributari	1.798.103	1.648.741	1.863.730	2,61	2,73	2,95
<b>TOTALE COSTI</b>	<b>68.802.902</b>	<b>60.348.311</b>	<b>63.092.960</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>RISULTATO ECONOMICO</b>	<b>-5.581.256</b>	<b>-9.925.837</b>	<b>-6.032.960</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





## VALORE DELLA PRODUZIONE

Il Valore della Produzione relativo all'esercizio 2023, pari a €/000 62.862, in termini complessivi, fa registrare un incremento pari a €/000 12.841 rispetto all'esercizio 2022. Nella seguente tabella si specificano i valori per settori di aggregazione.

	Bilancio 2023	Bilancio 2022
Voce	€/000	€/000
Contributi c/esercizio	22.870	18.059
Rettifica Contrib. In C/Esercizio	-	- 715
Ricavi per prest. san. e sociosan. a rilevanza sanitaria	35.244	27.428
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	333	1.254
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	1.062	807
Quota contributi in c/capitale imputata nell'esercizio	3.126	2.688
Utilizzo fondi per quote inutilizz. contributi vinc.ti di eserc. precedenti	200	393
Altri ricavi e proventi	28	108
<b>Totale VALORE DELLA PRODUZIONE</b>	<b>62.862</b>	<b>50.021</b>

I contributi in c/esercizio sommano €/000 22.870, e sono composti dalle seguenti voci:

	€/000
Contributi in C/Esercizio da Regione per quota FS Regionale	12.000
Finanziamento indistinto finalizzato da Regione	3.077
Finanziamento indistinto finalizzato da Regione (Progetto SALUS)	77
Contributo da Regione per Fondo Prestaz. Aggiuntive	8
Risorse aggiuntive da bilancio regionale a titolo di copertura LEA da Regione	2.100
Contributo "Ucraina"	1
Contributo per attività di Ricerca Corrente	3.816
Contributo per attività di Ricerca Finalizzata	964
Contributi da altri soggetti pubblici per attività di ricerca	571
Contributi da altri soggetti privati per attività di ricerca	256
<b>Totale</b>	<b>22.870</b>

Riguardo al contributo da Ministero per le attività di ricerca (complessivi €/000 3.816), nello specifico si notizza che il contributo assegnato all'Ente nell'anno 2023 per lo svolgimento di attività di ricerca corrente ammonta a €/000 1.384, giusta comunicazione del Ministero della Salute avvenuta mediante *Workflow* n. 023023117 del 28.11.2023, che il contributo utile a sostenere i costi della "Piramide dei Ricercatori, è pari a €/000 2.019, giusta comunicazione del Ministero della Salute

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

avvenuta mediante Workflow n. 2023023264 del 29/11/2023, al netto della trattenuta “Bibliosan” che vale €/000 52.

Si rappresentano in sintesi gli altri contributi erogati per attività di ricerca.

Importi espressi in €/000.

22	PROGETTO RCR-2022-23682287 dal titolo "The ACC Preclinical Re
679	CONTRIBUTO C/ESERCIZIO RICERCA CORRENTE 2023 ACCONTO
116	5 X 1000 ANNO 2022 (REDDITI 2021)
653	CONTRIBUTO C/ESERCIZIO RICERCA CORRENTE 2023 SALDO
2.019	FONDI PIRAMIDE 2023
34	" Progetti di Rete Acc 2022" DDG n. 436 del 15/06/2023 scadenza 31/12/2023 Rev. N. 470 del 04/07/2023
13	" Progetto UVAR +" DDG n. 410 del 06/08/2020 Rev. N.557 del 31/07/2023 e n. 895 del 03/11/2023
7	Progetto di rete Promising DCS n. 423 del 12/11/2021
94	Progetto PON BIO-D Sviluppo Biomarcatori diagnostici per la medicina di precisione e la terapia personalizzata. DCS n. 401 del 03/11/2021
21	Progetto PNC Diagnostica avanzata. ONC-E3-2022-23683266. DDG n. 437 del 15/06/2023
32	Progetto PNRR-MAD -2022-12375695. DDG n. 177 del 22/03/2023
7	Progetto UVAR+ DDGn. 9 del 18/01/2023
68	Progetto di Rete Aging Next generation Promising (NGP) DDGn. 555 del 10/11/2022
36	Progetto piano esecutivo di Rete Aging. DDGn. 555 del 10/11/2022
15	Progetto di rete ACC 2022 RCR-2022-23682287. DDG n. 436 del 15/06/2023
<b>Totale €/000 3.816</b>	

Di seguito si espone quanto ricevuto per attività di:

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Ricerca Finalizzata, per un totale pari a €/000 964:

22	"Progetto 'IDENTITA' - rete integrata mediterranea per l'osservazione ed Elaborazione di percorsi di Nutrizione personalizzata contro la malnutrizione"
133	Progetto: "BIOTECNOLOGIA, BIOINFORMATICA E SVILUPPO FARMACEUTICO"
796	Progetto in collaboraz. Con CENTRO CARDIOLOGICO MONZINO
13	PROGETTO RCI

Contributi da altri soggetti pubblici per attività di ricerca, per un totale pari a €/000 571:

495	PNRR - MISSIONE 5 "INCLUSIONE E COESIONE"
16	Progetto dal titolo "BIO-D - Sviluppo di Biomarcatori Diagnostici per la medicina di precisione e la terapia personalizzata" B22C20000270005
41	Progetto in collaboraz. Con INRCA ISTITUTO NAZIONALE DI RIPOSO E CURA PER ANZIANI
10	Accordo di collaborazione scientifica tra il CNR ISPA e IRCCS "de Bellis"
8	Progetto Emoticon-Net programma CCM 2022 AreSS Puglia,
1	Ministero Salute

I privati contribuiscono all'attività di Ricerca per €/000 256, principalmente erogati dalla Fondazione AIRC e altre minori.

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

In ordine ai finanziamenti erogati nel corso dell'esercizio 2023, quanto non utilizzato per l'ordinaria attività di ricerca è stato oggetto di accantonamento ad apposito fondo "per quote non utilizzate", ciò in ottemperanza al D. L.gs. n. 118, art. 29, c. e, per un totale complessivo pari a €/000 1.692, come di seguito si riporta.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





### Accantonamenti per quote inutilizzate per contributi vincolati

	€/000
Progetto piano operativo Salute Traiettoria 4 DDG n. 773 del 20/11/2023	133
Progetto piano operativo Salute Traiettoria 5 DDG n. 225 del 12/04/2023	23
Progetti di Rete Acc 2022 DDG n. 436 del 15/06/2023	37
Fondo " Progetto UVAR +" DDG n. 410 del 06/08/2020	13
Progetto PNC-TT Network PNC-E3-2022-23683268 DDG n. 356 del 24/05/2023	796
Progetto iParaCyts DDG n. 377 del 26/05/2023	125
Fondo contributo R.C.	116
Accantonamento quote inutilizzate Contributo Piramide Ricercatori 2021	449
<b>Totale</b>	<b>1.692</b>

Per quanto attiene ai proventi e ricavi diversi, si riporta di seguito una tabella relativa alla mobilità attiva dell'Istituto per l'anno 2023 rapportata ai risultati rilevati nell'esercizio precedente e nel budget 2023 oltre che ai valori parametrati al redigendo DIEF, come da comunicazioni dei competenti uffici regionali.

### Attività di ricovero

Importi in €/mgl	Produzione al 31/12/2023	ASSEGNAZIONI	Produzione al 31/12/2022	Budget 2023	Delta Produzione 2023- Bgt 2023	Delta Produzione 2023- Assegnazioni	Delta Produzione 2023- 2022
Mobilità attiva infraregionale	26.542	26.542	19.257	26.822	- 279	-	7.285
Mobilità attiva extraregionale	916	916	768	768	148	-	148
Prestazioni di File F	5.725	5.725	5.849	5.660	65	-	- 124
<b>TOTALE</b>	<b>33.183</b>	<b>33.183</b>	<b>25.874</b>	<b>33.249</b>	<b>- 67</b>	<b>-</b>	<b>7.309</b>

In confronto all'esercizio 2022 si rileva un incremento riguardo ai ricavi rivenienti dalle attività di ricovero in Mobilità infraregionale pari a €/000 7.285, a conferma del trend positivo delle attività di produzione dell'Ente successive alla riorganizzazione dell'Ente citata in premessa. Il dato "extraregionale" fa rilevare anch'esso un segno positivo rispetto all'esercizio precedente, vista la maggiore produzione pari a €/000 148, alla stessa stregua delle prestazioni da File F che crescono per €/000 124.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



L'attività Libero Professionale fa rilevare un incremento nell'anno 2023, pari a €/000 92, invertendo il trend degli ultimi esercizi come esplicito in sintesi:

	2023	2022	Budget 2023
<b>RICAVI per PREST.SAN. EROGATE IN REG. DI INTRAMOENIA</b>	1.646	1.554	2.646

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

Riguardo alle prestazioni sanitarie e socio sanitarie diverse non v'è nulla da rilevare per l'esercizio 2023. Tali attività riguardano studi e sperimentazioni di tipo clinico, come regolamentato con Delibere del Direttore Generale n. 266/2019 e 302/2018.

Altre attività per prestazioni sanitarie rendono all'Ente ricavi per €/000 414.

Le compartecipazioni, per l'esercizio in esame, fanno rilevare un ricavo pari a €/000 1.062, in incremento rispetto al 2022 per €/000 254.

Le entrate proprie ammontano a €/000 333 secondo seguenti aggregati parziali

Conc. da parte del pers. nelle spese(vitto,allog.)	13
Recup. per indenn. INAIL inabil. temporanea	2
Altri rimborsi e recuperi	69
Rimborsi assicurativi	2
Rimb.oneri stip. pers. in com.c/o Asl/Ao/Irccs e	39
Pay-back per superamento del tetto della spesa farmaceutica ospedaliera	149
Ulteriore Pay-back	60
<b>Totale</b>	<b>333</b>

I ricavi per utilizzo quote in C/Capitale ammontano a €/000 3.126, così ripartiti:

Utilizzo quota contrib. in c/cap. ricevuti da Reg.	1.551
Utilizzo Quota imputata all'esercizio dei finanziamenti per investimenti dallo Stato	447
Utilizzo Quota imputata all'esercizio di altre poste del patrimonio netto	1.127
<b>Totale</b>	<b>3.126</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Nel corso del 2023, inoltre, sono stati utilizzati fondi per quote inutilizzate su contributi vincolati per un importo complessivo pari a €/000 199, secondo la seguente ripartizione in €/000:

Progetto Di Ricerca: Medicina Di Genere	37
Progetto piano operativo Salute Traiettorie 5	1
Contributo R.C. anno 2018 - Delibera 348 del 03/06/2019	1
Contributo R.C. anno 2019 - Delibera 80 del 14/02/2020	3
Ricerca specifici 5x1000 del 2017	23
Ricerca specifici 5 x 1000 2018	30
Ricerca 5 X 1000 Anno 2021	39
Ricerca specifici " 5 x 1000 2019"	3
i Ricerca specifici 5 X 1000 Anno 2020	39
Ricerca Progetto PNC-TT Network PNC	8
Ricerca Delibera D.G. 473/2020 Starting Grant 12371540 Dott.Ssa Sanese P. - R.F. Sg-2019	7
Ricerca Progetto iParaCyts DDG n. 377 del 26/05/2023 Rev. N. 1554 del 29/12/2023	8
<b>Totale</b>	<b>199</b>

In ordine ad alcune voci, di seguito si espone esemplificativamente un'analisi relativa ai maggiori e minori ricavi in comparazione rispetto all'esercizio 2022.

Voce	Bilancio 2023 €/000	Bilancio 2022 €/000	Maggiori ricavi €/000	Minori ricavi €/000
Contributi c/esercizio	22.870	18.059	4.811	-
Rettifica Contrib. In C/Esercizio	-	- 715	715	-
Ricavi per prest. san. e sociosan. a rilevanza sanitaria	35.244	27.428	7.816	-
Concorsi, recuperi e rimborsi per attività tipiche	333	1.254	-	- 920
Compartecipazione alla spesa per prestazioni sanitarie	1.062	807	255	-
Quota contributi in c/capitale imputata nell'esercizio	3.126	2.688	438	-
Utilizzo fondi per quote inutilizz. contributi vinc.ti di eserc. precedenti	200	393	-	- 193
Altri ricavi e proventi	28	108	-	- 80
<b>Totale VALORE DELLA PRODUZIONE</b>	<b>62.862</b>	<b>50.021</b>	<b>14.034</b>	<b>- 1.193</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



REGIONE PUGLIA

Gli “Altri Ricavi e Proventi”, per questo Esercizio valgono complessivamente €/000 28, così rappresentati:

Diritti per rilascio di certif. e cartelle cliniche	10
Fitti Commerciali	4
Altri proventi di natura commerciale	12
Fitti attivi	2
<b>Totale</b>	<b>28</b>

## COSTI DELLA PRODUZIONE

	Bilancio 2023	Bilancio 2022	Maggiori costi	Minori costi
Voce	€/000	€/000	€/000	€/000
Acquisti di beni	15.924	13.421	2.504	
Acquisti di servizi sanitari	3.049	2.680	369	-
Acquisti di servizi non sanitari	8.827	8.720	107	-
Manutenzione e riparazione	2.846	1.909	937	-
Godimento beni di terzi	5.175	3.191	1.984	-
Personale	24.279	21.976	2.303	-
Oneri diversi di gestione	1.361	1.293	68	-
Ammortamenti	3.126	2.730	396	-
Rimanenze	- 702	- 80		
Accantonamenti	2.496	2.440	55	-
<b>COSTI DELLA PRODUZIONE</b>	<b>66.380</b>	<b>58.280</b>		

## ANALISI COSTI DELLA PRODUZIONE

### ACQUISTI DI BENI

Dall’analisi dello schema sotto riportato, ulteriormente dettagliato, si evince come l’acquisto di beni (sanitari e non), nel complesso, fa registrare un parziale incremento rispetto al dato di bilancio 2022, per €/000 2.504.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Nello specifico il Totale dei Beni Sanitari acquisiti ammonta a €/000 15.026, mentre i beni non Sanitari fanno rilevare un costo complessivo pari a €/000 196.

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

	CE 2023	CE 2022	Budget 2023	Delta CE 2023-CE 2022		DeltaCE 2023 - Budget 2023	
				Valori	%	Valori	%
<b>CONSUMO MATERIALI SANITARI</b>	<b>15.026.299</b>	<b>13.193.252</b>	<b>13.410.500</b>	<b>1.833.046</b>	<b>13,89%</b>	<b>1.615.799</b>	<b>12,05%</b>
• Acquisti materiali sanitari	15.706.779	13.269.630	13.410.500	2.437.148	18,37%	2.296.279	17,12%
- Farmaci ed emoderivati	6.995.345	6.890.148	6.829.500	105.196	1,53%	165.845	2,43%
- Presidi chirurgici e materiali sanitari	5.006.048	3.492.902	3.400.000	1.513.146	43,32%	1.606.048	47,24%
- Materiale protesico	6.408	0	0	6.408	#DIV/0!	6.408	#DIV/0!
- Altri materiali sanitari	287.846	158.500	131.000	129.347	81,61%	156.846	119,73%
- Materiale per radiologia	0	0	220.000	0	0,00%	(220.000)	100,00%
- Materiali diagnostici di laboratorio	3.410.823	2.726.430	2.830.000	684.393	25,10%	580.823	20,52%
- Materiali per emodialisi	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- Sieri e vaccini	308	1.650	0	(1.342)	-81,33%	308	#DIV/0!
- Materiale protesico fornitura diretta (assistenza protesica)	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Variazione scorte mat. sanitari	(680.480)	(76.378)	0	(604.102)	790,94%	(680.480)	#DIV/0!
<b>CONSUMO MATERIALI NON SANITARI</b>	<b>195.694</b>	<b>146.954</b>	<b>0</b>	<b>48.740</b>	<b>33,17%</b>	<b>195.694</b>	<b>#DIV/0!</b>
• Acquisti materiali non sanitari	217.485	151.055	0	66.430	43,98%	217.485	#DIV/0!
- Prodotti alimentari	305	141	1.000	164	116,19%	(695)	-69,46%
- materiali per guardaroba e pulizia	96.132	60.884	58.000	35.248	57,89%	38.132	65,75%
- Materiali per manutenzione	21.184	17.850	24.000	3.334	18,68%	(2.816)	-11,73%
- Combustibili, carburanti e lubrificanti	9.004	4.949	15.000	4.055	81,93%	(5.996)	-39,97%
- Cancelleria	66.426	62.897	75.000	3.529	5,61%	(8.574)	-11,43%
- Materiali diversi	24.433	4.333	10.000	20.100	463,88%	14.433	144,33%
• Variazione scorte mat. non sanitari	(21.791)	(4.101)	0	(17.690)	431,37%	(21.791)	#DIV/0!
<b>TOTALE CONSUMI</b>	<b>15.221.992</b>	<b>13.340.206</b>	<b>13.410.500</b>	<b>1.881.786</b>	<b>14,11%</b>	<b>1.811.492</b>	<b>13,51%</b>
• Totale acquisti	15.924.264	13.420.685	13.410.500	2.503.579	18,65%	2.513.764	18,74%
• Totale variazione scorte	(702.272)	(80.479)	0	(621.793)	772,61%	(702.272)	#DIV/0!



**ACQUISTI DI SERVIZI**

	CE 2023	CE 2022	Budget 2023	Delta CE 2023 - CE 2022		Delta CE 2023 - Budget 2023	
				Valori	%	,	%
<b>ACQUISTI DI SERVIZI</b>	<b>11.855.291</b>	<b>11.377.990</b>	<b>11.759.730</b>	<b>477.301</b>	<b>4,19%</b>	<b>95.561</b>	<b>0,81%</b>
• Prestazioni sanitarie da pubblico	658.225	553.065	180.000	105.160	19,01%	478.225	265,68%
• Prestazioni sanitarie da privato	2.390.522	2.127.032	3.277.730	263.490	12,39%	(887.208)	-27,07%
- Assistenza convenzionata	438.218	291.796	260.000	146.423	50,18%	178.218	68,55%
- ALPI e consulenze	1.308.188	961.305	2.264.730	346.883	36,08%	(956.542)	-42,24%
- Consulenze sanitarie	102.145	210.504	103.000	(108.359)	-51,48%	(855)	-0,83%
- Altri servizi	541.971	663.427	650.000	(121.456)	-18,31%	(108.029)	-16,62%
• Prestazioni non sanitarie da pubblico (altri costi)	5.898	1.239	0	4.658	375,85%	5.898	#DIV/0!
• Prestazioni non sanitarie da privato	8.800.646	8.696.654	8.302.000	103.992	1,20%	498.646	6,01%
- Consulenze tecniche	69.157	277.282	60.000	(208.125)	-75,06%	9.157	15,26%
- Consulenze amministrative	20.740	8.642	0	12.098	140,00%	20.740	#DIV/0!
- Consulenze legali	15.355	8.762	10.000	6.592	75,24%	5.355	53,55%
- Servizi diversi	126.638	161.503	166.000	(34.865)	-21,59%	(39.362)	-23,71%
- <b>Servizi appaltati</b>	<b>6.807.511</b>	<b>5.850.468</b>	<b>4.276.000</b>	<b>957.043</b>	<b>16,36%</b>	<b>2.531.511</b>	<b>59,20%</b>
Lavanderia	323.560	290.468	290.000	33.092	11,39%	33.560	11,57%
Pulizia	639.397	586.232	520.000	53.165	9,07%	119.397	22,96%
Mensa	641.349	542.232	490.000	99.117	18,28%	151.349	30,89%
Riscaldamento	716.590	952.707	0	(236.117)	-24,78%	716.590	#DIV/0!
Smaltimento rifiuti speciali	282.666	166.031	85.500	116.635	70,25%	197.166	230,60%
Altri servizi	4.203.949	3.312.799	2.890.500	891.150	26,90%	1.313.449	45,44%
- <b>Utenze</b>	<b>1.761.245</b>	<b>2.389.997</b>	<b>3.790.000</b>	<b>(628.751)</b>	<b>-26,31%</b>	<b>(2.028.755)</b>	<b>-53,53%</b>
Energia elettrica	1.589.946	2.310.739	2.650.000	(720.793)	-31,19%	(1.060.054)	-40,00%
Acqua	122.437	50.071	80.000	72.366	144,53%	42.437	53,05%
Gas	0	0	1.000.000	0	0,00%	(1.000.000)	-100,00%
Telefono	48.863	29.187	60.000	19.676	67,41%	(11.137)	-18,56%
<b>MANUTENZIONI E RIPARAZIONI</b>	<b>2.845.898</b>	<b>1.909.179</b>	<b>2.708.000</b>	<b>936.718</b>	<b>49,06%</b>	<b>137.898</b>	<b>5,09%</b>
• Manutenzione e riparazione immobili	7.623	46.988	50.000	(39.366)	-83,78%	(42.377)	-84,75%
• Manutenzione e riparazione mobili	8.337	18.469	15.000	(10.132)	-54,86%	(6.663)	-44,42%
• Manutenzione e riparazione attrezzature sanitarie	1.435.368	1.289.390	1.540.000	145.977	11,32%	(104.632)	-6,79%
• Manutenzione e riparazione mezzi di trasporto	772	4.190	3.000	(3.418)	-81,58%	(2.228)	-74,28%
• Manutenzione e riparazione impianti	1.393.799	550.142	1.100.000	843.657	153,35%	293.799	26,71%
<b>GODIMENTO BENI DI TERZI</b>	<b>5.175.366</b>	<b>3.191.410</b>	<b>4.120.000</b>	<b>1.983.957</b>	<b>62,17%</b>	<b>1.055.366</b>	<b>25,62%</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



• Affitti immobili	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Leasing e noleggio attrezzature sanitarie	737.639	601.468	590.000	136.171	22,64%	147.639	25,02%
• Canoni leasing e noleggio centri elettrocontabili	4.425.601	2.585.736	3.520.000	1.839.866	71,15%	905.601	25,73%
• Altri canoni di leasing e noleggio	12.127	4.206	10.000	7.920	188,31%	2.127	21,27%
<b>ONERI DIVERSI DI GESTIONE</b>	<b>1.381.709</b>	<b>1.315.102</b>	<b>1.316.000</b>	<b>66.607</b>	<b>5,06%</b>	<b>65.709</b>	<b>4,99%</b>
• Compensi agli organi istituzionali	877.325	852.587	861.000	24.737	2,90%	16.325	1,90%
• Spese postali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Spese legali	138.227	166.602	150.000	(28.375)	-17,03%	(11.773)	-7,85%
• Pubblicità	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Assicurazioni	20.741	22.467	25.000	(1.726)	-7,68%	(4.259)	-17,04%
• Spese di rappresentanza	105.411	95.611	60.000	9.800	10,25%	45.411	75,69%
• Oneri diversi di gestione	240.004	177.834	220.000	62.170	34,96%	20.004	9,09%
<b>Totale servizi e costi diversi</b>	<b>21.258.264</b>	<b>17.793.681</b>	<b>19.903.730</b>	<b>3.464.583</b>	<b>19,47%</b>	<b>1.354.534</b>	<b>6,81%</b>

L'acquisto di servizi fa registrare un incremento complessivo pari a €/000 3.465.

Nello specifico, si riportano i dettagli delle voci afferenti alla categoria “**Consulenze Sanitarie**”, pari a €/000 102

Consulenze sanitarie da privato - (prestazioni aggiuntive) Comparto L. 1/2002.	33
Oneri sociali su Consulenze sanitarie da privato - (prestazioni aggiuntive) Comparto L. 1/2002.	8
Altre consulenze sanitarie e sociosanitarie da privato	2
Co.Co.Co.	1
Indennità a personale universitario - area sanitaria	58
<b>Totale</b>	<b>102</b>

Così come le seguenti categorie di costo afferente a “**Altri Servizi**”, per €/000 542

Altre collaborazioni e prestazioni di lavoro - area sanitaria. Compensi ed oneri borsisti	422
Altre collaborazioni e prestazioni di lavoro - area sanitaria.	120
<b>Totale</b>	<b>542</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Mentre i “Servizi Diversi”, per €/000 127

Costi di formazione da privato	101
Person. relig. convenz. (incluso oneri riflessi)	16
Co.Co.Co. comparto ruolo Amm.vo - Competenze	9
Co.Co.Co. comparto ruolo Amm.vo - Oneri sociali	1
<b>Totale</b>	<b>127</b>

Altri servizi appaltati, per €/000 4.204:

Elaborazione dati	9
Assistenza hardware e software	506
Servizi trasporti (non sanitari)	32
Servizi di Logistica	582
Vigilanza	456
Gestione Archivi	57
Servizio di Portierato e Ausiliario	1.089
Altri Servizi	1.095
Manutenzione del verde	59
Servizi di radioprotezione	8
Rimb.spese viaggio al personale dipendente	3
Indennità per docenza svolta da personale dipendente	2
Libri, Riviste ed Abbonamenti vari	82
Commissioni ed oneri per il Servizio di Tesoreria	0
Altre spese bancarie e postali	63
Spese di pubblicità, pubblicaz. e bandi di gare	156
Spese postali	5
	4.204

Si rilevano incrementi dei costi riguardo alle attività di assistenza convenzionata, per €/000 146, a causa di attività consulenziali e di supporto da privati. L’attività ALPI fa registrare un parziale incremento, per €/000 347, ciò a causa di una conseguente ripresa delle prestazioni libero professionali, già limitate nel periodo pandemico.

Le prestazioni non sanitarie da pubblico pari a €/000 6 riguardano le attività in regime di convenzione svolte da personale delle aziende sanitarie regionali per supporto tecnico ingegneristico.

Le *Utenze* fanno rilevare un significativo decremento nella voce afferente alla fornitura di energia elettrica, per ragioni collegate a un riassetto del costo della fornitura. Tale costo risulta essere pari a €/000 1.590, in riduzione rispetto al 2022 per €/000 721.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



I costi di manutenzione incrementano il dato dell'esercizio precedente per €/000 937. Tali costi rappresentano attività manutentive necessarie alla buona gestione del parco macchine, attrezzature e ambiente incidendo soprattutto nell'area dell'impiantistica.

L'area che afferisce all'aggregato Godimento *Beni di Terzi* si incrementa, per €/000 1.984 e rappresenta i contratti stipulati per utilizzo attrezzature in regime di noleggio, di cui per una parte finanziati da contributi per attività di ricerca, corrente o vincolata. L'incremento significativo riguarda l'area dei "centri elettrocontabili" su cui si sta avviando un'importante attività di implementazione e innovazione del sistema.

Nello specifico:

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

Gli *Oneri Diversi di Gestione* fanno rilevare maggiori costi per €/000 67.

In tabella si esplodono le singole voci, per complessivi €/000 1.382:

Compensi per Direttore Generale	169
Oneri sociali per Direttore Generale	33
Compensi per Direttore Amm.vo	135
Oneri di gestione relativi al Direttore Amministrativo	35
Compensi per Direttore Sanitario	135
Rimborso spese per Direttore Sanitario	1
Oneri di gestione relativi al Direttore Sanitario	35
Compensi per Direttore Scientifico	142
Rimborso spese per Direttore Scientifico	4
Oneri sociali per Direttore Scientifico	41
Compensi per Collegio Sindacale	54
Rimborso spese per Collegio Sindacale	5
Oneri sociali per Collegio Sindacale	6
Indennità, rimborso spese e oneri sociali per organi direttivi e collegio sindacale	67
Comp. per Consiglio Indirizzo e verifiche (IRCCS)	16
Spese di promozione	105
Onerari e spese legali per resistenza in giudizio	138
Premi di assicuraz. per furto, incendio ed RC auto	21

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Altri oneri di gestione	151
Imposte, tasse e tributi	90
<b>Totale</b>	<b>1.382</b>

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

L'esercizio in esame fa rilevare ammortamenti complessivi per €/000 3.126

<b>AMMORTAMENTI</b>	<b>3.126</b>
<b>AMMORTAMENTI IMMOBILIZZAZIONI IMMATERIALI</b>	<b>105</b>
Amm.to Concess. licenze d'uso e marchi	100
Amm.to Altre Immobilizzazioni Immateriali	5
<b>AMMORTAMENTI IMMOBILIZZAZIONI MATERIALI</b>	<b>3.020</b>
Amm.to Fabbric. indis. (gravati da vincolo di destinaz.)	779
Amm.to Costruzioni leggere	4
Amm.to Impianti e macchinari	279
Amm.to Attrezzature sanitarie	1.669
Amm.to Attrezz. non sanitarie	38
Amm.to Mobili e arredi d'ufficio	79
Amm.to Autov., motov. e simili (comprese ambul.)	34
Amm.to Macchine elettroniche	133
Amm.to Telefoni cellulari	1
Amm.to Altri beni materiali	4

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

Nello specifico il consuntivo del "Personale", che ammonta complessivamente a €/000 24.279.

	CE 2023	CE 2022	Budget 2023	Delta CE 2023 - CE 2022		Delta CE 2023 - Budget 2023	
				Valori	%	Valori	%
<b>RUOLO SANITARIO/SOCIOSANITARIO</b>	<b>19.375.938</b>	<b>17.829.130</b>	<b>18.655.700</b>	<b>1.546.808</b>	<b>8,68%</b>	<b>720.238</b>	<b>3,86%</b>
• Competenze fisse	10.655.650	9.679.573	10.669.300	976.078	10,08%	(13.650)	-0,13%
• Competenze accessorie	3.872.474	4.169.361	3.910.500	(296.886)	-7,12%	(38.026)	-0,97%
• Altre indennità	167.224	168.614	52.000	(1.390)	-0,82%	115.224	221,58%
• Oneri sociali	4.680.589	3.811.583	4.023.900	869.006	22,80%	656.689	16,32%

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727

<b>RUOLO PROFESSIONALE</b>	<b>39.703</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>39.703</b>	<b>#DIV/0!</b>	<b>39.703</b>	<b>#DIV/0!</b>
• Competenze fisse	27.112	0	0	27.112	#DIV/0!	27.112	#DIV/0!
• Competenze accessorie	3.952	0	0	3.952	#DIV/0!	3.952	#DIV/0!
• Altre indennità	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Oneri sociali	8.639	0	0	8.639	#DIV/0!	8.639	#DIV/0!

<b>RUOLO TECNICO</b>	<b>1.547.945</b>	<b>2.641.157</b>	<b>2.821.600</b>	<b>(1.093.212)</b>	<b>-41,39%</b>	<b>#####</b>	<b>-45,14%</b>
• Competenze fisse	932.803	1.594.265	1.612.700	(661.462)	-41,49%	(679.897)	-42,16%
• Competenze accessorie	136.758	453.805	597.600	(317.048)	-69,86%	(460.842)	-77,12%
• Altre indennità	260	29.626	19.300	(29.366)	-99,12%	(19.040)	-98,65%
• Oneri sociali	478.124	563.459	592.000	(85.336)	-15,14%	(113.876)	-19,24%

<b>RUOLO AMMINISTRATIVO</b>	<b>1.795.185</b>	<b>1.505.770</b>	<b>1.538.600</b>	<b>289.416</b>	<b>19,22%</b>	<b>256.585</b>	<b>16,68%</b>
• Competenze fisse	1.029.237	788.490	876.200	240.747	30,53%	153.037	17,47%
• Competenze accessorie	384.062	393.930	329.500	(9.868)	-2,50%	54.562	16,56%
• Altre indennità	3.415	4.851	4.900	(1.436)	-29,61%	(1.485)	-30,31%
• Oneri sociali	378.472	318.499	328.000	59.973	18,83%	50.472	15,39%

<b>COSTO DEL PERSONALE DIPENDENTE</b>	<b>22.758.771</b>	<b>21.976.057</b>	<b>23.015.900</b>	<b>782.714</b>	<b>3,56%</b>	<b>(257.129)</b>	<b>-1,12%</b>
• Competenze fisse	12.644.802	12.062.328	13.158.200	582.474	4,83%	(513.398)	-3,90%
• Competenze accessorie	4.397.246	5.017.096	4.837.600	(619.850)	-12,35%	(440.354)	-9,10%
• Altre indennità	170.899	203.091	76.200	(32.192)	-15,85%	94.699	124,28%
• Oneri sociali	5.545.824	4.693.542	4.943.900	852.282	18,16%	601.924	12,18%

<b>COSTO DEL PERSONALE RICERCATORE</b>	<b>1.519.862</b>	<b>853.803</b>	<b>1.794.400</b>	<b>666.059</b>	<b>78,01%</b>	<b>(274.538)</b>	<b>-15,30%</b>
• Costo totale	1.519.862	853.803	1.794.400	666.059	78,01%	(274.538)	-15,30%

<b>COSTO COMPLESSIVO DEL PERSONALE DIPENDENTE</b>	<b>24.278.633</b>	<b>21.976.057</b>	<b>23.015.900</b>	<b>2.302.576</b>	<b>10,48%</b>	<b>1.262.733</b>	<b>5,49%</b>
• Costo totale	24.278.633	21.976.057	23.015.900	2.302.576	10,48%	1.262.733	5,49%

Il Costo del Personale, pari a €/000 24.279, comprende anche quello afferente alla cosiddetta Piramide dei Ricercatori, per un importo complessivo pari a €/000 1.620 (a totale carico dei Contributi Ministeriali per la Ricerca Corrente).



Si espone specifica relativa alla “Piramide dei Ricercatori”.

<b>PIRAMIDE DEI RICERCATORI</b>	
<b>PERSONALE DEL RUOLO DELLA RICERCA SANITARIA E DELLE ATTIVITA' DI SUPPORTO ALLA RICERCA SANITARIA</b>	<b>1.520</b>
<b>PERSONALE DEL RUOLO DELLA RICERCA SANITARIA E DELLE ATTIVITA' DI SUPPORTO ALLA RICERCA SANITARIA - TEMPO DETERMINATO</b>	<b>1.020</b>
Competenze fisse Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	702
Competenze da fondo condizioni di lavoro e incarichi Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	24
Competenze da fondo premialità e fasce Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	65
Altre competenze extra fondi Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	1
Oneri sociali su restanti retribuzioni Ricercatore Sanitario a Tempo DETERMINATO	228
<b>PERSONALE DEL RUOLO DELLA RICERCA SANITARIA - COLLABORATORE SANITARIO DI SUPPORTO RICERCA - TEMPO DETERMINATO</b>	<b>449</b>
Competenze fisse Collaboratore Sanitario di Ricerca - Ruolo Sanitario - Tempo DETERMINATO	321
Competenze da fondo condizioni di lavoro e incarichi Collaboratore Sanitario di ricerca - Ruolo Sanitario - Tempo DETERMINATO	12
Competenze da fondo premialità e fasce Collaboratore Sanitario di ricerca - Ruolo Sanitario - Tempo DETERMINATO	15
Altre competenze extra fondi Collaboratore Sanitario di ricerca - Ruolo Sanitario - Tempo DETERMINATO	1
Oneri sociali su restanti retribuzioni Collaboratore Sanitario di ricerca - Ruolo Sanitario - Tempo DETERMINATO	101
<b>PERSONALE DEL RUOLO DELLA RICERCA SANITARIA - COLLABORATORE AMMINISTRATIVO DI SUPPORTO ALLA RICERCA - TEMPO DETERMINATO</b>	<b>52</b>
Competenze fisse Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	36
Competenze da fondo condizioni di lavoro e incarichi Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	1
Competenze da fondo premialità e fasce Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	3
Oneri sociali su restanti retribuzioni Comparto Collaboratore Amministrativo di Ricerca - Ruolo Amministrativo - Tempo DETERMINATO	11
<b>Totale</b>	<b>1.520</b>
<b>IRAP per competenza</b>	<b>100</b>
<b>Totale costo personale "Piramide dei Ricercatori"</b>	<b>1.620</b>

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

Con riferimento al consuntivo 2023 si riporta schema relativo ai dati calcolati ai fini del rispetto del vincolo ex art. 1 c. 71 e 72 L.23 dicembre 2009, computati al netto degli aumenti contrattuali, dei costi in deroga ex art. 12 bis D. Lgs. n. 502/92 e dei costi afferenti alle categorie protette. Lo stesso vincolo risulta calcolato secondo i parametri comunicati dalla Regione Puglia giusta D.G.R. n. 2293/2018.

Per quanto in ordine all’osservanza del vincolo di spesa predetto, alla data del 31/12/2023 si prospetta il seguente quadro di sintesi:

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



	€/000
Limite spesa Art. 2 c. 71 L. 191/09 (- 1,4 % Spesa 2004) (DGR 1818/2022)	22.730
Costo del personale al netto dei rinnovi contrattuali e Cat. Protette	19.338
<b>Minore spesa rispetto al vincolo</b>	<b>3.392</b>

E' rispettato anche il limite di spesa di cui al c. 28 art. 9 del D.L. n. 78/2010. Di seguito schema riassuntivo come adottato in Delibera del Direttore Generale dell'Ente n. 253/2024.

**SCHEDE RIPILOGATIVE - ANNO 2023**

<b>SPESA SOSTENUTA PER IL PERSONALE A TEMPO DETERMINATO NELL'ANNO 2023 AI FINI DEL RISPETTO DEI VINCOLI DI CUI ALL'ART.9, COMMA 28, DEL D.L. n.78/2010 CONVERTITO CON MODIFICHE NELLA LEGGE n.122/2010</b>	
Totale della spesa sostenuta per l'assunzione di personale con contratto di lavoro Flessibile nell'Anno 2009	1.361.014
Totale spesa sostenuta per Convenzioni con altre Aziende/ Enti del Servizio Sanitario Regionale - Anno 2009	24.050
<b>IN DEDUZIONE:</b> Spesa sostenuta per personale assunto nel 2009 in sostituzione di personale assente dal servizio	0,00
Totale spesa per personale a Tempo Determinato - Anno 2009	1.385.065
<b>Limite di Spesa pari al 50% dell'Anno 2009 (art.9, comma 28, D.L. n.78/2010 )</b>	<b>692.532</b>
Totale spesa sostenuta per assunzioni a Tempo Determinato (Compreso personale in sostituzione, personale in comando e personale COVID) - Periodo: Gennaio - Dicembre 2023	319.446
Totale spesa sostenuta per Convenzioni con Aziende/Enti del SSR e Contratti di lavoro autonomo ex art.7 c.6 Dlgs.n.165/2001 - Periodo: Gennaio - Dicembre 2023	265.178
Totale spesa sostenuta per assunzioni di personale con rapporto di lavoro flessibile - ANNO 2023	584.624
<b>SPESE NON COMPUTABILI AI FINI DELLA VERIFICA DEL LIMITE 2009 (PORTATE IN DEDUZIONE)</b>	
Spesa sostenuta per assunzioni di personale a Tempo Determinato per sostituzione personale assente dal servizio per lunghi periodi (Maternità, Aspettative, Congedi) - Periodo: Gennaio - Dicembre 2023	- 32.432

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





Spesa sostenuta per personale comandato proveniente da altre Aziende/Enti del SSR - Periodo: Gennaio - Dicembre 2023	0,00
Spesa sostenuta per assunzioni di personale a Tempo Determinato per emergenza sanitaria COVID-19 - Periodo: Gennaio - Dicembre 2023	0,00
<b>TOTALE SPESA 2023 NON COMPUTABILE AI FINI DELLA VERIFICA DEL LIMITE 2009</b>	<b>- 32.432</b>
<b>Totale spesa sostenuta per assunzioni di personale con rapporto di lavoro flessibile (al netto delle spese non computabili) - ANNO 2023</b>	<b>552.193</b>
<b>Disponibilità Residua 2023 rispetto al Limite del 50% dell'anno 2009</b>	<b>140.440</b>

## ALTRI PROVENTI E ONERI

	CE 2023	CE 2022	Budget 2023	Delta CE 2023 - CE 2022		Delta CE 2023 - Budget 2023	
				Valori	%	Valori	%
<b>PROVENTI E ONERI FINANZIARI</b>	<b>(2.520)</b>	<b>(986)</b>	<b>(20.000)</b>	<b>(1.535)</b>	<b>155,70%</b>	<b>17.480</b>	<b>-87,40%</b>
• Interessi attivi	224	17	0	224	#DIV/0!	224	#DIV/0!
• Altri proventi	0	25	0	(25)	100,00%	0	0,00%
• Interessi passivi	2.744	1.028	20.000	1.717	166,99%	(17.256)	-86,28%
- su debiti	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- su anticipazioni	0	1.028	10.000	(1.028)	100,00%	(10.000)	100,00%
- interessi moratori	2.744	0	10.000	2.744	#DIV/0!	(7.256)	-72,56%
• Altri oneri	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%

<b>PROVENTI E ONERI STRAORDINARI</b>	<b>(262.978)</b>	<b>(17.280)</b>	<b>0</b>	<b>- 245.698</b>	<b>1421,89%</b>	<b>- 262.978</b>	<b>#DIV/0!</b>
• Proventi straordinari	359.018	401.326	0	(42.307)	-10,54%	359.018	#DIV/0!
- plusvalenze patrimoniali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- sopravvenienze attive e insussistenze del passivo	359.018	401.326	0	(42.307)	-10,54%	359.018	#DIV/0!
- concorsi, recuperi, rimborsi attività non tipiche	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
• Oneri straordinari	621.996	418.605	0	203.391	48,59%	621.996	#DIV/0!
- minusvalenze patrimoniali	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%
- sopravvenienze passive e insussistenze dell'attivo	621.996	418.605	0	203.391	48,59%	621.996	#DIV/0!
- accantonamenti non tipici dell'esercizio	0	0	0	0	0,00%	0	0,00%

IMPOSTE E TASSE	1.798.103	1.648.741	1.863.730	149.361	9,06%	-65.627	-3,52%
-----------------	-----------	-----------	-----------	---------	-------	---------	--------

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



• Imposte, tasse e tributi	0	0	15.000	0	0,00%	-15.000	100,00%
• IRAP	1.798.103	1.648.741	1.848.730	149.361	9,06%	-50.627	-2,74%

Gli oneri finanziari rilevati nel 2023 presentano un saldo pari a €/000 3 addebitabile a interessi passivi su Anticipazione di Cassa forniti dall'Ente Tesoriere dell'IRCCS "de Bellis", come richiesto con Provvedimento n. 4/2023.

## PROVENTI E ONERI STRAORDINARI

I proventi e oneri straordinari per il 2023 presentano un saldo negativo pari a €/000 -263.

Tale risultato riviene dalle seguenti principali voci.

Gli oneri straordinari sono rappresentati a CE da complessivi €/000 623 e specificatamente:

Sopravv.ze pass. riguardanti Irap	1
Sopravv.ze pass. rel. ad acquisto di beni e servizi	600
Altre sopravvenienze passive	12
Insuss. pass. relative ad acquisto di beni e ser.	8
Altre insussistenze passive	1
<b>Totale</b>	<b>621</b>

I proventi straordinari sono rappresentati a CE da complessivi €/000 359 e specificatamente:

Sopravvenienze attive diverse	64
Sopravvenienze att relative ad acq. di beni e serv	294
Insussistenze attive v/Aziende sanitarie pubbliche della Regione	1
<b>Totale</b>	<b>359</b>

Gli "Accantonamenti Tipici dell'Esercizio" impattano sul bilancio secondo le seguenti voci di costo, per un totale di €/000 2.496:

Accant. fondi altri oneri diversi	104
Accant. fondo oneri rinnovi contrat. Dirigenza medica	225
Accant. fondo oneri rinnovi contrat. Dirigenza NON medica	44
Accant. Incentivi funzioni tecniche art. 113 D.lgs 50/2016	218
Accant. per vertenze giudiziarie e contenz.	82
Accant. per copertura diretta dei rischi (autoassicurazione)	100

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Accant. per interessi di mora	30
Accant. per quote inutilizzate contributi da soggetti pubblici (extra fondo) vincolati	156
Accant. per quote inutilizzate contributi da soggetti pubblici per ricerca	1.537
<b>Totale</b>	<b>2.496</b>

La voce *Imposte e tasse* per l'anno 2023 incrementa il valore rispetto all'Esercizio precedente, per €/000 149 e si attesta su €/000 1.798. Tale voce è alimentata quasi esclusivamente dall'Imposta Regionale sulle Attività Produttive.

Di seguito l'analisi puntuale dell'aggregato:

IRAP su pers. dip. (Base imp.le Redditi da Lavoro)	1.492
IRAP su pers. dip. (Base imp.le Redditi da Lavoro) - Ricercatori	100
IRAP su altre categ. (Base Imp.le Redditi)	93
IRAP su attività libero professionale	107
IRAP su consulenze art. 55 co.2 e L. 1/2002 (c.d. prestazioni aggiuntive)	6

## ESAME INCREMENTO 2% DEI COSTI AL 31/12/2023 E BILANCIO 2004

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

Tra esse si evidenziano:

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

Sintesi in €/000

Tot. Costi Governabili Bilancio 2004	Incremento del 2% annuo	Totale tetto	Tot. Costi Governabili Bilancio Eserc. 2023	Incremento percentuale
5.694	1.139	6.833	37.569	378%

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



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

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

## SINTESI DATI DI BILANCIO

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

## ESAME DELLA SITUAZIONE PATRIMONIALE

VOCI DI BILANCIO	VALORI IN BILANCIO		COMPOSIZIONE %	
	31/12/2023	31/12/2022	31/12/2023	31/12/2022
DISPONIBILITA' LIQUIDE	1.210	390	-7	-2
CREDITI OPERATIVI, RATEI E RISCONTI ATTIVI	32.349	29.886	-174	-182
DEBITI OPERATIVI, RATEI E RISCONTI PASSIVI	-14.985	-13.897	81	85
<b>ATTIVO REALIZZABILE NETTO</b>	<b>18.573</b>	<b>16.380</b>	<b>-100</b>	<b>-100</b>
MAGAZZINO	1.529	827	3	2
IMMOBILIZZAZIONI MATERIALI - IMMATERIALI	27.299	23.944	58	58
IMMOBILIZZAZIONI FINANZIARIE	15	15	0	0
<b>CAPITALE INVESTITO</b>	<b>47.416</b>	<b>41.166</b>	<b>-39</b>	<b>-40</b>
FONDI ACCANTONAMENTO	12.249	10.600	26	26
PATRIMONIO NETTO	35.167	30.566	74	74
<b>COPERTURE FINANZIARIE</b>	<b>47.416</b>	<b>41.166</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Dai dati in tabella si può evincere un sostanziale pareggio rispetto all'esercizio precedenti dei crediti e dei debiti operativi dell'Ente rivenienti dai rapporti con il Ministero della Salute.

I crediti ammontano a €/000 32.348 e si attestano su €/000 1.058 verso Ministero, per €/000 1.026, di cui €/000 556 per investimenti e €/000 502 per ricerca, mentre verso Regione Puglia per €/000 30.629, di cui €/000 9.460 di parte corrente e €/000 21.168 per Investimenti.

I crediti verso aziende del SSR ammontano a €/000 90, €/000 11 VS/Erario e €/000 560 verso altri, al netto del Fondo Svalutazione crediti pari a €/000 84.

Di seguito si specifica dettaglio della debitoria in/000.

Altri crediti diversi	150
Crediti v/person. dip. per antic., prest. e altro	18
Crediti v/altri soggetti pubblici	18

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



Crediti v/clienti privati	406
Fatture e ric. da emettere a Clienti Privati	51
F.do Svalut. Crediti da Clienti	- 84
<b>Totale</b>	<b>560</b>

I Risconti Attivi ammontano a €/000 15, mentre quelli Passivi a €/000 540, questi ultimi principalmente afferibili a ricavi relativi ad attività di ricerca clinica.

Nella seguente tabella, invece, si esplica la situazione relativa alla consistenza dei Fondi Rischi ed Oneri che vedono un saldo complessivo pari a €/000 12.249.

F.do rinnovo contratt. pers. Dirig. Medica	845
F.do rinnovo contratt. pers. Dirig. Sanit. Non Medica	152
F.do rinnovo contratt. pers. Dirig. Prof.le	5
F.do rinnovo contratt. pers. Dirig. Amm.va	27
F.do rinnovo contratt. pers. Comparto	30
F.do per interessi di mora	145
Altri fondi	169
Fondo incentivi funzioni tecniche art. 113 D.lgs 50/2016	60
Fondo BALDUZZI ex L.189/2012	98
F.do rischi per cause civili ed oneri processuali	355
F.do rischi per copertura diretta dei rischi (autoassicuraz.)	3.660
F.do quote inutiliz. contrib. da Reg. per quota F.S. vinc.	155
Fondo quote inutilizzate contributi per ricerca e sperimentazioni cliniche	6.548
<b>totale</b>	<b>12.249</b>

I Fondi “Rischi”, nello specifico:

	2023	2022	Delta 2023/2022
<b>FONDI PER RISCHI</b>	<b>4.160</b>	<b>4.337</b>	
Fondo rischi per cause civili ed oneri processuali	355	277	78
Fondo rischi per copertura diretta dei rischi (autoassicurazione)	3.660	3.917	- 257
Altri fondi rischi (Fondi a copertura Interessi di mora)	145	143	2

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





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

Descrizione	Consistenza fondo (€/000)
Progetto PNC-TT Network	789
Fondo quote inutilizzate contributi per ricerca Misura 5X1000	247
Fondo per la Piramide dei Ricercatori	5.369
Fondo Progetto SG-SMYD3	77
Fondo Progetto UVAR	2
Progetto iParaCyts	117
<b>Totale</b>	<b>6.599</b>

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

F.do Formazione area SPTA	4
F.do Regolamento Sperime. Clin. Art. 12 _D. Sc.	96
F.do Regolamento Sperime. Clin. Art. 12 _D. San.	18
Altri fondi per Produttività Pers. Piramide	51
<b>Totale</b>	<b>169</b>

#### Fondo Svalutazione Crediti

	2023	2022
<b>FONDI SVALUTAZIONE CREDITI</b>	<b>84</b>	<b>84</b>
Fondo Svalut. Crediti da Clienti	84	84



## ANALISI PATRIMONIO NETTO

Il Bilancio di Esercizio 2023 presenta un valore a **PATRIMONIO NETTO** pari a €/000 35.167, in incremento rispetto al 2022 per €/000 4.601.

	2023	2022	Delta 2023/2022
<b>Fondo di dotazione</b>	<b>1.205</b>	<b>1.205</b>	<b>0</b>
<b>Finanziamenti per investimenti</b>	<b>39.408</b>	<b>39.148</b>	<b>260</b>
1) Finanziamenti per beni di prima dotazione	-	-	0
2) Finanziamenti da Stato per investimenti	13.842	14.702	-860
a) Finanziamenti da Stato ex art. 20 Legge 67/88	9.187	4921	4.266
b) Finanziamenti da Stato per ricerca	40	76	-36
c) Finanziamenti da Stato - altro	4.615	9.705	-5.090
3) Finanziamenti da Regione per investimenti	10.582	10.632	-50
4) Finanziamenti da altri soggetti pubbl, per investimenti	12.308	12308	0
4) Finanziamenti per investimenti da rettifica contributi in conto esercizio	2.675	1.505	1.170
Riserve da donazioni e lasciti vincolati ad investimenti	12	16	-4
Altre riserve	-	0	0
Utili (perdite) portati a nuovo	123	123	0
Utile (perdita) dell'esercizio	- 5.581	-9.926	4.345
<b>Totale Patrimonio Netto</b>	<b>35.167</b>	<b>30.566</b>	<b>4.003</b>

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727







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

**Prospetto pagamento fornitori al 31.12.2023**

Importo dei pagamenti effettuati dopo la scadenza	€/000 5.885
Indice di tempestività dei pagamenti	- 14

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

**CONCLUSIONI**

Il Bilancio di Esercizio 2023 presenta una perdita pari a €/000 5.281, in decremento rispetto al 2022 per €/000 4.344.

Tale perdita è stata autorizzata dalla Regione Puglia e pertanto oggetto di copertura, giusta Determina Dirigenziale Dipartim. Promoz. Salute della Reg. Puglia n. 34/2024 avente a Oggetto "Riparto Provvisorio delle Risorse del Fondo Regionale per il bilancio d'esercizio 2023, in favore degli enti del SSR".

La gestione dell'Istituto, all'indomani dell'asfissiante periodo segnato dalla crisi pandemica, è stata caratterizzata da una importante innovazione in termini di organizzazione e asset funzionali alla erogazione di prestazioni, siano esse svolte in regime ordinario sia specialistico.

Infatti i risultati sono stati importanti considerato il certificato incremento dei livelli produttivi dell'Ente.

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727





I ricavi rilevati nell'esercizio 2023 per attività per prestazioni sanitarie hanno fatto rilevare un incremento pari a €/000 7.816, da menzionare €/000 7.309 per prestazioni di ricovero e specialistica e per €/000 507 per attività intramoenia.

Importante è segnalare un altro risultato positivo, quello di un maggiore riconoscimento delle Funzioni dalla Regione incrementate di €/000 1.400, ulteriore a quanto già avvenuto rispetto al 2022, e attestante l'ormai certificato sviluppo in termini strutturali dell'Istituto.

L'aumento delle attività, è evidente, ha determinato un incremento dei costi operativi che vede spesa del personale un segnale evidente, ma funzionale, considerato che ha fortemente contribuito alla crescita produttiva dell'Ente. Ugual commento va espresso riguardo ai costi per acquisizione di beni materiali e di servizi non sanitari in linea con le nuove esigenze di una struttura particolarmente cresciuta e presente sul territorio.

I significativi risultati raggiunti nella gestione del paziente e del suo percorso nei diversi protocolli di cura e chirurgici dovranno essere ulteriormente sviluppati nel corso del 2024, con particolare attenzione nei confronti del paziente obeso e dall'intervento chirurgico bariatrico.

Nello specifico, a seguito dell'ormai conclusa realizzazione di un altro reparto operatorio, dotato di altri due tavoli operatori, sarà resa più ampia e organizzata la offerta chirurgica che vedrà un incremento di tutte le prestazioni di chirurgia.

Dovranno essere completate le attivazioni di altri posti letto già autorizzati dalla Regione di oncologia e di chirurgia al fine di poter dare risposte concrete alle richieste dei pazienti oncologici e non dell'intero territorio regionale.

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

Castellana Grotte (BA), 30/04/2024

**F.to**

**II DIRETTORE GENERALE**

**Dr. Tommaso A. Stallone**

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

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

Sede legale ed operativa: via Turi 27

70013 Castellana Grotte (BA)

C.F. – P. iva: 00565330727



# RELAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE

## ANNO 2023

Direzione Scientifica

*istituto nazionale  
di gastroenterologia*

*de Bellis - Castellana Grotte*



**IRCCS**



## SOMMARIO

<b>LINEA DI RICERCA 1</b> .....	<b>4</b>
VALIDAZIONE IN PAZIENTI DI TARGET TERAPEUTICI RESPONSABILI DELLA CHEMIO-RESISTENZA NEI TUMORI GASTROINTESTINALI.....	5
UP-REGOLAZIONE DELLE PROTEINA GASDERMINA E MEDIANTE INIBIZIONE DEL RILASCIO ESOSOMIALE COME NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NELL'AMBITO DELLE PATOLOGIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO.....	13
LA METILTRASFERASI SMYD3 COME NUOVO BERSAGLIO MOLECOLARE NEI TUMORI GASTRO/ENTERO/PANCREATICI.....	25
CARATTERIZZAZIONE EPIGENETICA MEDIATA DA SMYD3 E VALUTAZIONE DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI DEL TRATTO GASTROINTESTINALE.....	45
IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POTENZIALI TARGET MOLECOLARI PER CONTRASTARE LA FARMACORESISTENZA NEL TRATTAMENTO DEI CARCINOMI DEL TRATTO GASTROENTERICO.....	75
NUOVE FORMULAZIONI LIPOSOMALI PER IL TARGETING SIMULTANEO DEL PATHWAY DI NOTCH IN EPATOCARCINOMA E DELL'INFLAMMASOMA NLRP3 IN MACROFAGI ASSOCIATI A TUMORE.....	89
SMYD3, SCREENING TRIPEPTIDICO IN SILICO, INTERATTOMA DI SMYD3, CANCRO DEL COLON RETTO, HALLMARKS DEL CANCRO, STIMOLI STRESSORI, RISPOSTA ADATTATIVA DELLE CELLULE TUMORALI A STIMOLI STRESSORI.....	100
NANOPARTICELLE BIOMIMETICHE COME NUOVA STRATEGIA PER IL TRASPORTO DI FARMACI NELLE TERAPIE ONCOLOGICHE DEL TRATTO GASTRO-ENTERICO.....	131
NOTCH ED INFLAMMASOMA NELLA.....	138
PATOGENESI DEL COLANGIOCARCINOMA.....	138
RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA A TERAPIE SISTEMICHE NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA GASTRICO.....	155
RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DI... ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO.....	182
LA CLAUDINA 18.2: POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO PER ZOLBETUXIMAB NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO DUTTALE.....	192
<b>LINEA DI RICERCA 2</b> .....	<b>195</b>
STUDIO PILOTA PER LA VALUTAZIONE DEI CORRELATI DI IMAGING EPATICO CON SCANSIONE IN RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (RMN) E DEI BIOMARCATORI SIERICI DI MAFLD IN PAZIENTI CON SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO (PCOS).....	196
SVILUPPO DI STRATEGIE TERAPEUTICHE BASATE SUI MIRNAS IN MODELLI PRECLINICI DI MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI.....	202



HELICOBACTER PYLORI: ASSOCIAZIONE DEL FATTORE DI VIRULENZA CAGA E RESISTENZE ANTIBIOTICHE.....	225
EFFETTI DELL'ATTIVITÀ FISICA INDOOR SULL'INTEGRITÀ E FUNZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE DI PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E FIBROMIALGIA.....	232
VALUTAZIONE RETROSPETTIVA PER L'INDIVIDUAZIONE DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO CON VEDOLIZUMAB.....	246
UTILIZZO DEI BIOMARCATORI EMATICI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELL'EPATOCARCINOMA (HCC).....	254
EFFETTI DEL CONSUMO DI ARANCE SUL METABOLISMO GLUCIDICO E LIPIDICO IN SOGGETTI CON MAFLD: STUDIO IN VITRO E TRIAL CLINICO.....	265
<b>LINEA DI RICERCA 3.....</b>	<b>270</b>
VALUTAZIONE DI APPROCCI ALTERNATIVI PER IL MIGLIORAMENTO DEL PROFILO SINTOMATOLOGICO E LA QUALITÀ DELLA VITA IN PAZIENTI CON SINDROME DEL COLON IRRITABILE (IRRITABLE BOWEL SYNDROME – IBS)	271
VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI AGENTI SENOLITICI NATURALI IN MODELLI SPERIMENTALI DI TUMORI GASTROENTEROLOGICI.....	279
CAMBIAMENTI NEL PROFILO LIPIDOMICO, IMMUNOLOGICO E DEI MICRORNA CIRCOLANTI IN PAZIENTI CON PATOLOGIA EPATO-BILIARE, AFFETTI DA OBESITÀ PATOLOGICA SOTTOPOSTI AD UN INTERVENTO DIETETICO E/O AD INTERVENTO DI CHIRURGIA BARIATRICA.....	287
VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE NEL PAZIENTE CON OBESITÀ E NAFLD: IMPATTO DELLA DIETA CHETOGENICA SUI MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI DI EPATOPATIA.....	295
DIET-MAP: DIETA E DETERMINANTI METABOLICI NELLA CONVERSIONE DA PSORIASI AD ARTRITE PSORIASICA.....	303



## LINEA DI RICERCA 1

### INNOVAZIONE IN DIAGNOSTICA E TERAPIA DELLE NEOPLASIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

**Responsabile Scientifico:** Gianluigi Giannelli

#### Descrizione

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

#### Obiettivi

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



## TITOLO DEL PROGETTO

### **VALIDAZIONE IN PAZIENTI DI TARGET TERAPEUTICI RESPONSABILI DELLA CHEMIO-RESISTENZA NEI TUMORI GASTROINTESTINALI**

**Ricercatori responsabili:** Valentina Grossi

**Settore di ricerca:** Genetica Medica Sperimentale

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

## INTRODUZIONE

In Italia i tumori del colon-retto (CCR) sono in assoluto i più frequenti (13% dei nuovi tumori diagnosticati all'anno in entrambi i sessi); in particolare, rappresentano la terza neoplasia più frequente negli uomini (dopo i tumori della prostata e del polmone) e la seconda nelle donne (dopo il tumore della mammella). Inoltre, il 25% dei pazienti va incontro a recidiva anche dopo resezione del tratto interessato dalla neoplasia. Attualmente, il principale trattamento terapeutico è la chemioterapia, capace di distruggere le cellule in attiva replicazione mediante il danneggiamento del DNA. Durante la fase S/G2, le rotture a doppio filamento (Double strand breaks: DSBs) vengono riparate per Ricombinazione Omologa (Homologous Recombination: HR). L'attivazione dei sistemi di riparo del DSB è uno dei principali meccanismi che promuovono la chemioresistenza, pertanto terapie mirate che agiscono su di essa risultano essere una potenziale strategia terapeutica, così come è stato già descritto per BRCA1, BRCA2 e RAD51 [1-5]. Tant'è vero che oggi alcuni trials clinici prevedono la caratterizzazione delle mutazioni dei geni dell'HR e dello status dell'HRD (homologous recombination deficiency) score per valutare la resistenza alle terapie a base di derivati del platino.

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

SMYD3 è una proteina altamente espressa in circa un terzo dei pazienti con CCR [6-10]. Nonostante sia un'istone H3K4 metil-transferasi, vari studi suggeriscono che la



sua attività oncogenica possa anche essere mediata da interazioni funzionali con proteine non istoniche. Quindi, al fine di comprendere al meglio il ruolo di SMYD3 nella chemioresistenza è di fondamentale importanza l'identificazione di nuovi interattori.

Recentemente è stato dimostrato come SMYD3 abbia un ruolo fondamentale nel riparo del DSB con la formazione dei complessi dell'HR, in esperimenti con neocarziostatina (che induce DSB) e inibitore di SMYD3 [11, 12], confermando che alti livelli proteici di SMYD3 nelle cellule tumorali siano richiesti per la riparazione del DNA e siano responsabili della chemioresistenza. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato un lavoro, i cui dati dimostrano che SMYD3 è un interattore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture a DSBs. La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi dell'HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di 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 [13].

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

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

Studio dell'espressione tissutale di SMYD3 nei tumori gastroenterologici di pazienti sottoposti a terapia neo-adiuvante (tumori del retto localmente avanzati, carcinomi gastrici avanzati) e recidivati dopo terapia adjuvante. I campioni saranno sottoposti ad analisi dell'espressione genica a livello tissutale (trascrittomica spaziale) su tessuti fissati in formalina (FFPE) e sottoposti a sequenziamento NGS.

Per valutare il potenziale dell'applicazione clinica della proposta terapeutica valuteremo per prima cosa l'espressione tissutale di SMYD3 in una coorte di pazienti sottoposti a terapia neo-adiuvante (tumori del retto localmente avanzati, carcinomi gastrici avanzati) e recidivati dopo terapia adjuvante classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati che mostreranno elevati livelli di espressione





di SMYD3 verranno avviati ad analisi di trascrittomica spaziale (10x Genomics) e sequenziamento NGS (in service). Attraverso la trascrittomica spaziale si potrà riuscire ad individuare centinaia o migliaia di trascritti su un singolo tessuto, andando a localizzarli in modo preciso in base al loro contesto biologico. Grazie a questa tecnologia sarà possibile studiare l'eterogeneità dell'espressione genica di diverse regioni di uno stesso tessuto, o di specifiche popolazioni cellulari presenti, o ancora di distinguere i profili di espressione di zone di tessuto interessate da processi patologici (tumori) rispetto a zone che appaiono normali o rispetto a tessuti di controllo.

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

## Obiettivo specifico 2

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

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

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

Data la loro capacità di mantenere inalterate le caratteristiche del tessuto e del paziente d'origine e di espandersi illimitatamente, gli organoidi saranno poi utilizzati per gli studi in vitro. Sulla base delle analisi del profilo trascrittomico dei campioni a livello tissutale, gli organoidi tumorali verranno trattati secondo protocolli personalizzati con inibitori di SMYD3 in combinazione con CHT convenzionale. Testeremo l'efficacia di un nuovo inibitore EM127 recentemente pubblicato (PMID: 36116234) e brevettato (n. 102022000021138). Il nuovo inibitore covalente di SMYD3, può agire con maggiore potenza e selettività rispetto agli inibitori SMYD3 di prima generazione e può esercitare effetti anti-tumorali di lunga durata a causa dell'inattivazione completa e irreversibile dell'attività enzimatica. I risultati in vitro hanno mostrato che il nuovo composto EM127 ha indotto una significativa riduzione della crescita delle cellule tumorali del CCR in



modo molto più efficiente degli inibitori commercialmente disponibili, BCI-121 e EPZ031686.

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

### **Obiettivo specifico 3**

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

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

### **DATI PRELIMINARI**

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

In collaborazione con l'unità di Chirurgia che ha seguito i pazienti nel decorso clinico abbiamo selezionato quelli che possiedono i requisiti richiesti secondo la proposta

progettuale (pazienti con tumori del retto localmente avanzati e carcinomi gastrici avanzati sottoposti a terapia neo-adiuvante).

Abbiamo poi valutato l'espressione tissutale di SMYD3 nei tessuti di 10 pazienti, classificati nell'archivio dell'unità di Anatomia Patologica. I tessuti analizzati mostrano elevati livelli di espressione di SMYD3 nelle area neoplastiche proliferativamente attive residue post terapia neo adjuvante (figura 1). Il risultato ottenuto ha un significato maggiore dal punto di vista clinico/traslazionale, visto che il target farmacologico è rappresentato proprio dalla proteina SMYD3. Come controllo della colorazione viene sempre incluso una porzione di tessuto normale (staining negativo) e porzione muscolare nel quale SMYD3 risulta fisiologicamente espresso (staining positivo).

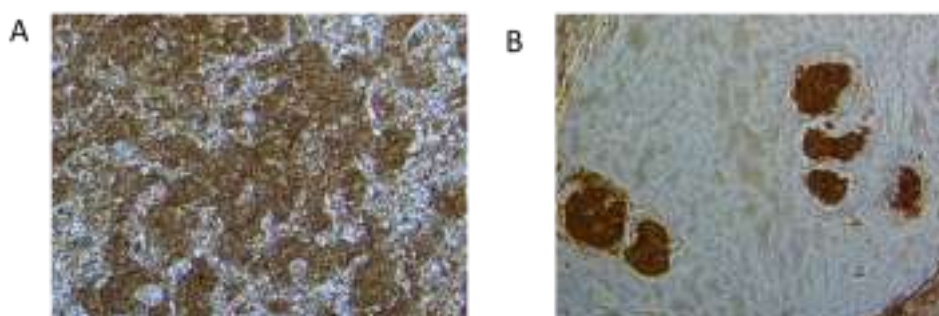


Figura 1. Analisi rappresentativa immunohistochimica di SMYD3 in metastasi epatica metacrona del carcinoma del retto (A) e residui di cellule neoplastiche in un carcinoma del retto medio dopo neo adjuvante (B).

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

**Obiettivo 1.** La valutazione dell'espressione di SMYD3 sarà effettuata con metodica 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  $\chi^2$  a seconda dei casi, analisi ANOVA, test T per campioni indipendenti.

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

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



Verranno testati in vitro gli inibitori di SMYD3 e CHT convenzionale per valutare l'effetto chemo sensibilizzante dell'inibizione farmacologica di SMYD3. Verranno condotti saggi per valutare la risposta apoptotica, l'induzione autofagica e la sopravvivenza cellulare (ad es. clivaggio delle caspasi, conversione di LC3, analisi di microscopia e biochimiche).

**Obiettivo 3.** Una parte degli organoidi dei pazienti ottenuti da pezzi operatori freschi dei tumori sopracitati e trattati con le varie combinazioni farmacologiche verranno inclusi in OCT e/o paraffina per le analisi di Trascrittomica spaziale, tecnologia VISIUM (kit 10x Genomics) e sequenziamento NGS (service Illumina). L'analisi di RPPA (reverse phase protein array) verrà condotta in service per gli stessi campioni presso il Servizio Tecnico Scientifico Grandi Strumentazioni e Core Facilities dell'Istituto Superiore di Sanità.

## RISULTATI ATTESI

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

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

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

## INNOVAZIONI

Grazie al piano sperimentale proposto, ci aspettiamo di caratterizzare a livello funzionale il ruolo di SMYD3 nei processi di riparo del DNA e nella risposta alla terapia. Ci aspettiamo anche di valutare il potenziale della manipolazione di SMYD3



per aumentare la chemiosensibilizzazione, utile per concepire strategie terapeutiche mirate. In particolare, nuovi approcci terapeutici per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3, basati sull'uso di inibitori small molecule di SMYD3 (di cui uno, EM127 è già oggetto di brevettazione), può aiutare a superare la resistenza tumorale ai farmaci esistenti, così da permettere non solo di ridurre la dose e gli effetti collaterali, ma anche di trattare i tumori che non rispondono alle comuni terapie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Husain A, et al. BRCA1 Up-Regulation Is Associated with Repair-mediated Resistance to m Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 1998;58:1120-1123.
2. Hine CM, et al. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:20810-20815.
3. Ohnishi T, et al. In Vitro and in Vivo Potentiation of Radiosensitivity of Malignant Gliomas by Antisense Inhibition of the RAD51 Gene *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:319-324.
4. Carreira A, et al. The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell.* 2009;136:1032-43.
5. Venkitaraman AR, et al. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 2002; 108(2):171-82.
6. Cock-Rada AM, et al. SMYD3 Promotes Cancer Invasion by Epigenetic Upregulation of the Metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res* 2012;72:810–20.
7. Luo XG, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters.* 2014;344:129–37.
8. Peserico A, et al., A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol.* 2015. 230(10):2447-2460.
9. Kim H, et al. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284:19867–77.
10. Mitchell LH, Boriack-Sjodin PA, Smith S, Thomenius M, Rioux N, Munchhof M, et al. Novel Oxindole Sulfonamides and Sulfamides: EPZ031686, the First Orally Bioavailable Small Molecule SMYD3 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2015 Aug 27;7(2):134-8.
11. Chen YJ, et al. SMYD3 Promotes Homologous Recombination via Regulation of H3K4- mediated Gene Expression. *Scientific Reports.* 2017; 7: 3842.



12. Sanese P, et al. Targeting SMYD3 to Sensitize Homologous Recombination-Proficient Tumors to PARP-Mediated Synthetic Lethality. Science. 2020; 23,101604.

13. Telly ML and Ford JM. PARP inhibitors in breast cancer. Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2010; 8, 629-635.

## TIMELINE

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

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

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





## TITOLO DEL PROGETTO

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

**Ricercatori responsabili:** Roberto Negro

**Settore di ricerca:** Medicina Personalizzata

**Parole chiave del progetto:** HCC, GSDME, Caspasi-3, esosomi, TRIM21, inflammasoma, piroptosi

## INTRODUZIONE

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

Nell'ultimo decennio c'è stato un miglioramento nella comprensione della patogenesi molecolare di HCC; le analisi genomiche hanno fornito informazioni riguardo i principali responsabili dell'iniziazione e della progressione di HCC. Ogni HCC ha una media di 40 aberrazioni genomiche e di queste alcune sono considerate driver (3). L'alterazione del microambiente è una caratteristica chiave del cancro ed è noto per essere coinvolto in tutte le fasi di progressione del tumore: dalla trasformazione iniziale fino alle fasi di invasione e metastasi (4,5). Poiché il carcinoma epatocellulare è strettamente associato a un fenomeno infiammatorio, il microambiente immunitario ha un ruolo fondamentale nella patogenesi di questa malattia (6).

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



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

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

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

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

1. valutare l'espressione della GSDME in cellule e tessuti di epatocarcinoma rispetto alla controparte normale, per valutare una possibile strategia terapeutica che ne permetta l'espressione, a svantaggio delle cellule tumorali.
2. valutare se la sua eventuale mancata espressione nella controparte tumorale, è dovuta all'azione regolatrice esercitata dal TGF $\beta$ , presente abbondantemente nel microambiente tumorale di HCC, attraverso metilazione del promotore o altri meccanismi, seguito da uno studio sul meccanismo molecolare, al fine di realizzare nuove potenziali strategie terapeutiche.





## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

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

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

1. Screening trascrizionale e proteico per la GSDME di linee cellulari tumorali, fibroblasti associati al tumore e cellule primarie di HCC in rapporto alla loro controparte wild-type (linee cellulari) e peri-tumorali (fibroblasti non tumorali, e cellule primarie).
2. Studio del meccanismo molecolare attraverso il quale le cellule tumorali riescono a ridurre i livelli citosolici della GSDME; in dettaglio, dati preliminari dimostrano come le stesse cellule tumorali (linee cellulari e primary cells) secernano GSDME attraverso la fuoriuscita di esosomi, la quale, a sua volta, è drasticamente inibita da TGF $\beta$ . Pertanto, l'inibizione della biogenesi/rilascio esosomiale, da parte di farmaci già conosciuti (GW4869 o Manumicina), che mimino l'azione del TGF $\beta$ , consentirebbe una strategia di accumulo di GSDME all'interno della cellula. Tali esperimenti verranno condotti in vitro su linee cellulari e cellule primarie (fibroblasti e HCC).
3. Attivazione del pathway della GSDME con conseguente morte cellulare in vitro ed in vivo. Gli esperimenti in vitro verranno effettuati su cellule di HCC (linee cellulari e cellule primarie), utilizzando i classici inibitori della biogenesi/secrezione degli esosomi, affiancati all'utilizzo dell'attivatore della caspasi-3, raptinal, che a sua volta interviene sulla GSDME attivandone le sue funzioni pro-apoptotiche. La parte in vivo prevede l'utilizzo di modelli murini di HCC, in particolare topi con tumori ectopici di HCC (mediante injection sottocute di cellule tumorali quali HLC19 e PLC/PRF/5) ai quali verrà somministrata la combinazione dei due farmaci in questione (GW4859 + raptinal), e per i quali verrà studiato l'andamento del tumore dal punto di vista morfologico.

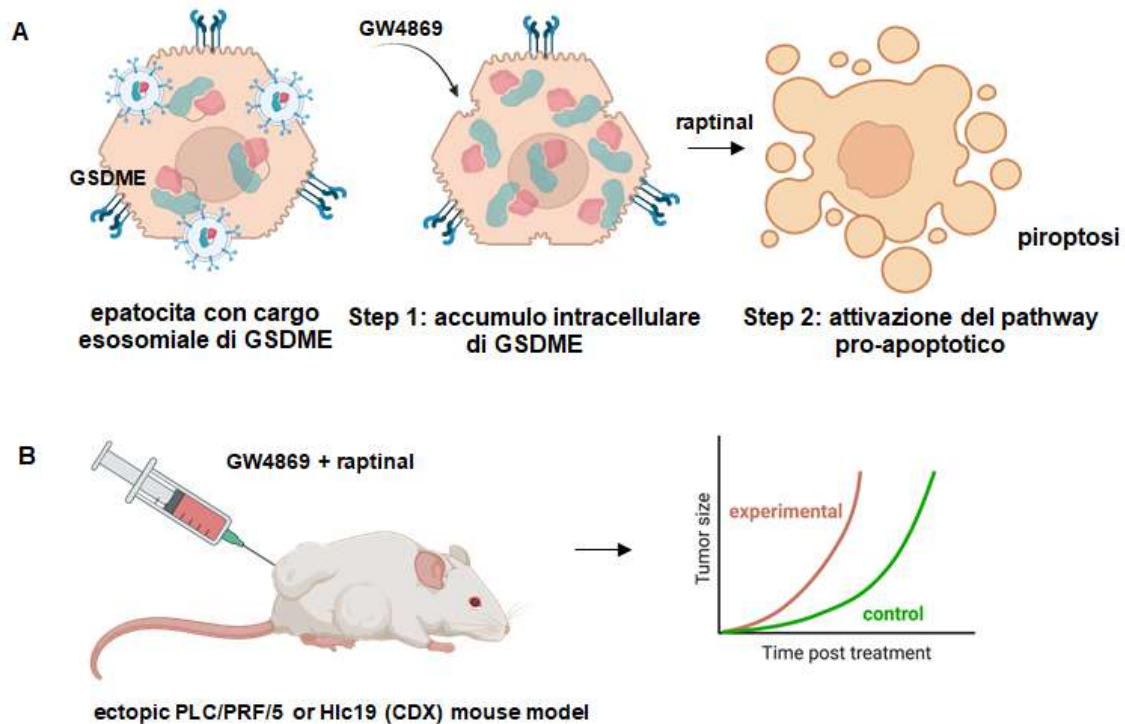


Figura 1: Rappresentazione schematica degli obiettivi specifici in vitro (A) ed in vivo (B).

## DATI PRELIMINARI

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

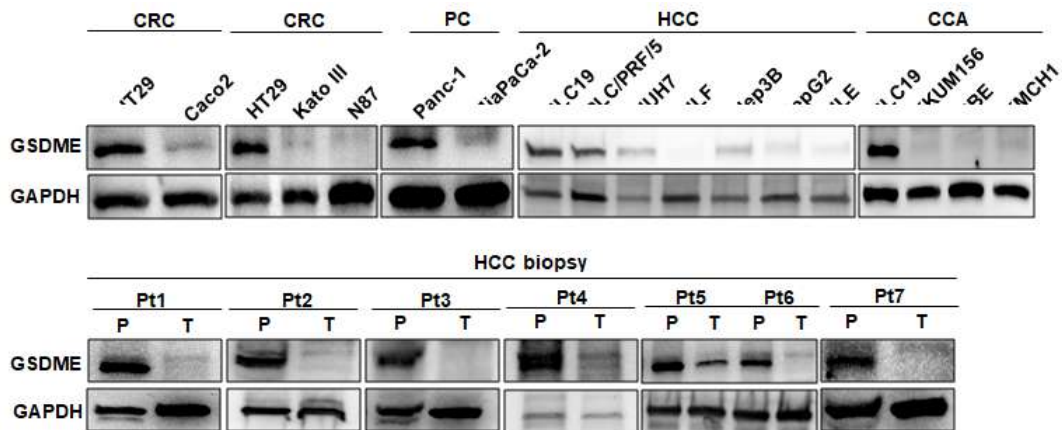


Figura 2: Analisi di Western Blot per valutare l'espressione di GSDME in linee cellulari tumorali di vari tumori del tratto gastro-enterico (in alto) e in cellule primarie provenienti da campioni biotici di HCC (in basso). CRC = colorectal cancer, PC = pancreatic cancer, HCC = hepatocarcinoma, CCA =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

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

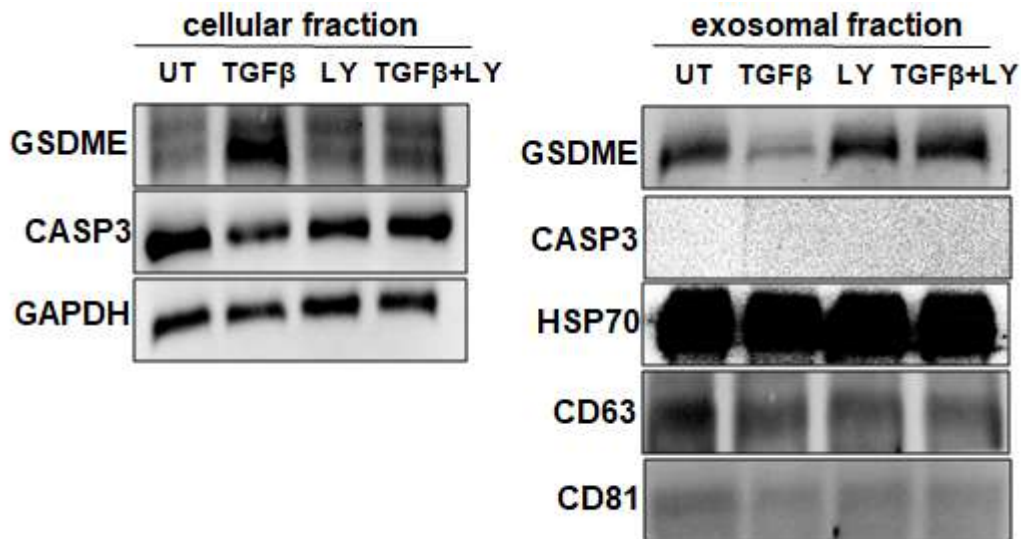


Figura 3: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con TGF. Gli estratti proteici derivano da cellule e da esosomi derivanti dalle stesse.

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

è plausibile prevedere un suo utilizzo in terapia anti-tumorale, abbiamo effettuato esperimenti successivi utilizzando inibitori della biogenesi/rilascio esosomiale, quali GW4869 e Manumicina.

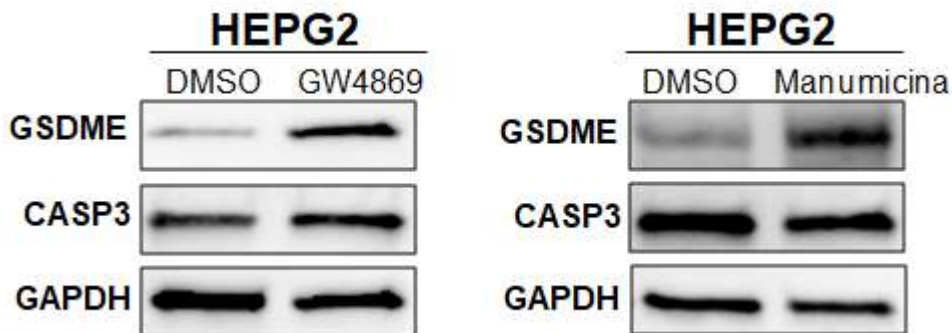


Figura 4: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con due diversi inibitori della biogenesi degli esosomi: GW4869 e Manumicina.

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

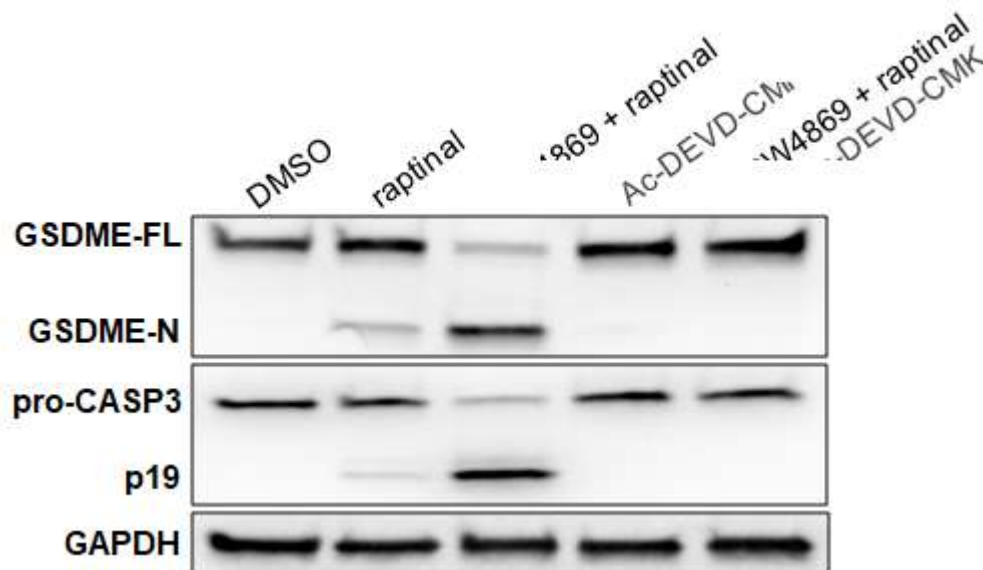


Figura 5: Analisi di Western Blot su cellule HepG2 trattate con GW4869 + raptinal (lane 3), che mostra come la combinazione dei due farmaci sia più efficiente sull'attivazione della caspase-3 e della GSDME, rispettivamente. Ac-DEVD-CMK = inibitore della caspase-3; GSDME-FL = GSDME full-length protein,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



= frammento N-terminale, porzione attiva, della GSDME; pro-caspasi-3 = caspase-3 full-length, frammento inattivo; p19 = frammento attivo della caspase-3.

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

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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





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

Gli esperimenti in vivo prevedono l'utilizzo di 90 Foxn1 female nude mice. Per ogni animale verranno somministrate 5-8 x10<sup>6</sup> cellule PLC/PRF/5 sotto cute. Inoltre, in ogni animale saranno somministrati i seguenti composti nel modo seguente: GW4869 a 1.5 mg/kg, intraperitonealmente, ogni giorno per 6 giorni (partendo dal giorno1) e con 20 mg/kg di raptinal intraperitonealmente a giorni alterni per 27 giorni (o fino al termine del trattamento), partendo dal giorno 3. Entrambi i reagenti saranno solubilizzati in 12.5% Cremophor, 12.5% ethanol, in 75% di soluzione salina sterile. Tutte le diluizioni successive saranno effettuate in PBS 1X.

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

Gruppi:

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

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



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

## RISULTATI ATTESI

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

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

## INNOVAZIONI

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



potrebbero rappresentare alternative terapeutiche alla chemioterapia convenzionale ed ai protocolli standard, traducendosi in benefici a lungo termine e migliorando l'assistenza sanitaria, la vita dei pazienti con un impatto sociale significativo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Akinyemiju, T. et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level. *JAMA Oncol.* 3, 1683 (2017).
2. Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. & Sanyal, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133 (2018).
3. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C. & Llovet, J. M. The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 144, 1226–1239 (2015).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
5. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899 (2010).
6. Hernandez-Gea, V., Toffanin, S., Friedman, S. L. & Llovet, J. M. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 144, 512–527 (2013).
7. Nagy, P., Schaff, Z., Lapis, K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\beta$ 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology*, 14, 269–273 (1991).
8. Larson, C., Oronsky, B., Carter, C. A., Oronsky, A., Knox, S. J., Sher, D., Reid, T. R. TGF-beta: A master immune regulator. *Expert Opin. Ther. Targets*, 24, 427–438 (2020).
9. Dituri, F., Mancarella, S., Cigliano, A., Chieti, A., Giannelli, G. TGF- $\beta$  as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Semin. Liver Dis.* 39, 53–69 (2019).





10. Nagy, P., Schaff, Z., Lapis, K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\beta$ 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology*, 14, 269–273 (1991).
11. Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B. Franco, D. Poynard, T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and TGF- $\beta$ 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology*, 21, 760–766 (1995).
12. Ranganathan, P., Agrawal, A., Bhushan R., Chavalmane, A. K., Kiran, R., Kalathur, R., Takahashi, T., Kondaiah, P. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: Differential regulation in normal and tumour cells (2007).
13. Broz P; Pelegrín P. and Feng Shao. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation (2020).
14. Akino, K., Toyota, M., Suzuki, H., Imai, T., Maruyama, R., Kusano, M., et al. (2007). Identification of DFNA5 as a Target of Epigenetic Inactivation in Gastric Cancer. *Cancer Sci.* 98, 88–95. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00351.
15. Kim, M. S., Chang, X., Yamashita, K., Nagpal, J. K., Baek, J. H., Wu, G., et al. (2008). Aberrant Promoter Methylation and Tumor Suppressive Activity of the DFNA5 Gene in Colorectal Carcinoma. *Oncogene* 27, 3624–3634. doi:10.038/sj.onc.1211021.
16. Clift, D., So, C., McEvan, W.A., James, L.C., Schuh, M. (2018). Acute and rapid degradation of endogenous proteins by Trim-Away. *Nat Protocols.* 13(10):2149-2175. doi: 10.1038/s41596-018-0028-3.

## TIMELINE

Event/Name	Start	End	Length
Screening of all available HCC cell lines, CAFs and primary cells; role of TGFb on GSDME expression level in vitro	0	6	6
In vitro studies of exosome inhibition and phenotype overturning	6	12	6



In vitro assessment of the molecular pro-apoptotic pathway activation	12	24	12
In vivo assessment of therapeutic efficacy of drug combination on tumor size	18	36	12
Management, Scientific, Technological, Economic impact.	1	36	36



## TITOLO DEL PROGETTO

### **LA METILTRASFERASI SMYD3 COME NUOVO BERSAGLIO MOLECOLARE NEI TUMORI GASTRO/ENTERO/PANCREATICI**

**Ricercatori responsabili:** Cristiano Simone

**Settore di ricerca:** Genetica Medica Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** SMYD3 – GI- chemoresistenza-letale sintetico

## 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).

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

### RISULTATI CONSEGUITI NEL SECONDO ANNO DI PROGETTO

Abbiamo validato l'effetto della manipolazione di SMYD3 in modelli 3D ottenuti da pazienti affetti da CCR. Pezzi operatori freschi di pazienti con CCR, sono stati sottoposti a dissociazione meccanica ed enzimatica al fine di isolare le cellule staminali normali e cancerose per la coltura in vitro per ottenere modelli 3D che ricapitolino le caratteristiche funzionali e strutturali del tessuto d'origine.



Per generare organoidi normali e cancerosi derivanti da pazienti (PDOs) i tessuti disgregati sono stati processati con un protocollo specifico che permette l'isolamento e la preservazione delle cellule intestinali staminali le quali daranno poi origine a tutte le cellule che compongono il tessuto. Tali cellule vengono mantenute all'interno di una matrice biologicamente attiva che ne permette la crescita tridimensionale. I campioni possono essere in questo modo amplificati, di modo tale da crioconservarne una parte e dall' utilizzarne un'altra per gli screening farmacologici (Figura 5).

Contemporaneamente, parte dei tessuti prelevati dal paziente sono stati sottoposti ad un protocollo di isolamento delle cellule staminali normali e cancerose (PDSCs). Queste cellule sono state mantenute in coltura in plastiche dedicate ultra low attachment e con terreni di coltura arricchiti di fattori di crescita e senza siero animale che potesse indurne il differenziamento. In una fase successiva, è stato effettuato un protocollo di arricchimento con biglie magnetiche associate al marcatore di staminalità CD44 (automacs pro system- mylteni) (Figura5).

Infine, abbiamo collezionato il sangue di tutti i pazienti, in modo tale da averlo a disposizione per eventuali analisi future.

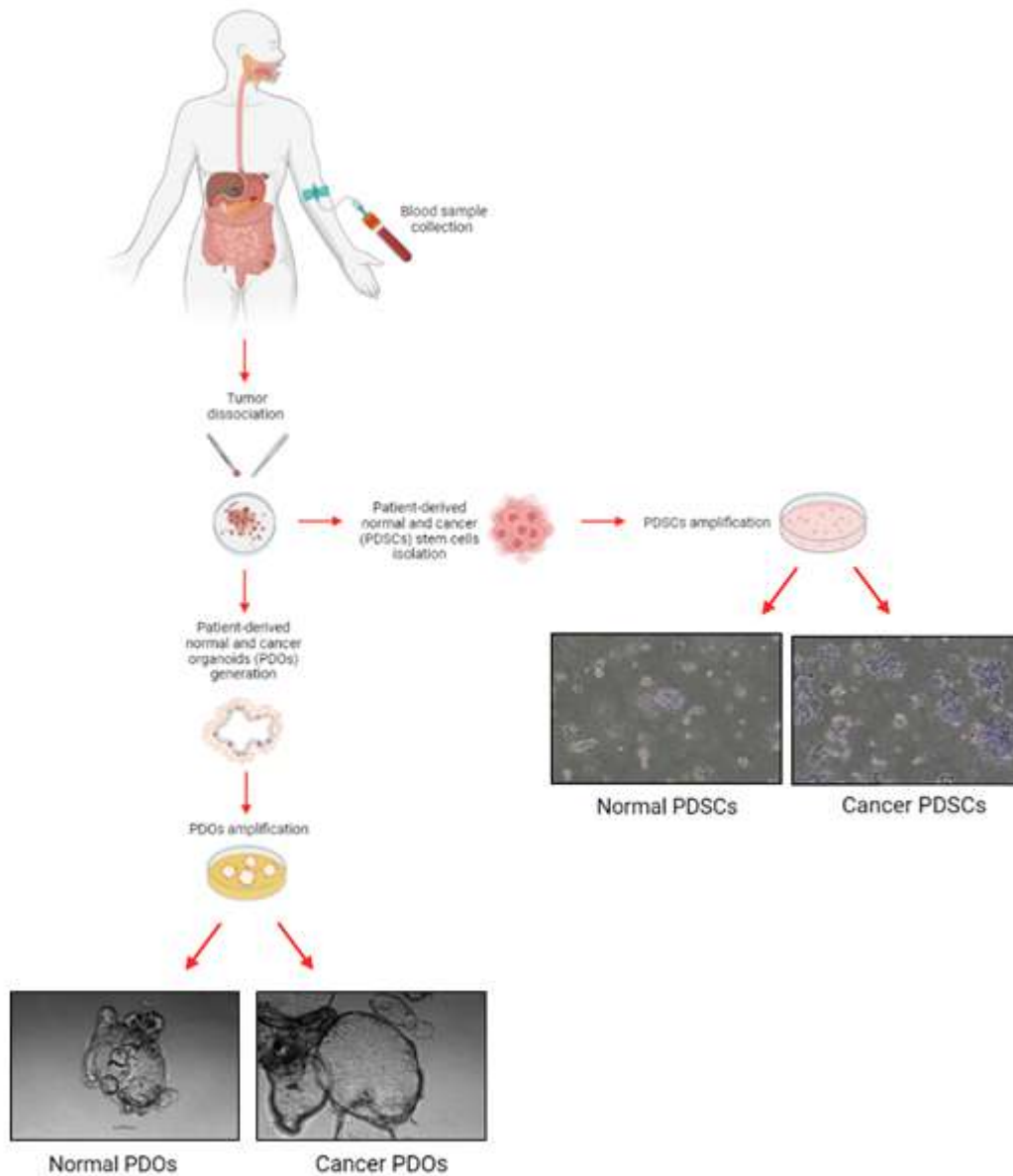


Figura 5: (A) Raccolta di materiale biologico (sangue e tessuti normali e cancerosi) a partire dal paziente affetto da tumore gastrico, o pancreatico o al colon retto. Dissociazione del tessuto normale o tumorale per l'isolamento delle cellule staminali e l'istituzione di colture cellulari e di modelli 3D (organoidi).

Successivamente abbiamo testato in PDSCs cancerose l'efficacia del nuovo inibitore EM127 recentemente pubblicato (PMID: 36116234) e di cui abbiamo depositato il brevetto (n. 10202200021138). Il nuovo inibitore covalente di SMYD3, può agire con maggiore potenza e selettività rispetto agli inibitori SMYD3 di prima generazione e può esercitare effetti anti-tumorali di lunga durata a causa dell'inattivazione completa e irreversibile dell'attività enzimatica. I nostri risultati in vitro hanno mostrato che il nuovo





composto EM127 ha indotto una significativa riduzione della crescita delle cellule tumorali del CCR in modo molto più efficiente degli inibitori BCI-121 e EPZ031686. Induce anche a una significativa riduzione dell'espressione di CDK2 e C-Met (diretti e conosciuti target di SMYD3), nonché dei marcatori mesenchimali fibronectina e N-caderina. I nostri dati suggeriscono che l'inibitore irreversibile EM127 è più efficace degli inibitori BCI-121 e EPZ031686 nel bloccare la funzione di SMYD3. Abbiamo inoltre scoperto che EM127 riduce la fosforilazione di ERK1/2 e induce la risposta apoptotica in modo dose e tempo dipendente nelle linee cellulari tumorali di CCR. È stata eseguita una curva dose-tempo che ci ha permesso di identificare l'IC 50 di EM127 nelle PDSCs. Il saggio di proliferazione cellulare ci ha permesso di stabilire che EM127 induceva una diminuzione del 50% quando utilizzato a 5 uM per 48 ore (Figura 6A). A questo punto abbiamo valutato la capacità chemiosensibilizzante di EM127, abbiamo trattato le PDSCs cancerose con EM127 per 48 ore e con i chemioterapici (CHT) attualmente utilizzati in clinica (5-FLUOROURACILE, OXALIPLATINO, IRINOTECANO) per le successive 24 ore. I dati ottenuti sia mediante saggi di proliferazione (WST assay) che mediante conta cellulare con colorazione in trypan blue dimostrano come il trattamento con EM127 renda le PDSCs cancerose maggiormente sensibili all'azione del chemioterapico (Figura 6B-C).

Le caratteristiche delle cellule staminali cancerose possono essere studiate con diversi approcci biologici. Al fine di valutare le capacità migratorie e invasive delle PDSCs cancerose che promuovono l'acquisizione di un fenotipo funzionale associato all'aggressività del tumore, abbiamo eseguito un saggio di migrazione trattando o meno le cellule con EM127 in associazione con i CHT. Abbiamo valutato la capacità delle PDSCs di migrare attraverso una matrice biologicamente attiva. I risultati raccolti da questi esperimenti hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica di SMYD3 consegue in una notevole diminuzione dell'abilità migratoria delle PDSCs cancerose (Figura 6C).

Successivamente, abbiamo eseguito un saggio di formazione delle colonie cellulari su agar bifasico per valutare la capacità delle PDSCs cancerose di formare strutture complesse come le tumorsfere dopo l'inibizione farmacologica di SMYD3 ottenuta con la somministrazione di EM127 per 48 ore seguite o meno dal trattamento con i CHT per le successive 24 ore. Le valutazioni sono state effettuate attraverso il calcolo delle aree (mediante software specializzato) rispettivamente ad una settimana dalla fine del trattamento (pannello di sinistra) e a tre settimane dalla fine del trattamento (pannello di destra). I risultati hanno dimostrato che il trattamento con EM127 non solo riduceva l'attività clonogena delle PDSCs cancerose ma ne arrestava la ricrescita anche a tempi prolungati. Infatti a tre settimane dalla fine del trattamento le cellule trattate solo



con i CHT ricrescevano in cluster più voluminosi, mentre quelle trattate anche con EM127 continuavano a mantenere dimensioni ridotte (Figura 6D).

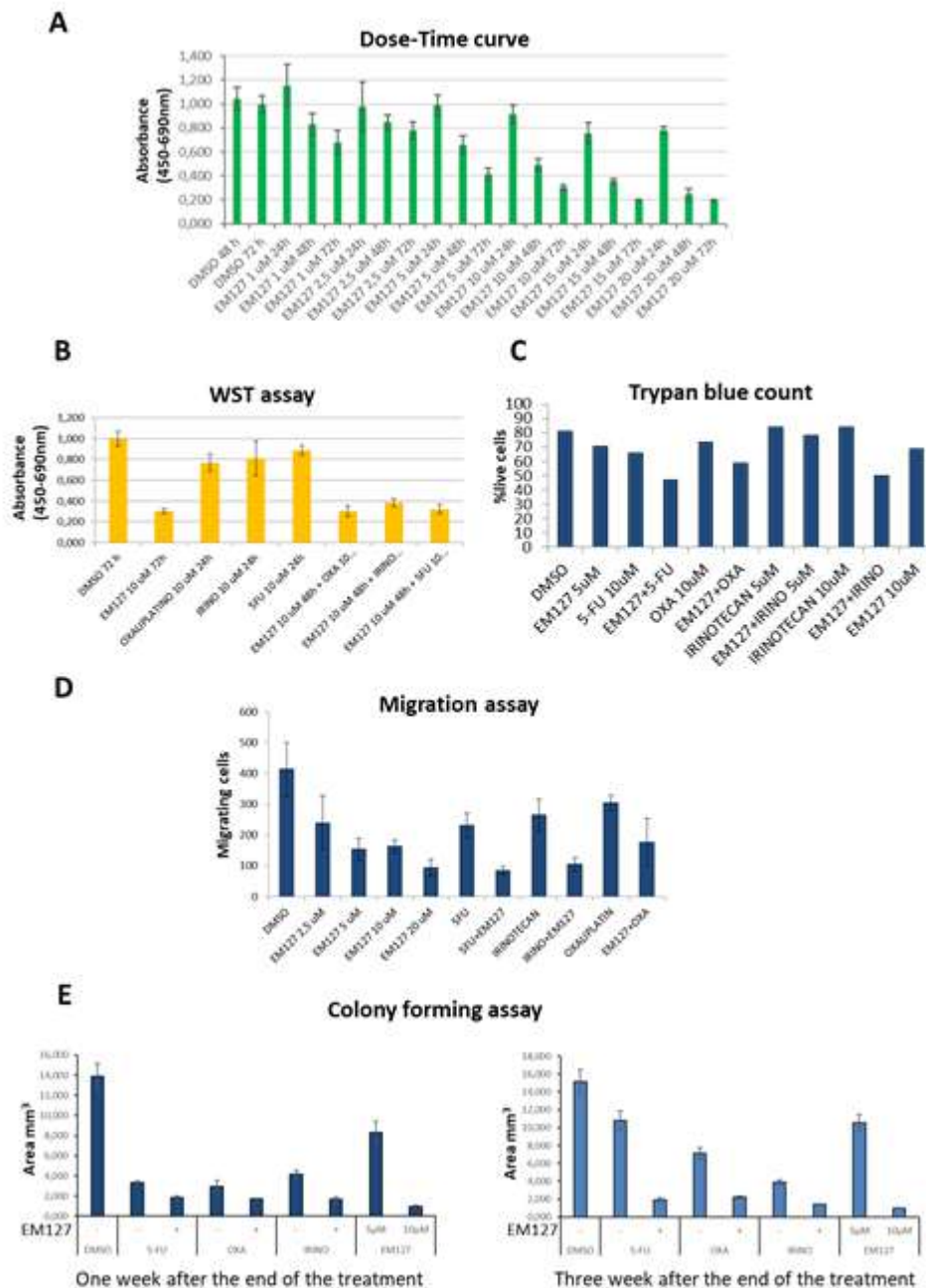


Figura 6: (A) Curva dose-tempo del nuovo inibitore EM127 mediante saggio di proliferazione cellulare su cellule PDSCs cancerose. (B) Saggio di proliferazione cellulare su PDSCs trattate per 48 ore con EM127 e per le successive 24 ore con i chemioterapici (CHT). (C) Conta cellulare con blu di trypan su PDSCs trattate per 48 ore con EM127 e per le successive 24 ore con i chemioterapici (CHT). (D) Analisi della capacità migratoria delle cellule



*PDSCs piastrate nel pozzetto interno delle transwell e trattate con i composti indicati per 16 ore. (E) Analisi della capacità della formazione delle colonie cellulari delle PDSCs trattate per 48 ore con EM127 e per le successive 24 ore con i chemioterapici. Gli istogrammi rappresentano i dati estrapolati dalle aree delle colonie ottenute a una settimana (pannello di sinistra) o a tre settimane (pannello di destra) dalla fine dei trattamenti.*

Dopo aver dimostrato il coinvolgimento di SMYD3 nella staminalità, abbiamo effettuato un esperimento in vivo con il modello AOM/DSS. Il modello AOM/DSS è un modello di iniziazione-promozione tumorale potente, riproducibile e relativamente poco costoso che utilizza l'induzione chimica del danno al DNA seguito da cicli ripetuti di colite. Questo modello di carcinogenesi colon-rettale prevede infatti una iniezione intraperitoneale di azossimetano (AOM potente carcinogeno colon-rettale) seguito da tre cicli di destrano solfato sodio (DSS) somministrato per via orale nell'acqua per una settimana. Ciascun ciclo di DSS è stato intervallato da due settimane di sola acqua. Terminati i cicli di DSS abbiamo iniziato i trattamenti randomizzando i topi in tre diversi gruppi : i non trattati, quelli trattati solo con l'irinotecano per via intra peritoneale (1 iniezione ogni 4 giorni per un totale di 4 iniezioni) e quelli trattati in combinazione con irinotecano e EM127 (1 iniezione ogni giorno per 16 giorni via intraperitoneale).

Terminati i trattamenti i topi sono stati sacrificati in accordo con le norme etiche vigenti. Abbiamo eseguito un esperimento ex-vivo, quindi abbiamo isolato dal tessuto tumorale murino le cellule staminali cancerose e le abbiamo messe in coltura come strutture 3D. Gli organoidi derivanti da queste colture hanno subito attratto la nostra attenzione poiché presentavano delle strutture morfologicamente molto distinte. Gli organoidi derivanti dai topi non trattati farmacologicamente o trattati solo con l'irinotecano presentavano una struttura differenziata con formazioni cripta-villo tipiche, ed estroflessioni che creavano i bud. Al contrario, gli organoidi derivanti dai topi trattati con EM127 e l'irinotecano assumevano un aspetto cistico, senza estroflessioni e senza elementi differenziati (Figura 7A).

Questi risultati ci hanno spinto ad indagare il ruolo di SMYD3 nella staminalità oltre che dal punto di vista farmacologico anche dal punto di vista genetico, realizzando una linea cellulare HCT116 SMYD3 ko. Abbiamo realizzato una coltura tridimensionale partendo dalle HCT116 wt e HCT116 SMYD3 ko, realizzando delle tumorsfere e le abbiamo seguite nel tempo, dimostrando come le cellule geneticamente deplete di SMYD3 presentavano un ridotto potenziale di formazione delle sfere. Analisi successive hanno dimostrato che le HCT116 wt avevano la capacità di generare in vitro un numero maggiore di sfere e con una dimensione maggiore (calcolata in base all'area e al diametro medio) rispetto alle HCT116 SMYD3-ko, suggerendo il loro miglior potenziale di formazione delle sfere (Figure 7B-E). Inoltre, quando abbiamo splittato le sfere, abbiamo confermato che anche nei passaggi successivi le HCT116 wt



mostravano un maggiore potenziale nella formazione delle sfere rispetto alle HCT116 SMYD3-ko (Figura 7F). Per convalidare questi risultati, abbiamo sovraespresso SMYD3-GFP nelle sfere tumorali HCT116 SMYD3-ko ottenendo un aumento del potenziale di formazione della sfera (Figura 7G).

Infine, abbiamo effettuato un altro esperimento in vivo con topi nudi xenografati con cellule HCT116.  $10 \times 10^6$  cellule sono state iniettate in maniera subcutanea nei fianchi dei topi nudi atimici (0.2 ml per fianco in DMEM senza siero). Il volume del tumore è stato misurato ogni due giorni usando la seguente formula: volume (mm<sup>3</sup>)= larghezza<sup>2</sup> \* lunghezza \* 0.5. Quando il tumore aveva raggiunto 100mm<sup>3</sup> di volume i topi sono stati randomizzati e suddivisi in due gruppi, il gruppo controllo e il gruppo trattato con EM127 per 14 giorni intraperitonealmente. Terminati i trattamenti i topi sono stati sacrificati in accordo con le norme etiche vigenti. Abbiamo eseguito un esperimento ex-vivo, quindi abbiamo isolato dal tessuto tumorale murino le cellule staminali cancerose e le abbiamo messe in coltura come strutture 3D. Gli organoidi derivanti da queste colture hanno mostrato subito enormi differenze, infatti le cellule derivanti da topi non trattati farmacologicamente producevano numerose strutture ben differenziate a differenza di quelle derivate dai topi trattati con EM127. Questi ultimi infatti producevano poche formazioni e con caratteristiche più indifferenziate (Figura 7H).

Tutti i risultati ottenuti ci hanno spinto a disegnare nuovi esperimenti che potessero meglio caratterizzare il ruolo di SMYD3 nel contesto staminale canceroso. È infatti comunemente accettato dalla comunità scientifica che le cellule staminali rivestono un ruolo essenziale nel propagare il cancro anche in altri distretti corporei inducendo così le metastasi. Per questa ragione abbiamo disegnato un esperimento (da realizzare nel prossimo anno) in vivo in topi nudi CD1 impiantati con PDSCs per valutare la capacità di metastatizzazione di queste cellule a seguito del trattamento con il nuovo inibitore covalente EM127.

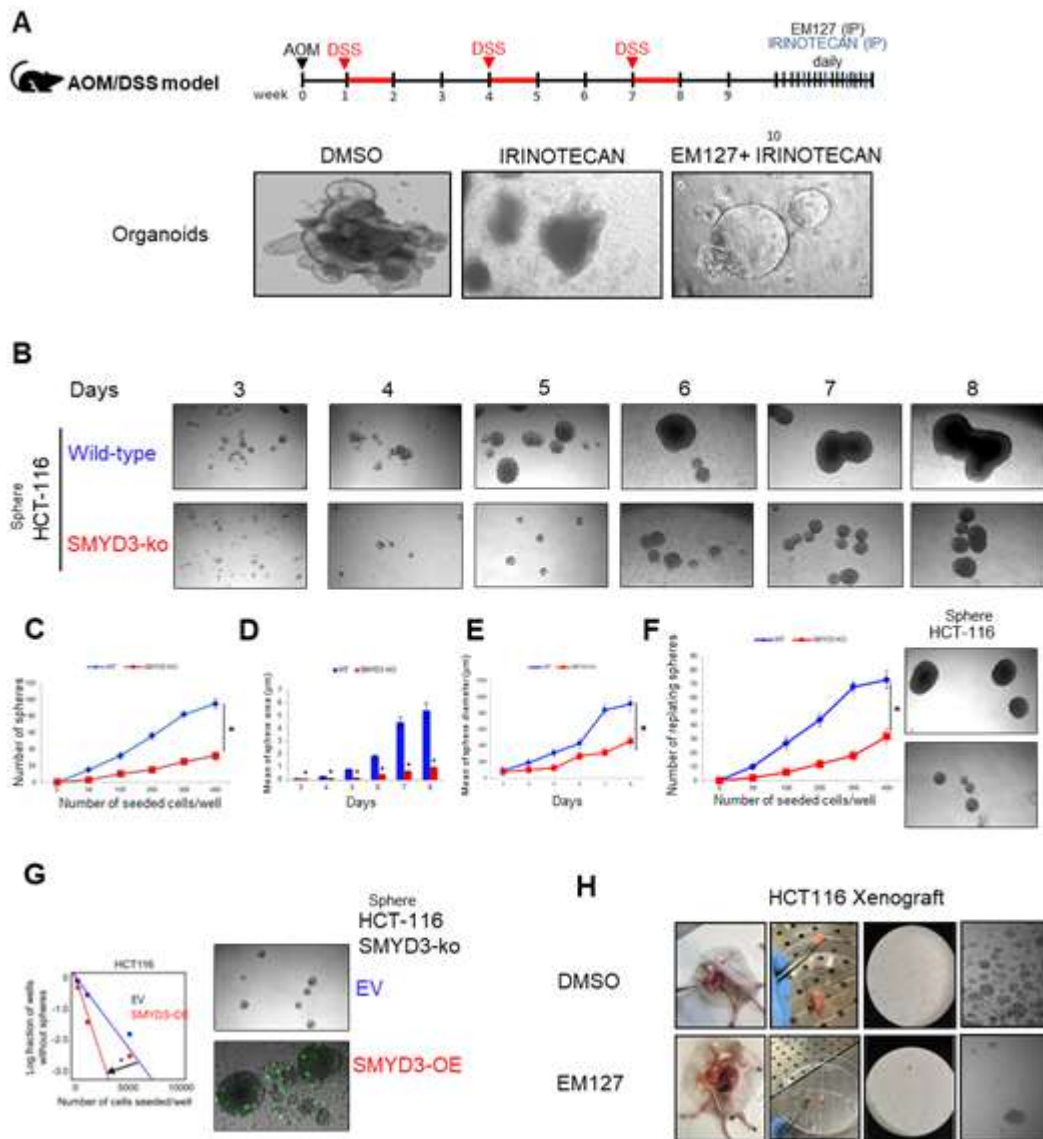


Figura 7: (A) schema di trattamento del modello AOM/DSS, i topi sono stati trattati con EM127 e/o irinotecano. (B) Generazione delle sfere a partire dalle cellule HCT116 wt e HCT116 SMYD3 ko. (C-E) Analisi del numero e della dimensione (intesa come area e diametro) delle sfere ottenute dalle cellule HCT116 wt e HCT116 SMYD3 ko. (F) Numero delle sfere derivanti dal passaggio 1 ripiastrate per seguire l'andamento distintivo tra le HCT116 wt e le HCT116 SMYD3 ko. (G) Over espressione di SMYD3-GFP nelle HCT116 SMYD3 ko. (H) Topi nudi atimici xenografati con HC116 wt e trattati o meno con EM127.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Scopo del progetto è quello di validare e sviluppare un approccio terapeutico per tumori che esprimono alti livelli di SMYD3 – il quale può essere utilizzato anche come



marcatore predittivo – basata sull’uso di trattamento combinato con nuovi SMYD3i e chemioterapici attualmente in uso o farmaci inibitori di PARP (sulla base delle caratteristiche tumorali dei geni relativi al pathway dell’HR) al fine di contrastare la resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia tradizionale.

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

### Obiettivo specifico 1

Studio dell’espressione tissutale di SMYD3 nei tumori gastro/entero/pancreatici e caratterizzazione dei geni coinvolti nel pathway dell’HR.

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





terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP. Inoltre, è stato interessante vedere che l'over-espressione dell'mRNA di SMYD3 risulta essere mutualmente esclusiva con alterazioni di perdita di funzione (loss-of-function) in diversi geni associati con HRD nel cancro (per esempio, TP53, BRCA1, NEIL2, HERC2, ATM, RAD51C, and BRCA2), supportando il potenziale terapeutico del protocollo che prevede la combinazione degli inibitori di SMYD3 e PARP nei tumori HR-proficienti con alti livelli di SMYD3.

Questi dati sono stati associati a partire dal dataset del PanCanAtlas negli adenocarcinomi del colon-retto (COAD-READ) e del pancreas (PAAD, dove la terapia con inibitori di PARP è stata già approvata per il trattamento di pazienti con mutazioni germinali o somatiche di BRCA1/ BRCA2), confermando la correlazione e il potenziale beneficio della terapia combinata con inibitori di SMYD3 e PARP.

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

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

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

**Obiettivo 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.



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 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.

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. Visti i risultati del secondo anno del progetto abbiamo disegnato un esperimento (da realizzare nel prossimo anno) in vivo in topi nudi CD1 impiantati con PDSCs per valutare la capacità di metastatizzazione di queste cellule a seguito del trattamento con il nuovo inibitore covalente EM127.

## DATI PRELIMINARI

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

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

Quindi, abbiamo valutato se BCI-121 (inibitore di SMYD3) possa sensibilizzare cellule di CCR con alti livelli di SMYD3 a CHTs. A questo scopo, abbiamo trattato due linee cellulari di CCR aventi alti livelli di SMYD3 (HCT116, HT19) [10] con una combinazione di SMYD3i BCI-121 e CHTs, dimostrando che l'uso di BCI-121 riduce il tempo richiesto affinché i chemioterapici abbiano un effetto inibitorio sulla crescita cellulare (Fig1A).



Inoltre, il trattamento combinato con la doxorubicina (DOX) e BCI-121 aumenta la risposta apoptotica, con attivazione delle caspasi (Fig1B-C). Questo effetto è dipendente dall'inibizione di SMYD3, così come è stato dimostrato mediante ablazione genetica (Fig1D). In particolare, il saggio di proliferazione cellulare ha dimostrato che il trattamento combinato induce citotossicità (Fig1E-F).

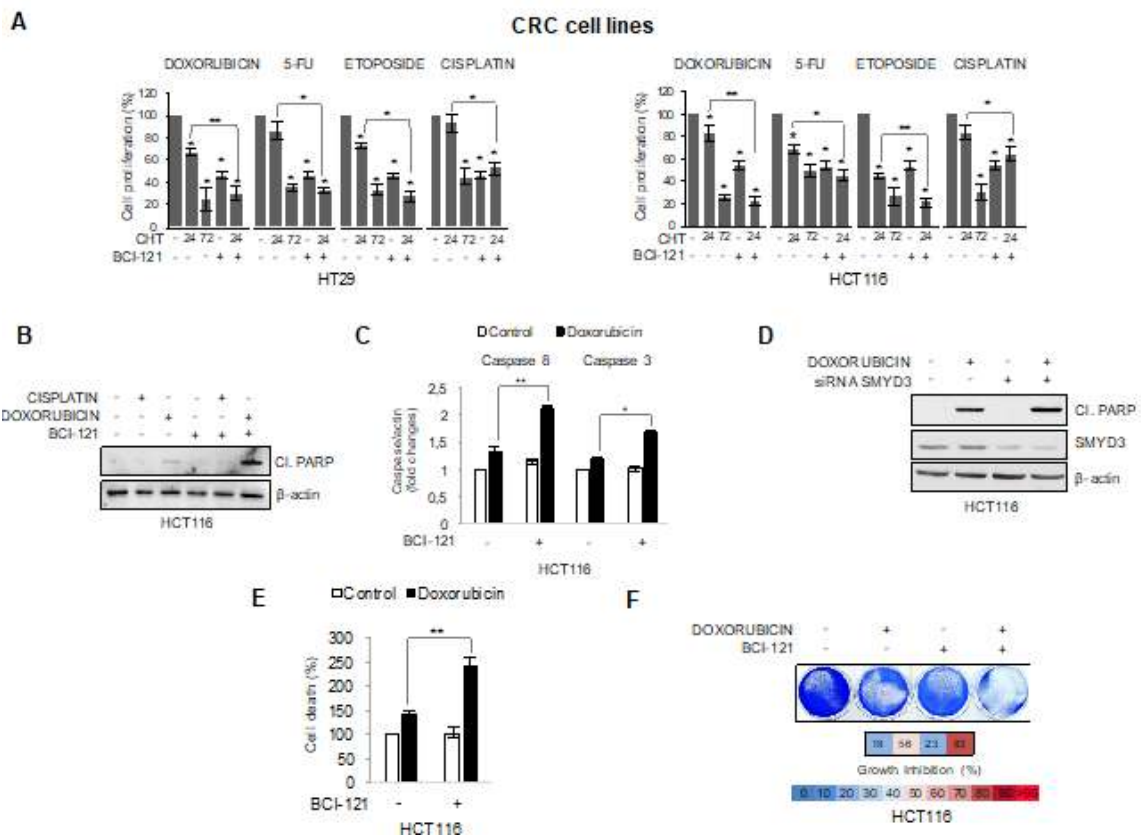


Figure 1 (A) Trattamento combinato di linee cellulari di CRC (HT29, HCT116) con BCI-121 e chemioterapici. Pre-trattamento di 48 ore con BCI-121 seguito dalla somministrazione dei chemioterapici per 24 ore. La vitalità è stata paragonata a quella ottenuta somministrando i chemioterapici per 72 ore. (B, 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  $\chi^2$  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 molecolarmente 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):487



## TIMELINE

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

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

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





## TITOLO DEL PROGETTO

### **CARATTERIZZAZIONE EPIGENETICA MEDIATA DA SMYD3 E VALUTAZIONE DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI DEL TRATTO GASTROINTESTINALE.**

**Ricercatori responsabili:** Vittoria Disciglio

**Settore di ricerca:** Genetica Medica Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** SMYD3; Epigenetica; Next Generation Sequencing (NGS); Chip-Seq; Terapia Basata sulla Letalità Sintetica; Tumori del Tratto Gastrointestinale.

## INTRODUZIONE

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

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

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





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

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

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



inoltre riduce la proliferazione promuovendo l'arresto del ciclo cellulare nella transizione tra le fasi S/G2, suggerendo il possibile coinvolgimento di SMYD3 nel checkpoint S/G2 [11]. E' stato inoltre scoperto che SMYD3 esercita primariamente il suo ruolo oncogenico attraverso l'interazione con e la metilazione di proteine non istoniche, mediante cui transattiva specifiche vie di segnalazione cancro-specifiche [12-18]. Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che il suo principale contributo nella regolazione della tumorigenesi sia ancora sconosciuto, in quanto non è basato sul sostegno della proliferazione autonoma delle cellule cancerose [19].

Inoltre, è stato proposto che il riparo delle rotture del DNA a doppio filamento (Double strand breaks, DSBs) mediante ricombinazione omologa (Homologous Recombination, HR) sia promosso dalla modulazione dell'espressione genica SMYD3-mediata. Infatti, abbiamo recentemente pubblicato che SMYD3 è un interruttore diretto dei principali membri del pathway dell'HR, come ATM, CHK2 e BRCA2 ed è richiesto per il riparo delle rotture DSBs. La fosforilazione di SMYD3 indotta da ATM porta alla formazione dei complessi HR e promuove il reclutamento di RAD51 ai siti di DSBs in risposta al danno endogeno o alla somministrazione di agenti danneggianti il DNA (come i chemioterapici) nel cancro del colon-retto e della mammella [20]. In tale lavoro scientifico abbiamo inoltre dimostrato che approcci terapeutici mirati, volti alla doppia inibizione di SMYD3 e PARP, mediante l'utilizzo del meccanismo di "letalità sintetica", rappresentano strategie terapeutiche innovative volte a indurre morte cellulare in tumori del tratto gastroenterico [20]. Ad oggi, l'unico approccio terapeutico mediante letalità sintetica utilizzato in clinica è basato sull'utilizzo degli inibitori di PARP (es. olaparib, rucaparib, niraparib, and talazoparib) in tumori della mammella, dell'ovaio e del pancreas in cui si verifica concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparo del DNA via HR, nei quali le proteine BRCA1/2 svolgono un ruolo principale.

Diversi lavori scientifici pubblicati in letteratura hanno inoltre messo in evidenza i principali meccanismi di interazione che mediano la regolazione dei meccanismi per il riparo dei DSBs in relazione alla struttura e conformazione della cromatina. Ad esempio è stato dimostrato come H2AX sia rapidamente fosforilato da ATM ad una distanza di diverse megabasi dalla sede in cui si è verificata la rottura DSB [21, 22]. Inoltre è stato dimostrato che alcune metiltransferasi istoniche possono regolare il reclutamento e/o la stabilizzazione delle proteine coinvolte nel riparo al DNA (es. CtIP, 53BP1, BRCA1) [23]. Nell'insieme, questi aspetti dimostrano che le modificazioni epigenetiche a carico della cromatina guidano i processi di riparo del DNA mediante il reclutamento di proteine specifiche, la scelta delle principali vie di segnalazione per i meccanismi di riparo e l'attivazione di checkpoint nella risposta al danno al DNA.



La caratterizzazione delle alterazioni nella regolazione dello stato epigenetico e della natura dinamica alla base dei meccanismi regolatori dello stato epigenetico guidati da SMYD3 rappresenta una interessante strategia per costruire una mappatura epigenetica nei tumori del tratto gastrointestinale (GI) e fornire dati interessanti per sviluppare approcci terapeutici innovativi.

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

In questa fase di progetto, abbiamo caratterizzato dal punto di vista molecolare alcune principali linee cellulari del tratto gastrointestinale al fine di stabilire lo stato mutazionale dei geni coinvolti nei principali meccanismi di riparo del DNA.

Recenti studi hanno dimostrato che i geni coinvolti nei processi di riparo dei danni al DNA giocano un ruolo chiave nel mantenere stabilità del genoma umano. La perdita della funzione di riparazione dei danni al DNA, rappresenta uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza e la progressione cancro, così come rappresenta uno dei principali meccanismi che influenzano la risposta terapeutica. I geni coinvolti nei processi di riparo del DNA possono essere raggruppati in differenti pathways molecolari e proteine appartenenti al medesimo pathway spesso lavorano in sinergia per riparare specifici tipi di danno al DNA [24].

Al fine di caratterizzare dal punto di vista molecolare le principali linee cellulari del tratto gastroenterico, abbiamo scelto di analizzare linee cellulari, precedentemente caratterizzate per lo stato di espressione della proteina SMYD3, che mostrano alti livelli di SMYD3. Nello specifico, dati relativi alle mutazioni geniche e alle alterazioni del numero di copie di 276 geni coinvolti nei principali meccanismi di riparo del DNA sono stati acquisiti dal database Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, <https://portals.broadinstitute.org/ccle>) [25] al fine di caratterizzare dal punto di vista molecolare le linee cellulari di cancro del colon (LOVO\_LARGE\_INTESTINE, HT29\_LARGE\_INTESTINE, HCT116\_LARGE\_INTESTINE, SW480\_LARGE\_INTESTINE, CaCo2\_LARGE\_INTESTINE), le linee cellulari di tumore pancreatico (CAPAN1\_PANCREAS, MIAPACA2\_PANCREAS, PANC1\_PANCREAS) e le linee cellulari di tumore dello stomaco (AGS\_STOMACH, NCIN87\_STOMACH, HGC27\_STOMACH).

Tale analisi è stata eseguita integrando i dati di mutazioni e variazione del numero di copie (delezioni) che coinvolgono i geni (N=276) di tutti i maggiori pathway coinvolti nella risposta al danno al DNA (DDR, DNA Damage Response): (1) vie di segnalazione



dell'anemia di Fanconi (FA, Fanconi Anemia); (2) ricombinazione omologa (HR, Homology Dependent Recombination); (3) giunzione non omologa delle estremità (NHEJ, Non-Homologous End Joining); (4) reversione diretta del danno (DR, Direct Damage Reversal/Repair); (5) sintesi translesione del DNA (TLS, Translesion DNA Synthesis); (6) mantenimento del pool di nucleotidi (NP, Nucleotide Pool Maintenance); (7) sensori del danno al DNA (DS, Damage Sensing); (8) escissione di nucleotidi (NER, Nucleotide Excision); (9) riparazione degli appaiamenti sbagliati (MMR, Mismatch Repair); (10) riparazione per escissione di base (BER, Base Excision Repair); (11) geni correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). Dei 276 geni coinvolti nei meccanismi molecolari DDR, 70 geni dei principali pathways coinvolti nel DDR e 9 geni di risposta al danno al DNA sono stati classificati come "core DDR" (Figura 1) [24].

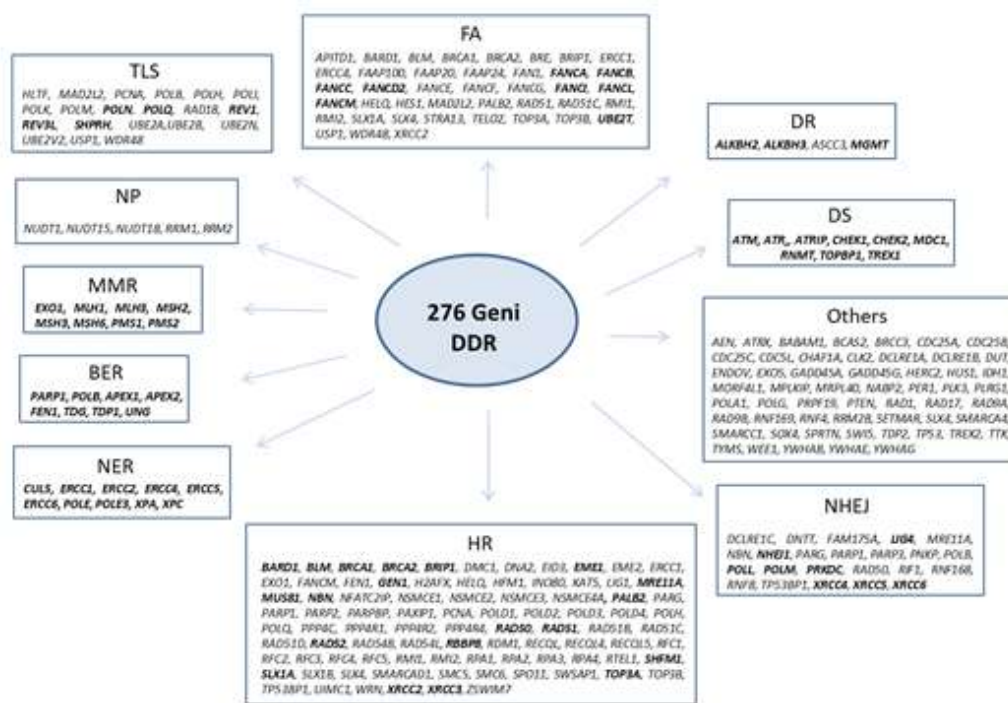


Figura 1. Rappresentazione schematica di 276 geni coinvolti nelle principali vie di segnalazione della risposta al danno al DNA (DDR). I geni classificati come "core DDR" sono rappresentati in grassetto.

Tale analisi ha messo in evidenza che di tutti i geni DDR, il gene TP53 risulta essere quello più frequentemente alterato nelle linee cellulari analizzate. Gli altri geni che sono risultati essere più frequentemente alterati sono WRN e POLI (Figura 2) . Tale analisi ha inoltre evidenziato che tra le linee cellulari del tumore del colon analizzate (HCT116, LoVo, HT29, SW480 e CaCO2), la linea cellulare HCT116 mostra una maggiore frequenza di alterazioni genetiche nei geni coinvolti nelle principali vie di segnalazione



DDR rispetto alle altre linee cellulari oggetto di studio. Nello specifico, la linea cellulare HCT116 presenta alterazioni coinvolgenti i geni (BRCA2, ERCC4, FAAP20, FANCA, SLX4, TOP3A, USP1) del pathway FA, geni (POLM, PRKDC, RIF1) del pathway NHEJ, geni (ASCC3, MGMT) del pathway DR, geni (POLM, POLH, POLI, POLQ, REV3L, SHPRH, USP1) del pathway TLS, geni ATM e CHEK2 coinvolti nella risposta al danno al DNA (pathway DS), il gene MLH1 del pathway MMR, il gene XPC del pathway NER, i geni (APEX1, TDG) del pathway BER, i geni (ATRX, CHAF1A, DUT, RRM2B, SLX4, TYMS, SMARCA4, IDH1, SOX4, AEN, PLRG1, BABAM1, RNF169, HERC2) correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). La stessa linea cellulare mostra inoltre alterazioni genetiche nei principali geni (LIG1, POLD1, BRCA2, EID3, GEN1, MUS81, POLH, POLQ, PPP4R4, SLX4, SMC6, TOP3A, WRN) del pathway HR. È importante evidenziare che la mutazione (frequenza allelica pari al 50%) coinvolgente il gene BRCA2 (p.I2675Dfs\*6) determina la creazione di un codone di stop e la conseguente produzione di una proteina tronca verosimilmente non funzionale nell'attività di ricombinazione omologa e riparazione dei danni al DNA. Pertanto poiché la linea cellulare HCT116 mostra difetto in alcuni dei principali geni (BRCA2, MUS81, TOP3A) coinvolti nel riparo HR ("HR core genes"), può essere classificata come "HR-". La linea cellulare LoVo presenta un numero cospicuo di geni (NBN, XRCC2, EXO1, POLD1, EME1, HFM1, INO80, PAXIP1, POLH, POLQ, RAD52, SMC5) alterati coinvolti nel riparo HR, di cui alcuni (NBN, XRCC2, EME1, RAD52) sono classificati come "HR core genes". La linea cellulare SW480 ha mostrato un numero di alterazioni somatiche inferiore rispetto alle altre linee cellulari nei geni (POLD1, EID3, GEN1, MUS81, POLH, WRN) del pathway HR, di cui il gene MUS81 rientra a far parte degli "HR core genes". Si riporta inoltre che la linea cellulare CaCO2 presenta una fusione tra i geni BRCA2 e N4BP2L2 il cui effetto funzionale non è ad oggi noto. La linea cellulare HT29, a differenza di tutte le altre linee cellulari tumorali del colon analizzate, mostra un minore numero di alterazioni genetiche nei geni coinvolti nei principali pathway DDR. Nello specifico, quest'ultima linea cellulare presenta alterazioni coinvolgenti i geni (POLQ, WRN) del pathway HR, il gene PRKDC del pathway NHEJ, i geni (POLB, POLN, POLQ) del pathway TLS, il gene POLB del pathway NER, e il gene TP53 (Figura 2, Figura 3).

Poiché le linee cellulari LoVo, SW480 e CaCO2 mostrano alterazioni genetiche nei principali geni coinvolti nel riparo HR ("HR core genes"), è verosimile definire tali linee cellulari come "HR-". Inoltre, poiché la linea cellulare HT29 non presenta alterazioni nei geni principali coinvolti nel riparo HR ("HR core genes") è possibile classificare tale linea cellulare come linea cellulare proficiente nei geni coinvolti nell'HR ("HR+").





Tra le linee cellulari tumorali del pancreas analizzate, la linea cellulare CAPAN1 è risultata essere la linea con un numero maggiore di alterazioni nei geni coinvolti nei principali pathway DDR (Figura 2). Nello specifico, la linea cellulare CAPAN1 presenta alterazioni coinvolgenti i geni (BRCA2, FANCA, FANCG) del pathway FA, i geni (RAD50, TP53BP1, RFC1, BRCA2, RAD54L) del pathway HR, i geni (RAD50, TP53BP1) del pathway NHEJ, i geni (POLI, POLN, REV3L, SHPRH, UBE2B) del pathway TLS, il gene ATM, e i geni (TP53, RNF4, YWHAE) correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). Le mutazioni coinvolgenti il gene BRCA2 (p.V1532Dfs\*2; p.S1982Rfs\*22), identificata in tale linea cellulare, determinano la creazione di un codone di stop e la conseguente produzione di una proteina tronca non funzionale nell'attività di ricombinazione omologa e riparazione dei danni al DNA che rendono tale linea cellulare non sensibile agli inibitori di PARP [26]. Poiché tale linea cellulare presenta difetti nei principali geni (BRCA2, RAD50) coinvolti nel riparo HR ("HR core genes"), è verosimile definire tale linea cellulare come "HR-".

La linea cellulare MIAPACA2 mostra una mutazione del gene PALB2 (pathways FA e HR), e dei geni ASCC3 (pathway DR), MLH1 (pathway MMR), ERCC6 (pathway NER), e TP53. La mutazione del gene PALB2 identificata nella linea cellulare MIAPACA2 è una mutazione missenso (p.Ser64Leu) associata ad un reclutamento difettoso della proteina PALB2 nei foci di danno al DNA e ad una compromissione della ricombinazione omologa avviata dalla rottura a doppio filamento del DNA [27]. Poiché tale linea cellulare presenta un difetto in uno dei principali geni coinvolti nel riparo HR ("HR core genes"), è possibile classificare tale linea cellulare "HR-".

La linea cellulare PANC1 presenta alterazioni genetiche nei seguenti geni: EID3, WRN (pathway HR), POLB (pathways NHEJ, TLS, BER), NUDT18 (pathway NP) e TP53. Poiché la linea cellulare PANC1 non presenta alterazioni nei geni principali coinvolti nel riparo HR ("HR core genes"), è possibile classificare tale linea cellulare come linea proficiente nei geni coinvolti nell'HR ("HR+") (Figura 2, Figura 3).

Tra le linee cellulari tumorali dello stomaco analizzate, la linea cellulare NCI-N87 è risultata essere la linea con un numero maggiore di alterazioni nei geni coinvolti nei principali pathways DDR (Figura 2). Nello specifico, tale linea cellulare mostra alterazioni con probabile perdita di funzione in 13 geni (XRCC2, XRCC3, RFC1, RPA1, RPA2, FANCM, PARP2, PAXIP1, PPP4R2, PPP4R4, TOP3A, WRN, ZSWIM7) coinvolti nel riparo HR. La linea cellulare NCI-N87 mostra inoltre alterazioni nei geni (XRCC2, CENPS, FAAP20, FANCE, FANCF, FANCM, MAD2L2, TOP3A, WDR48) del pathway FA, geni (PARP3, PRKDC, RNF8) del pathway NHEJ, il gene ALKBH3 del pathway DR,



geni (MAD2L2, POLI, POLN, UBE2V2, WDR48, RAD50, BRCA2, HFM1, RTEL1) del pathway TLS, geni (NUDT18, RRM1) del pathway NP, geni (MDC1, TOPBP1, TREX1) del pathway DS, geni (MLH1, MSH6) del pathway MMR, geni (APEX2, TDP1) del pathway BER, geni (CHAF1A, DCLRE1B, PER1, TP53, TDP2, RNF4, SOX4, WEE1, YWHAE, CDC25A, SMARCC1) correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). Poiché la linea cellulare NCI-N87 presenta un difetto in alcuni dei principali geni (XRCC2, XRCC3) coinvolti nel riparo HR (“HR core genes”), verosimilmente tale linea cellulare può essere classificata come “HR-“.

La linea cellulare HGC27 presenta alterazioni nei geni (BRCA2, FANCA, FANCB, FANCC) del pathway FA, nei geni (RAD50, BRCA2, HFM1, RTEL1) del pathway HR, geni (PNKP, RAD50) del pathway DR, gene NUDT18 del pathway NP, geni (ATM, ATR) coinvolti nella risposta al danno al DNA (pathway DS), geni (ERCC1, XPC) del pathway NER, geni (POLA1, TP53, PTEN, SMARCA4, CDC5L) correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). Poiché la linea cellulare HGC27 presenta un difetto in alcuni dei principali geni (RAD50, BRCA2) coinvolti nel riparo HR (“HR core genes”), verosimilmente tale linea cellulare può essere classificata come “HR-“.

La linea cellulare AGS mostra un minore numero di alterazioni genetiche nei pathway DDR. Tale linea cellulare inoltre presenta alterazioni nei geni (FAAP100, FANCI) del pathway FA, geni (TP53BP1, SMARCA4) del pathway HR, geni (DNTT, NHEJ1, TP53BP1) del pathway NHEJ, il gene POLI del pathway NP, il gene MSH3 del pathway MMR, geni (CHAF1A, DCLRE1B, PER1, TP53, TDP2, RNF4, SOX4, WEE1, YWHAE, CDC25A, SMARCC1) correlati a più vie di segnalazione coinvolte nei processi DDR o geni che coordinano risposte cellulari e molecolari al danno al DNA (Others). Poiché la linea cellulare AGS non presenta difetto nei principali geni coinvolti nel riparo HR (“HR core genes”), verosimilmente tale linea cellulare può essere classificata come “HR+“ (Figura 2, Figura 3).

Nell’insieme l’identificazione delle alterazioni coinvolgenti i principali geni coinvolti nei meccanismi DDR ha permesso di classificare le linee cellulari oggetto di studio in cellule tumorali proficienti nei geni coinvolti nell’HR (HR+) che esprimono alti livelli di SMYD3 (linee cellulari HT29, PANC1, AGS) e cellule tumorali che mostrano difetti nei principali geni coinvolti nell’HR (HR-) e che esprimono alti livelli di SMYD3 (linee cellulari HCT116, LOVO, SW480, CACO2, CAPAN1, MIAPACA2, NCI-N87, HGC27). Inoltre l’identificazione delle alterazioni coinvolgenti i principali geni coinvolti nei meccanismi DDR permetterà di selezionare i possibili inibitori DDR al fine di utilizzare





nuovi approcci terapeutici basati sull'inibizione combinata di SMYD3 e altre proteine DDR (Obiettivo 3 del presente progetto di ricerca).

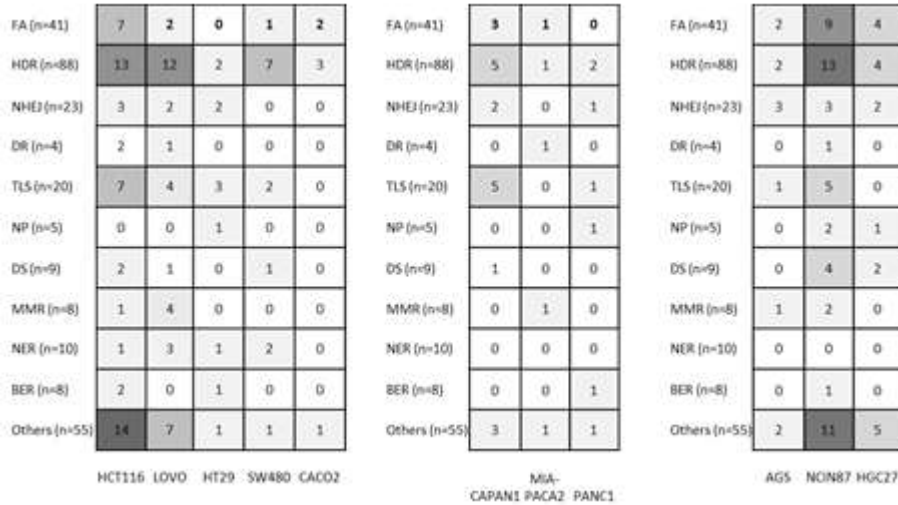
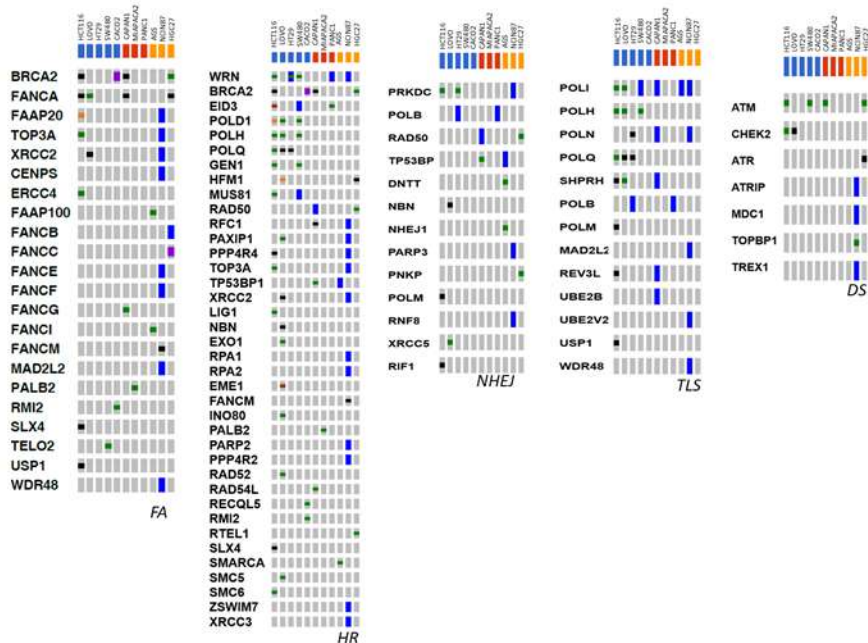


Figura 2. Rappresentazione grafica del numero di geni di tutti i maggiori pathway coinvolti nella risposta al danno al DNA (DDR, DNA Damage Response) risultati essere alterati nelle linee cellulari del tumore del colon-retto (HCT116, LOVO, HT29, SW480, CACO2), linee cellulari del tumore del pancreas (CAPAN1, MIAPACA2, PANC1) e linee cellulari del tumore dello stomaco (AGS, NCI-N87, HGC27). L'intensità del colore grigio indica il numero (rappresentato in ciascuna casella) di geni alterati coinvolti nei differenti pathway DDR identificati in ciascuna linea cellulare.



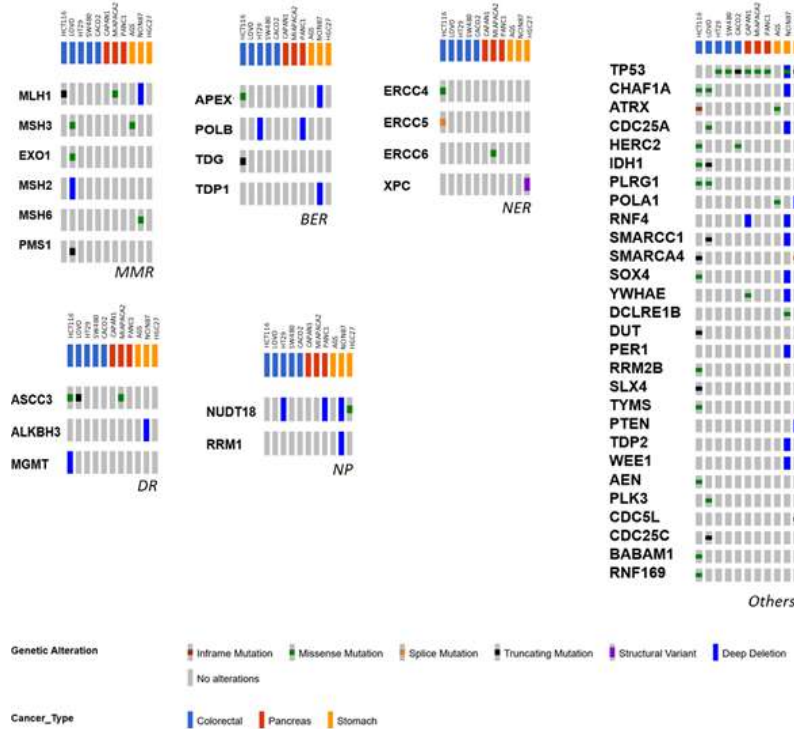


Figura 3. Profilo molecolare delle alterazioni genetiche dei geni DDR identificate nelle linee cellulari tumorali del colon-retto (HCT116, LoVo, HT29, SW480, CaCO2), linee cellulari del tumore del pancreas (CAPAN1, MIAPACA2, PANC1) e linee cellulari del tumore dello stomaco (AGS, NCI-N87, HGC27).

Abbiamo inoltre caratterizzato mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) lo stato mutazionale relativo a 27 geni (FAM175A, APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PTEN, PIK3CA, PMS2, PMS2CL, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2) coinvolti nell'eziopatogenesi del tumore del colon-retto e nelle principali vie di segnalazione DDR in alcune linee cellulari staminali isolate da tumore del colon-retto prelevato da pazienti (CSC#1; CSC#2; CSC#3; CSC#4). Tale caratterizzazione molecolare è stata eseguita al fine di poter utilizzare tali linee cellulari staminali, in grado di crescere come tumorsfere, nella valutazione dell'effetto di nuovi approcci terapeutici basati sull'inibizione di SMYD3 coinvolto nella via HR, in combinazione con l'inibizione di PARP o altri inibitori DDR (Obiettivo 3 del presente progetto di ricerca). Tale analisi molecolare ha messo in evidenza che la linea cellulare CSC#1 presenta alterazioni genetiche coinvolgenti i geni APC (p.Val1822Asp), PIK3CA (p.His1047Leu) e TP53 (p.Val157\_Arg158insLeu). In tale linea cellulare non sono state identificate mutazioni nei principali geni associati alla via di segnalazione HR. La linea cellulare CSC#2 presenta mutazioni nei geni BRIP1 (p.Arg855His), PTEN (p.Ala148Ser) e TP53 (p.Pro72Arg). Nella linea cellulare CSC#3 sono state identificate

le alterazioni coinvolgenti i geni APC (p.Arg805\*; p.Lys1456\*), BRCA1 (p.Lys119Glu), PIK3CA (p.Lys119Glu) e TP53 (c.559+1G>A). La linea cellulare CSC#4 presenta mutazioni nei geni BRIP1 (p.Arg855His), PTEN (p.Ala148Ser). Tale analisi molecolare ha pertanto messo in evidenza che la linea cellulare CSC#1 può essere verosimilmente classificata come HR proficiente in quanto non presenta alterazioni genetiche che determinano perdita di funzione delle principali proteine coinvolte nella via di segnalazione HR (BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, MRE11A, NBN, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D, XRCC2). Pertanto tale linea cellulare può essere considerata un valido modello per saggiare la strategia della letalità sintetica come nuovo approccio terapeutico (Obiettivo 3 del presente progetto di ricerca).



Figura 4. Profilo molecolare delle alterazioni genetiche identificate nei geni analizzati (FAM175A, APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PTEN, PIK3CA, PMS2, PMS2CL, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2) per la caratterizzazione molecolare delle linee cellulari staminali estratte da tumore del colon-retto di pazienti (CSC#1; CSC#2; CSC#3; CSC#4).

Una volta effettuata la caratterizzazione del profilo HR nelle linee cellulari cancerose del tratto gastrointestinale, abbiamo scelto le linee HT29, AGS (HR-proficienti) e HCT116 (presentanti una mutazione in eterozigosi sul gene BRCA2) per ottenere il modello ER-AsiSI inducibile. Nello specifico, il plasmide pBABE-HA-AsiSI-ER è stato trasfettato nelle linee cellulari selezionate mediante classico protocollo di trasfezione con lipofectamina 3000. La selezione dei cloni cellulari che hanno integrato il plasmide in maniera stabile è stata effettuata utilizzando la puromicina, in quanto il plasmide presenta il gene per la resistenza a questo antibiotico quale marker di selezione. Le linee cellulari ingegnerizzate HT29-ER-AsiSI e HCT116-ER-AsiSI sono state validate

mediante analisi di PCR della regione codificante del plasmide, al fine di confermare la corretta integrazione del gene di interesse, che codifica per l'enzima di restrizione AsiSI (Figura 5A). Le cellule HT29-ER-AsiSI, HCT116-ER-AsiSI e AGS-ER-AsiSI sono state successivamente trattate con 4-idrossitamossifene, che promuove la localizzazione nucleare dell'endonucleasi AsiSI, la quale causa molteplici DSBs, somministrato a diversi tempi, allo scopo di valutare la corretta induzione del danno al DNA e di scegliere quindi la modalità di somministrazione adatta tramite analisi per immunofluorescenza dei foci di danno marcati con  $\gamma$ H2AX (Figura 5B).

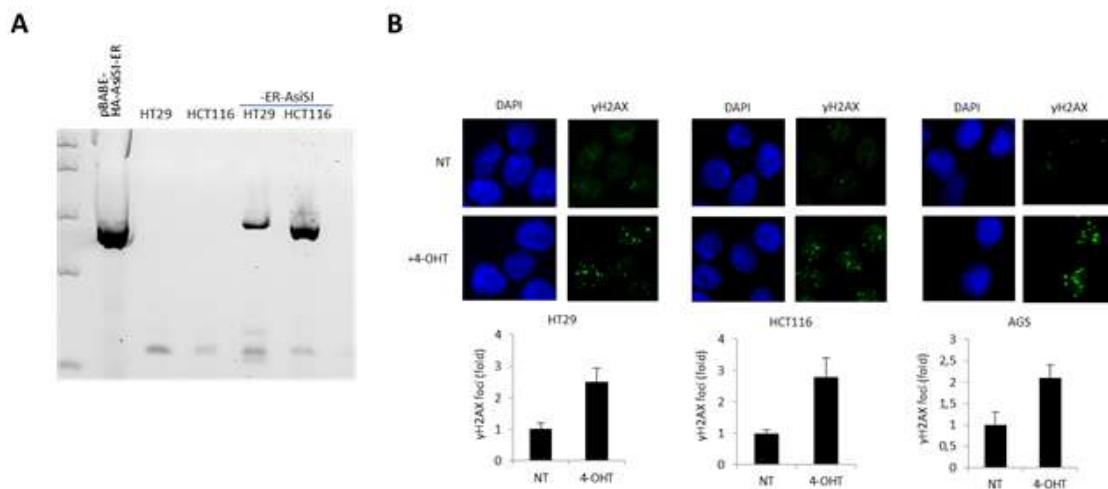


Figura 5. (A) Analisi su gel di agarosio dell'amplificazione della regione codificante del plasmide pBABE-HA-AsiSI-ER in cellule ingegnerizzate HT29-ER-AsiSI e HCT116-ER-AsiSI. L'amplificazione è stata effettuata anche nelle linee parentali HT29 e HCT116 come controllo negativo. In lane 1 è stato caricato il plasmide purificato come controllo del peso molecolare. (B) Analisi per immunofluorescenza dei foci di danno mediante colorazione di  $\gamma$ H2AX in cellule HT29-ER-AsiSI, HCT116-ER-AsiSI e AGS-ER-AsiSI trattate con 4-idrossitamossifene (4-OHT) per indurre la formazione di foci di danno. Grafico in basso: numero di foci di danno in cellule trattate con 4-OHT, normalizzato su foci contati in linee non trattate.

Al fine di utilizzare le linee cellulari tumorali ER-AsiSI ottenute come sistema cellulare per studiare il meccanismo di riparo del DNA in maniera riproducibile, abbiamo effettuato saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con anticorpi specifici per le proteine oggetto di studio (SMYD3, H3K4me3) utilizzando DNA della linea cellulare tumorale HCT116. Nello specifico, le cellule trattate, successivamente fissate, sono state lisate al fine di estrarre la cromatina che è stata successivamente sottoposta a sonicazione per generare frammenti di DNA di circa 100-300 paia di basi, condizione importante per la costruzione successiva delle librerie e l'analisi mediante sequenziamento. Abbiamo quindi ottimizzato il protocollo di sonicazione valutando la





grandezza delle dimensioni dei frammenti di DNA sonicati mediante lo strumento di elettroforesi automatica (TapeStation, Agilent).

Il DNA frammentato è stato successivamente sottoposto ad immunoprecipitazione con gli anticorpi anti-SMYD3 ed anti-H3K4me3, seguendo la procedura descritta nel protocollo del kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFisher Scientific).

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



flussi nucleotidici. Le librerie sono state successivamente sequenziate mediante l'utilizzo del sequenziatore IonGene Studio S5 Prime System (ThermoFisher). I frammenti di Chip-DNA sequenziati (reads, formato file FASTQ) sono stati allineati al genoma umano di riferimento (Homo sapiens (human) genome assembly GRCh37 (hg19)) mediante algoritmi di allineamento della piattaforma Torrent Suite 5.16.1 (ThermoFisher Scientific).

I nostri risultati hanno messo in evidenza che la qualità dei dati di sequenziamento ottenuti può essere considerata di buona/elevata per le seguenti evidenze: (1) buona qualità di caricamento del chip, che prende in considerazione la densità di particelle IonSphere (ISPs) caricate su Chip; (2) elevata qualità di arricchimento e numero totale di frammenti di DNA sequenziati utilizzabili per le analisi successive. Infatti, i nostri dati di sequenziamento hanno messo in evidenza che da ciascuna libreria di Chip-DNA relativa ai campioni HCT116 Input, HCT116 SMYD3, HCT116 H3K4me3 sono stati ottenuti rispettivamente 61,408,084, 44,148,822, 41,050,994 di reads mappate sul genoma di riferimento (dimensione media dei frammenti di DNA allineati: 130 paia di basi). Tale risultato è in linea con quanto riportato nelle linee guida pubblicate da ENCODE [28] in cui viene specificato che per marchi istonici e/o proteine arricchiti/e nei siti di legame del genoma umano (Narrow Marks) è necessario ottenere un numero di frammenti di DNA sequenziati pari a 20 milioni di reads.

Pertanto tali risultati mostrano che la qualità dei dati di sequenziamento dei campioni di Chip-DNA (HCT116 Input, HCT116 SMYD3, HCT116 H3K4me3) rispettano gli standard di qualità elencati nelle linee guida di ENCODE.

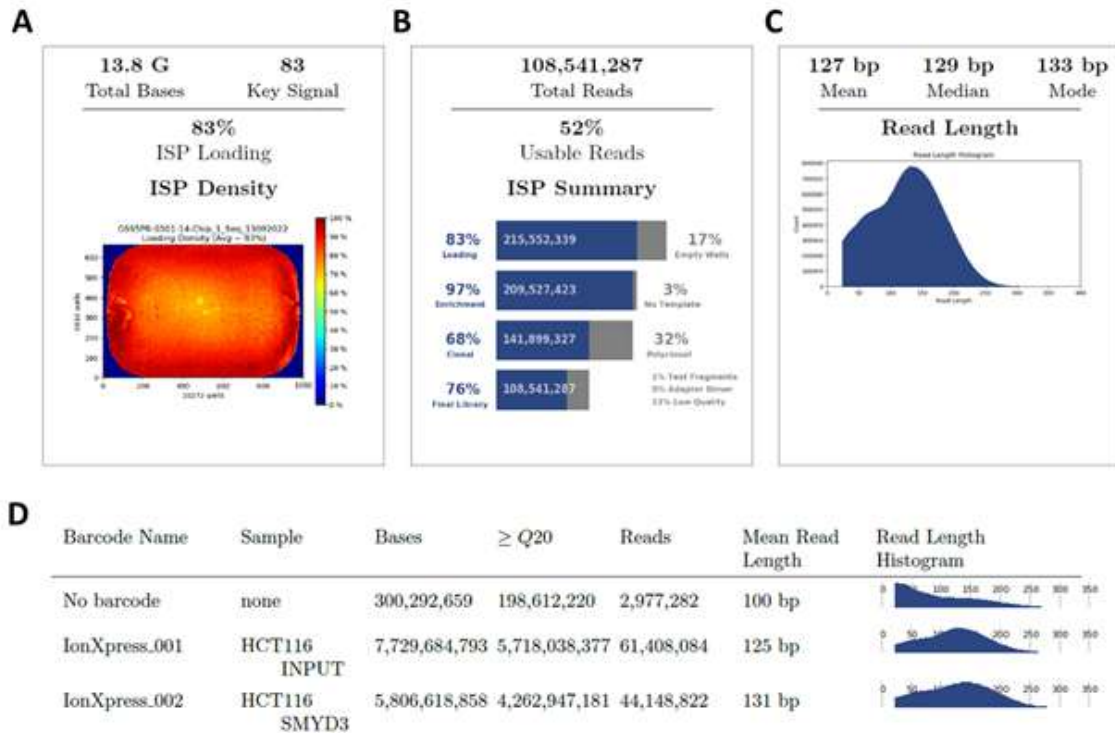


Figura 6. Report della corsa di ChIP-seq relativa ai campioni HCT116 Input e HCT116 SMYD3 (A) Densità di particelle IonSphere (ISPs): rappresentazione a colori dell'Ion Chip come indicatore della percentuale di caricamento sulla superficie fisica del Chip di sequenziamento. Il rosso indica una densità adeguata di caricamento, il giallo una inferiore ed il blu l'assenza di particelle caricate. (B) Analisi del numero totale di reads utilizzabili calcolata normalizzando le reads che superano i filtri di qualità (Final library) sul numero di librerie ISP identificate. (C) Grafico rappresentante tutte le reads delle librerie riportate in paia di basi. La forma dell'istogramma mostra la distribuzione delle dimensioni delle librerie, prive delle sequenze degli adattatori. (D) Dettagli delle reads ottenute per ogni campione (numero di basi, media della lunghezza, Q20 = percentuale di reads che hanno un valore di qualità predetto di 20 o superiore)



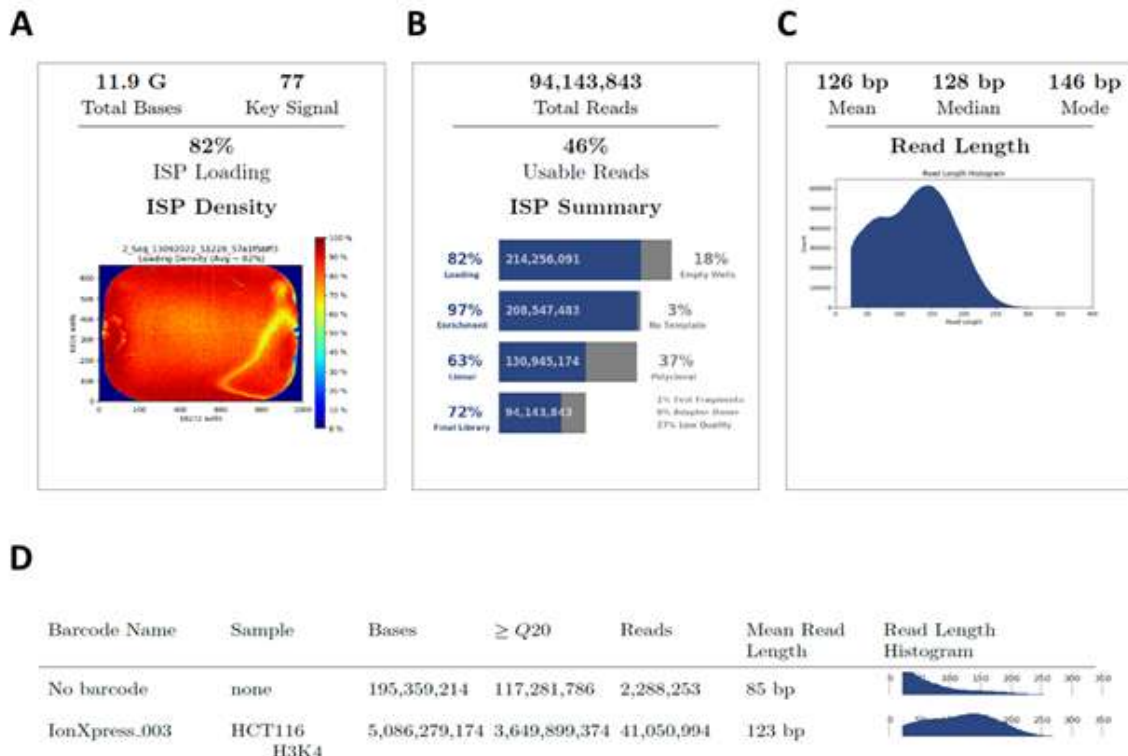


Figura 7. Report della corsa di ChIP-seq relativa al campione HCT116 H3K4 (A) Densità di particelle IonSphere (ISPs): rappresentazione a colori dell’Ion Chip come indicatore della percentuale di caricamento sulla superficie fisica del Chip di sequenziamento. Il rosso indica una densità adeguata di caricamento, il giallo una inferiore ed il blu l’assenza di particelle caricate. (B) Analisi del numero totale di reads utilizzabili calcolata normalizzando le reads che superano i filtri di qualità (Final library) sul numero di librerie ISP identificate. (C) Grafico rappresentante tutte le reads delle librerie riportate in paia di basi. La forma dell’istogramma mostra la distribuzione delle dimensioni delle librerie, prive delle sequenze degli adattatori. (D) Dettagli delle reads ottenute per ogni campione (numero di basi, media della lunghezza, Q20 = percentuale di reads che hanno un valore di qualità predetto di 20 o superiore)

I frammenti di Chip-DNA sequenziati e allineati (reads, formato file BAM) sono stati successivamente sottoposti a chiamata/annotazione dei picchi mediante il tool bioinformatico macsPeakFinder (Model-based Analysis of ChIP-Seq data) al fine di identificare le regioni del genoma che presentano siti di legame con le proteine oggetto di studio (SMYD3, H3K4me3) [29]. Tale analisi ha rilevato la presenza di un numero totale di picchi pari a 11027 (ampiezza media pari a 170 paia di basi) per il campione HCT116 Input, un numero totale di picchi pari a 50265 (ampiezza media pari a 177 paia di basi) per il campione HCT116 IP SMYD3 e un numero totale di picchi pari a 24671 (ampiezza media pari a 448 paia di basi) per il campione HCT116 H3K4me3 (Tabella 1). Analisi bioinformatiche sono attualmente in corso per valutare l’arricchimento delle regioni cromatiniche immunoprecipitate e sequenziate.



	N° picchi totali	Ampiezza media picchi
HCT116 INPUT	11027	170.121 bp
HCT116 SMYD3	50265	177.335 bp
HCY116 H3K4me3	24671	448.86 bp

Tabella 1. Numero di picchi totali e ampiezza media dei picchi rilevati mediante il tool macsPeakFinder

I primi esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina con successivo sequenziamento massivo del genoma (Chip-Seq) ci hanno permesso di standardizzare i protocolli di preparazione del DNA frammentato, di immunoprecipitazione, di preparazione delle librerie di Chip-DNA e di sequenziamento. Tali risultati possono essere considerati promettenti per il proseguo del presente progetto di ricerca. Sono infatti attualmente in corso le caratterizzazioni epigenetiche nelle linee cellulari HCT116-ER-AsiSI HT29-ER-AsiSI e AGS- ER-AsiSI generate al fine di arricchire i marchi istonici selezionati e le proteine dell'HR a livello dei siti di danno DSBs indotti da opportuno stimolo, e di caratterizzare la mappatura epigenetica coinvolta nei meccanismi di riparo del danno al DNA mediata da SMYD3.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

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

Abbiamo in programma di studiare, in modelli cellulari di tumori del tratto GI, l'effetto regolatorio di SMYD3 sui processi di danno e riparo del DNA. Focalizzeremo l'analisi sulla via HR coinvolta nel riparo dei DSBs e sulle modificazioni post-traduzionali che influenzano il rimodellamento della cromatina e promuovono così il riparo del DNA. La nostra attenzione si rivolgerà dunque alle modificazioni epigenetiche degli istoni che sono coinvolte nella risposta al danno al DNA, in quanto fungono da sensori in grado di indurre l'attivazione dei meccanismi di riparo [30]. Infatti, specifiche modificazioni istoniche fungono da sito di attacco per varie proteine effettrici coinvolte nella risposta al danno al DNA, determinando quindi la scelta della via di riparazione del DNA da attivare [30].



Ci avvarremo di un sistema cellulare ingegnerizzato, il quale permette di ottenere un alto numero di DSBs in siti specifici lungo tutto il genoma in risposta all'azione di un agente danneggiante [31, 32]. Ci occuperemo quindi della generazione di tale modello per diversi distretti del tratto GI, in particolare di colon, stomaco e pancreas. Le linee cellulari da ingegnerizzare (es. HT29, HCT116, AGS, PANC1) verranno sottoposte a caratterizzazione molecolare, mediante sequenziamento NGS, al fine di determinare lo stato mutazionale dei geni coinvolti nei principali meccanismi di riparo, in particolare quello HR. Le stesse linee cellulari precedentemente analizzate mostrano alti livelli di SMYD3. Le analisi delle alterazioni molecolari (livelli di SMYD3 e le mutazioni dei geni coinvolti nell'HR) identificano differenti sottotipi molecolari, che permettono di classificare le cellule tumorali oggetto di studio in: i) cellule tumorali proficienti nei geni coinvolti nell'HR che esprimono alti livelli di SMYD3 (HR+/SMYD3 high) e ii) cellule tumorali che mostrano difetti nei principali geni coinvolti nell'HR e che esprimono alti livelli di SMYD3 (HR-/SMYD3 high).

Una volta ottenute queste linee cellulari ingegnerizzate, effettueremo immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) seguita da sequenziamento massivo NGS (ChIP-Seq) per la valutazione del reclutamento di SMYD3, di modificazioni istoniche e dei complessi di riparo sui siti di danno [33].

Valuteremo dapprima le dinamiche di reclutamento di SMYD3 sui foci di danno DSB. Successivamente, verificheremo la presenza, sugli stessi siti, dei componenti della via HR ed analizzeremo i possibili patterns di modificazioni istoniche coinvolti nella risposta HR. Nello specifico, andremo a valutare in primis l'arricchimento dei marchi di metilazione istonica specifici di SMYD3 (es. H3K4me2/3, H4K5me, H4K20me), il cui ruolo nel riparo del DNA è stato precedentemente dimostrato [34, 35]. Successivamente, analizzeremo tutti i marchi istonici coinvolti nella risposta al danno al DNA (es.  $\gamma$ H2AX, H3K9me2/3, H3K27me2/3, H3K79me2/3, H3K36me2/3), in modo tale da caratterizzarne l'arricchimento a livello dei siti di DSB per ogni modello tumorale che studieremo. L'analisi in diverse linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas che presentano alti livelli di SMYD3 e classificate come HR-proficienti (HR+) ci permetterà, infatti, di determinare i profili epigenetici mutualmente esclusivi che mediano le differenze nei meccanismi di risposta al danno al DNA.

La caratterizzazione della mappatura epigenetica ottenuta mediante la tecnologia ChIP-Seq, ci permetterà di eseguire contemporaneamente l'analisi dei molteplici DSBs ottenuti, con una resa superiore al sequenziamento tradizionale, e di valutare complessivamente il reclutamento di SMYD3 e di altri fattori coinvolti nel riparo e



l'arricchimento dei marchi istonici, in modo da ottenere così risultati univoci e d'insieme per l'intero genoma.

## **Obiettivo specifico 2**

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

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

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

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

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



### Obiettivo specifico 3

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

Gli inibitori di PARP si presentano come il trattamento più promettente per i tumori che presentano mutazioni a carico dei geni BRCA1/2 [36]. Utilizzando inibitori di (PARPi), si sfrutta la strategia della letalità sintetica per le sole cellule cancerose, nelle quali i geni BRCA1/2 risultano mutati. Trattandosi però di mutazioni poco frequenti, le possibilità di applicazione di questa terapia sono ad oggi ridotte. Dato il successo dell'applicazione degli inibitori di PARP, un numero elevato di inibitori specifici per fattori coinvolti nei meccanismi di riparo, definiti "inibitori DDR" (DNA damage response (DDR) inhibitors) sono attualmente testati in studi preclinici e clinici, come gli inibitori di ATM, ATR, CHK1/2 [36]. La combinazione di inibitore di PARP e di altri inibitori DDR, o altre combinazioni di inibitori di DDR specifici per fattori coinvolti nella stessa pathway possono dare un potenziale effetto letale sintetica. Inoltre, aberrazioni nelle modificazioni epigenetiche che interessano la regolazione dei meccanismi di riparo del DNA possono essere considerati nuovi potenziali approcci per la strategia della letalità sintetica [37]. SMYD3 risulta quindi essere un valido bersaglio terapeutico e permette l'estensione dell'approccio del letale sintetica, in combinazione con altri inibitori DDR, a quei tumori HR-proficienti. Scopo di questo obiettivo sarà dunque quello di valutare il potenziale di nuovi approcci terapeutici basati sull'inibizione di SMYD3 come fattore epigenetico coinvolto nella via HR, combinata all'inibizione di PARP ed altri inibitori DDR.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'Obiettivo 2, che mostreranno come i singoli inibitori possano influenzare i profili di reclutamento delle proteine sulla cromatina e l'arricchimento dei marchi istonici che ne regolano il rimodellamento, valuteremo le giuste strategie che vedono la combinazione dell'inibizione di SMYD3 con un altro inibitore DDR. I primi sei mesi di questo anno procederemo dunque all'analisi dello status cromatinico (reclutamento SMYD3 ed altri fattori associati al riparo, arricchimento dei marchi istonici), mediante Chip-Seq, di linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas (HR+/SMYD3 high) sottoposte a doppia inibizione (inibitore SMYD3 + inibitore DDR). Valuteremo dal punto di vista molecolare la risposta al danno indotto dalla doppia inibizione. Allo scopo di investigare il potenziale della strategia del letale sintetica ottenuta mediante manipolazione di SMYD3 ed altro inibitore DDR, valuteremo gli effetti citotossici dei trattamenti combinati nelle stesse linee cellulari precedentemente analizzate. Inoltre, a partire da queste linee cellulari, genereremo sfere tridimensionali non aderenti, chiamate tumorsfere, che assicurano rilevanze





fisiologiche maggiori rispetto alle colture monostrato. Sceglieremo linee cellulari che ci permetteranno di ricapitolare il sottotipo tumorale HR+/SMYD3 high, al fine di valutare l'effetto della strategia terapeutica adottata, che permette di estendere l'approccio del letale sintetico a tumori HR-proficienti.

## DATI PRELIMINARI

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

La nostra analisi, condotta su 981 casi di tumore della mammella, ha mostrato che il gene SMYD3 è altamente espresso nel 25% (245/981) dei tumori analizzati e che il 62.4% (153/245) dei tumori della mammella con elevata espressione di SMYD3 sono HR proficienti. Tale dato suggerisce che il 15% (153/981) dei tumori della mammella possono usufruire della terapia combinata con SMD3i/PARPi (Figure 8A, 8B). È stato inoltre messo in evidenza che i livelli di overespressione di SMYD3 sono mutualmente esclusivi con alterazioni geniche indicative di una perdita di funzione delle principali proteine coinvolte nel riparo del DNA (TP53, BRCA1, NEIL2, HERC2, ATM, RAD51C e BRCA2) (Figura 8C). Questo dato mette in evidenza la rilevanza di potenziali approcci



terapeutici che prevedono la combinazione di SMYD3i/PARPi nei tumori HR proficienti e alti livelli di SMYD3.

L'analisi di integrazione dei dati omici eseguita su 459 tumori del colon-retto ha messo in evidenza che il 27% dei tumori analizzati (126/459) mostra livelli di espressione elevata del gene SMYD3 e che il 41.2% (52/126) dei tumori con alta espressione di SMYD3 è classificato come HR proficiente (Figure 8D, 8E). Tale analisi ha inoltre evidenziato che circa l'83% dei tumori del colon retto (383/459) mostra una o più alterazioni genetiche associate a perdita di funzione nei principali geni coinvolti nel riparo al DNA, tra cui MLH1, ATM, EXO5, HERC2 e che alterazioni genetiche coinvolgenti tali geni sono mutualmente esclusive con alti livelli di espressione del gene SMYD3 (Figura 8F). Questi dati dimostrano che l'11% di tutti i tumori del colon-retto (HR+/SMYD3 high) potrebbe beneficiare dell'approccio terapeutico che prevede la combinazione dell'inibizione di SMYD3 e PARP (Figura 1E). Poiché la terapia con inibitori di PARP è stata approvata per il trattamento di pazienti con mutazioni germinali e somatiche dei geni BRCA1/2 nei tumori del pancreas, abbiamo utilizzato dati del TCGA per valutare la prevalenza dei pazienti che potrebbero usufruire della terapia combinata con SMYD3i/PARPi. Tale analisi è stata effettuata su 152 tumori del pancreas rilevando che circa il 27% di tutti i tumori analizzati mostra alti livelli di espressione del gene SMYD3 e che circa il 65% dei tumori del pancreas presenta almeno una mutazione nei geni associati a difetti nel processo di riparo del DNA (Figura 8G). Inoltre è stato messo in evidenza che il 10% dei tumori del pancreas, che presentano alti livelli di espressione di SMYD3 sono HR proficienti, potrebbe usufruire della terapia combinata con SMYD3i/PARPi. (Figura 1H).

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

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



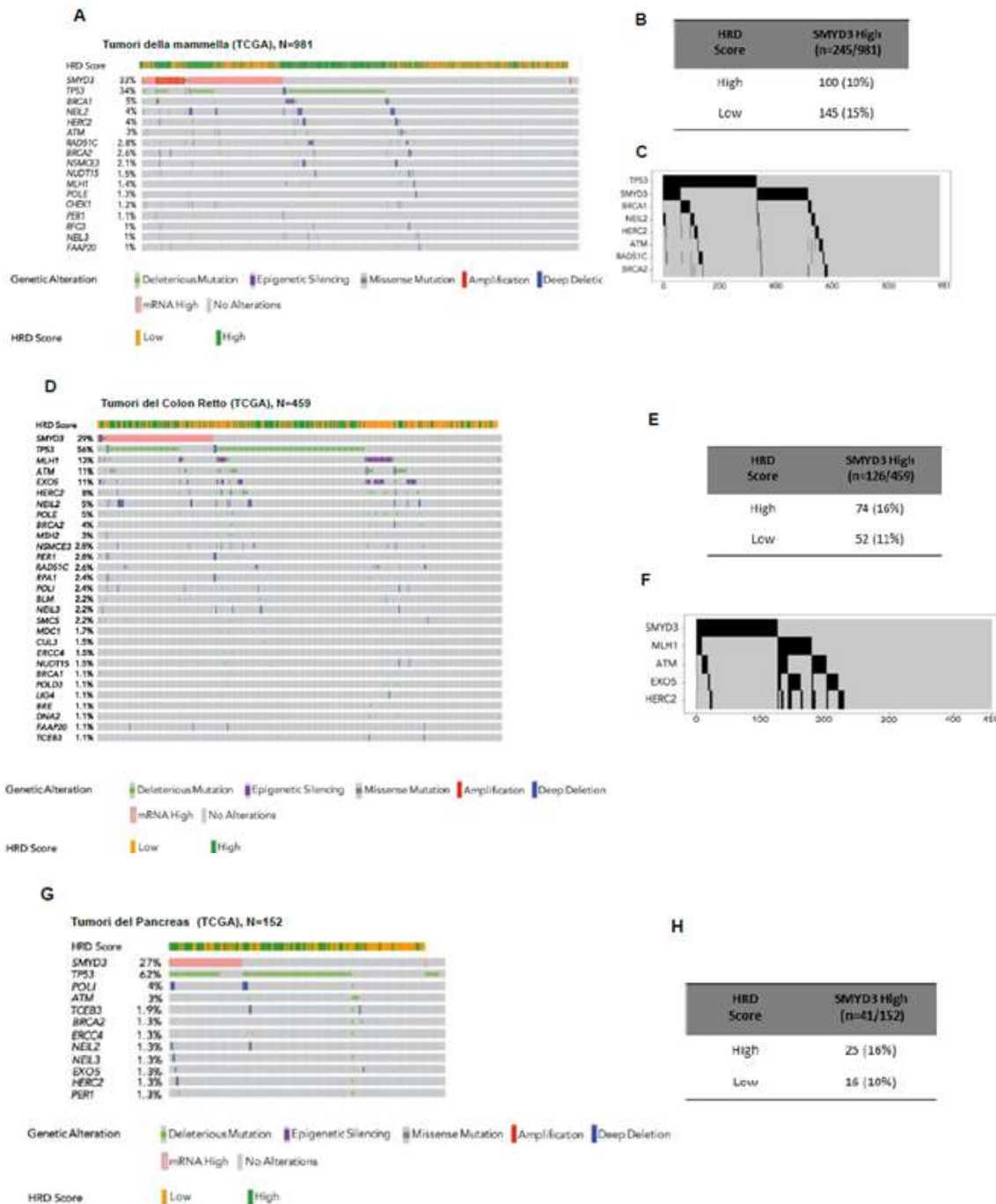


Figura 8: A) Profilo molecolare corrispondente all'integrazione di dati omici (livelli di espressione del gene SMYD3, mutazioni somatiche coinvolgenti i principali geni associati a difetti del riparo del DNA) depositati nel TCGA di 981 tumori della mammella. Lo stato HRD (HRD score) in associazione a ciascun tumore analizzato è rappresentato dai rettangoli gialli (HRD Score Low) e dai rettangoli verdi (HRD Score High). B) Percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR deficienti (HRD Score High) e percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR proficienti (HRD Score Low). C) Analisi di mutua-esclusione nei tumori



della mammella con elevata espressione di SMYD3 e alterazioni genomiche nei geni associati al riparo del DNA (TP53, BRCA1, NEIL2, HERC2, ATM, RAD51C, BRCA2).

D) Profilo molecolare corrispondente all'integrazione di dati omici (livelli di espressione del gene SMYD3, mutazioni somatiche coinvolgenti i principali geni associati a difetti del riparo del DNA) depositati nel TCGA di 459 tumori del colon retto. Lo stato HRD (HRD score) in associazione a ciascun tumore analizzato è rappresentato dai rettangoli gialli (HRD Score Low) e dai rettangoli verdi (HRD Score High). E) Percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR deficienti (HRD Score High) e percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR proficienti (HRD Score Low). F) Analisi di mutua-esclusione nei tumori del colon-retto con elevata espressione di SMYD3 e alterazioni genomiche nei geni associati al riparo del DNA (MLH1, ATM, EXO5 e HERC2).

G) Profilo molecolare corrispondente all'integrazione di dati omici (livelli di espressione del gene SMYD3, mutazioni somatiche coinvolgenti i principali geni associati a difetti del riparo del DNA) depositati nel TCGA di 152 tumori del pancreas. Lo stato HRD (HRD score) in associazione a ciascun tumore analizzato è rappresentato dai rettangoli gialli (HRD Score Low) e dai rettangoli verdi (HRD Score High). E) Percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR deficienti (HRD Score High) e percentuale di tumori con elevata espressione di SMYD3 (SMYD3 High) HR proficienti (HRD Score Low).

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

**Obiettivo 1.** I meccanismi di riparo del DNA SMYD3-dipendenti verranno studiati in cellule ingegnerizzate ER-AsiSI-inducibili, un sistema cellulare largamente utilizzato per l'induzione di specifici DSBs attraverso la somministrazione di 4-idrossitamoxifene [39]. Questo agente promuove la localizzazione nucleare dell'endonucleasi ingegnerizzata AsiSI, la quale causa la rapida induzione di circa 150 DSBs su siti specifici lungo tutto il genoma, fornendo l'opportunità di studiare a livello molecolare gli eventi di riparo che avvengono sui molteplici DSBs localizzati in differenti siti cromatinici. Linee cellulari tumorali di colon, stomaco e pancreas (es. HT29, HCT116, AGS, PANC1) verranno analizzate mediante sequenziamento NGS per una valutazione più approfondita dello stato dei geni coinvolti nei meccanismi di riparo, in particolare quello HR.

Nello specifico, la caratterizzazione molecolare delle linee cellulari tumorali, verrà effettuata mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS) al fine identificare alterazioni genomiche coinvolgenti i principali geni coinvolti nell'HR pathway. Nello specifico si procederà con l'estrazione di DNA dalle linee cellulari kit QIAamp DNA Tissue (Qiagen). La quantità e qualità dei campioni di DNA genomico purificato verrà valutata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), del fluorimetro Qubit4.0 (Thermo Fisher Scientific) e della piattaforma TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Successivamente si procederà con la preparazione di librerie di DNA, partendo da campioni di DNA purificati dalle linee cellulari, al fine di generare un pool di amplificazione delle regioni target dei geni coinvolti nell'HR pathway, secondo i protocolli IonAmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) e



mediante l'utilizzo dello strumento Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l'utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione "Ion GeneStudio S5 Sequencer" (Thermo Fisher Scientific). Le sequenze generate (formato FASTQ) verranno allineate sul genoma di riferimento umano (hg19) utilizzando il tool "Torrent Mapping Alignment Program aligner" implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool "Torrent Suite Browser" (Thermo Fisher Scientific). Verranno successivamente utilizzate pipelines bioinformatiche implementate nei softwares "Torrent Suite" e "Ion Reporter" per la determinazione e l'annotazione di varianti genomiche somatiche (mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni) coinvolgenti i geni HR sequenziati.

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

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

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



umano (hg19) utilizzando il tool “Torrent Mapping Alignment Program aligner” implementato nel Software Torrent Suite (Thermo Fisher Scientific) e la qualità dei dati di sequenziamento verrà valutata mediante il tool “Torrent Suite Browser” (Thermo Fisher Scientific).

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

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

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

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

Nello specifico le linee cellulari ER-AsiSI verranno processate mediante l’utilizzo del Kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (ThermoFischer Scientific). I campioni di DNA associati alle proteine di interesse (CHIP-DNA) verranno sottoposti a preparazione di librerie genomiche secondo i protocolli “Ion CHIP-Seq Library Preparation” (ThermoFisher Scientific). Le librerie di DNA generate, verranno successivamente sottoposte a sequenziamento mediante l’utilizzo della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione “Ion GeneStudio S5 Prime” (Thermo Fisher Scientific).

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



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

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

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

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

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

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

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





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

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

## RISULTATI ATTESI

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

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

## INNOVAZIONI

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

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



prevede la combinata inibizione di SMYD3 e di fattori coinvolti nei meccanismi di riparo, nei tumori del tratto GI.

## BIBLIOGRAFIA

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





21. Caron, P., et al., Cell Rep. 2015; 13:1598–1609.
22. Iacovoni, J.S., et al. EMBO J. 2010; 29: 1446–1457.
23. Clouaire T. et al. Mol Cell. 2018;72(2):250-262.e6.
24. Knijnenburg TA, et al. Cell Rep. 2018 Apr 3;23(1):239-254.
25. Ghandi M, et al. Nature. 2019 May;569(7757):503-508.
26. McCabe N, et al. Cancer Biol Ther. 2005 Sep;4(9):934-6.
27. Zhang Y, et al. Hum Mutat. 2021 Feb;42(2):150-163.
28. Landt SG, et al. Genome Res. 2012 Sep;22(9):1813-31.
29. [Zhang Y, Liu T, et al. Genome Biol. 2008;9(9):R137
30. Wei et al. Journal of Cancer 2018; 9 (12): 2072-2081.
31. Aymard et al. Nature Structural & Molecular Biology 2014; 21:366–74.
32. Gong et al. Genes & Development 2015; 29:197–211.
33. Furey T.S. Nat Rev Genet 2012;13(12):840-52.
34. Hamamoto R, et al. Cancer Sci 2006; 97:113–118
35. Liu C, et al. Cancer Res 2007. 67:2626–2631
36. Faraoni I, Graziani G. Cancers. 2018;10(12):487
37. A., Guo M. Biomark Res. 2020;8:44.
38. Hu Y., Guo M. Cancer Sci 2020; 111(9):3111-3121.

## TIMELINE

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

**Obiettivo 2:** questi esperimenti verranno condotti e completati nel secondo anno del progetto

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



## TITOLO DEL PROGETTO

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

**Ricercatori responsabili:** Francesco Dituri

**Settore di ricerca:** Medicina Personalizzata

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

## **INTRODUZIONE**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una delle neoplasie epatiche più aggressive e letali, e rappresenta la seconda causa di morte legata a cancro globalmente, con una incidenza tendenzialmente in crescita. L'HCC generalmente insorge in un quadro di epatopatia cronica (correlata a eziologia virale, metabolica, o da abuso di alcool), spesso progredita in uno stadio di cirrosi (1,2). Sebbene vi sia stato negli anni un incremento quantitativo e qualitativo delle opzioni terapeutiche di tipo farmacologico, il loro impiego tuttavia non determina complessivamente un esito prognostico soddisfacente. Le terapie chirurgiche (che includono resezione, termoablazione, chemoembolizzazione e trapianto epatico), per quanto efficaci nella rimozione delle masse tumorali macroscopicamente osservabili, non portano alla eradicazione definitiva della neoplasia, data l'elevata frequenza di recidive causata dalla disseminazione di cellule metastatiche (3).

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



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

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

L'esistenza di cellule staminali cancerose è stato postulato essere alla base della resistenza farmacologica delle cellule tumorali ai trattamenti farmacologici. Queste cellule sarebbero dotate di una particolare plasticità che le rende capaci di non rispondere ad agenti terapeutici come gli inibitori di pathway di signaling intracellulare, e rappresentano quindi una riserva di cellule maligne atte ad espandersi per rimpiazzare gli elementi cellulari sensibili eliminati con i trattamenti (8). Una intensa attività di ricerca è in corso per identificare marcatori chiave di cellule tumorali staminali che possano essere impiegati per una selettiva eliminazione di questi elementi (9). I markers cancerosi staminali finora associati all'HCC includono CD13, CD24, CD44, CD133 ed EpCAM (10). Per quanto promettente, la prospettiva di bersagliare le cellule che esprimono questi marker trova alcuni limiti, essendo questi markers non unicamente espressi dalle cellule tumorali, ma anche da cellule normali come fibroblasti e leucociti (11,12). Ciò pone potenziali limitazioni all'impiego di terapie mirate, che potrebbero quindi comportare effetti indesiderati off-target su cellule di tessuti normali. Inoltre, la più alta espressione di questi marker di staminalità cancerosa in soggetti con HCC non è sempre direttamente correlata con un minore tasso di sopravvivenza degli stessi, lasciando intravedere un significato funzionale degli stessi non univocamente pro-tumorale. Considerando la complessità dei processi biologici, ciò suggerisce che un marker catalogato come di staminalità tumorale possa funzionare attivando geni pro- o anti-tumorali simultaneamente e/o in modo contesto-dipendente. Ne consegue che l'efficacia di terapie basate sull'inibizione di marker di staminalità o di multiple chinasi (con farmaci come sorafenib o regorafenib)



potrebbe essere potenziata in maniera significativa associandola all'inibizione funzionale di geni pro-tumorali attivati per effetto dell'inibizione dei marker staminali cancerosi stessi o della farmaco-resistenza indotta dai farmaci.

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

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

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

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

Per conseguire maggior robustezza statistica della validazione, tale analisi sarà estesa ad una ulteriore linea HCC (HLC19), ed eseguita su cellule trattate con dosaggi dei farmaci e tempi di trattamento addizionali, rispetto a quelli impiegati nell'analisi



trascrittomica preliminare. I geni di interesse la cui variazione di espressione a seguito del silenziamento del CD44 o dei trattamenti farmacologici risulterà confermata dall'analisi tramite qPCR e western blot saranno oggetto di ulteriori investigazioni. Verranno quindi disegnate specifiche sequenze di RNA antisenso per il targeting transiente o stabile (tramite strategia RNA-interference) di questi mRNA. Le cellule verranno quindi impiegate in saggi di proliferazione in presenza/assenza di silenziamento dell'espressione dei mRNA di interesse validati, in combinazione con gain/loss-of function di CD44, o presenza/assenza di sorafenib o regorafenib. I geni per i quali il silenziamento, insieme al blocco di CD44 o il trattamento con sorafenib o regorafenib, risultassero in un rinforzo sinergico dell'azione antiproliferativa/pro-apoptotica dei farmaci in vitro saranno candidati come potenziali nuovi target farmacologici da investigare delle fasi pre-cliniche successive.

## Obiettivo specifico 2

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

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

Nell'esecuzione di questi modelli, si testeranno:

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



liposomali per il targeting dei mRNA di risposta agli stessi farmaci validati nell'obiettivo 1.

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

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

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

### Obiettivo specifico 3

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

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





## DATI PRELIMINARI

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

Gli stessi dati di trascrittomiche hanno rivelato che, per effetto del trattamento delle stesse cellule HCC con i farmaci sorafenib e regorafenib alla concentrazione di 2.5  $\mu\text{M}$  per 16 ore, gruppi di geni risultano up- o down-regolati a livello di mRNA (fold change  $\geq 2$  e  $\leq 0.5$ , rispettivamente). Specificamente, dopo trattamento con sorafenib 153 geni risultano up-regolati e 231 geni down-regolati, mentre dopo trattamento con regorafenib 169 geni risultano up-regolati e 238 geni down-regolati. Come per CD44, tra i geni up-regolati a seguito del trattamento con i 2 farmaci, sono stati selezionati esclusivamente quelli per i quali risulti una associazione statisticamente significativa tra up-regolazione e prognosi sfavorevole in pazienti HCC (N = 9 per sorafenib e N = 7 per regorafenib, figure 2 e 3). I prodotti di questi geni rappresentano potenziali mediatori di farmacoresistenza, e il blocco funzionale della loro attività, associato al trattamento con i farmaci che ne inducono l'up-regolazione, potrebbe tradursi in un potenziamento sinergico dell'azione anti-tumorale dei farmaci stessi.



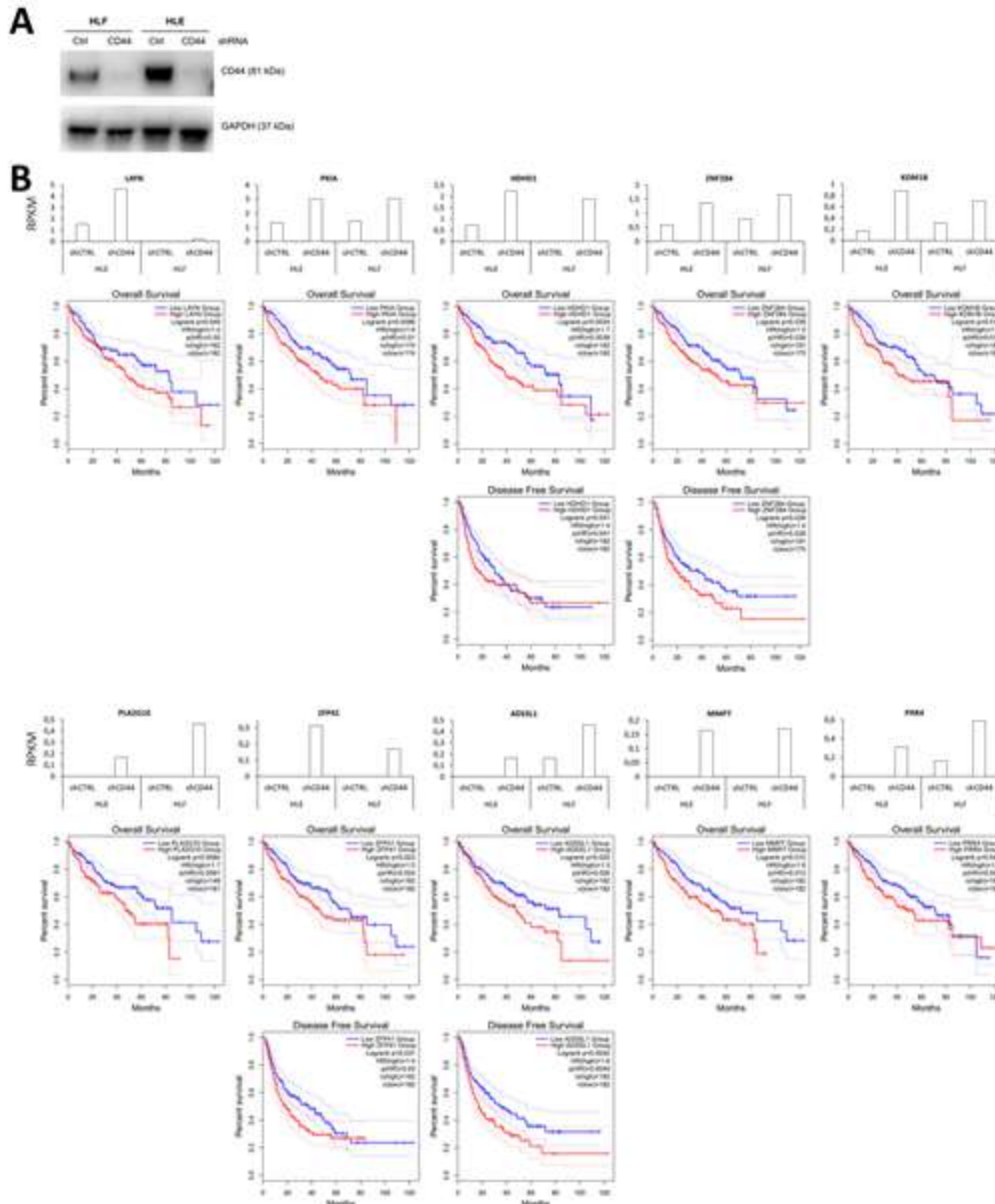


Figura 1. (A) Western blot per l'efficienza di silenziamento di CD44 in linee cellulari di HCC, HLE e HLF; GAPDH è usato come housekeeping gene per il controllo di caricamento (riadattato da Dituri et al, 2020 (17)). (B) Analisi trascrittomica di cellule HCC, HLE e HLF, trasfettate con vettore per l'espressione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

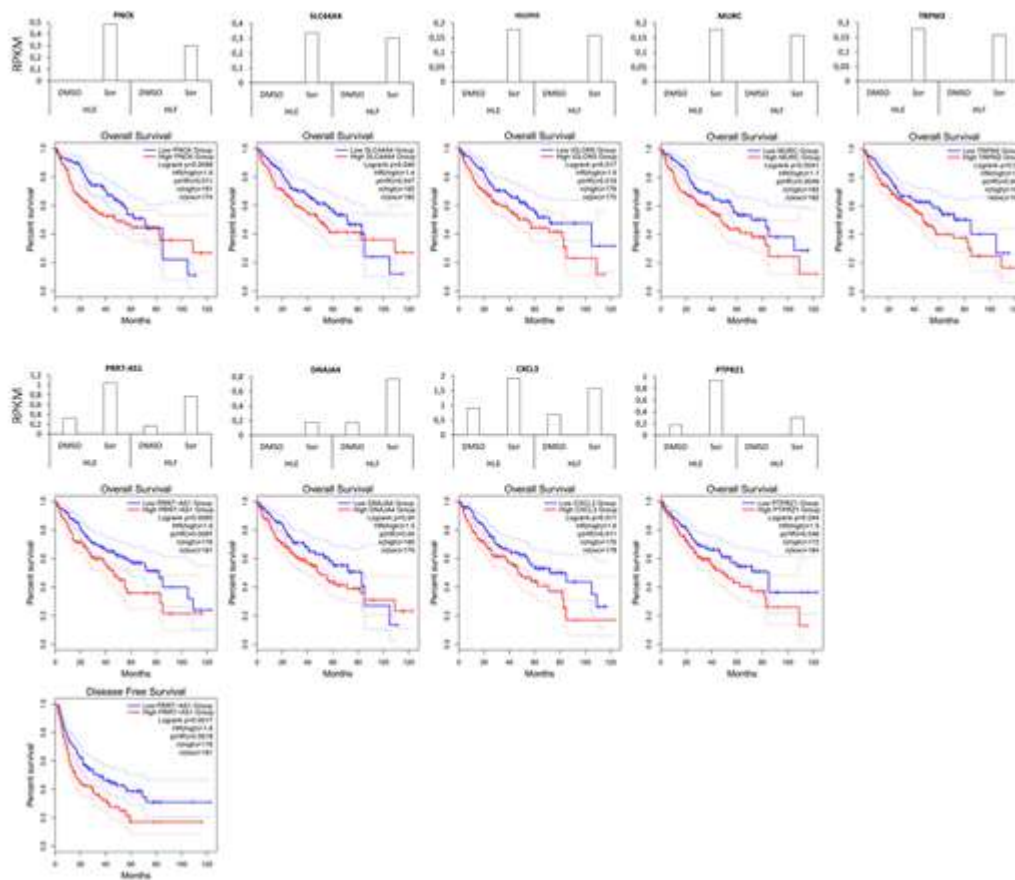


Figura 2. Analisi trascrittomica di cellule HCC, HLE e HLF trattate per 16 ore con veicolo (DMSO), o con sorafenib (Sor) alla concentrazione di 2.5  $\mu$ M. Sono riportati esclusivamente i geni per i quali il fold change è  $\geq 2$  per effetto del trattamento, e per i quali esiste una correlazione statisticamente significativa tra maggior espressione nei tessuti tumorali di pazienti HCC e prognosi sfavorevole (overall e disease free survival, mostrate nelle curve di sopravvivenza Kaplan-Meier). RPKM = Reads Per Kilobase Million

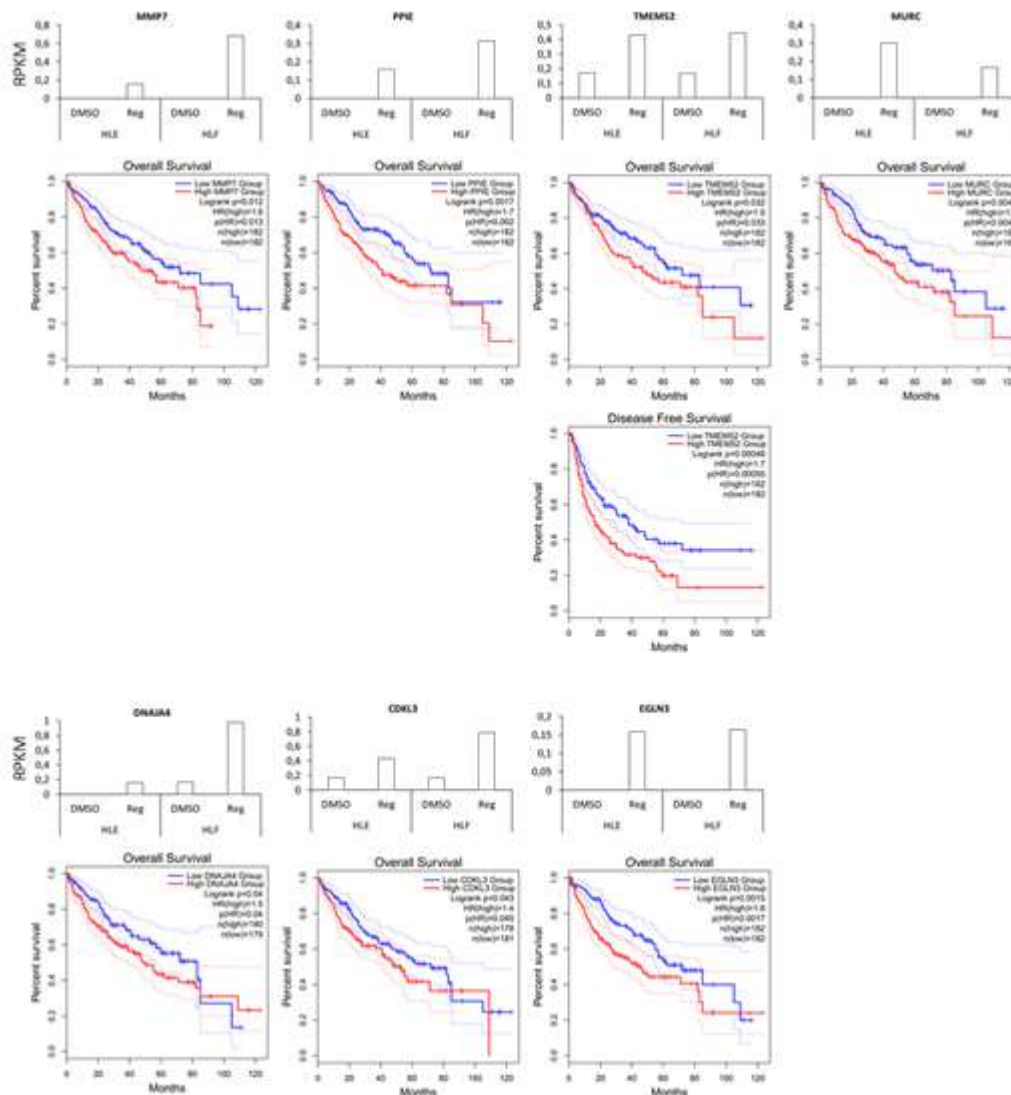


Figura 3. Analisi trascrittomiche di cellule HCC, HLE e HLF trattate per 16 ore con veicolo (DMSO), o con regorafenib (Reg) alla concentrazione di 2.5 µM. Sono riportati esclusivamente i geni per i quali il fold change è ≥ 2 per effetto del trattamento, e per i quali esiste una correlazione statisticamente significativa tra maggior espressione nei tessuti tumorali di pazienti HCC e prognosi sfavorevole (overall e disease free survival, mostrate nelle curve di sopravvivenza Kaplan-Meier). RPKM = Reads Per Kilobase Million

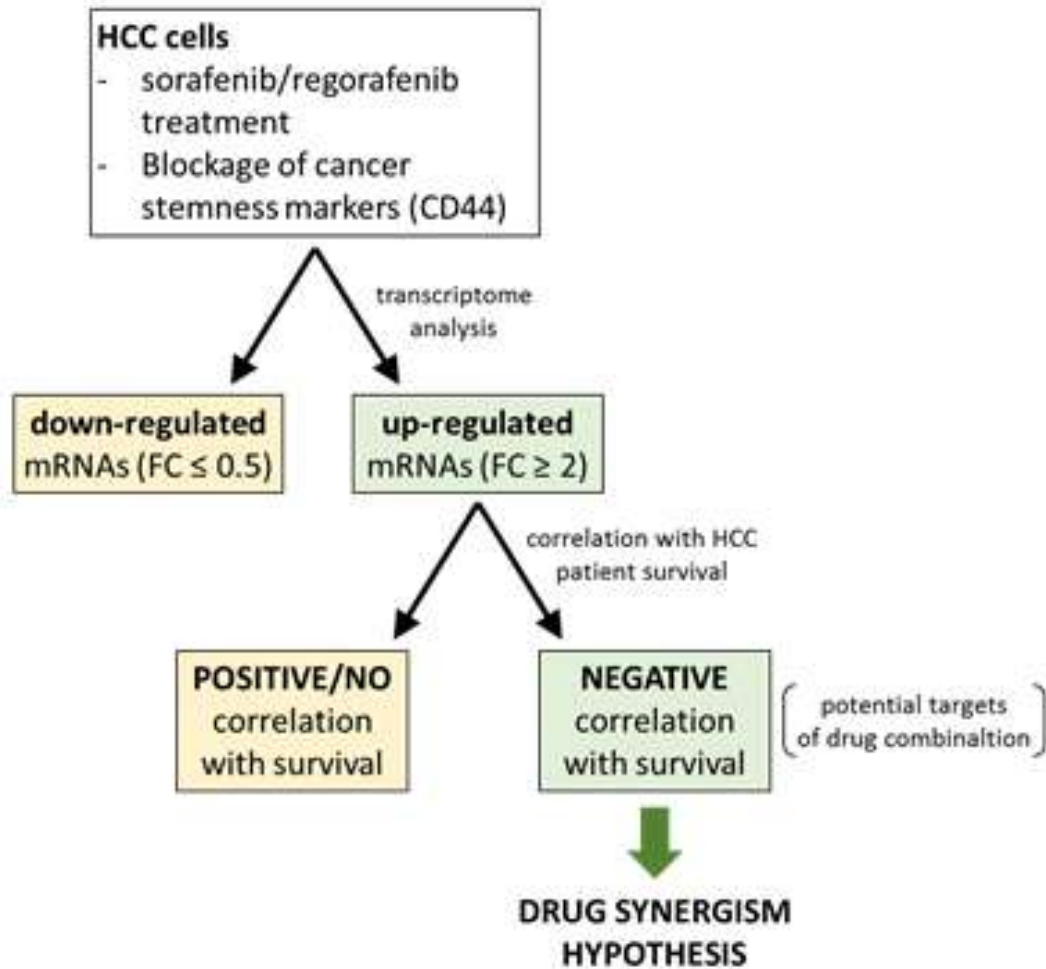


Figura 4. Diagramma descrittivo dell'ipotesi di partenza del progetto. FC = Fold Change.

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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

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



saranno generati a partire da frammenti tumorali di HCC ottenuti da chirurgia tramite resezione.

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

## RISULTATI ATTESI

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

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

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

## INNOVAZIONI

La ricerca sul cancro è incessantemente impegnata nell'identificazione di nuovi target molecolari coinvolti nella progressione maligna da aggredire farmacologicamente per migliorare il decorso clinico della patologia. In particolare, di grande interesse è l'individuazione di target (già noti o di nuova scoperta) la cui inibizione farmacologica combinata possa tradursi in effetti anti-tumorali sinergici, dato il vantaggio derivante dalla maggior efficacia della combinazione di molecole rispetto alla somma degli effetti delle molecole somministrate singolarmente. Il carattere innovativo del nostro progetto risiede nell'aver rivelato una inattesa iper-attivazione, in cellule HCC, di geni associati a progressione di questa neoplasia, in risposta all'inibizione di marcatori di staminalità cancerosa o all'azione di farmaci in uso nella pratica clinica (sorafenib/regorafenib). Il blocco funzionale di questi geni, in associazione all'inibizione di marcatori di staminalità





cancerosa, o all'impiego di quei farmaci potrebbe tradursi in una amplificazione su base sinergica dell'efficacia anti-tumorale. I risultati attesi nello svolgimento del progetto puntano alla rilevante finalità di by-passare le resistenze farmacologiche indotte dalle molecole usate nel trattamento dell'HCC e pongono le basi per il raggiungimento di un reale beneficio in termini prognostici per questa neoplasia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* (2021) doi: 10.1038/s41572-020-00240-3
2. Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2011) doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.006
3. Yu J jing, Xiao W, Dong S lin, Liang H fang, Zhang Z wei, Zhang B xiang, Huang Z yong, Chen Y fa, Zhang W guang, Luo H ping, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* (2018) doi: 10.1186/s12885-018-4744-4
4. Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, Maini MK, Mazzaferro V, Pinato DJ, Pikarsky E, Zhu AX, Finn RS. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* (2022) doi: 10.1038/s41571-021-00573-2
5. Kudo M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Latest advances. *Cancers (Basel)* (2018) 10: doi: 10.3390/cancers10110412
6. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, Wang Q, Wang S, Rong D, Reiter FP, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther* (2020) doi: 10.1038/s41392-020-0187-x
7. Bao MHR, Wong CCL. Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer. *Cells* (2021) doi: 10.3390/cells10071715
8. Wang N, Wang S, Li MY, Hu BG, Liu LP, Yang SL, Yang S, Gong Z, Lai PBS, Chen GG. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* (2018) doi: 10.1177/1758835918816287



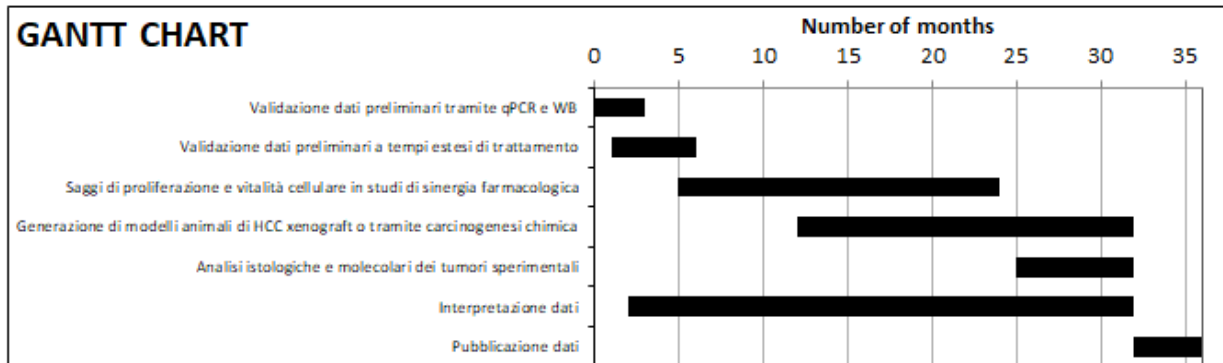


9. Gramantieri L, Giovannini C, Suzzi F, Leoni I, Fornari F. Hepatic cancer stem cells: Molecular mechanisms, therapeutic implications, and circulating biomarkers. *Cancers (Basel)* (2021) doi: 10.3390/cancers13184550
10. Tsui YM, Chan LK, Ng IOL. Cancer stemness in hepatocellular carcinoma: mechanisms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



## TIMELINE

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





## TITOLO DEL PROGETTO

### **NUOVE FORMULAZIONI LIPOSOMALI PER IL TARGETING SIMULTANEO DEL PATHWAY DI NOTCH IN EPATOCARCINOMA E DELL'INFLAMMASOMA NLRP3 IN MACROFAGI ASSOCIATI A TUMORE**

**Ricercatori responsabili:** Francesco Dituri

**Settore di ricerca:** Medicina Personalizzata

**Parole chiave del progetto:** HCC, drug delivery, nanoparticelle liposomali, target therapy

## INTRODUZIONE

I tumori epatici figurano come la seconda causa di morte correlata al cancro a livello globale. Circa il 90% di queste neoplasie è rappresentato dal carcinoma epatocellulare (HCC). L'HCC si sviluppa generalmente come conseguenza di una patologia cronica infiammatoria/cirrotica a carico del fegato, a sua volta scatenata da agenti eziologici di natura virale (HBV, HCV, HDV), alterazioni dello stesso organo legate a malattie metaboliche (come NASH o NAFLD), ingestione di alimenti contenenti l'aflatossina B1, o eccessivo consumo di alcool. L'HCC mostra modesta responsività agli agenti chemoterapici comunemente in uso nel trattamento di altri tumori solidi. L'approccio chirurgico (mediante resezione, termoablazione o chemioembolizzazione) costituisce in effetti l'opzione terapeutica di maggior impatto sul tasso di sopravvivenza complessiva dei pazienti con HCC. Le ragioni dello scarso effetto curativo dei farmaci disponibili dipendono almeno in parte dall'elevata complessità biologica a livello cellulare e molecolare dell'HCC. Il microambiente tumorale ha un ruolo notevole nell'accrescere la malignità e l'eterogeneità intra-tumorale (nello stesso paziente) e inter-tumorale (tra pazienti diversi). Tale componente include molteplici tipi cellulari, come le cellule stromali (fibroblasti), endoteliali vascolari e immunitarie (come diverse sottoclassi linfocitarie e macrofagi), e le molecole della matrice extracellulare (come collagene, fibronectina, laminina ecc.) e si sviluppa in concomitanza con l'instaurarsi delle condizioni pre-neoplastiche associate all'epatopatia cronica, ossia l'infiammazione e la degenerazione fibrotico/cirrotico. Le cellule del microambiente interagiscono



mutuamente ed in modo complesso con le cellule tumorali, sia per interazione diretta, che tramite secrezione di molecole solubili (fattori di crescita, citochine, chemochine ecc.), macro, microvescicole e nanovescicole (esosomi), o della matrice. L'architettura del tipico microambiente tumorale è composta da fibroblasti associati al cancro (CAF), cellule endoteliali, periciti, cellule adipose, cellule del sistema immunitario tra cui i macrofagi associati al tumore (TAM) ed elementi della matrice extracellulare (ECM). Queste interazioni sono mediate e si evolvono costantemente attraverso la segnalazione paracrina e juxtacrina utilizzata da molti pathway. Tra questi, vi è la segnalazione di Notch che ha un ruolo importante nella regolazione del crosstalk tra cellule tumorali e i componenti del microambiente indotta dal contatto cellula-cellula, tra una cellula che invia ed una che riceve il segnale. I segnali scambiati tra le cellule attraverso queste interazioni determinano così i destini delle cellule stesse, mentre la disfunzione della via di segnalazione di Notch interessa diversi aspetti della biologia del tumore, come l'angiogenesi, il mantenimento delle cellule staminali del cancro, l'infiltrato immunitario o la resistenza alla terapia.

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

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

Nel 2010, Akira e colleghi hanno dimostrato che uno step fondamentale per attivare qualsivoglia risposta infiammatoria, da parte del sistema immunitario innato, è rappresentato dal riconoscimento di molecole prodotte e secrete dai microorganismi da parte di recettori presenti sulle cellule appartenenti al sistema stesso. Un pathway fondamentale in questo contesto è rappresentato dall'inflammasoma, descritto per la prima volta nel 2002, e che, soprattutto nell'ultimo decennio, sta emergendo essere il mediatore principale dell'interazione tra organismo ospite e patogeno. L'inflammasoma è un complesso multi-proteico che si assembla in risposta ad un ampio spettro di patogeni culminando con l'attivazione di proteine, quali caspasi-1 e gasdermina D, che garantiscono rispettivamente la maturazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, interleuchina (IL) IL-1 e IL-18, in circolo da un lato e la morte



cellulare dall'altro, in un processo chiamato piroptosi, il quale contribuisce alla propagazione dell'infiammazione stessa. Tuttavia, un'attivazione incontrollata dell'inflammasoma determina un cambio di ruolo dello stesso, in particolare, da azione protettiva contro la perdita dell'omeostasi tissutale, allo sviluppo di patologie autoimmuni, immunosoppressione, cancro e insorgenza di metastasi. La sua completa attivazione avviene in due fasi temporalmente distinte. La prima fase, anche chiamata priming step, prevede l'attivazione del Toll-like Receptor (TLR), da parte di LPS, e del signaling pathway sottostante, che mediante NF- $\kappa$ 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  $\mu$ m. Tale filamento rappresenta la base per il reclutamento delle pro-caspasi-1 e per il loro successivo processamento nella forma matura. Infine, le caspasi-1 attive tagliano le citochine pro-infiammatorie nella loro forma biologicamente attiva e, parallelamente, le gasdermine D, il cui frammento N-terminale, il frammento attivo, forma dei pori sulla membrana citoplasmatica, promuovendo il rilascio delle citochine neoformate, nonché la piroptosi. Attraverso metodiche di microscopia ottica, si evince che l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, comporta la formazione di un singolo speck (o punctum) perinucleare per cellula al quale convogliano tutte le molecole facenti parte del pathway al fine di potenziarne l'azione. Il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nell'infiammazione dell'apparato gastrointestinale, nonché nella tumorigenesi, sta emergendo negli ultimi anni. Ad esempio, alcuni studi hanno evidenziato che topi knockout per NLRP3, per caspasi-1 o per IL-1 sviluppano coliti o infiammazioni intestinali con una incidenza significativamente ridotta rispetto ai corrispettivi wild-type. Inoltre, IL-1 e IL-18 svolgono un ruolo di immunosoppressione, favorendo la formazione di un microambiente pro-tumorale. IL-1 risulta avere un ruolo chiave nella soppressione della risposta immunitaria verso lo sviluppo tumorale attraverso un meccanismo di richiamo e attivazione in situ delle Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC), componenti chiave del microambiente tumorale e caratterizzate dalla loro abilità di produrre citochine con funzioni inibitorie, ossido nitrico sintasi, arginasi, e di indurre ed attivare le cellule T-regolatorie, tutti fattori con potenti azioni immunosoppressive. Diventa fondamentale, quindi, riuscire a prevenire, o convertire, un'over-attivazione di NLRP3 nel microambiente tumorale al fine di sollecitare il sistema immunitario verso un fenotipo più marcatamente anti-tumorale che pro-tumorale. Per far sì che questo possa avvenire efficacemente ed in modo tessuto-cellula-specifico, quindi interessando solo il tessuto tumorale e il microambiente ad esso correlato, di cui fa parte anche la componente



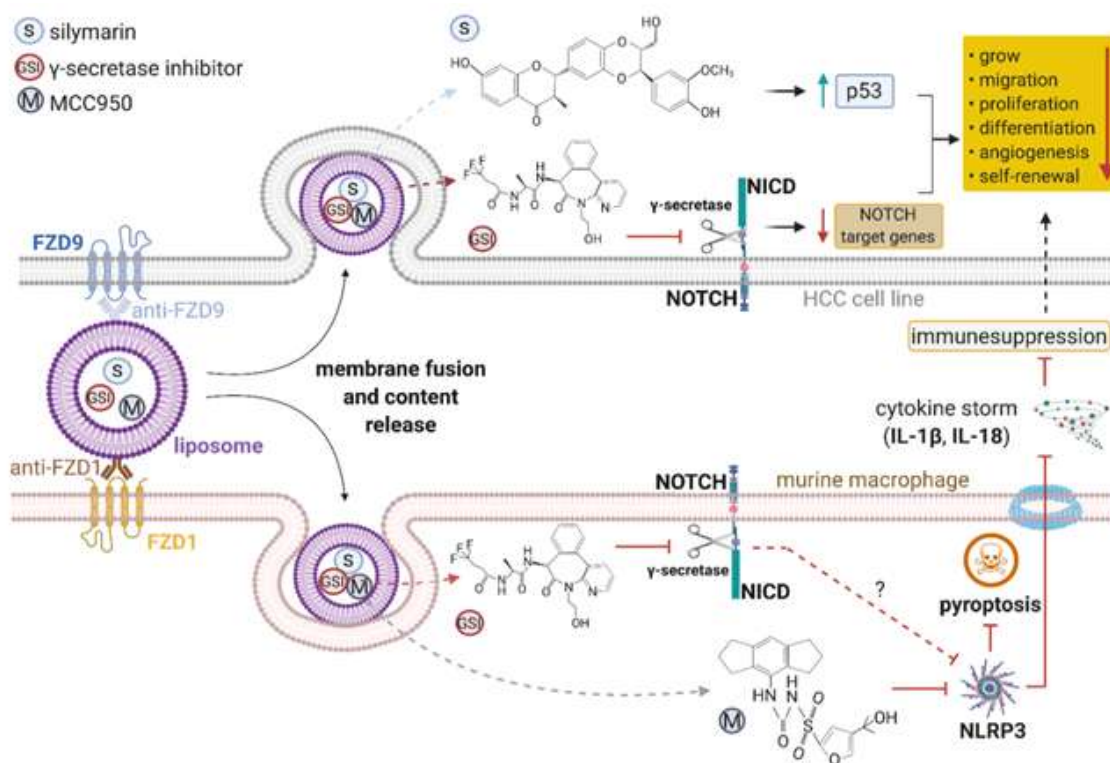
infiammatoria, diversi studi si stanno orientando sull'utilizzo di nanoparticelle di natura organica e/o inorganica, da far giungere per via sistemica al sito di trattamento.

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



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

Di seguito riportiamo schematicamente lo scopo del progetto.



## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

### Preparazione e caratterizzazione delle nanoformulazioni e dei farmaci incapsulati

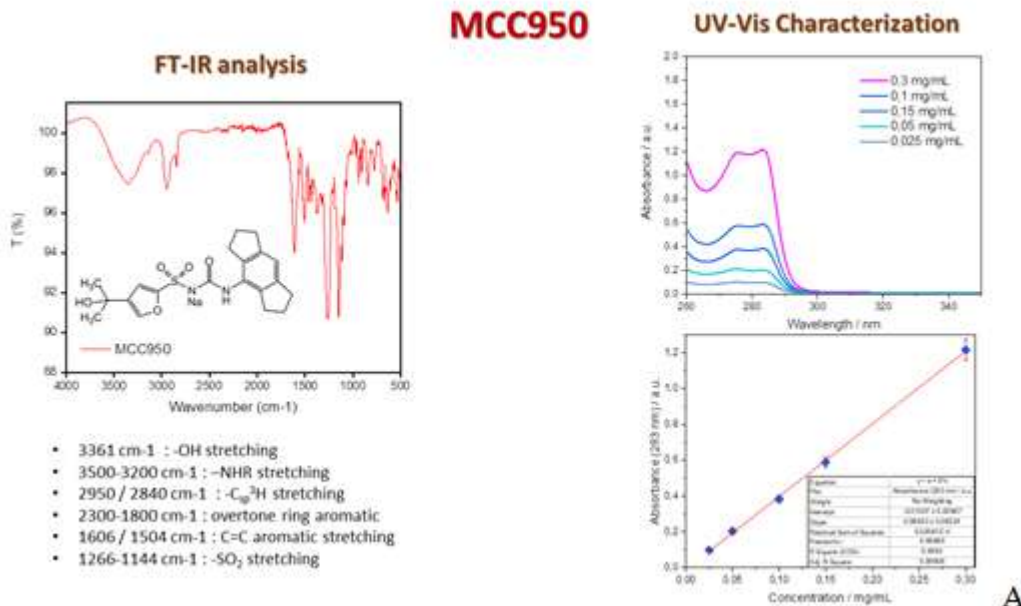
Nella prima fase di studio, sviluppando il primo obiettivo, abbiamo preparato e studiato a livello chimico fisico e conformazionale, la formulazione liposomiale, caratterizzandola, sia da vuota che in presenza dell'inibitore dell'inflammasoma MCC950. Schematicamente, il liposoma che realizzato è costituito da una shell

fosfolipidica, costituita da un bilayer al cui interno sono presenti le molecole di MCC950 (Figura 1).



Figura 1. Schema di preparazione dei liposomi contenuti MCC950 e localizzazione all'interno della shell fosfolipidica.

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



**Silymarin**

**UV-Vis Characterization**

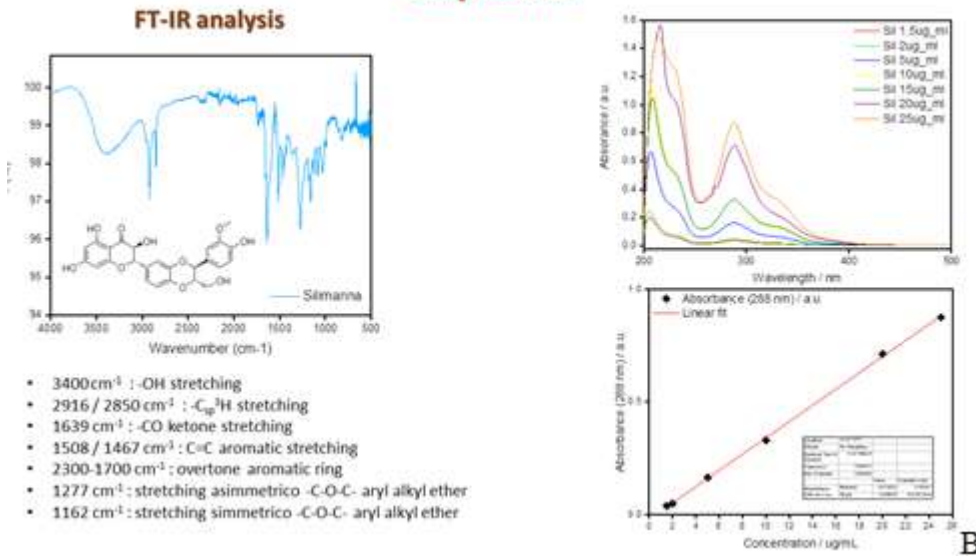


Figura 2 FT-IR e Spettrometria di 2 delle 3 molecole proposte come farmaci per la produzione del nanosistema da drug delivery

La preparazione delle varie formulazioni liposomiali (LP), in particolare in figura 3A è riportata la tabella riassuntiva delle varie formulazioni utilizzate per produrre liposomi che fossero biocompatibili soprattutto con le cellule normali epatocitarie. Dalla tabella si evince che la formulazione liposomiale più adeguata da utilizzare è la LP\_3, poiché il potenziale negativo si avvicina al potenziale di membrana delle cellule. In figura 3B il grafico estrapolato dal DLS, ripropone una popolazione particellare con una distribuzione monomodale, ed un indice di polidispersione (0.238±0.010) adeguato ad una sospensione particellare adeguata all'utilizzo per il drug delivery di nostro interesse. In figura 3C e 3D invece, riportiamo immagini descrittive di microscopia elettronica, rispettivamente TEM e SEM, in cui viene confermata l'omogeneità dimensionale delle particelle.

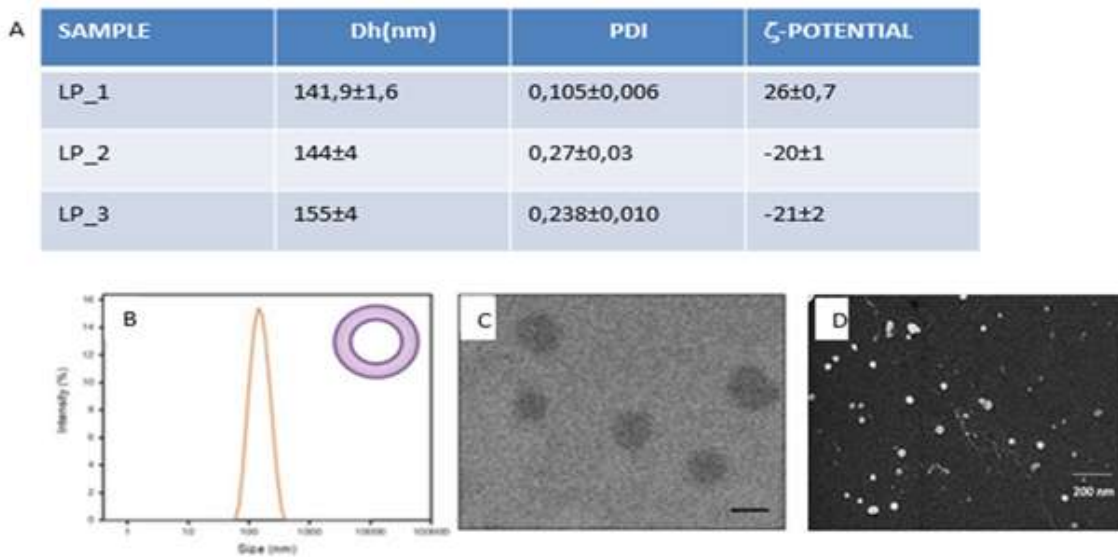


Figura 3 Caratterizzazione delle diverse formulazioni liposomiali vuote, effettuata con DLS, TEM e SEM

Nella formulazione LP\_3 abbiamo caricato il farmaco MCC950, inibitore dell'inflammasoma, specificatamente per NLRP3, ottenendo nelle varie preparazioni diverse concentrazioni di farmaco, da cui abbiamo ottenuto sempre delle preparazioni omogenee, da un punto di vista conformazionale, un potenziale zeta di membrana negativo, per cui consono alla somministrazione cellulare e dimensioni nanoparticellari che non hanno superato i 150 nm. In tabella 4A, riportiamo l'analisi DLS dei liposomi contenenti MCC950, nella quale si evince che le dimensioni dei liposomi sono aumentate così come è aumentata la negatività del potenziale zeta.

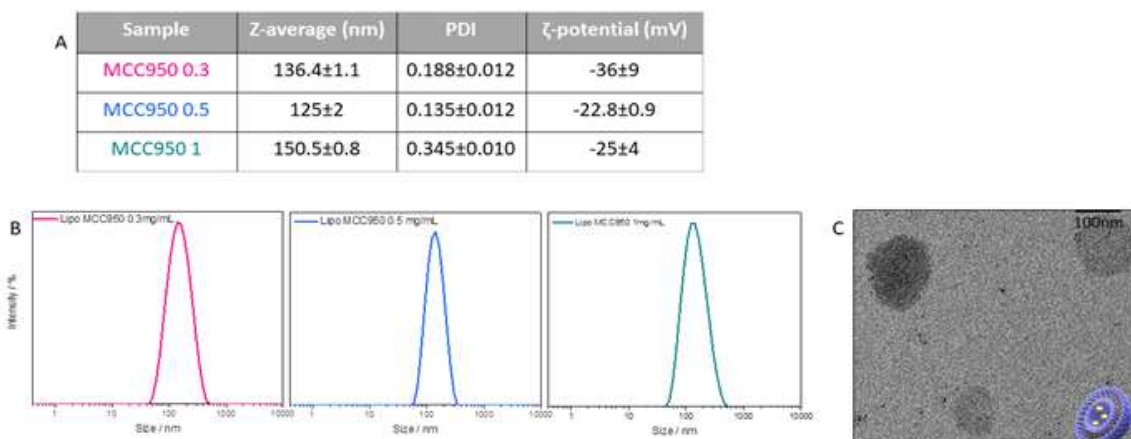


Figura 4 Caratterizzazione delle formulazioni complete con MCC950, attraverso l'utilizzo del DLS e del TEM

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

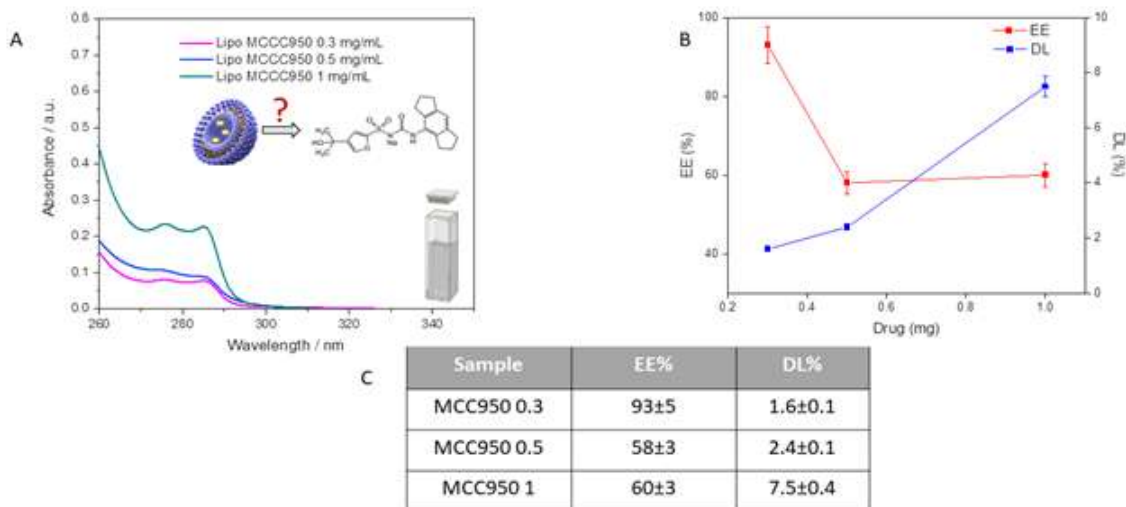


Figura 5 Studio del rilascio e dell'efficienza di incapsulazione del farmaco a varie concentrazioni

### Uptake dei liposomi nelle diverse linee cellulari.

Come abbiamo dimostrato l'anno scorso, l'uptake completo dei liposomi avviene definitivamente dopo 8 ore..

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

Lo scorso anno abbiamo dimostrato che non vi è tossicità quando somministravamo a tutte le linee cellulari i nanocomposti, quindi sono completamente biocompatibili, sia quando i liposomi sono targhettanti che quando non sono coniugati con l'anticorpo.



## Attivazione o inibizione dell'inflammasoma

In figura 6 riportiamo l'immunofluorescenza effettuata sulle THP1 per lo studio dell'attivazione dell'inflammasoma. E' possibile constatare come in presenza del farmaco incapsulato i punctus di ASC sono limitati rispetto a quelli presenti nelle cellule trattate con il farmaco libero, alla stessa concentrazione e che laddove sono visibili i Cdot, ( che ricordiamo sono stati utilizzati come tracciante per MCC950 incapsulato), l'attivazione non c'è.

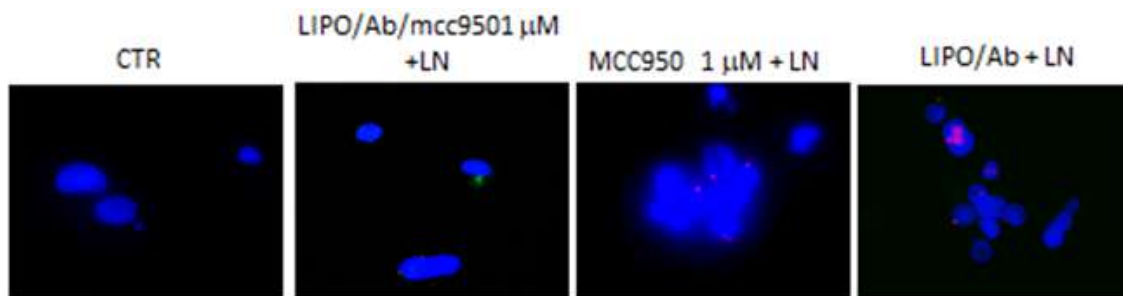


Figura 6. Attivazione ed inibizione dell'inflammasoma in presenza dei liposomi targhettanti FZD1 con e senza MCC950, a parità di concentrazione con il farmaco libero.

## Animali

Attualmente si stanno allevando dei topi Wild Type, utilizzando la dieta ricca di grassi e somministrazione periodica di DSS, per lo sviluppo dell'infiammazione.

I topi al momento hanno raddoppiato il loro peso corporeo ( in media peso di partenza 18g, peso attuale 36g) e, prossimamente inizieremo il trattamento con i liposomi e con il farmaco libero dividendoli in 4 gruppi come è stato fatto per gli esperimenti in vitro su THP1.

Ciò che ci aspettiamo è che ci sia anche in vivo un'inibizione dell'inflammasoma a concentrazioni di farmaco molto basse rispetto a quelle utilizzate usualmente nella somministrazione di MCC950 come farmaco libero.

## RISULTATI ATTESI

In linea con i risultati attesi lo scorso anno, e nel rispetto del timeline e del gantt proposti con il progetto, con i risultati ottenuti siamo ottimisticamente confidenti sul





proseguo dello stesso, nella linea prestabilita, considerando comunque gli eventuali problemi sperimentali che potrebbero insorgere durante lo sviluppo e la messa in opera del progetto stesso. Ci aspettiamo quindi che i risultati futuri saranno coerenti con quanto ottenuto sino ad ora e con quanto proposto nel progetto sottomesso lo scorso anno



## TITOLO DEL PROGETTO

**SMYD3, SCREENING TRIPEPTIDICO IN SILICO, INTERATTOMA DI SMYD3, CANCRO DEL COLON RETTO, HALLMARKS DEL CANCRO, STIMOLI STRESSORI, RISPOSTA ADATTATIVA DELLE CELLULE TUMORALI A STIMOLI STRESSORI.**

**Ricercatori responsabili:** Candida Fasano

**Settore di ricerca:** Genetica Medica Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** SMYD3, Screening tripeptidico in silico, Interattoma di SMYD3, Cancro del colon retto, Hallmarks del cancro, Stimoli stressori, Risposta adattativa delle cellule tumorali a stimoli stressori.

## INTRODUZIONE

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

Come tutti i processi biologici, anche la cancerogenesi dal punto di vista evolutivo può essere considerata come un processo adattativo multistep che prevede una riprogrammazione dell' epigenetica e dell'omeostasi metabolica della cellula pre-cancerosa in risposta a diversi stimoli stressori endogeni (checkpoints cellulari). In particolare, le cellule tumorali sono spesso soggette a condizioni di stress persistenti e



sviluppano sofisticati meccanismi adattativi per superare la pressione evolutiva imposta da diversi meccanismi di controllo cellulare [2,3]. Tale processo adattativo culmina con l'acquisizione di una o più caratteristiche adattative note come "hallmarks" del cancro. Oggi si conoscono 10 hallmarks del cancro che quindi rappresentano delle abilità adattative che permettono alla cellula pre-cancerosa di sopravvivere, di trasformarsi in cellula tumorale e di progredire nella sequela patologica del cancro che generalmente culmina con la metastatizzazione, ovvero la formazione di metastasi in distretti corporei differenti dalla sede del tumore primario [2].

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

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

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

Con questo progetto si vuole investigare l'ipotesi che il ruolo oncogenico di SMYD3 venga svolto in vari momenti della risposta adattativa allo stress che una cellula cancerosa mette in atto fin dalle primissime fasi della cancerogenesi. Nella fase precoce della cancerogenesi, SMYD3 interagendo con HSP90 e RPB1, può mediare la risposta epigenetica a diversi stimoli stressori (per es. stress ossidativo, genotossico e



metabolico) [5]. Al persistere dello stimolo stressorio nella fase intermedia della cancerogenesi, SMYD3 interagendo direttamente con i principali sensori dello stress (ad es. HSP90, ATM, AMPK) può favorire l'attivazione di specifiche vie di segnalazione in risposta allo stress, mentre in una fase tardiva della cancerogenesi SMYD3 può interagire con effettori delle vie di segnalazione proliferative, angiogenetiche e della metastatizzazione (come AKT1, VGFR1, p53, MAP3K2), promuovendo la proliferazione e la progressione delle cellule tumorali [5,6].

In letteratura, un numero crescente di prove indica che SMYD3 è sovraespresso in diversi tumori umani, evidenziando il suo ruolo cruciale nella cancerogenesi e nella progressione tumorale [5]. In vivo, la sovraespressione di SMYD3 promuove la progressione del cancro del pancreas [7], del polmone [8], del fegato, del colon-retto (CCR) [9], del seno [10], dell' esofago [11] e dell'ovaio [12]. Tuttavia, ad oggi l'attività oncogenica specifica di SMYD3 in questi processi è oggetto di un dibattito emergente in cui il ruolo di questa metil transferasi non è stato ancora completamente compreso. Tuttavia, un recente studio condotto su centinaia di linee cellulari tumorali di diversa origine e background genetico ha mostrato che l'ablazione genetica di SMYD3 o il blocco farmacologico non compromettono la proliferazione autonoma delle cellule tumorali [13]. A livello molecolare, SMYD3 esercita la sua attività oncogenica in vari modi. Inizialmente SMYD3 è stato caratterizzato come "enzima modificatore" della cromatina che, metilando la lisina 4 dell'istone H3 (H3K4), favorisce l'espressione di vari geni correlati al cancro [14–17]. Inoltre, SMYD3 agisce come attivatore trascrizionale di diversi geni bersaglio coinvolti in vie di segnalazione della morte cellulare e della proliferazione (ad esempio, hTERT, Wnt10b) [14,16], della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) (ad esempio, SLUG, MMP2, Vim, Met) [9,10,18–20], nonché oncogeni (es. c-MYC, JAK/STAT, CTNNB1) [9] e geni regolatori del ciclo cellulare (es. CCNA2, CCND1, CCNE1, PCNA, CDK2) [5]. Inoltre, SMYD3 interagisce e metila diverse proteine non istoniche (es. VEGFR1, HSP90, H2A.Z.1, MAP3K2, AKT1, ER, HER2), regolando finemente vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione delle cellule tumorali [5,8,21]. Inoltre, l'attività della metiltransferasi SMYD3 innesca l'attivazione costitutiva della chinasi AKT1, un fattore metabolico cruciale per la riprogrammazione metabolica della cellula tumorale e per i meccanismi infiammatori che favoriscono la cancerogenesi [22].

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

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

In questo primo anno di progetto abbiamo approfondito il ruolo oncogenico di SMYD3 nei processi distintivi del cancro (hallmarks of cancer) e i dati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione sulla rivista Computational Structural and Biotechnology Journal [23]. In particolare, abbiamo confermato tramite validazione in cellulo su linee cellulari di tumore gastrico HGC-27 (Fig 4 A) l'interazione di SMYD3 con BLM e p130 endogeni già precedentemente osservata in linee di CCR come descritto nei dati preliminari del presente progetto (Fig 2 A-D). In aggiunta, abbiamo validato l'interazione di SMYD3 con le forme attive fosforilate delle chinasi MTOR, AMPK e MET (Fig 4 B).

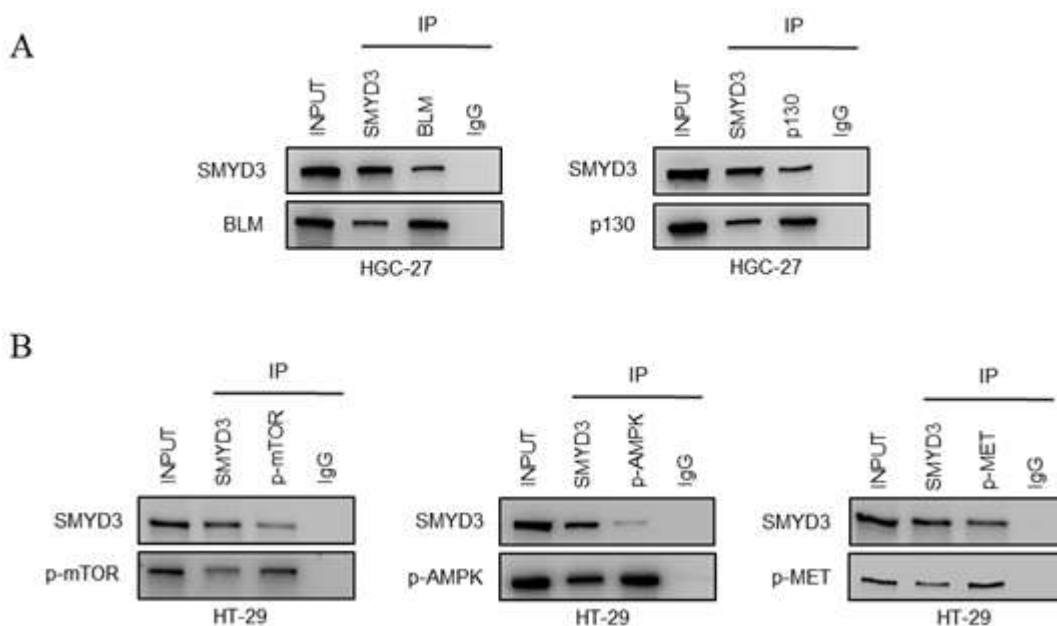


Figura 4: Validazione in cellulo delle interazioni di SMYD3 identificate in silico.

*A* Validazione delle interazioni di SMYD3 in linee cellulari di tumori gastrico. Co-immunoprecipitazione di SMYD3 e BLM, p130 endogeni, utilizzando anticorpi specifici in cellule di tumore gastrico HGC-27 L'input corrisponde al 10% del lisato. Gli anti-IgG sono stati utilizzati come controlli negativi. I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti. *B*. Validazione dell'interazione SMYD3-pMTOR; SMYD3-pAMPK; SMYD3-pMET in linee cellulari di cancro coloretale. Co-immunoprecipitazione di SMYD3 e pMTOR, pAMPK, pMET endogeni utilizzando anticorpi anti-SMYD3 e anti-pMTOR, pAMPK, pMET in cellule di cancro coloretale, HT-29. L'input corrisponde al 10% del lisato. Gli anti-IgG sono stati utilizzati come controlli negativi. I risultati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti.

La pubblicazione di questi dati ci ha inoltre permesso di investigare il ruolo dei P1-P19 tripeptidi come motivi consenso per l'interazione di SMYD3 con nuovi effettori dei processi distintivi del cancro oltre che chiarire quale fosse la regione di SMYD3



implicata in tale interazione. In particolare, per caratterizzare le regioni di SMYD3 direttamente coinvolte nell'interazione fisica con le P- proteine, abbiamo effettuato un test di pull-down in vitro utilizzando tre proteine ricombinanti HIS-SMYD3, ovvero HIS-SMYD3-FL (come controllo positivo), HIS-SMYD3-N-term(1–235), che comprende il dominio SET e HIS-SMYD3-C-term(236–428), che comprende il dominio CT coinvolto in diverse interazioni SMYD3 [1]. Questi 3 costrutti sono stati selezionati anche in base alla conformazione tridimensionale di SMYD3 N-terminale (in verde) e C-terminale (in grigio) regioni (ID PDB: 3MEK; <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb>) (Fig. 5A). In effetti, questi domini strutturalmente interconnessi circondano simmetricamente la tasca idrofobica catalitica che ospita il substrato, e ne modulano l'affinità E-S. Ad esempio, nel caso di BRCA2, i nostri risultati dimostrano che GST-BRCA2(1338–1781) si lega a tutti i costrutti di SMYD3, ma tale interazione presenta maggiore affinità nel caso del costrutto HIS-SMYD3-C-term (Fig. 5B). Per investigare il ruolo del P-tripeptide P1 nell'interazione fisica tra SMYD3 e BRCA2 abbiamo effettuato un saggio di inibizione competitiva in vitro. Il costrutto GST-BRCA2(1338–1781) contenente il tripeptide P1 è stato incubato con concentrazioni crescenti del tripeptide purificato P1 in presenza dei tre costrutti di SMYD3 (HIS-SMYD3-FL, HIS-SMYD3- N-terminale e HIS-SMYD3-C-term). Il tripeptide P1 purificato interferiva in modo significativo con l'interazione fisica tra HIS-SMYD3-C-terminale e GST-BRCA2(1338–1781) in maniera dose dipendente (Fig. 5C-E). Questi risultati, oltre a confermare la significatività biologica dei P-tripeptidi come brevi motivi che mediano le interazioni di SMYD3, suggeriscono anche che il dominio C-terminale di SMYD3 può essere prevalentemente implicato nell'interazione con le P proteine (Fig 5 C-E) [23].



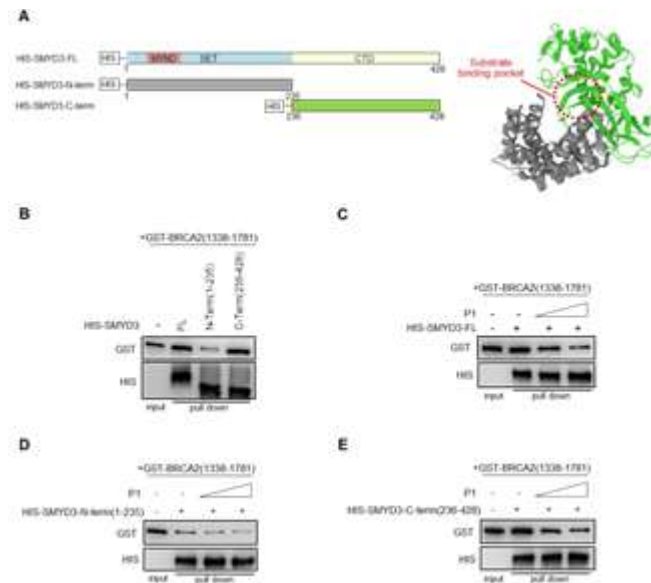


Fig. 5. Saggi di pull-down in vitro. (A) Pannello di sinistra: Schema dei costrutti HIS-SMYD3; pannello di destra: conformazione tridimensionale delle regioni SMYD3 N- e C-terminale (PDB ID:3MEK; <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb>). (B) Saggio pull-down in vitro dei costrutti HIS-SMYD3-FL, HIS-SMYD3-N-term(1-235) o HIS-SMYD3-C-term(236-428) con GST-BRCA2 (1338-1781). (C-E) Saggi pull-down in vitro di HIS-SMYD3-FL (come controllo positivo) (C), HIS-SMYD3-N-term(1-235) (D) o HIS-SMYD3-C-term(236-428) (E) con GST-BRCA2(1338-1781) e dosi crescenti del tripeptide P1 purificato. Le proteine legate sono state visualizzate mediante immunoblotting usando anti-GST e anti-HIS anticorpi. FL = a figura intera.

Inoltre in questo primo anno abbiamo condotto le analisi in silico previste dall'obiettivo 1, ovvero la clusterizzazione in silico delle P-proteine rispetto alle tre fasi della cancerogenesi.

### Risultati Obiettivo 1a

In particolare, partendo dai risultati mostrati in tabella 1 dei dati preliminari in cui si riporta l'analisi quantitativa delle 2249 P-proteine dei 10 clusters corrispondenti a ciascun hallmarks del cancro, abbiamo quindi analizzato e clusterizzato in silico tali proteine rispetto alle diverse fasi della cancerogenesi. Al termine di quest'analisi abbiamo quindi ottenuto 3 nuovi gruppi di P-proteine. Come dettagliato nella seguente tabella 2 il primo gruppo delle P- proteine della fase precoce della cancerogenesi comprende 408 proteine associate ai tre hallmarks ricorrenti nella fase precoce della cancerogenesi di diversi tipi di tumori, ovvero l'instabilità e le mutazioni del genoma, la resistenza alla morte cellulare programmata e la resistenza ai soppressori della crescita cellulare (Tabella 2) [2,3].



Il secondo gruppo delle P- proteine della fase intermedia della cancerogenesi include 1775 proteine associate alla fase intermedia della cancerogenesi ovvero quando le cellule acquisiscono i seguenti 4 segni distintivi del cancro: capacità di eludere il sistema immunitario, ad attivare meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore, ad abilitare programmi epigenetici che ne permettono l'immortalità replicativa e la riprogrammazione metabolica (Tabella 2) [2,3].

Il terzo gruppo comprende le P- proteine della fase tardiva della cancerogenesi ovvero 138 proteine che rientrano nelle fasi avanzate della cancerogenesi, ovvero quelle in cui la cellula attiva costitutivamente vie di segnalazione della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasione e della metastatizzazione (Tabella 2) [2,3].

Si noti che il secondo cluster corrispondente ai processi della fase intermedia della cancerogenesi, è formato da un numero più elevato di P-proteine (1775), ovvero le proteine identificate dallo screening tripeptidico in silico, candidate all'interazione con SMYD3. Questo dato sembra suggerire un ruolo oncogenico predominante di SMYD3 in questa fase della tumorigenesi, ma ulteriori analisi in silico e in cellulo previste nelle fasi successive del progetto (obiettivi 1b, 1c e 2), possono aiutarci a capire se si tratta di un dato stocastico o biologicamente rilevante.

FASI DELLA CANCEROGENESI	N. P-proteine (ripetizioni escluse) coinvolte nelle fasi della cancerogenesi	Segni distintivi del cancro	Pathway di Reactome DB pertinenti ai segni distintivi del cancro (Reactome ID)	N. tot di Proteine pertinenti ai segni distintivi del cancro	N. P-proteine pertinenti ai segni distintivi del cancro	% di P-proteine sul N. tot di Proteine pertinenti ai segni distintivi del cancro
FASE PRECOCE DELLA CANCEROGENESI	408	Instabilità e mutazione del genoma	DNA Repair (R-HSA-73894.3)	314	147	46.80%
		Resistenza alla morte cellulare	Programmed Cell Death (R-HSA-5357801.2)	217	73	33.60%
		Elusione dei segnali di soppressione della morte cellulare	Cell Cycle Mitotic (R-HSA-69278.4) Diseases of mitotic cell cycle (R-HSA-9675126.2)	540	225	41.60%
FASE INTERMEDIA DELLA CANCEROGENESI	1775	Evitare la distruzione immunitaria	Immune system (R-HSA-168256.7)	2249	872	38.80%
		Inflamazione che favorisce il tumore	Costimulation by the CD28 family (R-HSA-388841.4) Inflammasomes (R-HSA-622312.1) Cytokine Signaling in Immune System (R-HSA-1280215.5)	856	277	32.40%
		Consentire l'immortalità replicativa	Telomere Maintenance (R-HSA-157579.5)	93	28	30.10%
		Deregolazione del metabolismo energetico cellulare	Metabolism (R-HSA-1430728.10)	2146	987	46%
FASE TARDIVA DELLA CANCEROGENESI	138	Potenziamento della segnalazione proliferativa	Signaling by EGFR (Reactome Id: R-HSA-177929.2)	52	26	48%
		Induzione dell'angiogenesi	Signaling by VEGF (R-HSA-194138.2)	108	55	50.90%
		Attivazione dei processi di invasione e metastasi	Signaling by MET (R-HSA-6806834.2)	194	79	40.70%
			Signaling by TGF-beta Receptor Complex in Cancer (R-HSA-3304351.2)			
			TGF-beta receptor signaling in EMT (R-HSA-2173791.1)			
Signaling by NOTCH4 (R-HSA-9013694.2)						
Signaling by NOTCH3 (R-HSA-9012852.2)						

Tabella 2: Clusterizzazione in silico delle P-proteine rispetto alle tre fasi (precoce, intermedia e tardiva) della cancerogenesi.

## Risultati Obiettivo 1b

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

Al fine di poter identificare in silico uno o più potenziale motivi tripeptidici consenso di interazione con SMYD3 abbiamo effettuato un'analisi quantitativa dei tre cluster di P-proteine coinvolte nelle 3 fasi della cancerogenesi. La distribuzione dei P-tripeptidi nei tre cluster della cancerogenesi è riportata in tabella 3 dove come atteso teoricamente il numero di P-proteine dei tre cluster delle fasi della cancerogenesi diminuisce all'aumentare dei matches tripeptidici (Tabella 3, Tabella S2, cartella excel allegata alla presente relazione). In Tabella S2, le P-proteine (Accession Number



UniProt) sono elencate e raggruppate in base alla loro frequenza tripeptidica mostrata in tabella 3.

In aggiunta, quantitativamente abbiamo analizzato la frequenza (n. matches) dei P-tripeptidi e il numero complessivo di matches per ogni tripeptide per capire come varia la distribuzione dei motivi P1-P19 nelle P-proteine delle tre fasi della cancerogenesi (Figura 6).

In Figura 6A sono riportati a sinistra le strutture e le sequenze dei tripeptidi P1-P19 prevalentemente composti da aminoacidi rari (indicati in arancione), ovvero aminoacidi codificati da 1 o 2 codoni, in nero gli aminoacidi più frequenti codificati da più di 2 codoni. Dal punto di vista quantitativo la frequenza dei P-tripeptidi è funzione del numero di codoni complessivo che li codifica. In particolare il tripeptide più frequente è P3=LFF codificato da 10 codoni, mentre il meno frequente è P17= NFW codificato complessivamente da 5 codoni (Figura 6A). In Figura 6 B, si riporta il grafico della frequenza di ogni tripeptide nei tre cluster proteici della fase della cancerogenesi (Figura 6 B).

Frequenza dei P-tripeptidi nelle P-proteine delle tre fasi della cancerogenesi	Fase Precoce	Fase Intermedia	Fase Tardiva
N°Proteine totali con P-tripeptidi	408	1775	138
N°Proteine totali con 1 P-tripeptide	233	1050	79
N°Proteine totali con 2 P-tripeptidi	99	456	28
N°Proteine totali con 3 P-tripeptidi	44	156	15
N°Proteine totali con 4 P-tripeptidi	21	74	7
N°Proteine totali con 5 P-tripeptidi	4	18	2
N°Proteine totali con 6 P-tripeptidi	4	9	3
N°Proteine totali con 7 P-tripeptidi	1	5	3
N°Proteine totali con 8 P-tripeptidi	0	3	0
N°Proteine totali con 9 P-tripeptidi	0	2	0
N°Proteine totali con 10 P-tripeptidi	0	1	0
N°Proteine totali con 11 P-tripeptidi	0	1	0

Tabella 3: Analisi quantitativa delle proteine che rientrano nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi (precoce, intermedia e tardiva).



A

P1-P19 tripeptidi	Sequenza P	N. tot codoni per tripeptide	% matches P Cluster 408 proteine Fase precoce	% matches P Cluster 1775 proteine Fase Intermedia	% matches P Cluster 138 proteine Fase tardiva
	P1=NFF	6	11,5%	7,5%	6,5%
	P2=DFE	6	9,3%	10,9%	13%
	P3=LFF	10	14%	17,8%	17,4%
	P4=FFF	6	3,2%	8,01%	8,7%
	P5=QFF	6	11,3%	6,9%	3,6%
	P6=KFF	6	8,6%	9,2%	12,3%
	P7=NIF	7	10,5%	11,7%	4,3%
	P8=NYF	6	5,6%	6,1%	4,3%
	P9=NAF	8	9,3%	9,1%	10,9%
	P10=NDF	6	11,3%	9,2%	14,5%
	P11=NHF	6	4,6%	4,11%	7,2%
	P12=NNF	6	10%	9,9%	12%
	P13=NFI	7	13,5%	10,4%	10,1%
	P14=NFY	6	2,9%	6,2%	6,5%
	P15=NFA	8	8,6%	9,1%	10,9%
	P16=NFH	6	4,9%	5,2%	5,1%
	P17=NFW	5	2%	2,2%	1,4%
	P18=NFR	8	9,6%	9,2%	7,9%
	P19=NFK	6	10%	7,3%	7,9%

B

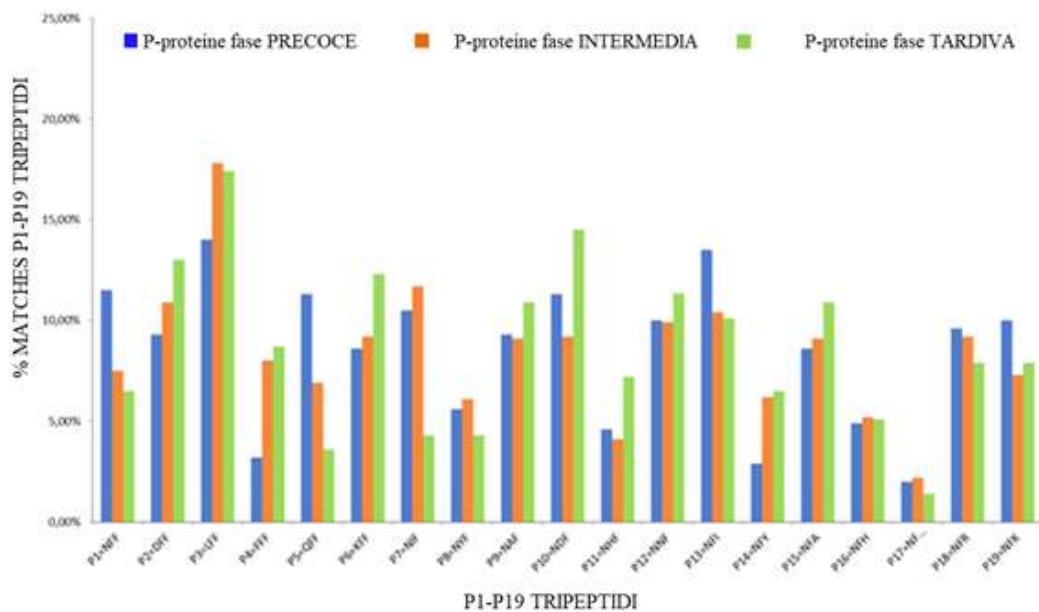


Figura 6: Analisi quantitativa della distribuzione dei P-tripeptidi nei tre clusters proteici delle fasi della cancerogenesi (precoce, intermedia e tardiva). A sinistra i tripeptidi P1-P19, in arancione gli aminoacidi rari codificati da 1-2 codoni al massimo. P3=LFF, il tripeptide più frequente; P17= NFW il più raro.



Dal punto di vista qualitativo abbiamo analizzato in silico le funzioni delle 2321 (escludendo le ripetizioni) P-proteine coinvolte negli hallmarks del cancro e raggruppate nei tre clusters delle fasi della cancerogenesi (Tabella S1, cartella excel allegata alla presente relazione). Per ogni P-proteina sono state riportate le informazioni funzionali annotate nel database UniProt oltre che le vie di segnalazione del cancro in cui esse intervengono, queste ultime disponibili nel database Reactome (Tabella S1, cartella excel allegata alla presente relazione). Successivamente in ogni cluster abbiamo identificato i migliori effettori proteici selezionati sulla base del maggior numero di matches tripeptidici e sulla base della loro ben nota rilevanza funzionale nella cancerogenesi in generale e specialmente in quella del colon retto (Tabella S3, cartella excel allegata alla presente relazione). In particolare, si identificano come interattori putativi di SMYD3: 28 P-proteine della fase precoce; 106 della fase intermedia e 15 P-proteine della fase tardiva (Tabella S3, cartella excel allegata alla presente relazione). In tabella S3 sono dettagliate le informazioni funzionali (funzione, coinvolgimento in pathway della cancerogenesi) di ognuna di queste P-proteine. Da letteratura, analizzando la funzione biologica correlata al cancro degli interattori putativi di SMYD3 appena identificati da questa analisi in silico, si riconoscono come proteine più rilevanti nella cancerogenesi precoce TLR4 (Toll-like receptor 4), RBL1 (Retinoblastoma-like protein 1), PLK4 (Serine/threonine-protein kinase PLK4) e BUB1 (Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1); intermedia le due subunità di PI3K, P3C2A (Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha), P3C2B (Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit beta) e PLB1 (Phospholipase B1, membrane-associated); tardiva FAK2 (Protein-tyrosine kinase 2-beta), KPCD (Protein kinase C delta type) e ITPR2 (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2).

### Risultati Obiettivo 1c

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

Al fine di confermare la significatività biologica dei P-tripeptidi come motivi consenso per l'interazione con SMYD3, siamo andati ad analizzare i dati molecolari dei tumori di CCR riportati nei più importanti portali online di dataset clinici (CBioPortal, TCGA e CPTAC). In particolare, abbiamo valutato nei set di dati molecolari riferiti a casi clinici di tumori coloretali la presenza di mutazioni somatiche in corrispondenza delle regioni codificanti per i P-tripeptidi nei potenziali interattori di SMYD3 identificati in silico, ovvero: TLR4, RBL1, PLK4, BUB1 per la fase precoce; le due subunità di PI3K (P3C2A





P3C2B) e PLB1 per la fase intermedia intermedia e FAK2, KPCD, e ITPR2 per la fase tardiva (Fig. 7-9).

In particolare, tra i potenziali interattori di SMYD3 della fase precoce della cancerogenesi abbiamo identificato mutazioni significative in TLR4, RBL1 e BUB1 (Fig 7); tra quelli della fase intermedia abbiamo riscontrato mutazioni in corrispondenza dei P-tripeptidi di entrambe le subunità di PI3K (P3C2A, P3C2B) (Fig. 8); in fine tra i potenziali interattori di SMYD3 della fase tardiva si riscontrano mutazioni in corrispondenza dei P-tripeptidi di ITPR2 (Fig 9).

La presenza di alterazioni in corrispondenza dei P-tripetidi nella sequenza dei nuovi interattori di SMYD3 rappresenta un'ulteriore conferma della validità del nostro approccio analitico in silico per l'identificazione di nuovi interattori di SMYD3.



Figura 7: Mutazioni in CCR dataset nei 3 miglior interattori putativi di SMYD3 della fase precoce della cancerogenesi identificati in silico.

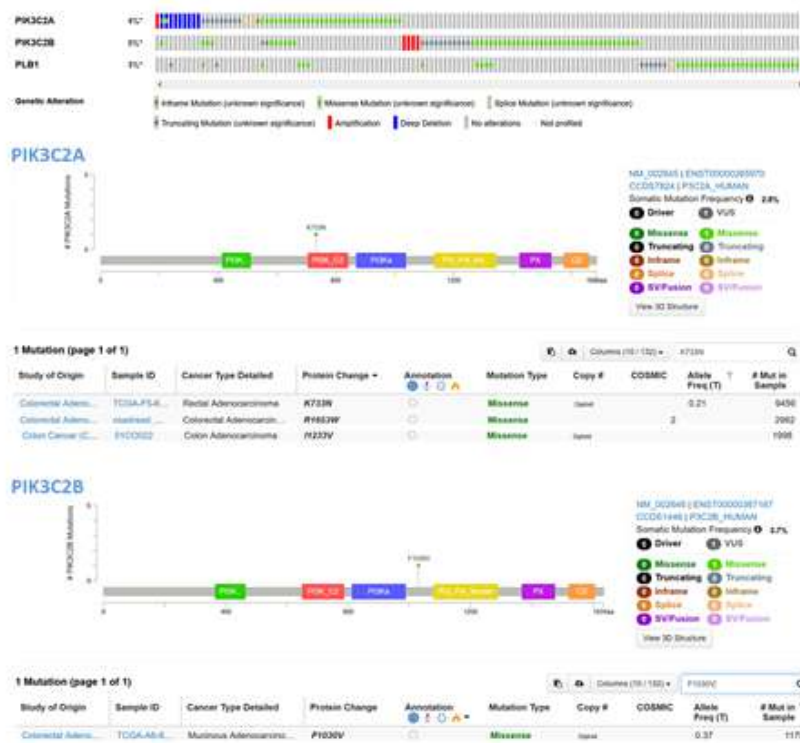


Figura 8: Mutazioni in CCR dataset per i 2 miglior interattori putativi di SMYD3 della fase intermedia della cancerogenesi identificati in silico.

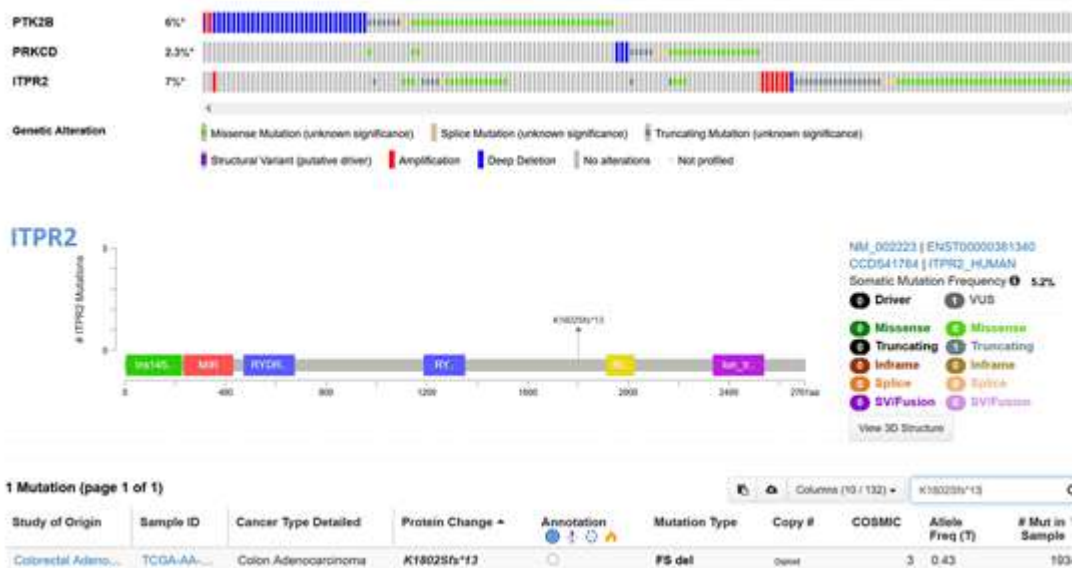


Figura 9: Mutazioni in CCR dataset per i3 miglior interattori putativi di SMYD3 della fase tardiva della cancerogenesi identificati in silico.



## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

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

### Obiettivo specifico 1

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

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

Partendo dalle 2249 P-proteine dei 10 clusters corrispondenti a ciascun hallmarks del cancro raggrupperemo ulteriormente in silico tali proteine rispetto alle diverse fasi della cancerogenesi. In particolare otterremo 3 raggruppamenti (clusters) proteici: a) P-proteine coinvolte nella fase precoce della cancerogenesi; b) P-proteine coinvolte nella fase intermedia della cancerogenesi; c) P-proteine coinvolte nella fase tardiva della cancerogenesi. Nel primo gruppo rientreranno tutte le proteine associate ai tre hallmarks ricorrenti nella fase precoce della cancerogenesi di diversi tipi di tumori, ovvero l'instabilità e le mutazioni del genoma, la resistenza alla morte cellulare programmata e la resistenza ai soppressori della crescita cellulare [2,3]. Nel secondo gruppo saranno incluse tutte le proteine associate alla fase intermedia della



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

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

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

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

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



## Obiettivo specifico 2

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

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

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

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

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

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





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

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

### Obiettivo specifico 3

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

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





Un approccio di co-targeting che includa SMYD3 potrebbe potenziare l'efficacia clinica dell'inibizione del MET in pazienti resistenti al solo inibitore MET (tivantinib), favorendo una risensibilizzazione delle cellule tumorali alla terapia.

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

## DATI PRELIMINARI

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

Una vasta letteratura corrente conferma che brevi peptidi lineari, come i tripeptidi, mediano una miriade di interazioni tra proteine. In effetti, i tripeptidi rappresentano i minimi determinanti strutturali e funzionali che mediano le interazioni proteiche [24–28]. In aggiunta, i nostri P-tripeptidi sono prevalentemente composti da amminoacidi rari cioè amminoacidi codificati da pochi (1-3) codoni, che secondo la “teoria degli amminoacidi



rari” si localizzano in corrispondenza di domini funzionali delle proteine [29,30]. Diversi studi computazionali infatti, supportano l'ipotesi che gli amminoacidi rari, abbiano un significato biologico maggiore rispetto agli amminoacidi più comuni (che sono codificati da 4-6 codoni) nel “cell talk” biologico [29–31].

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

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

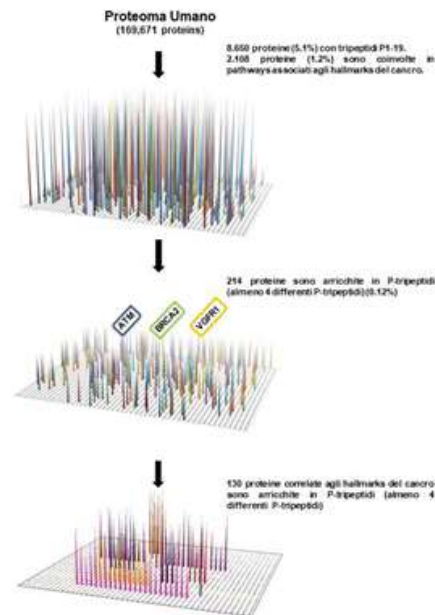


Figura 1: Schema procedurale dell'analisi della distribuzione dei P-tripeptidi nel proteoma umano. Il proteoma umano è stato sottoposto a screening tripeptidico per cercare corrispondenze esatte di ciascun P-tripeptide nelle proteine umane. Tra le 8.650 P-proteine identificate, 2.108 proteine (escludendo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

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

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



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

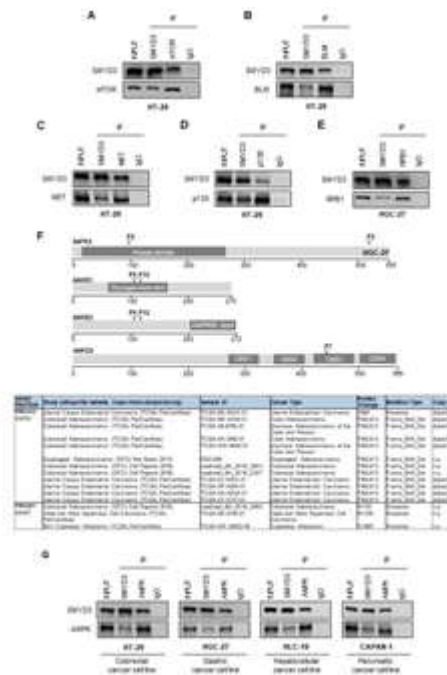


Figura 2: Validazione in cellulo delle interazioni di SMYD3 identificate in silico.

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

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

AMPK è una proteina eterotrimerica comprendente due subunità A catalitiche (AAMPK1 e AAMPK2), due subunità B regolatorie (AAKB1 e AAKB2) e tre subunità G non catalitiche (AAKG1, AAKG2 e AAKG3) [32].

Curiosamente, le subunità A, B e G di AMPK presentano almeno un P-tripeptide. In particolare, abbiamo trovato un P-tripeptide nel dominio chinasi di AAMPK2, quattro nelle

subunità AAKB (due nel dominio di legame del glicogeno e due nella regione centrale di AAKB2) e un P-tripeptide nella dominio CBS3 della subunità G2 (Fig. 3F). Analizzando i profili delle mutazioni somatiche dei geni codificanti per le diverse subunità di AMPK si osserva che soprattutto nei tumori gastrointestinali le mutazioni somatiche dei geni PRKAA2 e PRKAB1 comportano alterazioni della sequenza proteica in corrispondenza dei P-tripeptidi (Fig. 3F). Questa evidenza ci conferma la significatività biologica dei P-tripeptidi.

Ad oggi, questo studio è in fase di revisione presso la rivista “Computational and Structural Biotechnology Journal” (IF=7,3).



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

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

### Analisi in silico

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

Analizzeremo in silico le informazioni riportate nei database UniProt e Reactome per raggruppare le P-proteine del precedente screening in tre cluster proteici sulla base della loro funzione oncogenica. I tre cluster proteici comprenderanno: a) le P-proteine coinvolte nella fase precoce della cancerogenesi; b) le P- proteine coinvolte nella fase intermedia della cancerogenesi; c)le P- proteine coinvolte nella fase tardiva della cancerogenesi. Nel primo gruppo rientreranno tutte le proteine associate all’instabilità e





le mutazioni del genoma, la resistenza alla morte cellulare programmata e la resistenza ai soppressori della crescita cellulare [2,3]. Nel secondo gruppo saranno incluse tutte le proteine associate alla fase intermedia della cancerogenesi in cui le cellule neoplastiche acquisiscono capacità di eludere il sistema immunitario, di attivare meccanismi infiammatori che promuovono lo sviluppo del tumore, di attivare l'immortalità replicativa e la riprogrammazione metabolica [2,3]. Nel terzo gruppo saranno incluse le proteine che rientrano nella fase tardiva della cancerogenesi in cui la cellula attiva costitutivamente vie di segnalazione della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasione e della metastatizzazione [2,3].

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

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

-Costruzione dell'interattoma aggiornato di SMYD3.

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

- Analisi dei profili mutazionali dei nuovi interattori di SMYD3 in dataset di tumori colorettali.

Inerogheremo i portali proteogenomici CBioPortal, TCGA e CPTAC al fine di confermare la significatività biologica dei P-tripeptidi come motivi consenso per l'interazione con SMYD3. In particolare, andremo a valutare nei set di dati molecolari



riferiti a casi clinici di tumori coloretali la presenza di mutazioni somatiche in corrispondenza delle regioni codificanti per i P-tripeptidi nei potenziali interattori di SMYD3 identificati in silico.

### **Colture cellulari**

Tutte le linee cellulari che useremo in questo progetto sono già disponibili presso il nostro laboratorio. Le HCT116 saranno coltivate in DMEM ad alto contenuto di glucosio (HG) senza piruvato (#11360-070, Gibco) con 10% FBS (#0270-106, Gibco) e 100 UI/ml di penicillina-streptomina (#15140-122, Gibco). Le cellule HCEC-1CT saranno coltivate in terreno COLO-UP (Evercyte) integrato con 100 UI/ml penicillina-streptomina (#15140-122, Gibco). Le cellule saranno propagate in condizioni standard ad una confluenza massima del 60% per ogni passaggio. Le cellule staminali di pazienti con CCR saranno propagate come precedentemente descritto [33]. Tutte le linee cellulari saranno testate più volte durante lo studio con kit specifici (#117048; Minerva Biolabs) per essere certi che siano prive di infezioni da micoplasma. Tutte le colture cellulari saranno mantenute in coltura in un incubatore umidificato a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

### **Saggi di vitalità cellulare**

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

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

### **Co-immunoprecipitazioni**

Le cellule sono state raccolte e omogeneizzate in tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl e 1% Triton X-100) integrato con inibitori di proteasi e fosfatasi. L'accoppiamento tra Dynabeads Protein A (10002D, Thermo Fisher Scientific) o Dynabeads Protein G (10003D, Thermo Fisher Scientific) e gli anticorpi è



stato eseguito in 100 µl di Tween 20-1X PBS allo 0,01% per 45 minuti a temperatura ambiente su una piattaforma oscillante. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con complessi anticorpo-sfere. Gli immunocomplessi sono stati lavati ampiamente, sottoposti a ebollizione in tampone Laemmli e sottoposti ad analisi SDS-PAGE e immunoblot. Le IgG sono state utilizzate come controllo negativo.

## RISULTATI ATTESI

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

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

## INNOVAZIONI

In questo progetto sarà impiegata una metodologia innovativa di analisi in silico che, come dimostrato nei nostri recentissimi studi [6, Fasano et al. Computat. Struct.



Biotech. J under review], permette di identificare in generale nuove interazioni proteina-proteina e nel caso specifico sono interazioni tra SMYD3 e altri effettori di rilievo delle principali vie del cancro. Questo approccio potrebbe essere adatto per definire la rete dell'interattoma di molte altre proteine. La nostra metodologia si basa su un solido razionale: abbiamo identificato i tripeptidi che sono in grado di legarsi a SMYD3 in vitro e abbiamo usato queste brevi sequenze aminoacidiche come sonde in silico per cercare tutte le proteine che li contengono e che per tale caratteristica possono quindi essere considerati potenziali interattori di SMYD3. Il passaggio critico in questa analisi in silico è la scelta della lunghezza minima della sonda peptidica da impiegare per uno screening del proteoma umano che sia significativo dal punto di vista statistico e che allo stesso tempo non escluda proteine promettenti ai fini dello scopo dell'analisi in silico. Affinchè lo screening in silico di un proteoma non sia stocastico è fondamentale che le sonde peptidiche scelte per l'analisi abbiano caratteristiche biochimico-molecolari peculiari. Nel nostro screening in silico, da cui parte lo studio proposto in questo progetto, abbiamo utilizzato i tripeptidi come sonda per screenare il proteoma umano, che sono considerati i motivi consenso più brevi in grado di mediare le interazioni proteiche. In aggiunta, tali tripeptidi (P1-P19) presentano come peculiarità molecolare la prevalente composizione in amminoacidi rari. Gli amminoacidi rari, sono amminoacidi codificati da un basso numero di codoni che, come dimostrato dalla teoria degli amminoacidi rari, hanno un significato biologico più elevato rispetto agli amminoacidi più frequenti nella composizione delle proteine. Infatti, crescenti evidenze dimostrano che gli amminoacidi rari giocano un ruolo chiave nella funzione della proteina costituendo domini funzionali e motivi consenso di interazione proteica [29–31].

## BIBLIOGRAFIA

1. Gout, A.M.; Arunachalam, S.; Finkelstein, D.B.; Zhang, J. Data-Driven Approaches to Advance Research and Clinical Care for Pediatric Cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2021, 1876, 188571, doi:10.1016/j.bbcan.2021.188571.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011, 144, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Senga, S.S.; Grose, R.P. Hallmarks of Cancer-the New Testament. *Open Biol.* 2021, 11, 200358, doi:10.1098/rsob.200358.



4. Galluzzi, L.; Yamazaki, T.; Kroemer, G. Linking Cellular Stress Responses to Systemic Homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018, 19, 731–745, doi:10.1038/s41580-018-0068-0.
5. Bottino, C.; Peserico, A.; Simone, C.; Caretti, G. SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. *Cancers* 2020, 12, doi:10.3390/cancers12010142.
6. Sanese, P.; Fasano, C.; Buscemi, G.; Bottino, C.; Corbetta, S.; Fabini, E.; Silvestri, V.; Valentini, V.; Disciglio, V.; Forte, G.; et al. Targeting SMYD3 to Sensitize Homologous Recombination-Proficient Tumors to PARP-Mediated Synthetic Lethality. *iScience* 2020, 23, 101604, doi:10.1016/j.isci.2020.101604.
7. Zhu, C.-L.; Huang, Q. Overexpression of the SMYD3 Promotes Proliferation, Migration, and Invasion of Pancreatic Cancer. *Dig. Dis. Sci.* 2020, 65, 489–499, doi:10.1007/s10620-019-05797-y.
8. Mazur, P.K.; Reynoird, N.; Khatri, P.; Jansen, P.W.T.C.; Wilkinson, A.W.; Liu, S.; Barbash, O.; Van Aller, G.S.; Huddleston, M.; Dhanak, D.; et al. SMYD3 Links Lysine Methylation of MAP3K2 to Ras-Driven Cancer. *Nature* 2014, 510, 283–287, doi:10.1038/nature13320.
9. Sarris, M.E.; Moulos, P.; Haroniti, A.; Giakountis, A.; Talianidis, I. Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development. *Cancer Cell* 2016, 29, 354–366, doi:10.1016/j.ccell.2016.01.013.
10. Fenizia, C.; Bottino, C.; Corbetta, S.; Fittipaldi, R.; Floris, P.; Gaudenzi, G.; Carra, S.; Cotelli, F.; Vitale, G.; Caretti, G. SMYD3 Promotes the Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, 1278–1293, doi:10.1093/nar/gky1221.
11. Zhu, Y.; Zhu, M.-X.; Zhang, X.-D.; Xu, X.-E.; Wu, Z.-Y.; Liao, L.-D.; Li, L.-Y.; Xie, Y.-M.; Wu, J.-Y.; Zou, H.-Y.; et al. SMYD3 Stimulates EZR and LOXL2 Transcription to Enhance Proliferation, Migration, and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Hum. Pathol.* 2016, 52, 153–163, doi:10.1016/j.humpath.2016.01.012.
12. Jiang, Y.; Lyu, T.; Che, X.; Jia, N.; Li, Q.; Feng, W. Overexpression of SMYD3 in Ovarian Cancer Is Associated with Ovarian Cancer Proliferation and Apoptosis via Methylating H3K4 and H4K20. *J. Cancer* 2019, 10, 4072–4084, doi:10.7150/jca.29861.



13. Thomenius, M.J.; Totman, J.; Harvey, D.; Mitchell, L.H.; Riera, T.V.; Cosmopoulos, K.; Grassian, A.R.; Klaus, C.; Foley, M.; Admirand, E.A.; et al. Small Molecule Inhibitors and CRISPR/Cas9 Mutagenesis Demonstrate That SMYD2 and SMYD3 Activity Are Dispensable for Autonomous Cancer Cell Proliferation. *PLoS One* 2018, 13, e0197372, doi:10.1371/journal.pone.0197372.
14. Hamamoto, R.; Furukawa, Y.; Morita, M.; Imura, Y.; Silva, F.P.; Li, M.; Yagyu, R.; Nakamura, Y. SMYD3 Encodes a Histone Methyltransferase Involved in the Proliferation of Cancer Cells. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6, 731–740, doi:10.1038/ncb1151.
15. Hamamoto, R.; Silva, F.P.; Tsuge, M.; Nishidate, T.; Katagiri, T.; Nakamura, Y.; Furukawa, Y. Enhanced SMYD3 Expression Is Essential for the Growth of Breast Cancer Cells. *Cancer Sci.* 2006, 97, 113–118, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00146.x.
16. Liu, C.; Fang, X.; Ge, Z.; Jalink, M.; Kyo, S.; Björkholm, M.; Gruber, A.; Sjöberg, J.; Xu, D. The Telomerase Reverse Transcriptase (HTRT) Gene Is a Direct Target of the Histone Methyltransferase SMYD3. *Cancer Res.* 2007, 67, 2626–2631, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4126.
17. Zou, J.-N.; Wang, S.-Z.; Yang, J.-S.; Luo, X.-G.; Xie, J.-H.; Xi, T. Knockdown of SMYD3 by RNA Interference Down-Regulates c-Met Expression and Inhibits Cells Migration and Invasion Induced by HGF. *Cancer Lett.* 2009, 280, 78–85, doi:10.1016/j.canlet.2009.02.015.
18. Zhou, Z.; Jiang, H.; Tu, K.; Yu, W.; Zhang, J.; Hu, Z.; Zhang, H.; Hao, D.; Huang, P.; Wang, J.; et al. ANKHD1 Is Required for SMYD3 to Promote Tumor Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 2019, 38, 18, doi:10.1186/s13046-018-1011-0.
19. Wang, H.; Liu, Y.; Tan, W.; Zhang, Y.; Zhao, N.; Jiang, Y.; Lin, C.; Hao, B.; Zhao, D.; Qian, J.; et al. Association of the Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism in the Promoter Region of the SMYD3 Gene with Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Relation to Tobacco Smoking. *Cancer Sci.* 2008, 99, 787–791, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00729.x.
20. Wang, Y.; Xie, B.-H.; Lin, W.-H.; Huang, Y.-H.; Ni, J.-Y.; Hu, J.; Cui, W.; Zhou, J.; Shen, L.; Xu, L.-F.; et al. Amplification of SMYD3 Promotes Tumorigenicity and Intrahepatic Metastasis of Hepatocellular Carcinoma via Upregulation of CDK2 and MMP2. *Oncogene* 2019, 38, 4948–4961, doi:10.1038/s41388-019-0766-x.





21. Sanese, P.; Fasano, C.; Simone, C. Playing on the Dark Side: SMYD3 Acts as a Cancer Genome Keeper in Gastrointestinal Malignancies. *Cancers* 2021, 13, 4427, doi:10.3390/cancers13174427.
22. Yoshioka, Y.; Suzuki, T.; Matsuo, Y.; Nakakido, M.; Tsurita, G.; Simone, C.; Watanabe, T.; Dohmae, N.; Nakamura, Y.; Hamamoto, R. SMYD3-Mediated Lysine Methylation in the PH Domain Is Critical for Activation of AKT1. *Oncotarget* 2016, 7, 75023–75037, doi:10.18632/oncotarget.11898.
23. Fasano, C.; Lepore Signorile, M.; De Marco, K.; Forte, G.; Sanese, P.; Grossi, V.; Simone, C. Identifying Novel SMYD3 Interactors on the Trail of Cancer Hallmarks. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022, 20, 1860–1875, doi:10.1016/j.csbj.2022.03.037.
24. Gouget, A.; Senchou, V.; Govers, F.; Sanson, A.; Barre, A.; Rougé, P.; Pont-Lezica, R.; Canut, H. Lectin Receptor Kinases Participate in Protein-Protein Interactions to Mediate Plasma Membrane-Cell Wall Adhesions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2006, 140, 81–90, doi:10.1104/pp.105.066464.
25. Ortel, I.; Keller, U. Combinatorial Assembly of Simple and Complex D-Lysergic Acid Alkaloid Peptide Classes in the Ergot Fungus *Claviceps Purpurea*. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 6650–6660, doi:10.1074/jbc.M807168200.
26. McInnes, C.; Estes, K.; Baxter, M.; Yang, Z.; Farag, D.B.; Johnston, P.; Lazo, J.S.; Wang, J.; Wyatt, M.D. Targeting Subcellular Localization through the Polo-Box Domain: Non-ATP Competitive Inhibitors Recapitulate a PLK1 Phenotype. *Mol. Cancer Ther.* 2012, 11, 1683–1692, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0006-T.
27. Robinson, C.W.; Rye, C.S.; Chessum, N.E.A.; Jones, K. A Model  $\beta$ -Sheet Interaction and Thermodynamic Analysis of  $\beta$ -Strand Mimetics. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 7402–7407, doi:10.1039/c5ob00886g.
28. Vello, T.P.; da Silva, L.M.B.; Silva, G.O.; de Camargo, D.H.S.; Corrêa, C.C.; Bof Bufon, C.C. Hybrid Organic/Inorganic Interfaces as Reversible Label-Free Platform for Direct Monitoring of Biochemical Interactions. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 87, 209–215, doi:10.1016/j.bios.2016.08.050.
29. Kanduc, D. Protein Information Content Resides in Rare Peptide Segments. *Peptides* 2010, 31, 983–988, doi:10.1016/j.peptides.2010.02.003.
30. Trost, B.; Kanduc, D.; Kusalik, A. Rare Peptide Segments Are Found Significantly More Often in Proto-Oncoproteins than Control Proteins: Implications for



Immunology and Oncology. J. R. Soc. Interface 2009, 6, 123–127, doi:10.1098/rsif.2008.0320.

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

32. Yan, Y.; Zhou, X.E.; Xu, H.E.; Melcher, K. Structure and Physiological Regulation of AMPK. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, doi:10.3390/ijms19113534.

33. Todaro, M.; Alea, M.P.; Di Stefano, A.B.; Cammareri, P.; Vermeulen, L.; Iovino, F.; Tripodo, C.; Russo, A.; Gulotta, G.; Medema, J.P.; et al. Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. Cell Stem Cell 2007, 1, 389–402, doi:10.1016/j.stem.2007.08.001.

## TIMELINE

Obiettivo 1: l'intera analisi in silico sarà completata nel primo anno di progetto.

Obiettivo 2: questi esperimenti inizieranno e verranno completati entro la fine del secondo anno di progetto.

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



## TITOLO DEL PROGETTO

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

**Ricercatori responsabili:** Maria Principia Scavo

**Settore di ricerca:** Medicina Personalizzata

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

## INTRODUZIONE

Le malattie oncologiche che riguardano il tratto gastroenterico, risultano essere tra le più comuni cause di morte relative all'oncologia nel mondo in entrambi i sessi. Per questi pazienti vi è bisogno di approcci terapeutici su misura avanzati da sviluppare nel quadro della medicina di precisione. Nell'ambito di queste patologie l'infiammazione e l'immunità sono determinanti per lo sviluppo della carcinogenesi, della progressione e della metastatizzazione. Recentemente, Deng et al. ha riportato che i macrofagi associati al tumore (TAMs) che risiedono nel microambiente tumorale non solo esprimono i recettori dei cluster di differenziazione 68 (CD68) (1), ma sono coinvolti nell'attivazione dell'inflammasoma rispetto ai macrofagi residenti nei tessuti non patologici, stimolando, in tal modo, le capacità migratorie e invasive delle cellule tumorali. L'inflammasoma è un complesso intracellulare multiproteico tipico del sistema immunitario innato che media in prima linea le difese in risposta ad agenti patogeni attraverso l'attivazione e il rilascio delle citochine pro-infiammatorie (2). L'inflammasoma consiste in una proteina sensore, NLRP3, la quale riconosce e lega le molecole induttrici e attiva le proteine effettrici, quali la caspasi-1 (3). La conseguente attivazione della caspasi-1 produce forme mature delle citochine pro-interleuchine 1e 18, così come la gasdermina D, il cui frammento N-terminale si autoassembla formando pori nella membrana plasmatica per il successivo rilascio delle citochine bioattive che inducono l'infiammazione e la morte cellulare conosciuta come pyroptosi dando luogo alla risposta immunitaria sviluppata verso il complesso attivatore (5-4). Inoltre, una



anomala risposta infiammatoria, risulta essere anche associate all'infiammazione che si sviluppa nelle malattie metaboliche, neurodegenerative e maligne. L'infiammazione cronica perpetuata nel tempo gioca un ruolo predominante in tutti gli stadi della tumorigenesi, inclusa l'immunosoppressione, la proliferazione, l'angiogenesi e metastasi (6-5). A dispetto dell'efficacia terapeutica, l'utilizzo dell'agente chemioterapico, 5-fluoracile (5FU), da solo o associato con altri farmaci quali l'oxaliplatino, la capecitabina o l'irinotecan, ha dimostrato avere limitazioni come l'aumento della farmaco-resistenza ed una breve emivita (da 5 a 20 minuti) data dal rapido turnover cellulare nell'organismo umano. Per questo motivo, le somministrazioni multiple ad alto dosaggio, per mantenere invariata la concentrazione terapeutica nel siero spesso causa una tossicità severa. Lo sviluppo di nuove nanoformulazioni targhetanti ha portato ad un rilascio selettivo ed alternative delle molecole farmacologiche, che potenzialmente riducono gli effetti collaterali e migliorano la qualità di vita dei pazienti con patologie oncologiche del tratto gastrointestinale (7, 8, 9). Le emergenti vescicole extracellulari (EVs) rappresentano delle nanoparticelle naturali che potrebbero essere utilizzate a scopo terapeutico nel rilascio dei componenti farmacologici direttamente nei distretti cellulari colpiti. Le EVs sono nanovesicole rilasciate nello spazio extracellulare sia dalle cellule normali che da quelle patologiche e, possono essere isolate a partire da differenti fluidi biologici come sangue, urine e saliva. Svariati studi hanno messo in evidenza che le EVs derivanti dalle cellule tumorali contengono e trasportano frammenti di acidi nucleici, proteine e lipidi che possono essere trasferiti attivamente in cellule riceventi con conseguente induzione di modifiche cellulari quali la riprogrammazione, le metastasi e la resistenza terapeutica (10, 11). Le EVs possiedono delle proprietà superficiali peculiari dei tessuti di provenienza e la modifica delle loro proprietà di superficie può causare la riduzione o la completa inattivazione della loro attività. La sintesi di nanoparticelle derivanti da biomateriali organici ed inorganici può migliorare l'attività terapeutica delle EVs nel trattamento dei tumori del tratto gastroenterico mediante la sintesi di nanoparticelle ibride ottenute attraverso la combinazione di nanoparticelle organiche come liposomi e/o micelle e EVs. Tali nanoparticelle ibride, possono essere utilizzati come "cavallo di Troia" per il rilascio mirato degli agenti chemioterapici solo sulle cellule tumorali, lasciando integre le cellule normali. La modifica delle proprietà di superficie delle nanoparticelle ibride, mediante l'utilizzo di RNAi/DNAi, sistemi diagnostici e biomolecole sintetiche, consente un targeting specifico. In accordo con questi limiti, abbiamo posto come obiettivo la produzione di nanoparticelle lipidiche innovative basate su nanomedicina, che possano soddisfare determinati requisiti fornendo così lo strumento più moderno e all'avanguardia per il targeting del tumore e il suo microambiente. Le nuove particelle saranno definite come Vescicole asimmetriche con



doppio bilayer (AVs), dove si potranno caricare componenti bioattivi come RNAi/DNAi. Le nostre AVs (Figura 1) hanno una struttura sovramolecolare con bilayer interno (IL) costituito da fosfolipidi a carica positive e un bilayer esterno (EL) costituito da colesterolo, polietilenglicole e fosfolipidi.

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

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

In questo anno abbiamo realizzato infatti la modifica degli acidi grassi nella composizione degli esosomi, arricchendo con quantità note di acido oleico gli esosomi derivati dai pazienti.

### Dati Ottenuti

Dopo aver estratto gli esosomi da pazienti con NAFLD e steatosi grave, li abbiamo caratterizzati per le loro caratteristiche chimico-fisiche mediante visure al DLS e al TEM (Fig 1) e contenuto lipidico, mediante lipidomica. Si è osservato che sussiste uno sbilanciamento nel rapporto tra oleico e palmitico nel malato rispetto al sano la ratio fra i due acidi grassi è doppia nel campione del paziente affetto da NAFLD. In seguito li abbiamo modificati attraverso cicli di sonicazione alternati con bagni in ghiaccio e ri-caratterizzati, per calcolare sia le modifiche quantitative che qualitative (Fig 2).

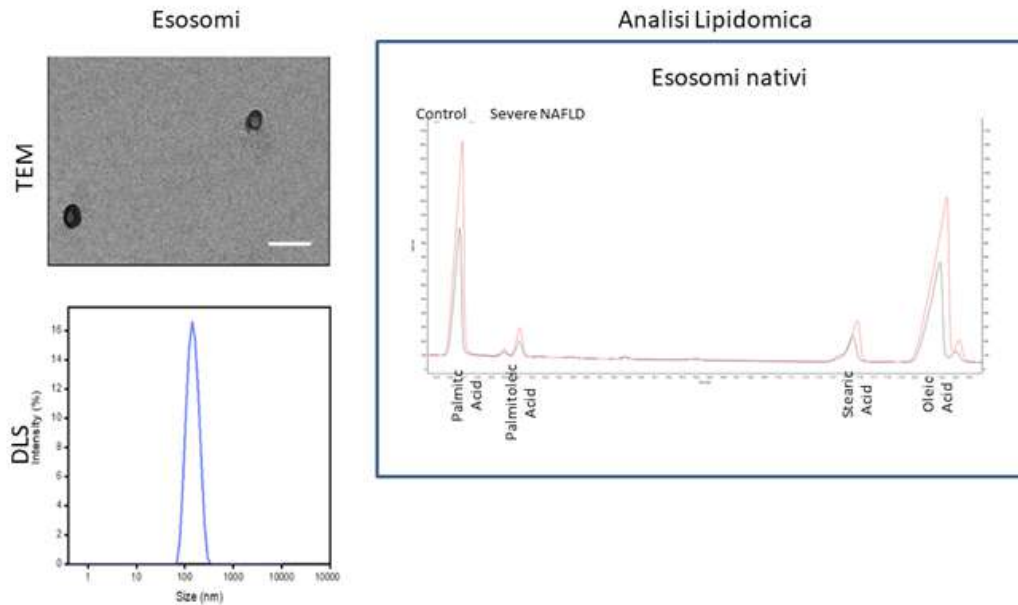


Figura 1: caratterizzazione degli esosomi estratti dal plasma dei pazienti NAFLD con steatosi grave. Gli esosomi sono stati caratterizzati con analisi TEM, DLS e GC per il contenuto lipidico.

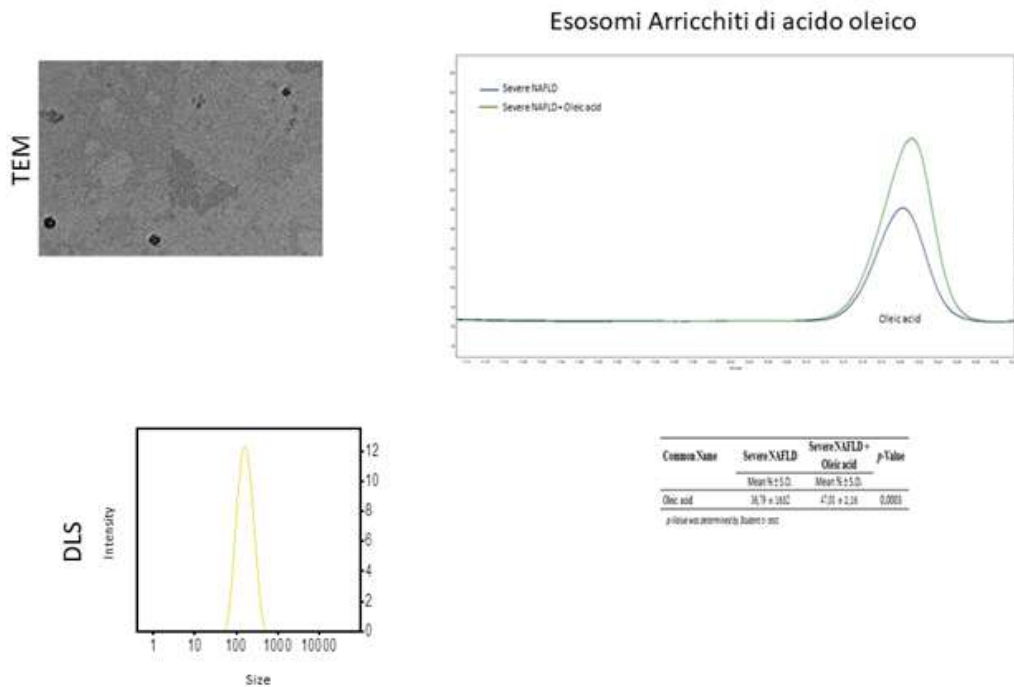


Figura 2: caratterizzazione degli esosomi estratti dal plasma dei pazienti NAFLD con steatosi grave ed arricchiti con acido oleico. Gli esosomi sono stati caratterizzati con analisi TEM, DLS e GC per il contenuto lipidico.



Da una prima analisi lipidomica gli esosomi modificati risultano arricchiti acido oleico di circa il 30% rispetto agli esosomi nativi. Inoltre dall'analisi effettuata al TEM e al DLS, appaiono uniformi sia da un punto di vista della forma che da un punto di vista della distribuzione dimensionale.

Attraverso la tecnica dell'alternanza dei cicli di sonicazione con i bagni in ghiaccio, siamo riusciti ad incapsulare negli esosomi derivanti dai pazienti NAFLD, diverse quantità di acido oleico, per un massimo di 100M. Abbiamo effettuato uno studio di vitalità cellulare sulle HEPA-RG, epatociti maturi, a cui abbiamo somministrato sia esosomi derivanti da pazienti NAFLD che esosomi di pazienti NAFLD modificati con diverse concentrazioni di acido oleico; abbiamo osservato che gli esosomi modificati con l'oleico miglioravano la vitalità cellulare rispetto a quelle trattate con gli esosomi nativi, e che questo miglioramento era dose dipendente (Figura 3).

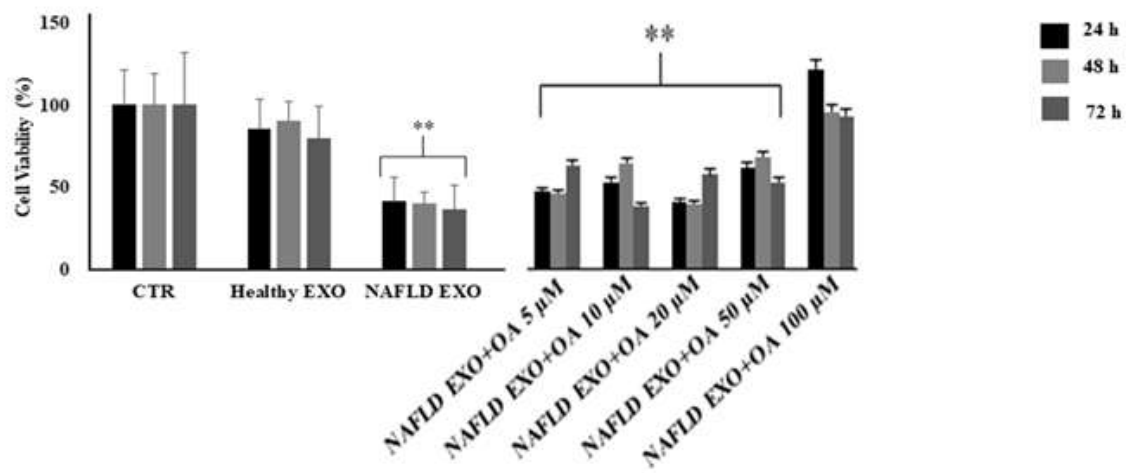


Figura 3. MTS su cellule HEPA-RG trattate con esosomi di pazienti NAFLD e con esosomi degli stessi pazienti arricchiti di acido oleico a varie concentrazioni.  $**p < 0.0001$

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

**Impatto scientifico:** Questa nostra ricerca, rappresenterà il primo studio in campo scientifico rispetto all'uso di nanoparticelle innovative, basate sulla tecnologia ibrida. I risultati saranno pubblicati su riviste open access con alto fattore di impatto. Inoltre, sarà presentato brevetto nazionali degli EVs ibridi innovativi e le loro applicazioni sul trattamento dei tumori del tratto gastrointestinale. L'innovazione delle nanoparticelle ibride di EV per il trattamento di NAFLD del CRC e del GC deve avere non solo un impatto verticale nella nanomedicina ma anche orizzontale nella medicina del cancro e



nella medicina in generale per il trattamento delle malattie croniche, aprendo così un nuovo scenario nella medicina personalizzata per il trattamento di patologie aggressive e letali come CRC e GC. Inoltre, lo sviluppo di nanoparticelle ibride innovative in biomateriali e nanomedicine sviluppando biomateriali combinati naturali e sintetici per la somministrazione di farmaci avanzati può rappresentare una potenziale alternativa terapeutica alla chemioterapia convenzionale ed ai protocolli standard.

Abbiamo dimostrato che riequilibrando la quantità di acido oleico negli esosomi derivanti dai pazienti con NAFLD, possiamo riequilibrare i livelli di vitalità cellulare, consentendo un miglioramento della vita cellulare. Questo apre nuove prospettive nelle terapie per questi pazienti. Il passo successivo sarà infatti procedere a creare nuove strutture in grado di veicolare quantità ben determinate di acido oleico in modo da ribilanciare la ratio fra palmitico e oleico.

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

## BIBLIOGRAFIA

1. Deng Q, Geng Y, Zhao L, Li R, Zhang Z, Li K, Liang R, Shao X, Huang M, Zuo D, Wu Y, Ma Q. NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver. *Cancer Lett.* 2019 Feb 1;442:21-30. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.030. Epub 2018 Oct 28
2. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677-87. doi: 10.1038/nm.3893. Epub 2015 Jun 29
3. Venkat Giri Magupalli, Roberto Negro, Yuzi Tian, Arthur V. Hauenstein, Giuseppe Di Caprio, Wesley Skillern, Qiufang Deng, Pontus Orning, Hasan B. Alam, Zoltan Maliga, Humayun Sharif, Jun Jacob Hu, Charles L. Evavold, Jonathan C. Kagan, Florian I.



Schmidt, Katherine A. Fitzgerald, Tom Kirchhausen, Yongqing Li, Hao Wu. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. doi: 10.1126/science.aas8995;

4. Huang, Y., Xu, W. & Zhou, R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00740-6>

5. Karki, R., Kanneganti, TD. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer* 19, 197–214 (2019). doi: 10.1038/s41568-019-0123-y

6. Bishop D, Smith R, Smith M, Rigby H. Effect of plyometric training on swimming block start performance in adolescents. *Journal of Strength & Conditioning Research*. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181b866d0;

7. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Sep;78(3):447-64. Epub 2016 May 23. doi: 10.1007/s00280-016-3054-2;

8. Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Synergistic antitumor activity of capecitabine in combination with irinotecan. *Clin Colorectal Cancer*. 2005 Jan;4(5):336-43. doi: 10.3816/ccr.2005.n.007

9. Youn Jae Jung, Hark Kyun Kim, Yoonsuk Cho, Ji Suk Choi, Chang Hee Woo, Kyoung Soo Lee, Jae Hoon Sul, Chan Mi Lee, Jihoon Han, Jae Hyung Park, Dong-Gyu Jo, Yong Woo Cho. *Science Advances* 25 Mar 2020; Eaay6721. doi: 10.1126/sciadv.aay6721

10. Maria Principia Scavo, Federica Rizzi, Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Chiara Ingrosso, Maria Lucia Curri and Gianluigi Giannelli . A Possible Role of FZD10 Delivering Exosomes Derived from Colon Cancers Cell Lines in Inducing Activation of Epithelial–Mesenchymal Transition in Normal Colon Epithelial Cell Line. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6705; doi:10.3390/ijms21186705

11. Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, Cosco D, Schiavon O, Shen H, Fresta M. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. *J Control Release*. 2015 Feb 10;199:106-13. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.008. Epub 2014 Dec 9

TITOLO DEL PROGETTO

**NOTCH ED INFLAMMASOMA NELLA  
PATOGENESI DEL COLANGIOCARCINOMA**

**Ricercatori responsabili:** Isabella Gigante

**Settore di ricerca:** Medicina Personalizzata

**Parole chiave del progetto:** iCCA, Notch, inflammasoma, inibitori farmacologici

## INTRODUZIONE

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

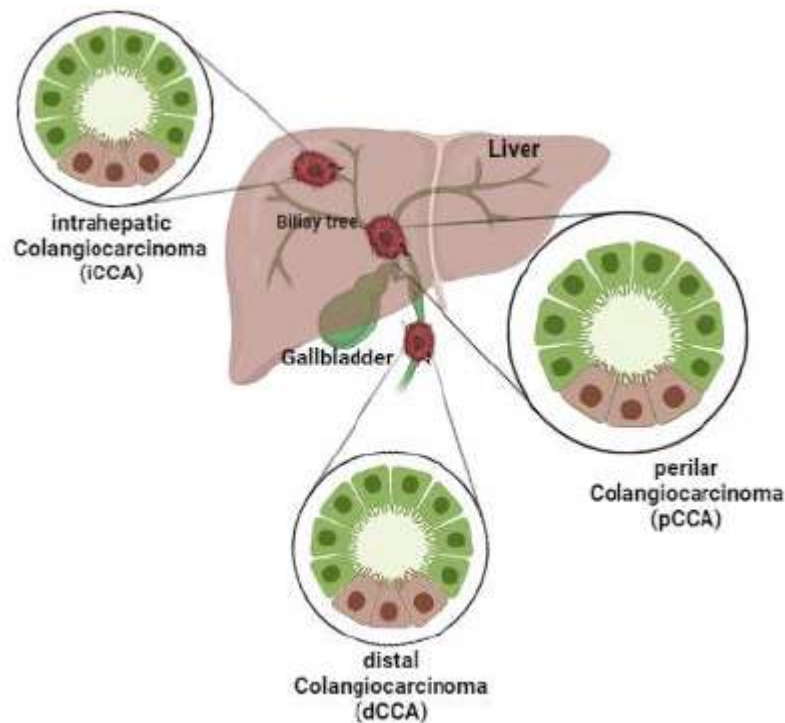


Figura 1. Definizione dei tumori delle vie biliari in base alla loro localizzazione.

Le cellule cancerose CCA scambiano segnali autocrini/paracrini con altre cellule tumorali e con le componenti che popolano il microambiente tumorale mediante la produzione e il rilascio di varie molecole quali citochine, chemochine e fattori di crescita [4]. Tra queste vie di segnalazione, vi è la segnalazione di Notch che svolge un ruolo essenziale nella differenziazione biliare [5]. Nello specifico, l'attivazione del pathway di Notch avviene quando uno dei quattro recettori transmembrana della famiglia di Notch (Notch 1-4) interagisce con uno dei cinque ligandi affini, tra cui Jagged (JAG 1, 2) e Delta-like (DLL 1, 3 e 4), espressi sulle cellule adiacenti. A seguito dell'attivazione del recettore, si ha il clivaggio proteolitico del dominio intracellulare di Notch (NICD), da parte del complesso  $\gamma$ -secretasi. In seguito, NICD trasloca nel nucleo e si associa con l'effettore nucleare RBP-Jk/CBF-1 che costituisce la porzione legante il DNA in grado di convertire il complesso trascrizionale da un repressore ad un attivatore della trascrizione dei geni bersaglio di Notch (HES, HEY) [6]. Recenti studi eseguiti in modelli sperimentali preclinici hanno dimostrato che la disfunzione della via di segnalazione di Notch è correlata alla rigenerazione e riparazione epatica, alla fibrosi epatica e allo sviluppo del colangiocarcinoma [7]. Recentemente, abbiamo dimostrato che Crenigacestat, uno degli inibitori del pathway di Notch, precisamente inibitore della gamma secretasi (GSI), è in grado di ridurre la crescita dei tumori che esprimono alti livelli di CD90, marcatore di staminalità [8] e di ridurre l'angiogenesi



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

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

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





L'inflammasoma è stato descritto per la prima volta nel 2002 [14], e, soprattutto nell'ultimo decennio, sta emergendo essere il mediatore principale dell'interazione tra organismo ospite e patogeno. L'inflammasoma è un complesso multi-proteico che si assembla in risposta ad un ampio spettro di patogeni culminando con l'attivazione di proteine, quali caspasi-1 e gasdermina D, che garantiscono rispettivamente la maturazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, interleuchina (IL) IL-1 $\beta$  e IL-18, in circolo da un lato e la morte cellulare dall'altro, in un processo chiamato piroptosi, il quale contribuisce alla propagazione dell'infiammazione stessa [12,15,16]. Tuttavia, un'attivazione incontrollata dell'inflammasoma determina un cambio di ruolo dello stesso, in particolare, da azione protettiva contro la perdita dell'omeostasi tissutale, allo sviluppo di patologie autoimmuni, immunosoppressione, cancro e insorgenza di metastasi [17]. Ad oggi, sono stati descritti quattro inflammasomi principali (pur essendo questo un numero in crescita): absent in melanoma 2 (AIM2), NLR family pyrin domain containing (NLRP) 1 e 3 (NLRP1 e NLRP3), e NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) [18]. Il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nell'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 $\beta$  sviluppano coliti o infiammazioni intestinali con una incidenza significativamente ridotta rispetto ai corrispettivi wild-type [19,20]. Inoltre, IL-1 $\beta$  e IL-18 svolgono un ruolo di immunosoppressione, favorendo la formazione di un microambiente pro-tumorale. IL-1 $\beta$  risulta avere un ruolo chiave nella soppressione della risposta immunitaria verso lo sviluppo tumorale attraverso un meccanismo di richiamo e attivazione in situ delle Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC), componenti chiave del microambiente tumorale e caratterizzate dalla loro abilità di produrre citochine con funzioni inibitorie, ossido nitrico sintasi, arginasi, e di indurre ed attivare le cellule T-regolatorie, tutti fattori con potenti azioni immunosoppressive [21]. Tumori xenograft che overesprimono IL-1 $\beta$  evidenziano accumuli di MDSC ed una progressione più rapida del tumore stesso [22]. Dati questi confermati da modelli animali con diversi tipi di carcinoma deficienti per il recettore IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ R) nei quali si è vista una ridotta crescita della massa tumorale [23]. In aggiunta, IL-1 $\beta$  derivante dall'attivazione di NLRP3 nei tumor associated macrophages (TAM), stimola le CD4+ T-cells a produrre e secernere IL-22, citochina anch'essa associata alla crescita di numerosi tumori [24]. Parallelamente, IL-18 svolge la sua funzione di immunosoppressione attraverso l'induzione, sulla membrana plasmatica delle cellule natural killer (NK), che normalmente possiedono funzioni anti-tumorali, della proteina pro-tumorale, nota come programmed cell death 1 (PD1) [25]. Diventa fondamentale, quindi, riuscire a prevenire, o convertire, un'over-attivazione di NLRP3



nel microambiente tumorale al fine di sollecitare il sistema immunitario verso un fenotipo più marcatamente anti-tumorale che pro-tumorale.

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

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

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

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



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

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

Nella prima parte dello studio, ci proponiamo di investigare la presenza dell'inflammasoma e quale tipo nelle cellule tumorali e nel microambiente (macrofagi) nell'iCCA (Figura 2, punto 1). Linee cellulari di iCCA verranno caratterizzate per le varie componenti dei principali inflammasomi (NLRP1, NLRP3 e NLRC4), la cui espressione verrà investigata mediante analisi genica e proteica. Nello sviluppo degli esperimenti in vitro, verranno utilizzate 4 linee cellulari di iCCA, nello specifico, HUCCT1, RBE, KKU-M123 e KKU-M156 e gli esperimenti saranno condotti in triplicato, su culture cellulari in 2D. Successivamente, compreso se e quale tipo di inflammasoma è espresso, utilizzando le stesse linee cellulari di iCCA si andrà a valutarne il ruolo, cioè se l'attivazione dell'inflammasoma comporta un'azione pro- o anti-tumorale (Figura 2, punto 2). A tal fine, si procederà con co-culture di monociti umani e linee cellulari di iCCA, in cui i primi saranno attivati per aggiunta esogena dell'LPS e l'attivazione dell'inflammasoma sarà confermato mediante immunofluorescenza per ASC e western blotting sulla Caspasi-1 clivata, ed infine rilascio nel mezzo delle citochine pro-infiammatorie (IL-1b e IL-18) mediante tests ELISA. Per elucidare il ruolo dell'inflammasoma, sulle linee cellulari di iCCA verrà valutata la vitalità cellulare post trattamento mediante saggi di MTS, l'espressione di alcuni marcatori dell'EMT, l'espressione di marcatori dell'apoptosi. Dopo aver individuato l'inflammasoma presente ed il suo ruolo nella colangiocarcinogenesi, si procederà al raggiungimento del secondo obiettivo. (Figura 2).

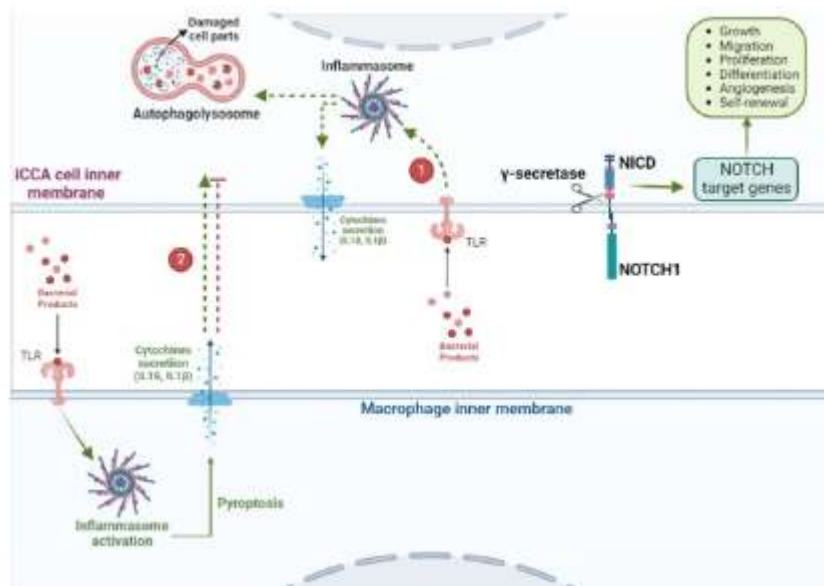


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'obiettivo 1. (1) Nell'iCCA (cellule tumorali e microambiente) è presente l'inflammasoma?; (2) Laddove presente, che ruolo ha, pro- o anti-tumorale?

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

Nella seconda parte, anch'essa in vitro andremo a valutare l'effetto dell'attivazione dell'inflammasoma su Notch (Figura 3). Negli stessi sistemi di coltura cellulare descritti sopra, si andrà ad analizzare l'espressione del dominio attivato di NOTCH, Notch intracellular domain (NICD) e dei geni target della segnalazione di Notch, mediante western blotting. In seguito, compreso come il pathway di Notch è influenzato dall'attivazione dell'inflammasoma nell'iCCA, si procederà con l'inibizione farmacologica o di Notch o dell'inflammasoma (Figura 4). Nel primo caso si valuterà come l'inibizione di Notch influenzi l'attivazione dell'inflammasoma mediante analisi proteica dei componenti dell'inflammasoma. Nel secondo caso si valuterà come l'inibizione dell'inflammasoma influenzi l'attivazione del segnale di Notch mediante analisi proteica del dominio NICD e dei target di attivazione del suo segnale. In entrambe le condizioni sperimentali si eseguiranno test funzionali di vitalità cellulare, analisi proteica sull'espressione delle molecole cardine dell'apoptosi, dell'infiammazione e dell'autofagia.

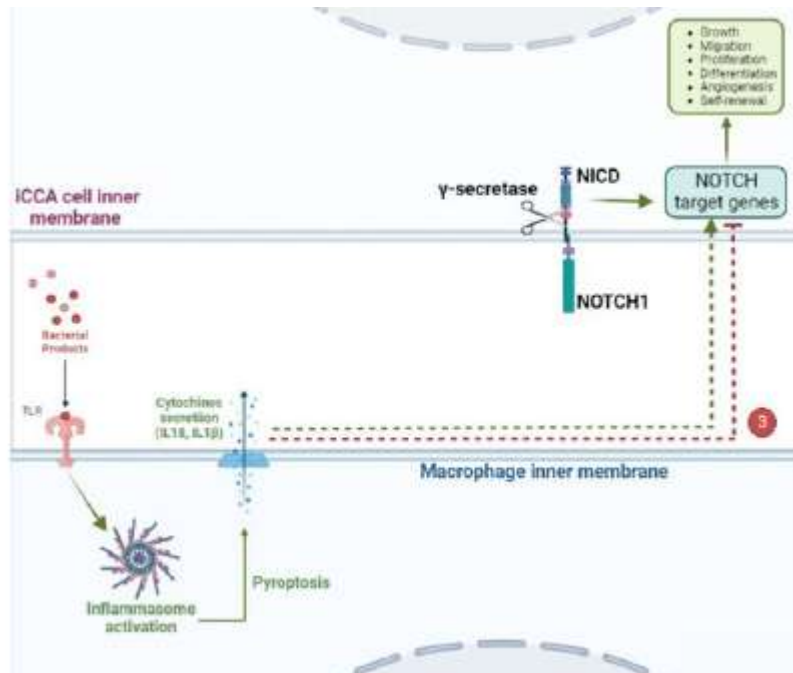


Figura 3. Raffigurazione schematica dell'obiettivo 2. (3) Esiste nell'ICCA un link Notch-inflammasoma? Promuove o ritarda la progressione tumorale?

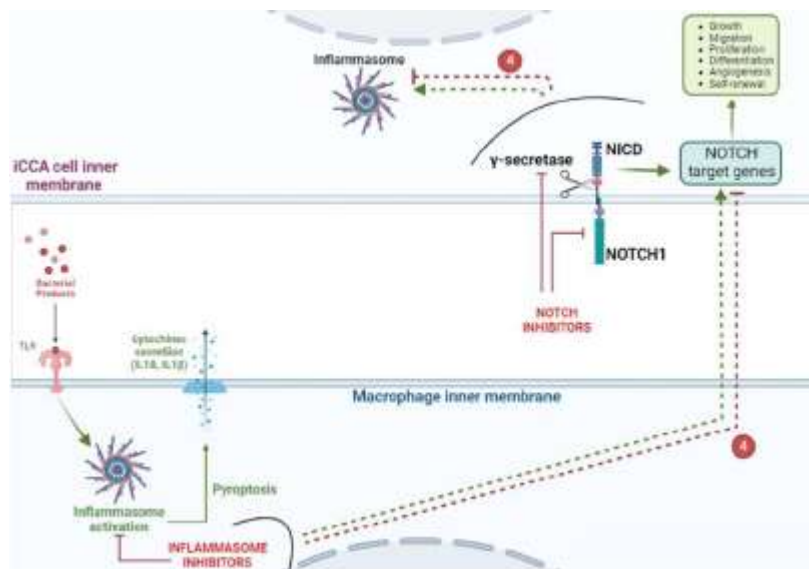


Figura 4. Raffigurazione schematica degli obiettivi 2. (4) Cosa comporta l'inibizione di una delle due parti, Notch-inflammasoma, sull'altra e cosa ne consegue?



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

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



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

## DATI PRELIMINARI

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



rispetto ai tessuti non neoplastici adiacenti (Figura 6), indicando diversi bersagli molecolari potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'iCCA.

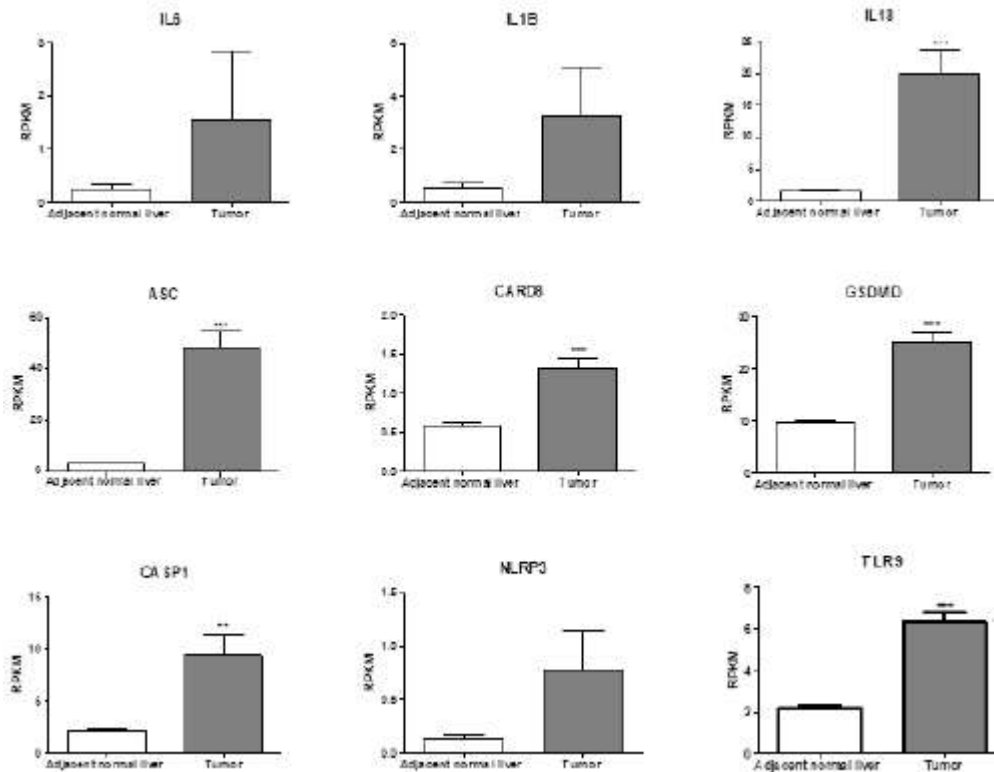


Figure 6: Analisi di diversi geni coinvolti nella risposta infiammatoria, come IL6, IL1B, IL18 e geni coinvolti nel complesso oligomerico dell'inflammasoma NLRP3, come ASC, CARD8, GSDMD, CASP1, NLRP3, TLR9 nei tessuti tumorali e peritumorali corrispondenti di 31 pazienti affetti da iCCA, tratti dal database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

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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



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

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

-inibitori di Notch:

-inibitori dell'inflammasoma.

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

Real time PCR. L'RNA totale sarà estratto con TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione di RNA sarà determinata con lo spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Il cDNA sarà retrotrascritto a partire da 2 µg di RNA totale, utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. Le reazioni di PCR quantitativa saranno eseguite utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) e primers specifici dei geni oggetto di studio (geni coinvolti nel pathway di Notch, nell'inflammasoma, nell'infiammazione, nell'apoptosi).

Analisi bioinformatica. Il software Ingenuity pathway analysis (IPA) (Qiagen, USA) sarà utilizzato per identificare i percorsi e i regolatori trascrizionali a monte modulati nelle condizioni sperimentali riprodotte in vitro su cellule ed in vivo nei modelli animali. I replicati biologici e tecnici saranno analizzati con i test statistici più appropriati (ad



esempio, test-t o ANOVA) per stabilire la significatività statistica e la riproducibilità. Per eseguire tutte le analisi statistiche sarà utilizzato il software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA).

Western, ELISA. I saggi di western blotting ed ELISA, saranno effettuati con protocolli standardizzati in precedenza, utilizzando anticorpi per i pathways di: Notch (Notch, HES1), apoptotici (Bcl2, Bax, Bad, cleavedPARP, Caspasi...), infiammatori (IL1 $\beta$ , IL18...) e dell'EMT (vimentina, e-caderina..); come proteina housekeeping, utilizzeremo la GAPDH (cell signaling). Dopo aver estratto le proteine totali con RIPA-Buffer, completo di inibitori di proteasi (Thermo Fisher Scientific), e aver trasferito le proteine su membrane in PVDF, si procede all'incubazione con i vari anticorpi primari di nostro interesse, e dopo un periodo di incubazione o.n., si procede ai lavaggi e al trattamento con il secondario coniugato con la perossidasi, per poi procedere la rilevazione del segnale mediante reagente chemiluminescente, Clarity Max Western Substrate (Bio-Rad Laboratories), utilizzando il ChemiDoc MP instrument (Bio-Rad Laboratories). I saggi di western verranno effettuati sia sulle colture cellulari che sui tessuti provenienti dai modelli animali. I tests ELISA per IL-1b e IL-18, verranno effettuati secondo protocollo applicato dall'azienda venditrice (abCAM).

Immunofluorescenza e immunoistochimica. L'immunofluorescenza verrà eseguita per lo studio dei marcatori (ASC) utilizzando come anticorpi utili a rilevare le proteine coinvolte, in modo da cogliere le variazioni di sovra-espressione o riduzione di espressione nelle cellule di iCCA trattate con inibitori di Notch o inibitori dell'inflammasoma , oppure per evidenziare modifiche delle proteine dell'inflammasoma. L'immunofluorescenza verrà effettuata sia su cellule che sui tessuti provenienti dai modelli animali trattati. A tal proposito, ricordiamo che tutti i tessuti da analizzare, saranno inclusi in paraffina tamponata e successivamente tagliati a 4  $\mu$ 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.

Sperimentazione in vivo. Per la sperimentazione in vivo verrà utilizzato il modello murino di iCCA idrodinamico [28,29]. I topi FVB/N saranno acquistati dal Jackson Laboratory, ai quali verrà indotto il colangiocarcinoma intraepatico primario mediante iniezione idrodinamica nella vena caudale con la combinazione di plasmidi AKT (10ug), Jagged1 (40ug) e SB (2ug). A partire dalla seconda settimana dall'inoculo delle cellule o dei tessuti, quando il volume tumorale raggiungerà circa i 60-70mm<sup>3</sup>, si procederà al trattamento degli animali. Ai topi verrà somministrato l'inibitore di Notch che ha dato i



migliori risultati in vitro o un veicolo per via orale alla nona settimana, ogni due giorni per una durata di 3 settimane. Secondo lo stesso modus operandi verrà somministrato l'inibitore/i dell'inflammasoma. I topi verranno pesati 2 volte a settimana insieme ai diametri dei tumori per tutta la durata dell'esperimento. La dimensione del tumore (in mm<sup>3</sup>) sarà calcolata usando l'equazione  $(length \times width^2)/2$ . L'effetto del trattamento sulla crescita tumorale sarà valutato come T/C% (mediana peso tumore nei trattati/mediana peso tumori nei controlli, in %). Il prelievo ematico verrà eseguito dalla vena orbitale, previo utilizzo di anestetico oftalmico. Le masse espianate subiranno dei processi di omogeneizzazione tissutale da cui estrarre RNA o proteine e procedere con lo studio genico e proteico dei pathway coinvolti nei processi infiammatori, apoptotici e pathway di Notch.

## RISULTATI ATTESI

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

Nel caso in cui tali risultati attesi non dovessero essere confermati, ma al contrario se dovessimo riscontrare una riduzione della vitalità cellulare e quindi riscontrare un ruolo pro-tumorale dell'inflammasoma nell'iCCA, saremmo indotti a pensare di poter essere di fronte ad un caso di sinergia con il pathway di Notch nel favorire un contesto infiammatorio. In tal caso potremmo descrivere il link Notch-inflammasoma come un team che la cellula tumorale di iCCA sfrutta a suo favore per poter sopravvivere e favorire un contesto pro-infiammatorio e perché no, magari un meccanismo di



chemioresistenza, magari anche per attivazione di meccanismi di autofagia per poter distruggere tutto ciò che la cellula riconosce come danneggiato e da eliminare per poter sopravvivere. La possibilità di poter traslare lo studio su modelli animali di colangiocarcinoma ci porrà in condizioni sperimentali più affini all'uomo, consentendoci di comprendere più chiaramente tali meccanismi cellulari.

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

## INNOVAZIONI

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

## BIBLIOGRAFIA

1. Alvaro D, Crocetti E, Ferretti S, Bragazzi MC, Capocaccia R. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma in Italy. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42:490–5.
2. Kim Y, Kim M, Shin JS, Park SH, Kim SB, Kim J, et al. Hedgehog Signaling Between Cancer Cells and Hepatic Stellate Cells in Promoting Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:2684–98.



3. Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Horino K, Masuda T, Komori H, et al. Hepatic stellate cells may relate to progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:2555–64.
4. Fabris L, Sato K, Alpini G, Strazzabosco M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology*. 2021;73:75–85.
5. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*. 2009;136:1727–39.
6. Strazzabosco M, Fabris L. Notch Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Guilty in Association! *Gastroenterology*. 2012;143:1430–4.
7. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, et al. Yes-Associated Protein Up-regulates Jagged-1 and Activates the NOTCH Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2013;144:1530-1542.e12.
8. Mancarella S, Serino G, Gigante I, Cigliano A, Ribback S, Sanese P, et al. CD90 is regulated by notch1 and hallmarks a more aggressive intrahepatic cholangiocarcinoma phenotype. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41:65.
9. Mancarella S, Serino G, Dituri F, Cigliano A, Ribback S, Wang J, et al. Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. *Cell Death Differ*. 2020;27:2330–43.
10. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*. 2014;15:e493–503.
11. Lee S, Kim SK, Park H, Lee YJ, Park SH, Lee KJ, et al. Contribution of Autophagy-Notch1-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation to Chronic Inflammation and Fibrosis in Keloid Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8050.
12. Jin Y, Li C, Xu D, Zhu J, Wei S, Zhong A, et al. Jagged1-mediated myeloid Notch1 signaling activates HSF1/Snail and controls NLRP3 inflammasome activation in liver inflammatory injury. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:1245–56.
13. Matsushita H, Miyake Y, Takaki A, Yasunaka T, Koike K, Ikeda F, et al. TLR4, TLR9, and NLRP3 in biliary epithelial cells of primary sclerosing cholangitis: Relationship with clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:600–8.
14. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Mol Cell*. 2002;10:417–26.





15. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol.* 2014;15:738–48.
16. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:99–109.
17. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell.* 2010;140:821–32.
18. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell.* 2016;165:792–800.
19. Bauer C, Duell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut.* 2010;59:1192–9.
20. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, et al. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4<sup>+</sup> Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2012;209:1595–609.
21. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation.* 2015;125:3356–64.
22. Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b + /Gr-1 + Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 $\beta$ -Secreting Cells. *The Journal of Immunology.* 2005;175:8200–8.
23. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Res.* 2007;67:10019–26.
24. Voigt C, May P, Gottschlich A, Markota A, Wenk D, Gerlach I, et al. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4 + T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114:12994–9.
25. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et



26. Karki R, Kanneganti T-D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:197–214.

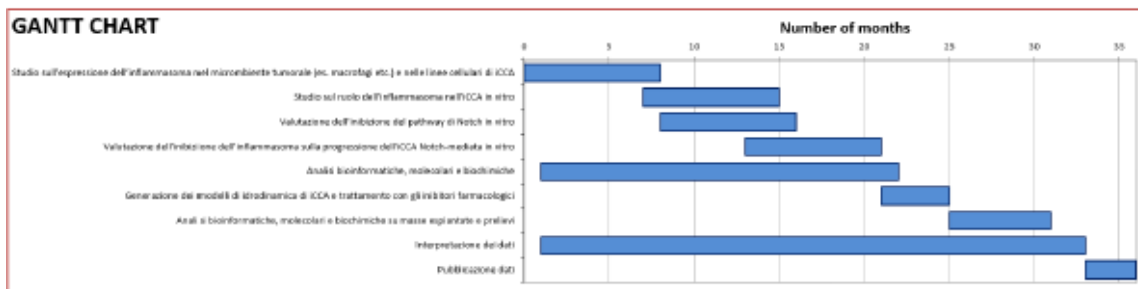
27. Ahn KS, Kang KJ, Kim YH, Kim T-S, Song B-I, Kim HW, et al. Genetic features associated with 18F-FDG uptake in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Treat Res*. 2019;96:153–61.

28. Che L, Fan B, Pilo MG, Xu Z, Liu Y, Cigliano A, et al. Jagged 1 is a major Notch ligand along cholangiocarcinoma development in mice and humans. *Oncogenesis*. 2016;5:e274.

29. Chen X, Calvisi DF. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am J Pathol*. 2014;184:912–23.

## TIMELINE

Event / Name	Start	End	Length
Studio sull'espressione dell'inflammasoma nel microambiente tumorale (es. macrofagi etc.) e nelle linee cellulari di iCCA	0	8	8
Studio sul ruolo dell'inflammasoma nell'iCCA in vitro	7	15	8
Valutazione dell'inibizione del pathway di Notch in vitro	8	16	8
Valutazione dell'inibizione dell'inflammasoma sulla progressione dell'iCCA Notch-mediata in vitro	13	21	8
Analisi bioinformatiche, molecolari e biochimiche	1	22	21
Generazione dei modelli di idrodinamica di iCCA e trattamento con gli inibitori farmacologici	21	25	4
Analisi bioinformatiche, molecolari e biochimiche su masse espianate e prelievi	25	31	6
Interpretazione dei dati	1	33	32
Pubblicazione dati	33	36	3





## TITOLO DEL PROGETTO

### **RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA A TERAPIE SISTEMICHE NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA GASTRICO**

**Ricercatori responsabili:** Rosalba D'Alessandro

**Settore di ricerca:** Oncologia Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** chemioterapia, terapia molecolare, marcatori predittivi, microambiente tumorale, resistenza farmacologica, marcatori circolanti.

## INTRODUZIONE

In Italia nel 2019 sono stati registrati 14.300 nuovi casi di tumore dello stomaco (8.400 tra gli uomini e 5.900 tra le donne), che rappresenta il quinto tumore più frequente nelle persone con più di 70 anni e la quinta causa di morte per cancro nella popolazione generale [1]. Nei paesi occidentali, l'80% dei pazienti viene diagnosticato con malattia in stadio avanzato non resecabile o sviluppa una recidiva entro 5 anni dalla chirurgia con intento curativo. Pertanto, la prognosi della malattia avanzata rimane sfavorevole con un tasso di sopravvivenza a 5 anni < 30% per tutte le fasi e < 4% per la malattia metastatica [2, 3].

Attualmente, la chirurgia con linfadenectomia D2, (rimozione di almeno 25 linfonodi) e senza residui macro o microscopici (cosiddetta resezione R0), rappresenta l'unico approccio curativo per GC localizzato [4], ma solo il 20% dei pazienti presenta una malattia resecabile alla diagnosi e, anche in caso di resezione curativa, la prognosi rimane infausta a causa dell'alto tasso di recidiva della malattia. In questo contesto, diversi approcci peri-operatori sono stati sviluppati al fine di diminuire i tassi di ricaduta e migliorare la sopravvivenza. Il recente studio di fase III FLOT4 ha rappresentato un progresso sostanziale nel trattamento peri-operatorio del carcinoma gastrico localmente avanzato e dell'adenocarcinoma della giunzione gastro-esofagea (GEJ). Lo schema FLOT, che prevede la combinazione di fluorouracile, leucovorin, oxaliplatino e docetaxel, ha portato ad un miglioramento significativo della sopravvivenza globale rispetto ad altri schemi [5, 6] migliorando anche la percentuale di resezioni con margini



liberi da malattia (85% vs 78%) e la PFS (30 mesi vs 18 mesi) [7]. La chemioterapia neoadiuvante sembra essere più efficace negli istotipi intestinali, ma ci sono indicazioni recenti di una sua efficacia anche in presenza di GC diffuso. La definizione di fattori predittivi di risposta al trattamento risulta un elemento essenziale per la selezione di pazienti candidabili al trattamento peri-operatorio.

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

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

Il pathway di riparo del DNA è composto da un intricato network di proteine coinvolte nella riparazione del DNA e nel controllo del ciclo cellulare, che hanno la funzione di sovrintendere alla corretta replicazione del materiale genico e all'efficiente svolgimento della proliferazione cellulare. Un efficiente sistema di riparo è necessario per la preservazione dell'integrità del patrimonio genetico e alterazioni in questi geni potrebbero rappresentare potenziali target terapeutici per la terapia antitumorale, come i sali di platino e i PARP inibitori [10, 11]. BRCA1 e BRCA2 sono i geni più noti correlati ai meccanismi di riparo del DNA, ma in realtà un più ampio spettro di mutazioni somatiche e germinali possono conferire il cosiddetto fenotipo "BRCAness", come nel caso di mutazioni a carico dei geni ARID1A, ATM, ATR, CDK12, CHEK1, CHEK2, PALB2, e RAD51 [12]. Tuttavia, la prevalenza e la rilevanza clinica di queste mutazioni nel tumore gastrico rappresentano una terra incognita. Interessanti studi preclinici hanno dimostrato un possibile coinvolgimento dell'infezione/inflammation mediata dall' H. pylori, riconosciuto come uno dei maggiori fattori di rischio nella cancerogenesi



del tumore gastrico, sia nell'indurre danni al materiale genetico che nel compromettere l'efficienza dei sistemi di riparo [13, 14].

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

Numerose evidenze hanno inoltre dimostrato che il GC è caratterizzato da una stretta interdipendenza tra il sottotipo molecolare e il profilo angiogenico e immunitario del microambiente tumorale. Come in altri tumori solidi, diverse citochine e fattori di crescita svolgono un duplice ruolo nel microambiente tumorale, in quanto promuovono sia l'angiogenesi tumorale che l'immunosoppressione. I fattori di crescita appartenenti alla famiglia del "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGFs) sono i promotori più diffusi e potenti dell'angiogenesi. I membri della famiglia VEGF sono coinvolti a diversi livelli nella regolazione del ciclo immunitario del cancro, producendo cambiamenti sostanziali che contribuiscono a creare un microambiente che consente al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. I profili angiogenico ed immunitario sono in stretta correlazione con le classi molecolari del tumore. I sottotipi MSI ed EBV-positivi sono caratterizzati da elevata espressione di PD-L1, da un infiltrato linfocitario citotossico ricco in CD8+ TILs e da un elevato tasso mutazionale (TMB  $\geq 10$ ), questi sono stati definiti "Hot Tumors" che rendono questi tumori aggredibili da farmaci immunoterapici. Al contrario, i sottogruppi molecolari dei tumori geneticamente stabili e con instabilità cromosomica sono definiti "Cold Tumors" e sono spesso caratterizzati da un microambiente immunosoppressivo e ricco in fattori che favoriscono l'angiogenesi. In quest'ultima classe di tumori rientrano i tumori con amplificazione del VEGFA che si riscontra con un'incidenza del 7%. Il VEGFA è un fattore molecolare in grado di entrare in diverse fasi del ciclo immunitario del cancro, producendo modifiche sostanziali che contribuiscono in ultima analisi a creare un microambiente tollerogenico che consente al tumore di eludere la sorveglianza immunitaria. Questi tumori però potrebbero essere trattati in modo efficace con terapie antiangiogeniche. L'analisi delle "firme" molecolari e dei pattern immunitario e angiogenico può pertanto portare ad individuare biomarcatori utili non solo a selezionare pazienti che possano beneficiare di uno specifico trattamento farmacologico ma anche a monitorarne nel tempo l'efficacia rivelando fenomeni di resistenza [15, 16].



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

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

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Il presente progetto di ricerca si propone di individuare marcatori molecolari nel processo di progressione tumorale del Carcinoma Gastrico (GC). Tale progetto si svilupperà attraverso studi specifici incentrati sull'analisi delle "firme" molecolari e dei pattern immunitario e angiogenico sia in pazienti affetti da forme precoci della malattia e sottoposti a terapie perioperatorie, sia in pazienti affetti da malattia metastatica sottoposti a terapie di prima o seconda linea. Individuare marcatori è cruciale non solo nella selezione di pazienti che possano beneficiare di uno specifico trattamento farmacologico ma anche nel monitorarne nel tempo l'efficacia rivelando possibili fenomeni di resistenza.





## Obiettivo specifico 1

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

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

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

- Un primo studio già avviato nel nostro gruppo di ricerca intende esplorare le caratteristiche molecolari del carcinoma gastrico resecabile importanti nel determinare il tipo di risposta alla terapia neoadiuvante. In particolare in questo studio sono arruolati pazienti con GC resecabile sottoposti a terapia neoadiuvante secondo lo schema FLOT. Lo studio si avvale della determinazione dello stato MSI e positività per EBV che verrà eseguita dall'Unità di Anatomia Patologica del nostro istituto. Ci sono infatti alcune evidenze che i tumori gastrici resecabili con elevato grado di MSI e MMRD beneficiano del solo trattamento chirurgico e sembrano non beneficiare del trattamento perioperatorio. Pertanto, determinare lo stato MSI prima dell'intervento potrebbe fornire un utile fattore predittivo negativo per la selezione dei pazienti da indirizzare al trattamento perioperatorio. Inoltre, lo stato dei microsatelliti così come la positività per EBV, sono associati ad uno specifico profilo immunitario nel microambiente tumorale. In particolare, tumori gastrici con elevato grado di MSI o EBV+ sono considerati immunopermissivi e sono quelli che potrebbero beneficiare delle terapie perioperatorie integrate con farmaci immunoterapici. Le informazioni sulle caratteristiche molecolari saranno messe in relazione con la valutazione patologica eseguita sulla biopsia chirurgica che stabilirà il grado di regressione tumorale (TRG) secondo i criteri di regressione di Becker (Al-Batran SE et al. The Lancet Oncology 2016).

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



- Un secondo studio è incentrato sulle mutazioni somatiche responsabili di deficit dei meccanismi di riparo del DNA in pazienti con GC sottoposti a Chemioterapia a base di sali di platino. Lo studio prevede l'individuazione tramite sequenziamento massivo (Next Generation Sequencing) di profili molecolari correlati al deficit di riparazione dei danni al DNA, analizzando il materiale genetico estratto da tessuto tumorale ricavato in corso di intervento chirurgico (su primitivo e/o metastasi) o biopsia diagnostica eseguiti nell'ambito del normale percorso clinico-assistenziale. I profili molecolari saranno correlati alla presenza di infezione da H. pylori. Inoltre sono individuate le mutazioni somatiche con valore prognostico di sopravvivenza globale e predittivo di risposta alla chemioterapia. Lo studio recluterà circa 50 pazienti per quanto riguarda la componente retrospettiva ed indicativamente 50 pazienti per quanto riguarda la parte prospettica.
- Un terzo studio già avviato nel nostro gruppo di ricerca è incentrato sull'analisi dei biomarcatori di risposta ad una terapia combinata tra chemioterapico appartenente alla famiglia dei taxani, il Paclitaxel, ed un farmaco molecolare antiangiogenico il Ramucirumab, il quale è diretto a bloccare il VEGFR2. Tale schema terapeutico rappresenta una terapia di seconda linea nel trattamento del GC metastatico. In questo studio sono reclutati pazienti sottoposti a questa combinazione di farmaci. Il nostro interesse in questo caso è incentrato sull'analisi di una specifica alterazione molecolare, costituita dall'amplificazione del gene VEGFA, che codifica per il fattore che lega il recettore VEGFR2. Il nostro obiettivo è quello di stabilire la correlazione tra amplificazione del gene, la sua overespressione nel tessuto tumorale e la risposta alla terapia. Abbiamo effettuato analisi di FISH per determinare lo stato di amplificazione del gene e analisi di IHC per determinare lo stato di espressione del gene nel tessuto tumorale. Tale analisi è stata effettuata su 30 pazienti ed i risultati sono riportati nella sezione dei Risultati Preliminari. Intendiamo estendere tale analisi prospettica ad altri 30 pazienti coinvolgendo le Unità di Oncologia coinvolte nella presente proposta progettuale.

## Obiettivo specifico 2

Studio delle popolazioni linfocitarie nell'infiltrato tumorale e nel sangue periferico al fine di rilevare possibili clusters di popolazioni correlabili alle caratteristiche del tumore o alla terapia in atto.

La presente proposta progettuale si propone altresì di caratterizzare l'immunofenotipo delle diverse classi di pazienti arruolate nei singoli studi. La caratterizzazione delle diverse popolazioni linfocitarie isolate sia dal tessuto tumorale (ove possibile) che dal



sangue periferico sarà effettuata utilizzando citofluorimetria a flusso multiparametrica che permette una caratterizzazione dal punto di vista numerico, fenotipico e funzionale. Verrà, inoltre, effettuato un confronto tra le diverse classi di linfociti presenti nel sangue e nell'infiltrato tumorale al fine di rilevare possibili clusters di popolazioni linfocitarie correlabili alle caratteristiche del tumore o alla terapia in atto.

Saranno caratterizzate le due principali classi di linfociti dell'immunità adattativa, le cellule CD4+ e CD8+  $\alpha\beta$ T, così come le popolazioni linfocitarie coinvolte nell'immunità innata, i linfociti  $\gamma\delta$ T e cellule natural killer (NK.). Queste ultime, oltre a contrastare le cellule tumorali attraverso la loro azione citotossica, regolano processi di differenziamento e attivazione dei linfociti  $\alpha\beta$ T e contribuiscono ad abrogare l'immunosoppressione operata dalle cellule Treg.

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

1. Nel microambiente tumorale, sono presenti distinte classi di linfociti T (CD4, CD8, Treg), T (V1, V2) e NK con diverso profilo di maturazione e capacità di attivazione/inibizione. La stretta relazione tra cellule tumorali e microambiente mette in atto distinti meccanismi molecolari che regolano le proprietà di attivazione/inibizione dei linfociti infiltranti il tumore. In particolare, il profilo immunitario dell'infiltrato tumorale è in stretta correlazione con lo stato di attivazione dell'asse VEGF/VEGFR e di altri fattori angiogenici.
2. L'eterogeneità dei tumori gastrici legata alle diverse caratteristiche isto-patologiche e molecolari (MSI status, infezione da EBV) è associata all'eterogeneità delle diverse popolazioni dei linfociti infiltranti il tumore.
3. I linfociti infiltranti il tumore, con il loro fenotipo tumore-dipendente, hanno un ruolo rilevante nella risposta del tumore alla terapia in atto.
4. La caratterizzazione delle specifiche popolazioni dei linfociti T, T e NK nel sangue periferico sarà utile a definire nuovi biomarcatori circolanti, importanti sia per il follow-up dei pazienti, sia per la conoscenza dei meccanismi responsabili del successo o del fallimento del trattamento terapeutico in pazienti con GC.



### Obiettivo specifico 3

Studio del pattern angiogenico nel tessuto tumorale e nel sangue periferico, con particolare riferimento all'asse VEGF/VEGFR.

- I risultati di tali analisi saranno messi in correlazione con l'analisi immunofenotipica e con le caratteristiche molecolari del tumore.

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

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

### DATI PRELIMINARI E RISULTATI ATTESI

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

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



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

### **Marcatori angiogenici circolanti**

In una prima fase sono stati misurati i livelli sierici di biomarcatori angiogenici selezionati a partire dall'inizio della terapia (T0) e ad intervalli di tre mesi sino al momento della progressione di malattia (TP). Sulla base della prima valutazione radiologica (dopo tre mesi dall'inizio della terapia), la popolazione è stata suddivisa in "gruppo con controllo di malattia (CD)" e "gruppo con malattia in rapida progressione (RP)". I livelli dei diversi marcatori sono stati misurati al basale, all'inizio del terzo ciclo di terapia e al momento della progressione della malattia. Sono stati considerati tutti i membri della famiglia VEGF, nonché l'Angiopoietina2 (Ang2) e il suo recettore (Tie2).

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

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

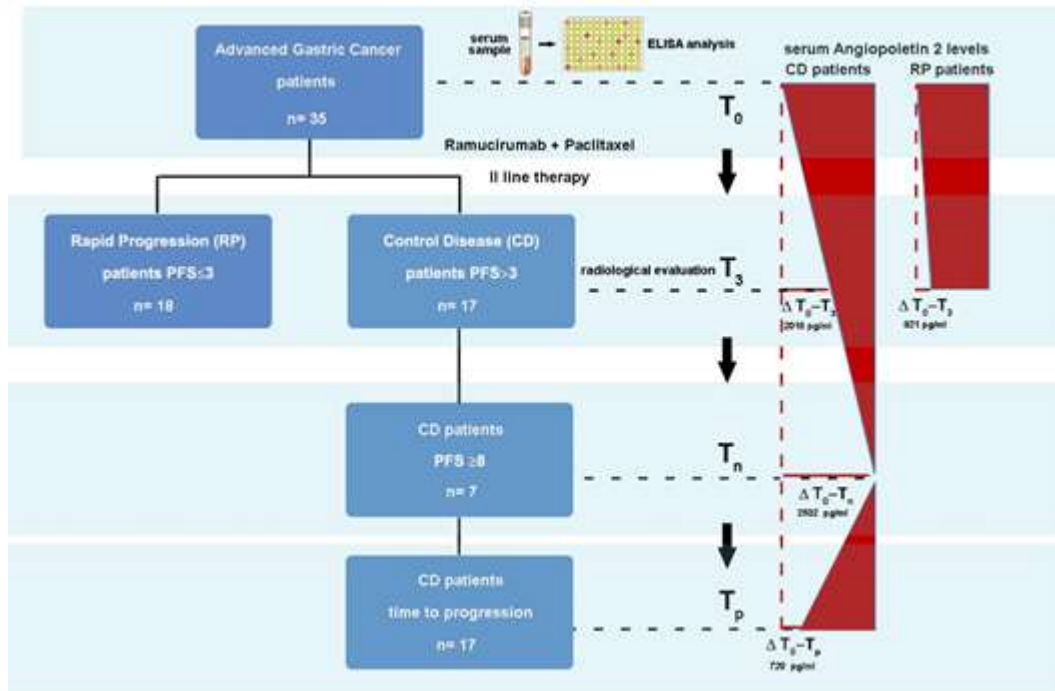


Fig. 1 Variazioni dei livelli sierici di Ang2 in 17 pazienti con controllo di malattia (CD) e 18 pazienti con malattia in rapida progressione (RP) misurati all'inizio della terapia (T<sub>0</sub>) e dopo tre mesi (T<sub>3</sub>), in corrispondenza del primo controllo radiografico. Nei pazienti CD si osserva una riduzione crescente dei livelli sierici di Ang2 e un successivo aumento al momento della progressione (T<sub>p</sub>).

### miRNA circolanti

In collaborazione con la Dr Grazia Serino stiamo effettuando un'analisi di un ampio pannello di miRNA circolanti nel plasma degli stessi pazienti appartenenti ai due gruppi CD e RP. Verranno effettuate le analisi sui miRNA estratti al T<sub>0</sub> e dopo tre mesi dall'inizio della terapia (T<sub>3</sub>) e nel gruppo dei pazienti CD ad intervalli di tempo successivi sino al tempo della progressione (T<sub>p</sub>). La nostra analisi è incentrata su diversi aspetti:

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





## Analisi e caratterizzazione degli esosomi circolanti

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

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

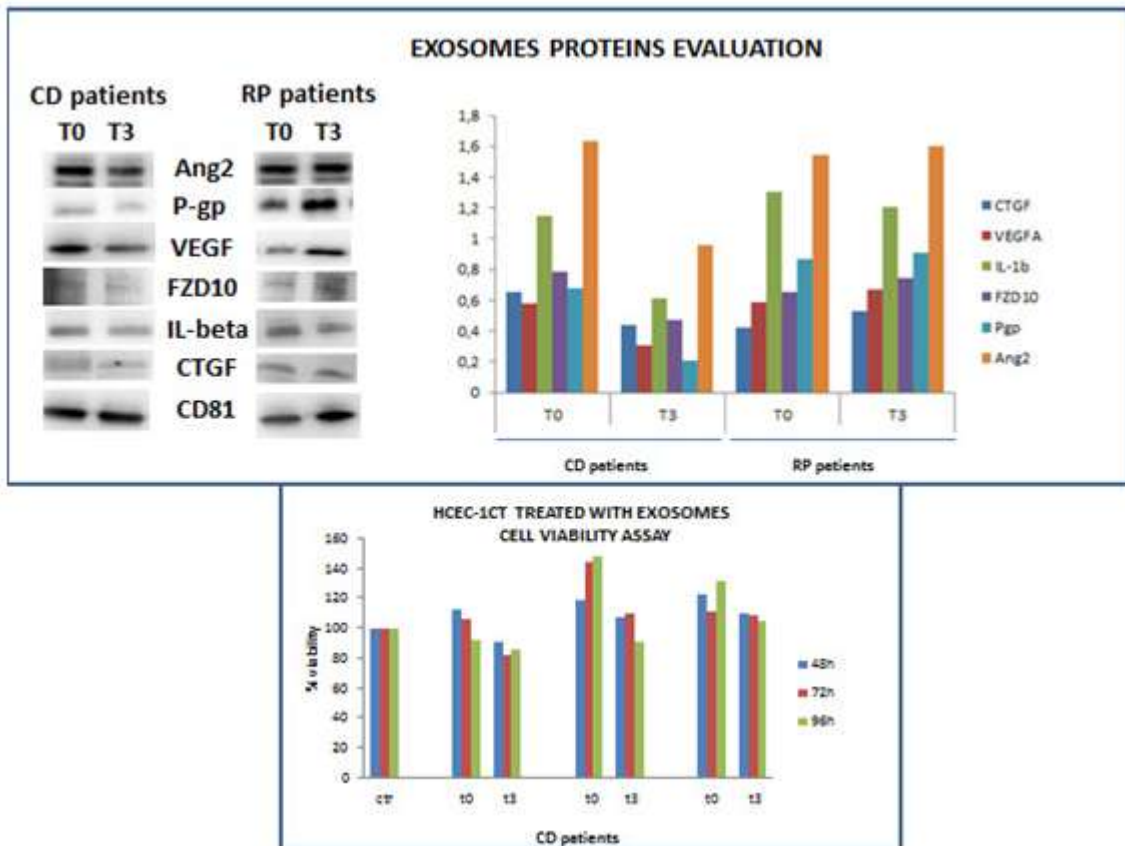


Fig. 2 Variazioni del contenuto di alcune proteine coinvolte in angiogenesi in esosomi estratti da pazienti dei due gruppi CD e RP il cui livello è stato valutato al T3 e al T0. I livelli di Ang2 e VEGFA diminuiscono al T3 rispetto al T0 nei pazienti del gruppo CD. Nel pannello sottostante, cellule epiteliali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

### Analisi e caratterizzazione dei PBMC circolanti

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



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

Alla luce di questi risultati riteniamo interessante estendere la nostra analisi ad un numero maggiore di pazienti (n=60) equamente distribuiti tra i due gruppi CD e RP. Pertanto, questa parte retrospettiva dello studio potrebbe facilmente essere completata grazie alla collaborazione di altri centri di Oncologia. Hanno dato disponibilità a partecipare allo studio il gruppo coordinato dal Prof. Ferdinando De Vita dell'Unità di Oncologia del Secondo Policlinico di Napoli ed il gruppo coordinato dal Dr Evaristo Maiello dell'Unità di Oncologia della Casa Sollievo della Sofferenza di S. Giovanni Rotondo.

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

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



le rispettive controparti sensibili. Nelle linee resistenti abbiamo riscontrato le seguenti caratteristiche:

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

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

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

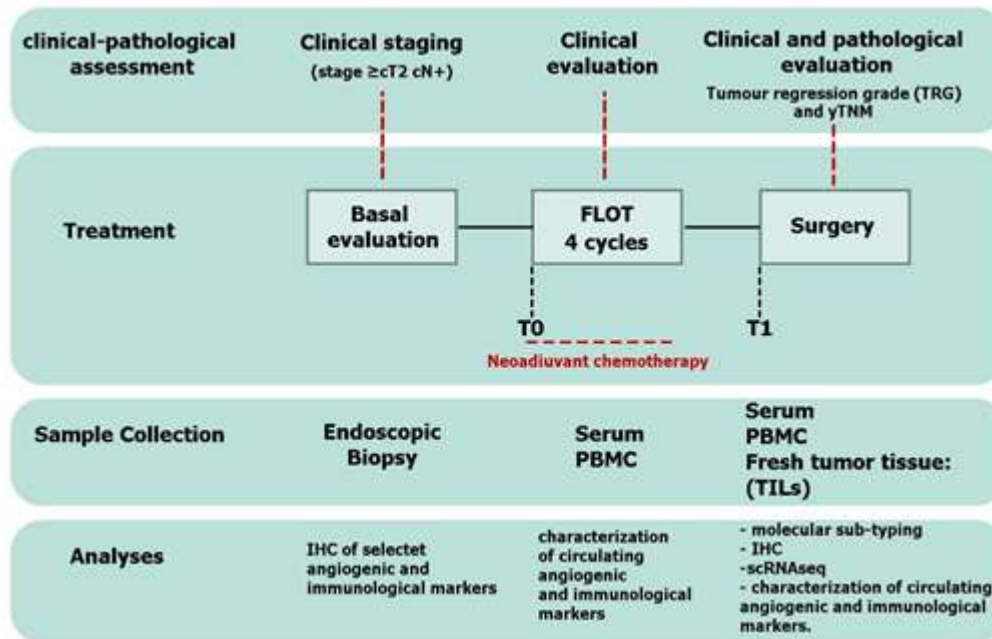
I risultati oggetto di questo studio in vitro sono stati inclusi in due pubblicazioni scientifiche:

1- Refolo MG et al. Molecular mechanisms of synergistic action of Ramucirumab and Paclitaxel in Gastric Cancers cell lines. *Sci Rep.* 2020 Apr 28;10(1):7162. doi: 10.1038/s41598-020-64195-x. PMID: 32346056; PMCID: PMC7188894.

2- "The multiple combination of Paclitaxel, Ramucirumab and Elacridar reverses the Paclitaxel-mediated resistance in Gastric Cancer cell lines". Annalisa Schirizzi et al. *IJMS* (ri-sottomissione del manoscritto revisionato)

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

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



## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

### 1. Pazienti

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





informativa circa gli obiettivi dello studio e successivamente sarà acquisito il consenso informato.

Studio multicentrico IMAN: pazienti con GC resecabile sottoposti a terapia neoadiuvante FLOT Approvato dal CE in data 19/04/2021. Centri partecipanti: IRCCS “S. de Bellis” Castellana Grotte, Policlinico di Bari

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

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

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

### 1.1 Dimensione del campione

Al fine di valutare, in maniera statisticamente rilevante, l’impatto di potenziali problemi non prevedibili in fase di design dello studio e che potrebbero richiedere una variazione dei criteri di inclusione / esclusione abbiamo utilizzato la formula proposta da W Viechtbauer, L Smits, D Kotz, L Budé, M Spigt, J Serroyen, R Crutzen: “A simple formula for the calculation of sample size in pilot studies” . J Clin Epidemiol 2015 Nov;68(11):1375-9: Valutando la probabilità del verificarsi di un evento imprevisto che determini l’esclusione di un paziente dallo studio nella misura del 4% (con un limite di confidenza del 95%).



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

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

### 2.1 Sangue periferico

Verranno ricavate aliquote di sangue intero e siero esclusivamente dai prelievi ematici previsti dal piano terapeutico. In particolare verranno ricavati prelievi ematici prima dell'inizio dei cicli di terapia e a tempi successivi secondo il modello sperimentale di ogni singolo studio.

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

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

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

### 2.2 Reperti bioptici

I reperti bioptici fissati in formalina ed inclusi in paraffina per le analisi di immunoistochimica verranno forniti dall'Anatomia Patologica dell'IRCCS "S. De Bellis", o dai centri che parteciperanno allo studio dopo che siano state assicurate tutte le analisi previste dal piano terapeutico.

### 2.3 Tessuto fresco

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

Nello specifico, i campioni a fresco provenienti dai pezzi operatori saranno processati mediante l'utilizzo del gentleMACSDissociator (MiltenyiBiotec), applicando il protocollo specifico per il TumorDissociation Kit, che consente di ottenere una sospensione di cellule singole a partire da tessuti solidi combinando una dissociazione meccanica con una degradazione enzimatica della matrice extracellulare. Le cellule così dissociate,



dopo essere state filtrate e lavate con HBSS, potranno essere messe in coltura o isolate. Dal tessuto tumorale e dalla sua controparte normale verranno isolate popolazioni linfocitarie (TILs).

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

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

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

### **4. Isolamento dei TILs da tessuto tumorale**

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

### **5. Isolamento delle cellule tumorali**



Seguendo il protocollo indicato per il Tumor Cell Isolation Kit human (MiltenyiBiotec), le cellule non tumorali saranno marcate magneticamente con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con micro beads. In seguito, la sospensione cellulare verrà caricata su una colonna posta nel campo magnetico di un separatore MACS. Le cellule non tumorali marcate verranno trattenute all'interno della colonna, al contrario le cellule tumorali prive di marcatura attraverseranno la colonna. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule non tumorali trattenute magneticamente saranno eluite. Le cellule tumorali così ottenute saranno messe in coltura in flask T25 in numero di  $5 \times 10^6$  cellule/ml, in RPMI-1640 con 20% FBS, 1% Pen-Strept, 1% glutammina e 1% di amminoacidi non essenziali (NEAA). Dopo 24h verranno rimosse cellule non aderenti e verrà rinnovato il terreno ogni due giorni per circa 2 settimane. Le cellule tumorali potranno poi essere congelate fino alle successive analisi.

### Next Generation Sequencing (NGS)

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

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

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

## 7. Analisi fenotipica e funzionale

I pannelli Polychromatic Flow Cytometry (PFC) verranno applicati per l'analisi fenotipica (colorazione di marcatori della membrana cellulare) e funzionale (colorazione dei



marcatori della membrana cellulare e di quelli intracellulari) dei linfociti circolanti dei donatori sani e dei linfociti isolati dal sangue periferico e residenti nei tessuti dei pazienti.

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

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

### 7.1 Analisi dei dati derivanti da esperimenti di Citometria a Flusso

I dati grezzi generati dal citofluorimetro "FACS Symphony flow cytometer" nel formato Flow Cytometry Standard (FCS) 3.0 verranno analizzati con il programma "FlowJo software (TreeStarInc), version 9.9.6." che permetterà dopo aver ripulito i dati da debris, cellule morte, doppietti di cellule, di identificare singole popolazioni di linfociti grazie ad modello computazionale che combina le informazioni derivanti dai singoli marcatori al fine di identificare nel campione popolazioni di cellule con le stesse caratteristiche. Per un'analisi unbiased sarà usato l'algoritmo t-SNE che permette di identificare delle sub-popolazioni cellulari con delle specifiche caratteristiche fenotipiche. I dati derivanti da ogni singolo campione verranno concatenati in una singola matrice al fine di produrre l'algoritmo t-SNE. I dati saranno così visualizzati in uno scatter plot bi-dimensionale (t-SNE map) dove le cellule fenotipicamente simili formeranno differenti clusters rendendo così visibili le diverse sub-popolazioni.

### 8. Valutazione della Instabilità dei microsatelliti



La instabilità dei microsatelliti sarà valutata mediante il sistema Idylla (Biocartis).

Il test Idylla MSI è un test completamente automatizzato che prevede l'utilizzo diretto del campione grezzo, fino al risultato finale, su un unico strumento, con tutti i reagenti integrati in un'unica cartuccia, senza alcuna manipolazione da parte dell'operatore dopo il caricamento (Modalità campione IN/Referto OUT). Il campione è rappresentato da sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina che contengano almeno il 20% di cellule neoplastiche.

Il test Idylla MSI esegue il rilevamento delle mutazioni in 7 biomarkers (ACVR2A, BTBD7, DDO1, MRE11, RYR3, SEC31A e SULF2) utilizzando una reazione di PCR seguita da analisi di melting ad alta risoluzione. La presenza di mutazioni in almeno 2 biomarker sarà refertata come fenotipo instabile (MSI-H), l'assenza di mutazione o soltanto la mutazione in un singolo biomarker sarà refertata come fenotipo stabile (MSS).

## 9. Valutazione dell'infezione da Epstein-Barr virus (EBV)

La valutazione di EBER (Epstein Barr Encoding Region) sarà effettuata con metodica CISH utilizzando il kit RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA). Le sezioni di tessuto (spessore 4 µm) saranno asciugate in stufa a 60 ° C per 1 ora, sottoposte a sparaffinatura e idratazione. Seguirà smascheramento antigenico mediante incubazione per 10' in tampone citrato (pH 6.0) a 98°C, permeabilizzazione della sezione con proteasi a 40°C per 30', ibridazione con sonda target, amplificazione del segnale e rilevazione dello stesso mediante aggiunta del cromogeno. Saranno considerati positivi i campioni con presenza di positività nucleare nelle cellule neoplastiche e/o infiammatorie.

## 10. Immunoistochimica per caratterizzazione del profilo immunologico dell'infiltrato linfocitario (TILs)

Tutte le fasi delle indagini di immunoistochimica per i marcatori in studio (PD-L1, CD8, CD4, FOXP3 -VEGFA, VEGFR2/VEGFR1/VEGFR3, TUBBIII) saranno effettuate mediante l'utilizzo dell'immuno-coloratore automatico Bond III (Leica).

Per la valutazione immunoistochimica delle cellule CD4+ e CD8+ saranno selezionati 5 campi nelle aree intra e peritumorali della sezione istologica al fine di ottenere un valore medio per ogni campione. La mediana dei valori medi sarà il cut-off per classificare i casi con alta o bassa concentrazione di CD8+/CD4+.

## 11. Analisi dei livelli sierici dei fattori angiogenetici





Per la determinazione dei livelli dei fattori di crescita e delle citochine presenti nel siero ci avvarremo della tecnologia Bio-PlexMagPIX Suspension Array System che è un sistema integrato per analisi quantitative multiparametriche di molecole biologiche in sospensione ottenute da campioni di siero, plasma, medium di colture cellulari, fluidi biologici in genere. Verrà indagati pannelli stabiliti di fattori coinvolti in angiogenesi tumorale

## 12. Analisi dei livelli di espressione dei miRNA circolanti

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

## 13. Isolamento degli esosomi:

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

## 14. Analisi Statistica

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

Per confrontare le differenze tra il gruppo di pazienti in cui si riscontra un controllo di malattia inseguito ad un dato trattamento e pazienti in cui si riscontra progressione rapida, verrà adoperato il test del Chi-Quadrato o il test di Fisher quando necessario per le variabili categoriche e verrà valutata la scelta di un test parametrico o non parametrico, a seconda della distribuzione, per le continue.



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

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

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

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

## INNOVAZIONI

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

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

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



## BIBLIOGRAFIA

1. AIOM –AIRTUM – Fondazione – AIOM – PASSI. I numeri del cancro in Italia, 2019. Intermedia Editore. Settembre 2019
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* (2021) 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* (2017) 8(8):CD004064. doi: 10.1002/14651858
4. Smith, D.D.; Schwarz, R.R.; Schwarz, R.E. Impact of Total Lymph Node Count on Staging and Survival After Gastrectomy for Gastric Cancer: Data from a Large US-Population Database. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 7114–7124.
5. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastro-esophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11–20.
6. Ychou M, Boige V, Pignon JP, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastro-esophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1715–21.
7. SE Al-Batran, N Homann, C Pauligk, T O Goetze, J Meiler, S Kasper, HG Kopp, F Mayer, G M Haag, K Luley, U Lindig, on behalf of the FLOT4-AIO Investigators. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 2019; 393: 1948–57.
8. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI et al. Gastric cancer. *Lancet* 2020, 635–648
9. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513:202-209.
10. Goldstein M, Kastan MB. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med.* 2015;66:129–43.



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



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

**TIMELINE**

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
Caratterizzazione molecolare	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Isolamento PBMCs e siero	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Analisi FACS						Yellow	Yellow				Yellow	Yellow
Analisi fattori angiogenici						Orange	Orange				Orange	Orange
Analisi miRNA	Purple	Purple	Purple							Purple	Purple	Purple
Analisi Esosomi	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue					Blue	Blue
Sperimentazione <i>in vitro</i>	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	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	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
Caratterizzazione molecolare	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Isolamento PBMCs e siero	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Analisi FACS			Yellow	Yellow					Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici			Orange	Orange					Orange	Orange		
Analisi miRNA				Purple	Purple	Purple					Purple	Purple
Analisi Esosomi	Blue				Blue	Blue	Blue				Blue	Blue
Sperimentazione <i>in vitro</i>	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					
Caratterizzazione Molecolare	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red					
Isolamento PBMCs e siero	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green					
IsolTILs e Cell. tumorali	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue					
Analisi FACS								Yellow	Yellow	Yellow		
Analisi fattori angiogenici								Orange	Orange	Orange		
Analisi miRNA								Purple	Purple	Purple		
Analisi Esosomi								Blue	Blue	Blue		
Sperimentazione <i>in vitro</i>	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



## TITOLO DEL PROGETTO

# RICERCA DI BIOMARCATORI PREDITTIVI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DI ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO

**Ricercatori responsabili:** Marina Liso

**Settore di ricerca:** Immunologia Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** adenocarcinoma pancreatico, neoplasie mucinose papillari intraduttali, biomarcatori

## INTRODUZIONE

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) è attualmente la terza causa di morte per cancro negli Stati Uniti [1], con 495.773 nuovi casi diagnosticati nel 2020. Si stima che nel 2030 possa diventare la seconda causa di morte per cancro negli USA [2].

La stragrande maggioranza di PDAC è costituita da tumori solidi che derivano da lesioni microscopiche displastiche, denominate neoplasie intraepiteliali del pancreas (PanIN). Un sottoinsieme di PDAC deriva da lesioni cistiche, ovvero neoplasie cistiche mucinose (MCN) e in particolare neoplasie intraduttali, neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN) e altre neoplasie correlate, che formano tumori visibili in genere più grandi di 1 cm [3-4].

Questi ultimi si pensa che abbiano un percorso evolutivo differente dai PDAC, e presentano caratteristiche molecolari, biologiche e prognostiche distinte [3-4].

La frequenza di IPMN associati a PDAC (e simili neoplasie intraepiteliali tumorali) è molto variabile (da <1% a 15%) [5-6].

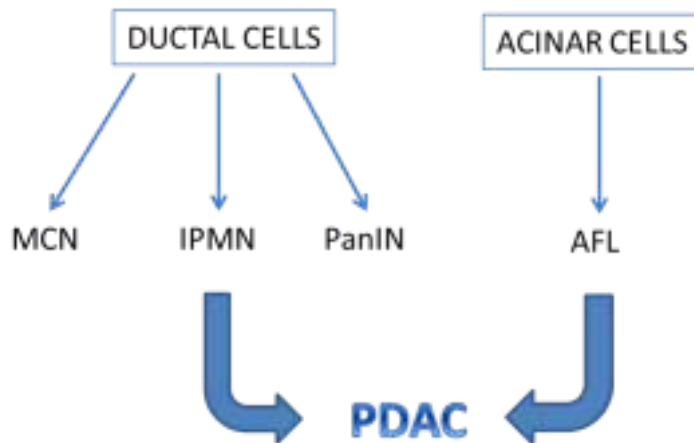
Le cisti pancreatiche accidentali vengono diagnosticate sempre più frequentemente nella popolazione generale (fino al 15% negli anziani), pertanto conoscere la percentuale di cisti pancreatiche che evolve realmente a PDAC può avere implicazioni importanti nella popolazione generale [7]. In molti studi è emerso che piccoli IPMN non

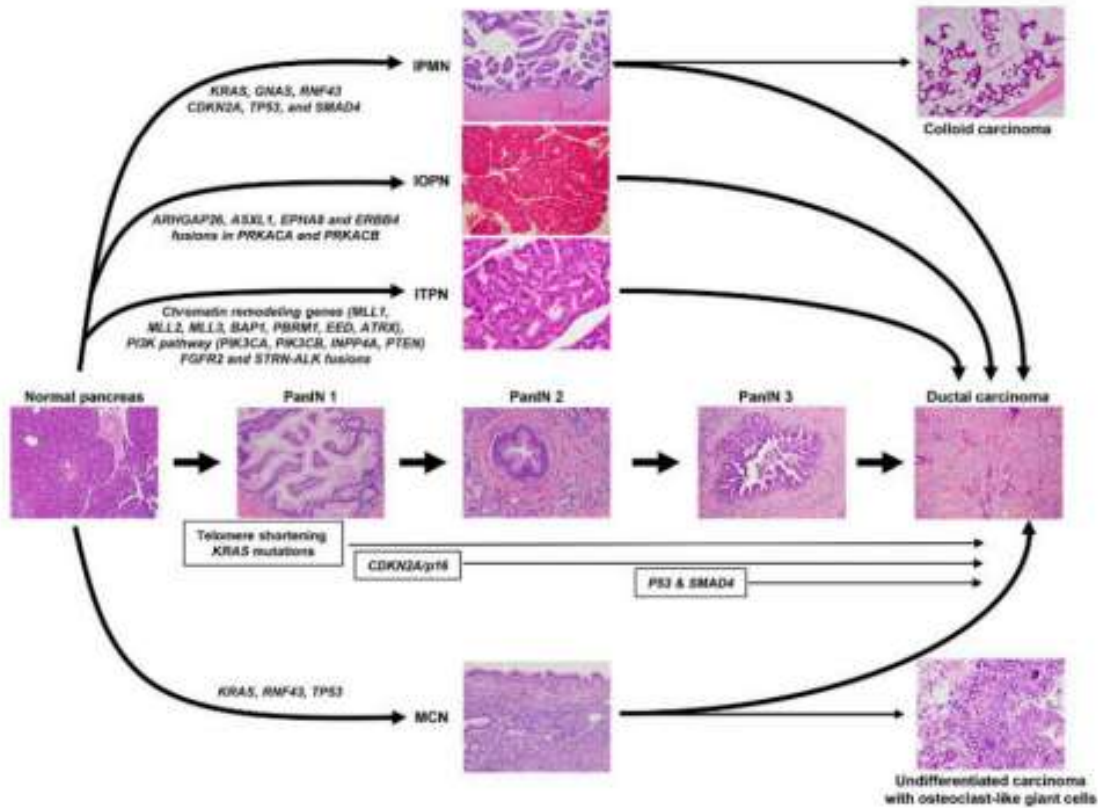


complessi (detti anche “Sendai-negativi” secondo i criteri radiologici) si sono rivelati innocui, ed in questi casi viene raccomandata la “sorveglianza attiva” [8].

Anche MCN e IPMN evolvono in PDAC attraverso alterazioni genetiche (KRAS e GNAS1 nelle fasi iniziali, TP53 nelle fasi tardive). Differenze istopatologiche sono associate a differenti sottotipi di lesione cancerosa (KRAS associato e lesioni gastriche, GNAS1 al sottotipo intestinale). Queste differenze si riflettono in un processo evolutivo differente della lesione pre-cancerosa. In ogni caso, il fenotipo duttale e la mutazione di KRAS sono caratteristiche comuni dei precursori di PDAC [13]. Studi su modelli murini, hanno evidenziato come in certi casi, il PDAC possa originare dal compartimento centro-acinare, tramite una sequenza metaplasia-displasia, senza uno step intermedio di lesione di tipo PanIN. In questo caso si parla di lesione piatta atipica (AFL) [14]. In questo tipo di lesioni CK-19 positive, vi è una elevata espressione di Ki-67, e una alterata espressione di CDKN2A/p16 [14].

## PANCREATIC CARCINOGENESIS





Il 10% circa di PDAC ha una componente familiare ereditaria; tuttavia, non sono state ad oggi identificate specifiche mutazioni comuni per la maggioranza dei casi. Studi futuri si rendono necessari per caratterizzare meglio da un punto di vista molecolare e morfologico le lesioni precursori di PDAC.

Studi recenti hanno dimostrato che la presenza di un numero elevato di linfociti T citotossici e uno specifico repertorio di T cell receptor (TCR) nel microambiente tumorale, si associano ad una più lunga sopravvivenza nei pazienti con PDAC, mentre la presenza di un elevato numero di cellule T CD3+Foxp3+ è associata con un più breve tasso di sopravvivenza [15].

Studi che permettano l'identificazione di sottotipi di PDAC con caratteristiche cliniche e risposta alla terapia differenti, e l'integrazione di questi dati nella pratica clinica, forniranno un valido sostegno nell'individuazione della terapia specifica per i pazienti con PDAC, nell'ottica di una medicina sempre più personalizzata [16].



## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

Il progetto si propone di identificare nuovi marcatori molecolari in grado di differenziare gli IPMN e PanIN dalle PDAC.

In particolare, lo scopo del progetto è quello di studiare le basi molecolari che portano una neoplasia di tipo intraepiteliale e mucinosa ad evolvere in adenocarcinoma duttale pancreatico.

### Obiettivo specifico 1

Analisi molecolare differenziale tra i gruppi di studio

L'avvio del progetto comprenderà la stesura del protocollo da sottomettere al Comitato Etico per l'approvazione dello studio.

La prima fase del progetto prevede l'identificazione di due gruppi ben distinti di neoplasie pancreatiche. Il primo gruppo sarà costituito dagli IPMN e PanIN, e costituirà il gruppo di studio. Il secondo gruppo sarà invece costituito da PDAC, e andrà a costituire il gruppo di controllo.

Ogni anno, presso il nostro istituto, vengono operati circa 40 nuovi pazienti per sospetta neoplasia pancreaticata. Il pezzo operatorio verrà fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded), mentre parte del campione verrà sottoposto a dissociazione meccanica ed enzimatica a fresco, al fine di isolare le cellule staminali cancerose per la coltura in vitro, per ottenere modelli 3D che ricapitolino le caratteristiche funzionali e strutturali del tessuto d'origine.

Trattandosi di uno studio con due bracci di trattamento, prevediamo di reclutare un numero di pazienti che sia di almeno  $N=30$  per braccio, ovvero un campione totale di  $N=60$ . Tale approccio si rende necessario in quanto in letteratura non esistono lavori simili a questo, e quindi non esiste quella misura di effetto utile per il calcolo della grandezza del campione.

In questo caso l'utilizzo di tale strategia consente di calcolare seppur in modo fittizio, la grandezza minima del campione, rispettando il rigore metodologico del teorema del limite centrale, consentendo cioè, di avere almeno teoricamente una distribuzione normale dei parametri analizzati. Dai blocchetti di tessuto in FFPE verrà estratto l'RNA totale. I campioni di RNA saranno quindi inviati presso un ente esterno che provvederà a sequenziare i campioni.



I dati del sequenziamento saranno quindi elaborati e sottoposti ad analisi bioinformatica, al fine di identificare un pattern di espressione genica differente tra i due gruppi di studio.

## **Obiettivo specifico 2**

Validazione dei biomarcatori mediante ricerca delle proteine target

La seconda fase del progetto prevede la selezione, fra tutti i geni con espressione significativamente differente tra i due gruppi, di un sottogruppo di geni candidati (circa 10) con il più elevato valore predittivo.

I suddetti geni saranno validati sugli stessi campioni selezionati, mediante analisi di espressione genica con RealTime qPCR, utilizzando primers specifici.

Inoltre, si procederà alla ricerca delle relative proteine su tessuto pancreatico, tramite analisi immunoistochimica con specifici anticorpi, utilizzando campioni di tessuto provenienti dagli stessi pazienti appartenenti ai due gruppi di studio precedentemente selezionati.

Il risultato di un pattern differenziale di espressione delle proteine target nei due gruppi di studio, andrà a confermare la validità di ciascuna proteina, precedentemente selezionata con indagine molecolare, come un potenziale biomarcatore per la diagnosi precoce di PDAC.

## **Obiettivo specifico 3**

Analisi del potenziale predittivo dei biomarcatori mediante screening su nuovi tessuti.

L'ultima fase del progetto, prevede l'analisi del potenziale predittivo dei biomarcatori identificati, mediante screening delle medesime proteine sui nuovi pazienti con neoplasia del pancreas che giungeranno nel nostro Istituto.

In particolare, si procederà con la valutazione dell'espressione dei biomarcatori, mediante caratterizzazione immunofenotipica su tessuto e su organoidi. Questa valutazione sarà prodromica ad un successivo screening farmacologico, che ci permetterà di valutare come l'espressione dei nuovi biomarcatori identificati abbia conseguenze sulla risposta alle attuali terapie a disposizione per la cura del tumore pancreatico.



## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

- Analisi istologica dei tessuti inclusi in FFPE.
- Estrazione di mRNA totale da tessuto pancreatico fissato e incluso in FFPE.
- Preparazione delle librerie indicizzate (TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero) e sequenziamento dell'RNA su piattaforma Illumina (paired-end 2x100 cicli, 20x106 reads/campione).
- Analisi bioinformatica di II livello (demultiplexing, controllo di qualità delle reads, allineamento delle reads su genoma di riferimento, identificazione dei geni espressi, analisi di espressione differenziale).
- RealTime qPCR con primers specifici per un gruppo di geni selezionati e analisi dell'espressione genica relativa ad un gene housekeeping di riferimento.
- Immunoistochimica su tessuto pancreatico, fissato e incluso in FFPE, con anticorpi specifici per un gruppo di proteine selezionate.
- Per generare organoidi normali e cancerosi derivanti da pazienti, i tessuti disaggregati saranno processati con un protocollo specifico (stemcell technologies Pancreacult Organoids kit) che permette l'isolamento e la preservazione delle cellule staminali.
- I risultati verranno descritti tramite media e deviazione standard ( $M \pm SD$ ) o mediana e range, per le variabili quantitative e mediante frequenze e percentuali (%) per le categoriche. · Per confrontare le differenze tra il gruppo di controllo e la categoria di pazienti affetti da neoplasia intraepiteliale del pancreas, verrà adoperato il test del Chi-Quadrato o il test di Fisher quando necessario per le variabili categoriche e verrà valutata la scelta di un test parametrico o non parametrico, a seconda della distribuzione, per le continue.
- Verranno adoperati test specifici di confronto tra i due gruppi indipendenti per valutare la differenza di espressione genica tra i geni valutati.
- Inoltre grafici come gli heatmaps verranno costruiti per una rappresentazione grafica dei dati genetici a due dimensioni. L'analisi per cluster verrà adoperata per valutare la relazione e la co-regolazione della funzionalità genica.
- Per valutare l'associazione, nonché il valore predittivo tra i biomarcatori analizzati e la progressione tumorale (Progressione Si vs Progressione No), verrà adoperato un



modello di regressione logistica, la cui stima di rischio verrà espressa come Odds Ratio (OR), ed eventuali covariate verranno aggiunte per aggiustare i modelli.

- Per tutte le analisi verrà valutato un intervallo di confidenza al 95% e per testare l'ipotesi nulla, si prediligerà l'analisi a due code con un livello di errore a 0,05.
- Le analisi verranno effettuate con il Software STATA 17.0 (StataCorp. 2021. Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCorp LLC.) e il software RStudio ("Prairie Trillium" Release).

## RISULTATI ATTESI

Il presente progetto si propone di individuare biomarcatori molecolari in grado di differenziare le neoplasie intraepiteliali mucinose dagli adenocarcinomi duttali pancreatici.

Lo studio in vitro con colture di organoidi derivate da pancreas, ci fornirà un valido modello per la messa a punto di studi futuri per la valutazione di inibitori ad azione farmacologica. Mediante la scrupolosa raccolta di dati potremmo migliorare i processi di selezione e monitoraggio dei pazienti.

Studi traslazionali futuri potranno portare all'individuazione di potenziali nuove terapie che abbiano come target le proteine da noi identificate come biomarcatori.

## INNOVAZIONI

Il presente studio rappresenta una innovazione per l'Istituto, in quanto getta le basi per studi futuri, nell'ottica di una medicina sempre più personalizzata.

Inoltre, lo studio si propone di coordinare diverse unità operative all'interno dell'Istituto, al fine di creare collaborazioni costruttive tra i diversi ricercatori, che contribuiranno con impegno e responsabilità alla buona riuscita del progetto.

L'identificazione di biomarcatori potrà portare, in futuro, alla messa a punto di nuove strategie terapeutiche aventi come target le molecole da noi selezionate.

Le nuove terapie potranno, poi, essere testate in modelli preclinici di adenocarcinoma duttale pancreatico, grazie anche alla messa a punto del modello sperimentale in vitro di organoidi da neoplasia del pancreas.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan;72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020204. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001 May;25(5):579-86. doi: 10.1097/00000478-200105000-00003. PMID: 11342768.
2. Taherian M, Wang H, Wang H. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Molecular Pathology and Predictive Biomarkers. *Cells.* 2022 Sep 29;11(19):3068. doi: 10.3390/cells11193068. PMID: 36231030; PMCID: PMC9563270.
3. Muraki T, Jang KT, Reid MD, Pehlivanoglu B, Memis B, Basturk O, Mittal P, Kooby D, Maithel SK, Sarmiento JM, Christians K, Tsai S, Evans D, Adsay V. Pancreatic ductal adenocarcinomas associated with intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) versus pseudo-IPMNs: relative frequency, clinicopathologic characteristics and differential diagnosis. *Mod Pathol.* 2022 Jan;35(1):96-105. doi: 10.1038/s41379-021-00902-x. Epub 2021 Sep 13. PMID: 34518632.
4. Adsay V, Mino-Kenudson M, Furukawa T, Basturk O, Zamboni G, Marchegiani G, Bassi C, Salvia R, Malleo G, Paiella S, Wolfgang CL, Matthaei H, Offerhaus GJ, Adham M, Bruno MJ, Reid MD, Krasinskas A, Klöppel G, Ohike N, Tajiri T, Jang KT, Roa JC, Allen P, Fernández-del Castillo C, Jang JY, Klimstra DS, Hruban RH; Members of Verona Consensus Meeting, 2013. Pathologic Evaluation and Reporting of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Other Tumoral Intraepithelial Neoplasms of Pancreatobiliary Tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting. *Ann Surg.* 2016 Jan;263(1):162-77. doi: 10.1097/SLA.0000000000001173. PMID: 25775066; PMCID: PMC4568174.
5. Marsoner K, Haybaeck J, Csengeri D, Waha JE, Schagerl J, Langeder R, Mischinger HJ, Kornprat P. Pancreatic resection for intraductal papillary mucinous neoplasm- a thirteen-year single center experience. *BMC Cancer.* 2016 Nov 4;16(1):844. doi: 10.1186/s12885-016-2887-8. PMID: 27809876; PMCID: PMC5096332.
6. Zhang L, Zhang ZY, Ni JM, Li B, Chen FM, Jiang CJ, Hu CH. Prediction of Vascular Invasion Using a 3-Point Scale Computed Tomography Grading System in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Correlation With Surgery. *J Comput Assist Tomogr.* 2017 May/Jun;41(3):394-400. doi: 10.1097/RCT.0000000000000530. PMID: 27798447.



7. de Jong K, Nio CY, Hermans JJ, Dijkgraaf MG, Gouma DJ, van Eijck CH, van Heel E, Klass G, Fockens P, Bruno MJ. High prevalence of pancreatic cysts detected by screening magnetic resonance imaging examinations. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Sep;8(9):806-11. doi: 10.1016/j.cgh.2010.05.017. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20621679.
8. Fritz S, Klauss M, Bergmann F, Hackert T, Hartwig W, Strobel O, Bundy BD, Büchler MW, Werner J. Small (Sendai negative) branch-duct IPMNs: not harmless. *Ann Surg*. 2012 Aug;256(2):313-20. doi: 10.1097/SLA.0b013e31825d355f. PMID: 22791105.
9. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Klöppel G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 14;20(38):13833-41. doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13833. PMID: 25320520; PMCID: PMC4194566.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32. doi: 10.1056/NEJM198809013190901. PMID: 2841597.
11. Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM. Precancerous lesions of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Apr;27(2):299-322. doi: 10.1016/j.bpg.2013.04.001. PMID: 23809247.
12. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):730-733.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.042. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22226782; PMCID: PMC3321090.
13. Molin MD, Matthaei H, Wu J, Blackford A, Debeljak M, Rezaee N, Wolfgang CL, Butturini G, Salvia R, Bassi C, Goggins MG, Kinzler KW, Vogelstein B, Eshleman JR, Hruban RH, Maitra A. Clinicopathological correlates of activating GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Ann Surg Oncol*. 2013 Nov;20(12):3802-8. doi: 10.1245/s10434-013-3096-1. Epub 2013 Jul 12. PMID: 23846778; PMCID: PMC3842009.
14. Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, Mazur PK, Da Silva-Buttkus P, Bartsch DK, Langer P, Chiblak S, Dürr A, Höfler H, Klöppel G, Müller-Decker K, Brielmeier M, Esposito I. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a

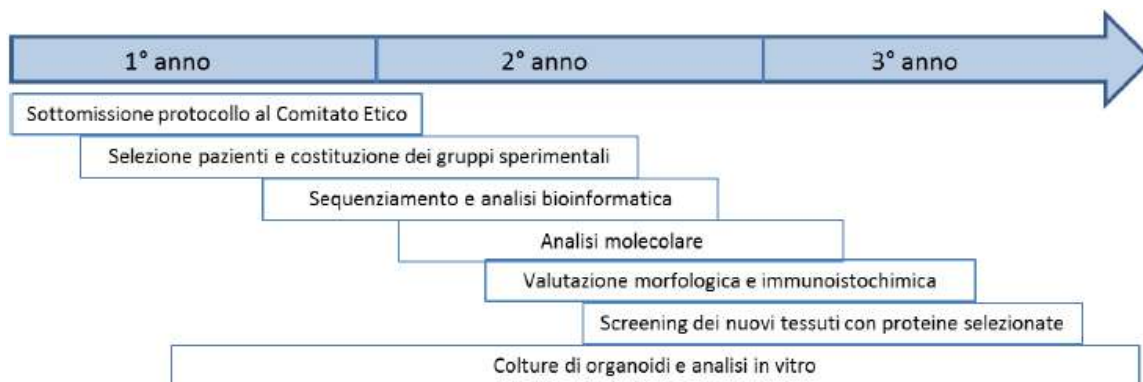


comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol.* 2012 Apr;226(5):723-34. doi: 10.1002/path.3017. Epub 2012 Jan 17. PMID: 21984419.

15. Nejati R, Goldstein JB, Halperin DM, Wang H, Hejazi N, Rashid A, Katz MH, Lee JE, Fleming JB, Rodriguez-Canales J, Blando J, Wistuba II, Maitra A, Wolff RA, Varadhachary GR, Wang H. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Pancreas.* 2017 Oct;46(9):1180-1187. doi: 10.1097/MPA.0000000000000914. PMID: 28902789; PMCID: PMC5790553.

16. Meckler KA, Brentnall TA, Haggitt RC, Crispin D, Byrd DR, Kimmey MB, Bronner MP. Familial fibrocystic pancreatic atrophy with endocrine cell hyperplasia and pancreatic carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001 Aug;25(8):1047-53. doi: 10.1097/00000478-200108000-00009. PMID: 11474289.

## TIMELINE





## TITOLO DEL PROGETTO

### **LA CLAUDINA 18.2: POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO PER ZOLBETUXIMAB NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO DUTTALE**

**Ricercatori responsabili:** Anna Maria Valentini

**Settore di ricerca:** Anatomia Patologica

**Parole chiave del progetto:** Claudina, adenocarcinoma pancreatico duttale, Zolbetuximab

## INTRODUZIONE

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

La Claudina 18.2 (CLDN18.2) è una proteina transmembrana, presente a livello delle giunzioni serrate, la cui funzione è mantenere la polarità cellulare e l'adesione intercellulare. Nelle cellule epiteliali normali, essa è principalmente presente nella frazione apicale delle giunzioni serrate. L'espressione di CLDN18.2 diminuisce generalmente durante la carcinogenesi, tuttavia, la sua overespressione è stata osservata in diversi tipi di cancro e studiata come uno strumento diagnostico e bersaglio terapeutico.

Zolbetuximab è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi in maniera altamente selettiva alla CLDN18.2. Lo studio clinico di fase II (FAST: NCT01630083) ha rivelato che Zolbetuximab combinato con la chemioterapia di prima linea ha migliorato significativamente la sopravvivenza globale, la sopravvivenza libera da progressione e



il tasso di risposta obiettiva con pochi eventi avversi di alto grado nei pazienti con tumori gastrici e tumori della giunzione gastroesofagea che mostravano overespressione di CLDN18.2. Pochi dati sono disponibili sulla espressione di CLDN18.2 nel PDAC, pertanto questo studio è stato progettato allo scopo di fornire un contributo allo sviluppo di studi clinici sul possibile utilizzo del Zolbetuximab nel PDAC.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo 1

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

### Obiettivo 2

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

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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

I risultati ottenuti saranno sottoposti ad adeguate indagini statistiche

## RISULTATI ATTESI

Correlazione della overespressione della Claudina 18.2 con fattori di peggiore prognosi

## BIBLIOGRAFIA

1. Wang Xi, et al World J Gastronterol Oncol 2022, 14: 1252-1264
2. Yu S et al. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2021, 1875: 188461



3. Sahin U et al. Ann Oncol 2021, 32: 609-619. Woll S et al. Int J Cancer 2014, 134: 731-739
4. Tureci O et al. Oncoimmunology 2019, 8: e1523096
5. Sahin U et al. Clin Cancer Res 2008, 14: 7624-7634.

**TIMELINE**

PRIMO ANNO												
Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Taglio sezioni paraffinate	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Colorazione immunoistochimica	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Valutazione preparati	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█

SECONDO ANNO												
Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reclutamento pazienti	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Taglio sezioni paraffinate	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Colorazione immunoistochimica	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Valutazione preparati	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█

TERZO ANNO												
Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Correlazioni anatomo-cliniche	█	█	█	█	█	█	█					
Elaborazione dati	█	█	█	█	█	█	█					
Analisi statistica	█	█	█	█	█	█	█					





## LINEA DI RICERCA 2

### PATOLOGIE FUNZIONALI, INFIAMMATORIE E DEGENERATIVE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

**Responsabile Scientifico:** Gianluigi Giannelli

#### Descrizione

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

#### Obiettivi

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



## TITOLO DEL PROGETTO

**STUDIO PILOTA PER LA VALUTAZIONE DEI CORRELATI DI IMAGING EPATICO CON SCANSIONE IN RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (RMN) E DEI BIOMARCATORI SIERICI DI MAFLD IN PAZIENTI CON SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO (PCOS).**

**Ricercatori responsabili:** Vincenza Di Stasi

**Settore di ricerca:** Endocrinologia

**Parole chiave del progetto:** PCOS, MAFLD, Sindrome metabolica

## INTRODUZIONE

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è la più comune endocrinopatia nelle donne in età riproduttiva [Legro et al., 2013]. La diagnosi è di esclusione: è necessario infatti valutare a priori, ed escludere, l'eventuale presenza di tireopatie, iperprolattinemia ed iperplasia surrenalica congenita non classica. In donne con amenorrea vanno escluse inoltre gravidanza, amenorrea ipotalamica, insufficienza ovarica primitiva, tumori secernenti androgeni, sindrome/morbo di Cushing e acromegalia. Secondo i Criteri di Rotterdam, per la diagnosi sono necessari almeno due dei seguenti elementi: - Iperandrogenismo (clinico e/o biochimico), - Disfunzione ovulatoria, - Aspetto policistico delle ovaie (almeno un ovaio con 12 follicoli con diametro compreso tra 2-9 mm o un volume ovarico >10 ml, in assenza di un follicolo dominante di > 10mm), con varie combinazioni e quattro possibili fenotipi finali. Questi fenotipi sono:

- fenotipo A (paziente con iperandrogenismo, anovulazione cronica e policistosi ovarica);
- fenotipo B (iperandrogenismo e anovulazione cronica);
- fenotipo C (iperandrogenismo e policistosi ovarica);
- fenotipo D (anovulazione cronica e policistosi ovarica) [Belenkaia et al., 2019].



Le classificazioni del National Institute of Health e della Androgen Excess and PCOS Society (AEPCOS SOCIETY ), invece, considerano indispensabile la presenza di iperandrogenismo (clinico, biochimico o entrambi) per la diagnosi. In merito alla definizione di morfologia ecografica ovarica (PCOM, PolyCystic Ovarian Morphology), l'uso di apparecchi ecografici più avanzati, mantenendo i succitati criteri di Rotterdam, ha portato a una sovrastima delle diagnosi anche in pazienti sane [Christ et al., 2017]. Questo ha fatto sì che nel 2014 l'AEPCOS society ha rianalizzato questi criteri e stilato delle nuove raccomandazioni al riguardo [Dewailly et al., 2014]. Secondo questi nuovi criteri la diagnosi ecografica di PCOM è possibile: - in presenza di un numero  $\geq 25$  follicoli se utilizzato un ecografo di nuova generazione (con sonde con frequenza  $\geq 8\text{MHz}$ ) – in caso di sonde con frequenza più bassa può essere utilizzato il volume ovarico  $\geq 10\text{ ml}$ ). In ambito di ricerca viene raccomandato l'utilizzo del primo criterio, mentre il secondo può essere utile per la pratica clinica quotidiana [Deiwally et al., 2014].

La PCOS non rappresenta però solo una patologia della sfera dell'endocrinologia ginecologica e, in quanto tale, rappresenta anche un fattore di rischio e una conseguenza di alterazioni metaboliche.

A tal proposito, studi recenti hanno chiaramente dimostrato che l'insulino-resistenza (IR) può essere considerata una parte integrante della sindrome, coinvolgendo il 65-80% delle pazienti (precisamente il 75% di quelle normopeso e il 95% di quelle sovrappeso) [Dahan et al., 2019]. Sulla base dell'associazione con l'IR è opportuno quindi considerare la PCOS non solo come una problematica di fertilità o di natura estetica limitatamente alle sue manifestazioni di iperandrogenismo clinico, bensì come una patologia multisistemica. Le linee guida dell'Endocrine Society [Legro et al., 2013] raccomandano infatti di effettuare lo screening dei fattori di rischio cardio-vascolare e metabolici nelle pazienti con PCOS.

Numerosi studi hanno dimostrato come la PCOS sia correlata alle alterazioni dei marcatori classici e non classici di infiammazione e come questi siano strettamente associati all'IR, incrementando ulteriormente il rischio cardiovascolare delle donne affette [Danesh et al., 2004; Escobar-Morreale et al., 2011; Toulis et al., 2009; Gao et al., 2016; Peng et al., 2016; Orio et al., 2005, Yilmaz et al., 2016, Escobar-Morreale et al., 2008]. Recentemente è nato infatti il concetto di "meta-infiammazione" (infiammazione correlata alla sindrome metabolica), caratterizzata da due aspetti specifici: il coinvolgimento multi-organo e il coinvolgimento dell'omeostasi metabolica [Lumeng & Saltiel, 2011]. D'altronde è noto che i tessuti coinvolti nella regolazione del metabolismo ospitano popolazioni residenti di cellule infiammatorie [Lumeng & Saltiel,



2011]. Uno di questi tessuti è il fegato, uno degli organi bersaglio dell'infiammazione. In accordo con questa visione, è opportuno ricordare che nelle pazienti con PCOS è frequente riscontrare la presenza della Steatosi epatica non alcolica (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), al cui instaurarsi concorrono l'IR e l'obesità e che può progredire in Steatoepatite non alcolica (Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH).

Recentemente alcuni autori, anche in virtù di quanto percepito dai pazienti, hanno riconsiderato la correttezza della definizione NAFLD; dopo attenta valutazione dei dati e delle implicazioni cliniche, il termine è stato dunque sostituito con quello di MAFLS, ovvero Malattia Epatica correlata a Sindrome Metabolica (Metabolic-dysfunction Associated Fatty Liver Disease) [Eslam et al., 2020].

A differenza della diagnosi di NAFLD, che consisteva principalmente in una diagnosi di esclusione rispetto ad altre diagnosi di steatosi, la diagnosi di MAFLD si basa su diversi criteri di inclusione che prevedono la presenza di steatosi epatica e 1 tra questi 3 criteri – sovrappeso o obesità; - diabete mellito; - normopeso con evidenza di disregolazione metabolica [Lim et al., 2021].

In letteratura pochi sono ancora gli studi che hanno considerato l'associazione con questa nuova definizione di MASH (tanta è invece la letteratura disponibile sulla correlazione tra NAFLD e PCOS) [Li et al., 2022; Pal et al., 2022; de Zegher et al., 2021]. L'insulino-resistenza resta comunque un punto cardine di queste due condizioni e senza dubbio le pazienti con PCOS sono ad aumentato rischio di sviluppare MAFLD.

In conclusione, si può quindi sostenere che la correlazione tra PCOS e sindrome metabolica, infiammazione e MASH sia direttamente correlata al rischio cardiovascolare di queste pazienti.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

**Obiettivo specifico 1:** Valutazione dell'imaging epatico in RMN e dei parametri biochimici di MAFLD in pazienti afferenti presso gli ambulatori per PCOS vs donne senza PCOS matchate per fascia di BMI.

**Obiettivo specifico 2:** Valutazione dell'imaging epatico in RMN e dei parametri biochimici di MAFLD in pazienti affette da diversi fenotipi di PCOS vs donne senza PCOS matchate per fascia di BMI.



## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Le variabili verranno espresse in maniera lineare (parametri emodinamici e biochimici), dicotomica o su una scala Likert (a seconda del questionario/intervista). I dati saranno espressi come media  $\pm$  deviazione standard quando normalmente distribuiti, come mediana (quartili) per i parametri con distribuzione non normale, e come categorico quando opportuno. Le correlazioni saranno valutate usando Spearman di o il metodo di Pearson ove opportuno. Regressioni multiple lineari o logistiche saranno applicate per l'analisi multivariata, di caso in caso.

## RISULTATI ATTESI

Il presente studio mira a dimostrare che, a pari di indice di massa corporea, le pazienti affette da PCOS, abbiano dei peggiori marcatori strumentali e biochimici di MAFLD rispetto a donne non affette da PCOS.

## INNOVAZIONI

Gli studi presenti in letteratura non hanno eseguito gli stessi studi di imaging in RMN per definire il contenuto di grasso nel fegato delle pazienti PCOS dunque questo studio può porre le basi per successivi studi al riguardo.

## BIBLIOGRAFIA

Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Dec;98(12):4565-92.

Belenkaia LV, Lazareva LM, Walker W, Lizneva DV, Suturina LV. Criteria, phenotypes and prevalence of polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.* 2019 Jun;71(3):211-223. doi: 10.23736/S0026-4784.19.04404-6.

Christ JP, Gunning MN, Fauser BCJM. Implications of the 2014 Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society guidelines on polycystic ovarian morphology for



polycystic ovary syndrome diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 2017 Oct;35(4):480-483. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.06.020.

Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014 May-Jun;20(3):334-52. doi: 10.1093/humupd/dmt061.

Dahan MH, Reaven G. Relationship among obesity, insulin resistance, and hyperinsulinemia in the polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. 2019 Jun;64(3):685-689. doi: 10.1007/s12020-019-01899-9.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004 Apr 1;350(14):1387-97.

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):1048-58.

Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, Papadimas I, Panidis D. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009 May-Jun;15(3):297-307.

Gao L, Gu Y, Yin X. High Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Oct 20;11(10):e0164021.

Peng Z, Sun Y, Lv X, Zhang H, Liu C, Dai S. Interleukin-6 Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Feb 5;11(2):e0148531.

Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Manguso F, Tauchmanová L, Nardo LG, Labella D, Savastano S, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi G. The increase of leukocytes as a new putative marker of low-grade chronic inflammation and early cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):2-5.





Yilmaz MA, Duran C, Basaran M. The mean platelet volume and neutrophil to lymphocyte ratio in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2016 Jan;39(1):45-53.

Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JI, Martínez-García MA, Luque-Ramírez M, Alvarez-Blasco F, San Millán JL. Serum osteoprotegerin concentrations are decreased in women with the polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2008 Sep;159(3):225-32.

Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6):2111-7.

Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020 May;158(7):1999-2014.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312.

Lim GEH, Tang A, Ng CH, Chin YH, Lim WH, Tan DJH, Yong JN, Xiao J, Lee CW, Chan M, Chew NW, Xuan Tan EX, Siddiqui MS, Huang D, Nouredin M, Sanyal AJ, Muthiah MD. An Observational Data Meta-analysis on the Differences in Prevalence and Risk Factors Between MAFLD vs NAFLD. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021 Dec 4:S1542-3565(21)01276-3. doi: 10.1016/j.cgh.2021.11.038.

Li M, Chi X, Wang Y, Setrerrahmane S, Xie W, Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jul 6;7(1):216. doi: 10.1038/s41392-022-01073-0.

de Zegher F, Diaz M, Ibañez L. From adolescent PCOS to adult MAFLD: opposing effects of randomised interventions. *BMJ Open Gastroenterol.* 2021 May;8(1):e000574. doi: 10.1136/bmjgast-2020-000574. Erratum in: *BMJ Open Gastroenterol.* 2021 Oct;8(1):



## TITOLO DEL PROGETTO

### **SVILUPPO DI STRATEGIE TERAPEUTICHE BASATE SUI MIRNAS IN MODELLI PRECLINICI DI MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

**Ricercatori responsabili:** Grazia Serino

**Settore di ricerca:** Immunologia Sperimentale

**Parole chiave del progetto:** CmiRNA, IBD, cellule epiteliali intestinali

## **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).

Inflammatione 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 $\alpha$ ) 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.

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

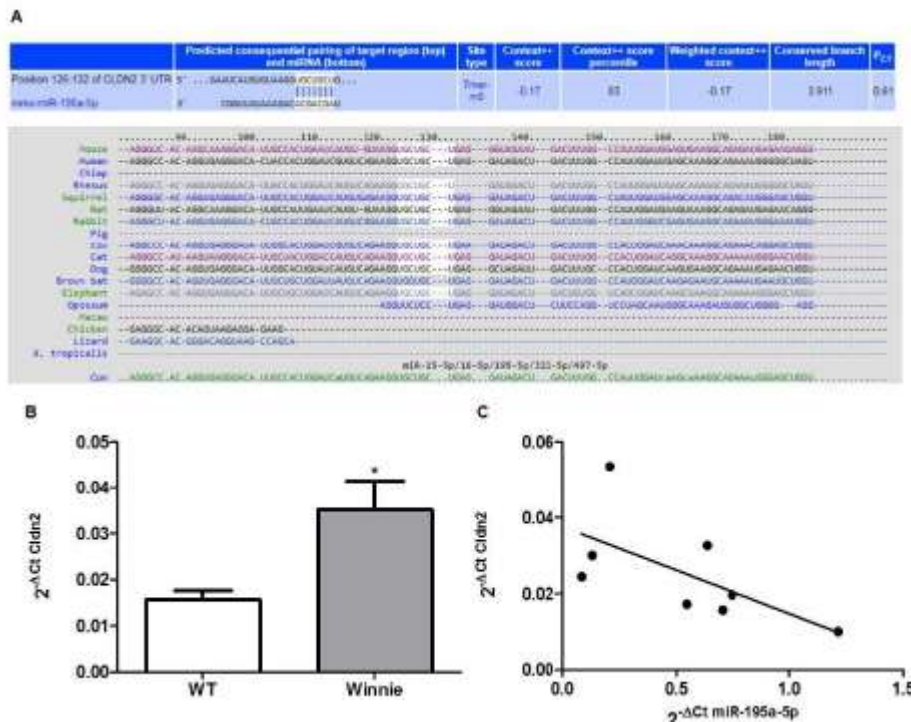
In questo primo anno, partendo dai dati di espressione dal profilo di espressione dei miRNAs ottenuto nelle cellule epiteliali isolate da colon di topi Winnie e topi wild-type, abbiamo studiato i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i 18 miRNAs identificati. A questo proposito, è stata eseguito uno studio bioinformatico per analizzare i loro possibili geni regolati dai miRNAs individuati. Sulla base dei risultati dell'analisi bioinformatica, abbiamo scoperto che uno dei bersagli putativi del miR-195a-5p era CLDN2, un gene che codifica per una proteina espressa nell'epitelio del colon a livello delle tight junctions (TJ).

L'analisi delle pathway regolate dai miRNAs ha rivelato che le pathways principali in cui i miRNAs erano coinvolti riguardavano l'adesione focale, la cascata MAPK, Wnt pathway, Adherens junctions, Gap junctions e Tight junctions. Da notare che all'interno di queste pathway, più miRNAs regolavano presumibilmente gli stessi geni bersaglio e un singolo miRNA modulava simultaneamente diversi geni.

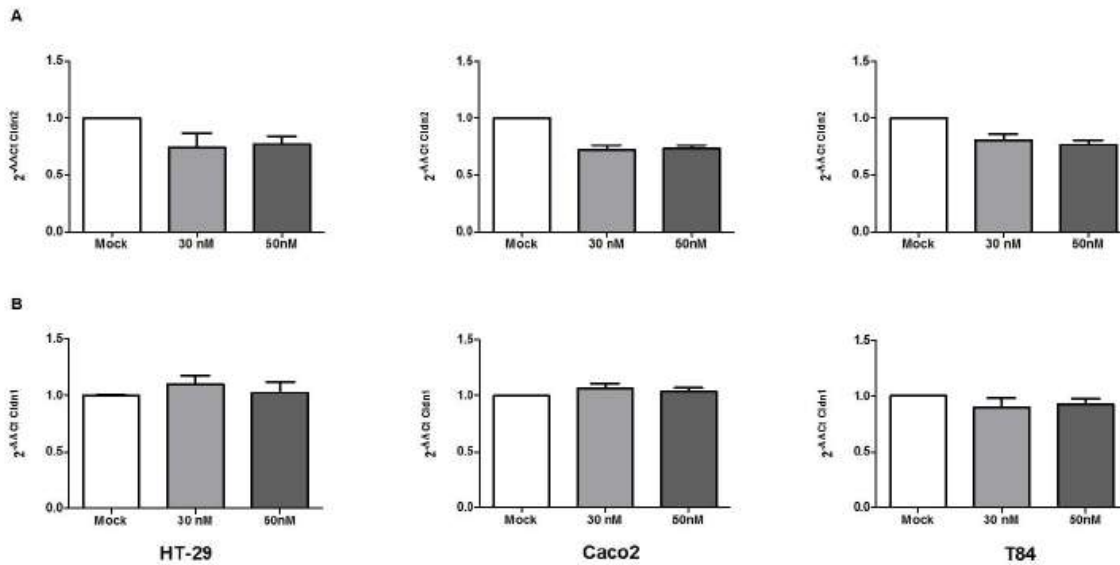
Per validare i risultati del microarray, abbiamo effettuato una Real-Time PCR su RNA estratto da cellule epiteliali intestinali di un gruppo indipendente di 4 topi Winnie e 4 topi wild-type. Tutti i miRNAs analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo nell'espressione nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto a quelle isolate da topi wild-type, confermando i risultati del microarray (\* $p < 0.01$ ). L'aumento di espressione della CLDN2 nelle IBD è ampiamente riconosciuto, ma il fenomeno alla base della sua sovraespressione è ancora sconosciuto. L'analisi in-silico ha messo in evidenza che il miR-195a-5p potrebbe regolare l'espressione della Cldn2; infatti, l'allineamento della sequenza di miR-195a-5p murino con la regione 3'UTR della Cldn2 ha identificato un sito di legame che è ben conservato tra diverse specie. Lo stesso sito di legame a livello della regione 3'UTR è stato osservato nel corrispondente gene umano CLDN2 (Figura A).



Quindi, abbiamo valutato i livelli di espressione dell'mRNA della Cldn2 nello stesso set di campioni di RNA utilizzati nell'esperimento di validazione del microarray. I livelli di Cldn2 risultavano significativamente più alti nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type ( $p = 0,03$ ; Figura B). Inoltre, per studiare se l'aumento della Cldn2 fosse attribuibile a livelli inferiori di miR-195a-5p, abbiamo testato la correlazione statistica tra il miR-195a-5p e l'mRNA della Cldn2. È stata osservata una correlazione negativa ( $r = -0,64$ ;  $p = 0,04$ ; Figura C).



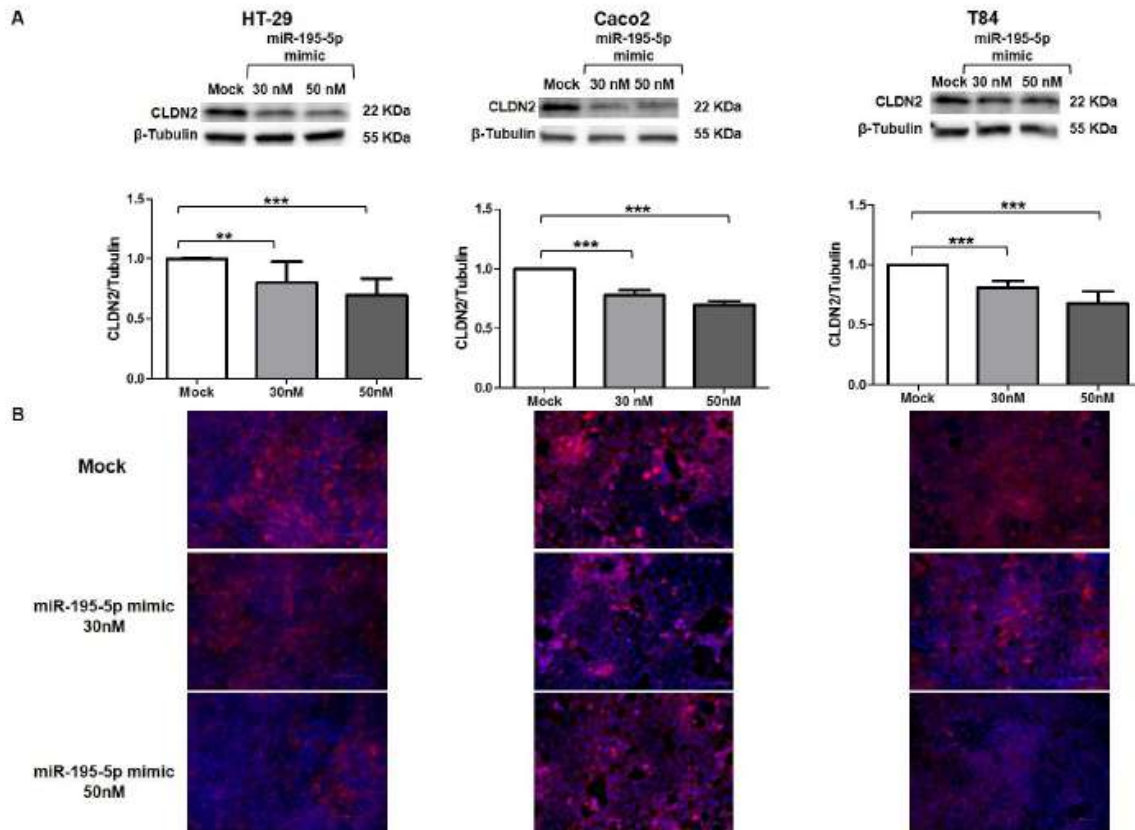
Per validare i risultati dell'analisi bioinformatica, abbiamo studiato l'effetto dell'aumento intracellulare del miR-195-5p sull'espressione del gene target Cldn2. Abbiamo effettuato, in vitro, transfezioni transienti con molecole di miR-195-5p mimic in tre linee cellulari epiteliali del colon umano: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



Abbiamo, quindi, utilizzato la stessa strategia per incrementare la forma matura di miR-195-5p nelle HT-29, Caco2 e T84, con l'obiettivo di verificare se anche l'espressione della proteina CLDN2 fosse controllata dai livelli di miR-195-5p. In accordo con i risultati ottenuti a livello di RNA, le analisi del Western blot hanno mostrato che l'espressione della proteina CLDN2 è diminuita dopo la transfezione con miR-195-5p mimic in tutte le linee cellulari ( $p < 0,05$ ; Figura A).

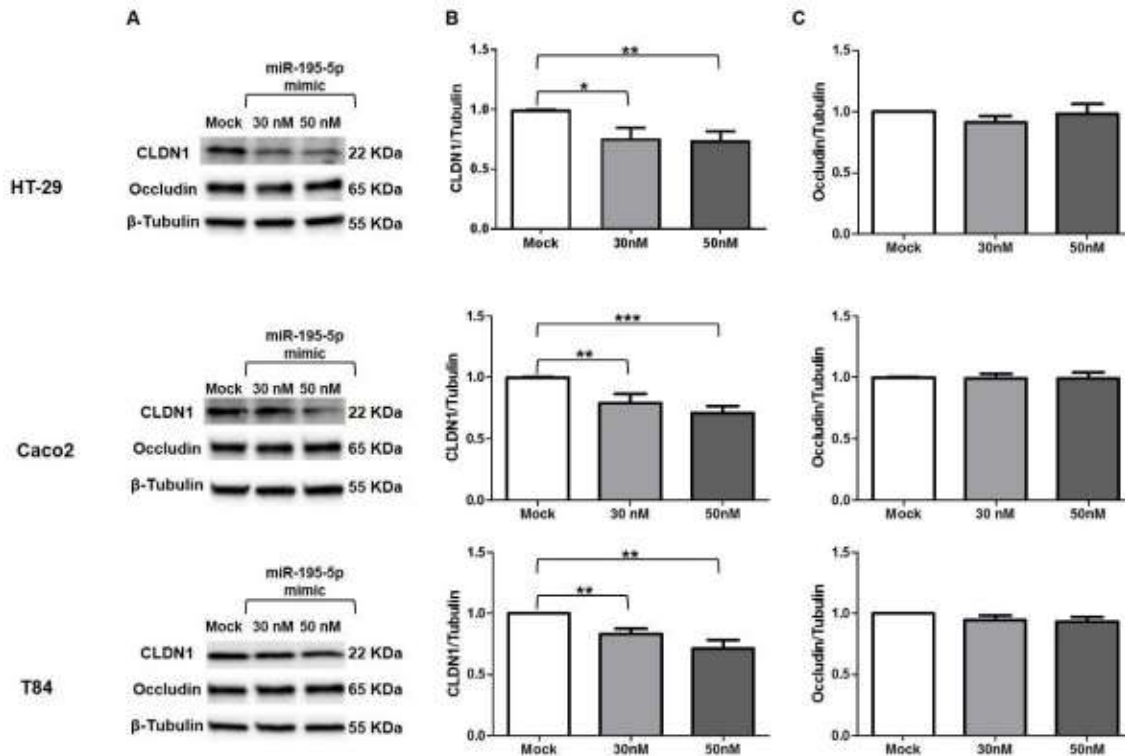
Inoltre, abbiamo studiato la localizzazione della CLDN2 in HT-29, Caco2 e T84 in seguito alla transfezione col miR-195-5p mimic. Come mostrato dai risultati dell'immunofluorescenza, nelle colture monostrato la CLDN2 è localizzata sulla membrana plasmatica in tutte le linee cellulari considerate. In accordo con i risultati del western blot, dopo la transfezione transiente con miR-195-5p mimic, l'espressione della CLDN2 è diminuita rispetto al mock utilizzato come controllo (Figura B).





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

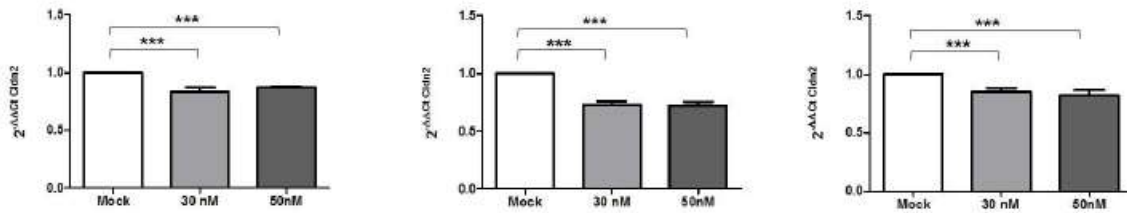
Un'altra proteina che svolge un ruolo cruciale nella struttura della TJ e nella permeabilità dell'epitelio intestinale è l'Occludina. Questa proteina non è coinvolta individualmente nella formazione di TJ, ma il suo reclutamento richiede la co-espressione di claudine come la CLDN1. Per questi motivi,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



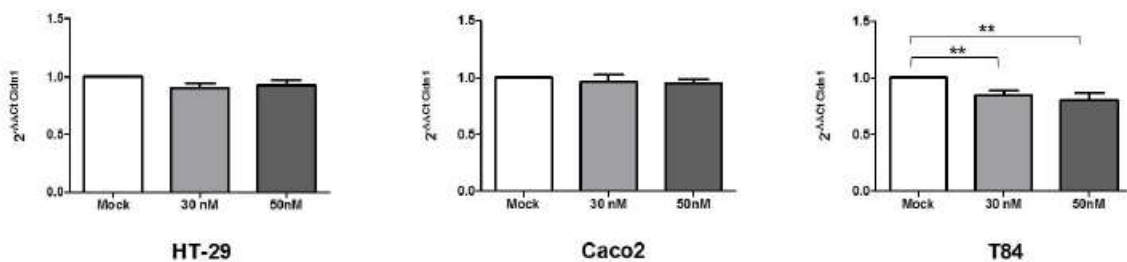
La citochina proinfiammatoria TNF- $\alpha$  ha un ruolo rilevante nella disfunzione della barriera intestinale mediata dalle tight junctions nelle IBD.

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

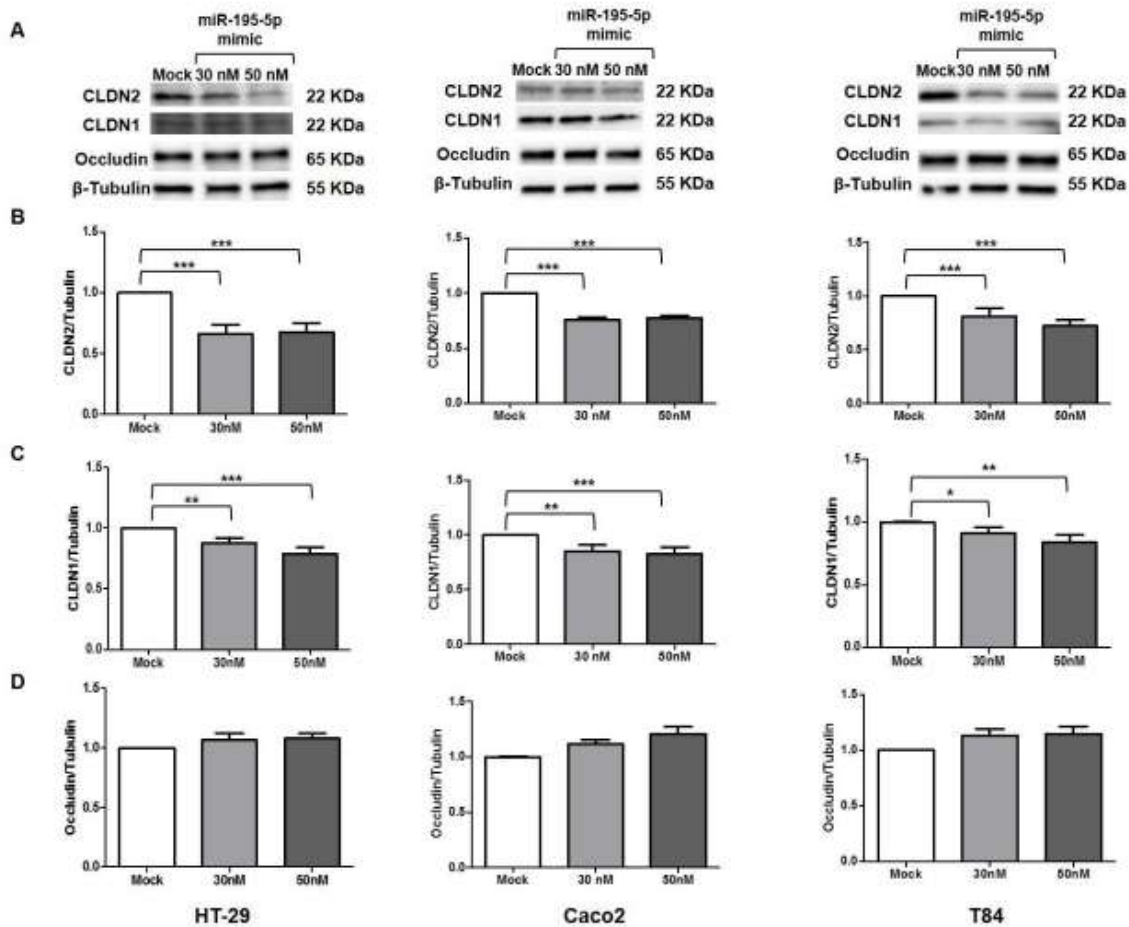
A



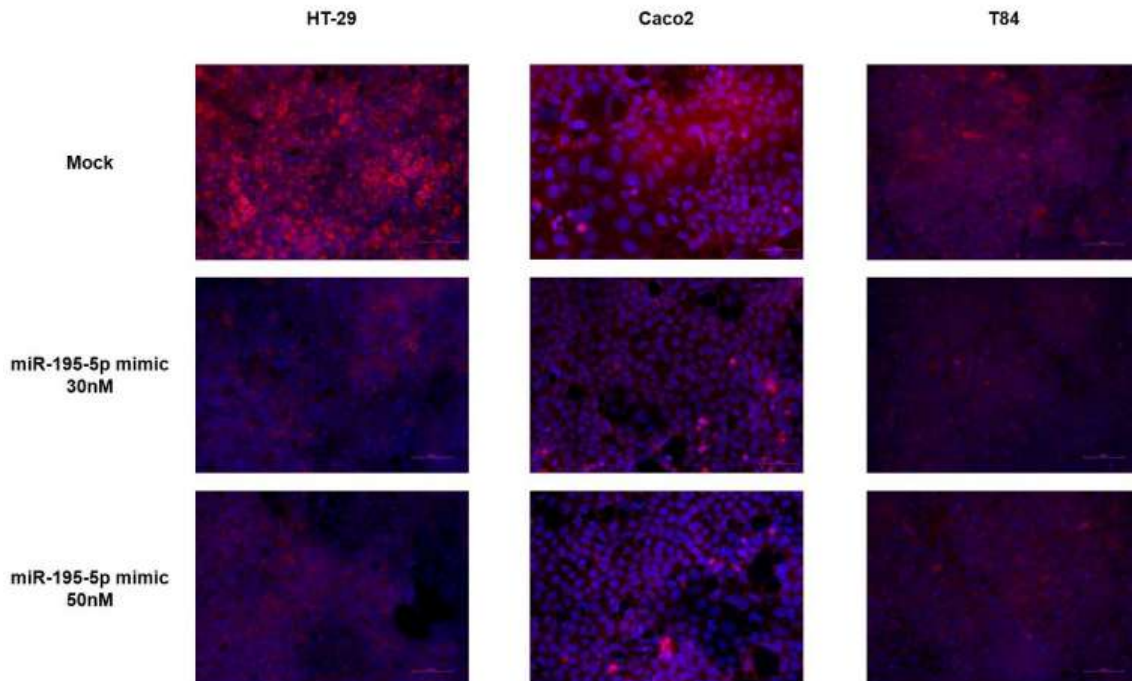
B



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



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



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

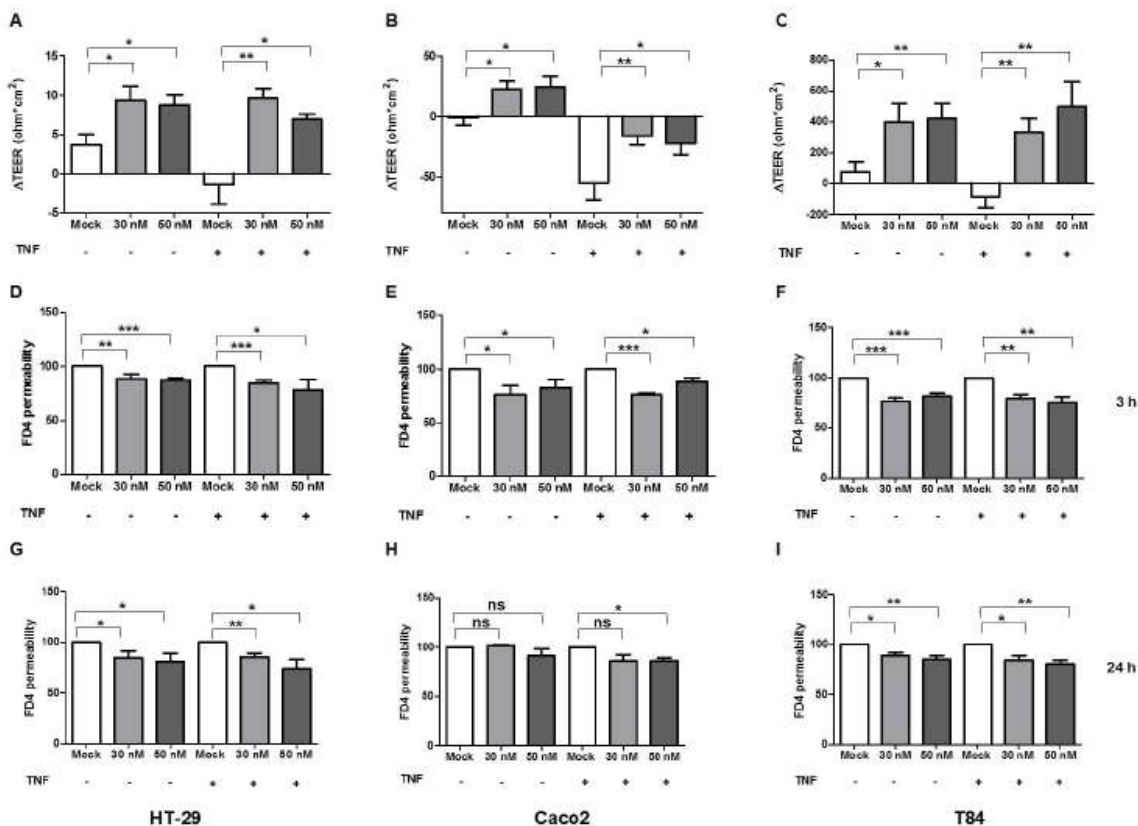
I nostri dati hanno dimostrato che dopo aver aumentato la quantità di miR-195-5p intracellulare, la permeabilità delle cellule epiteliali intestinali, espressa sottoforma di TEER, era significativamente ridotta in tutte le linee cellulari ( $p < 0,05$ ). Inoltre, anche dopo la stimolazione del TNF- $\alpha$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

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



La riduzione è stata osservata anche nelle linee cellulari trattate con TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ , Figura D-I).

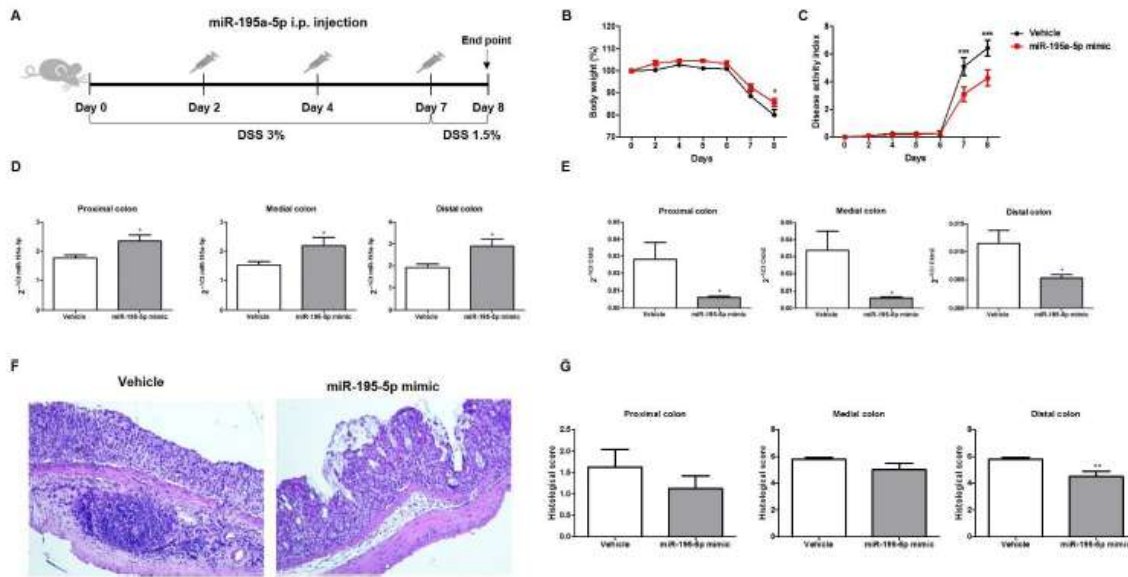
Questi risultati dimostrano che il miR-195-5p potrebbe regolare la funzione della barriera epiteliale intestinale andando ad agire sul gene CLDN2.



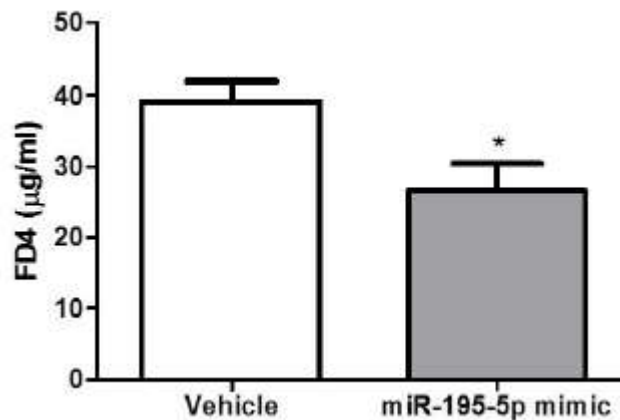
Per valutare l'applicazione terapeutica del miR-195-5p in vivo, abbiamo utilizzato un modello di colite ulcerosa indotto chimicamente con DSS (Figura A). La somministrazione del miR-195-5p mimic nei topi con colite ulcerosa migliorava significativamente la perdita di peso e il Disease Activity Index (DAI) score (Figura B-C). Inoltre, a dimostrazione dell'efficacia del trattamento e in accordo con i nostri dati in vitro, dopo la somministrazione si osservava un aumento di espressione del miR-195-5p e una riduzione dell'espressione della CLDN2 nelle 3 porzioni di colon (prossimale, mediale e distale) (Figura D-E).

Dopo trattamento, è stata anche osservata la struttura del colon mediante ematossilina/eosina. L'analisi istologica ha messo in evidenza che la somministrazione del miR-195-5p mimic migliorava i danni al colon tipici della colite ulcerosa indotta da DSS (Figura F-G).





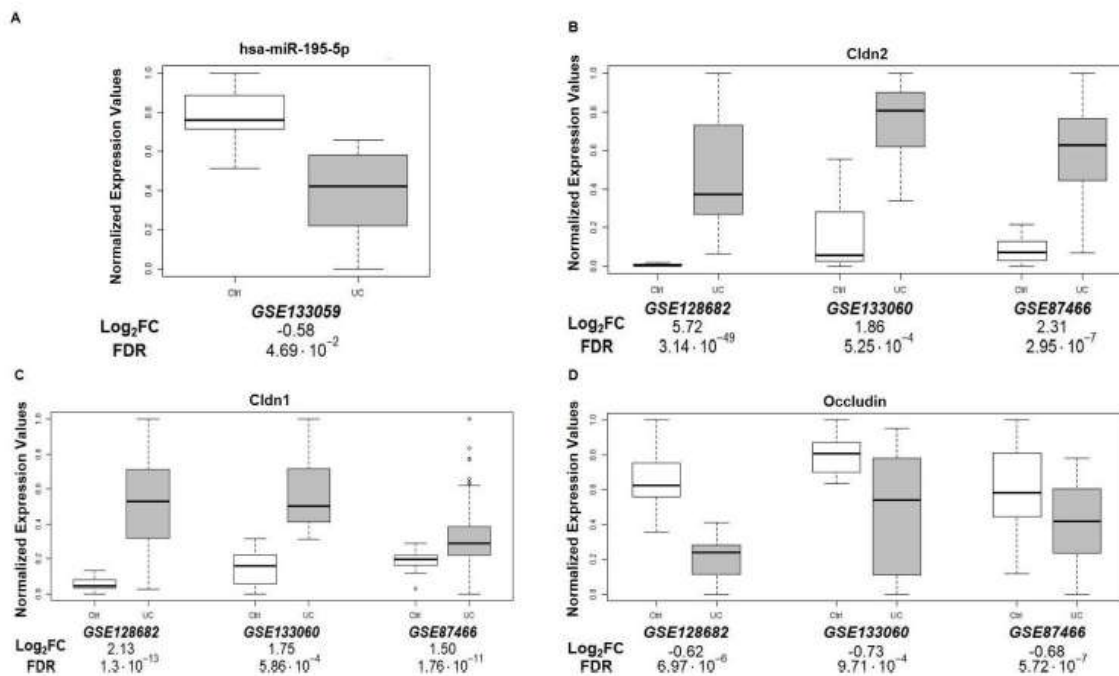
Inoltre, in un altro gruppo indipendente di topi trattati e non con miR-195-5p, abbiamo valutato l'effetto del miRNA sulla permeabilità intestinale in vivo. Dopo trattamento, la permeabilità del FITC-destrano risultava notevolmente ridotta a dimostrazione dell'efficacia del trattamento sulla permeabilità intestinale (Figura).



Per valutare la potenziale rilevanza clinica dei nostri risultati, abbiamo analizzato 4 set di dati di espressione genica pubblicati su database pubblici che includevano profili di espressione di miRNA o mRNA di pazienti con colite ulcerosa.

Per l'analisi dell'espressione genica, abbiamo combinato 3 set di dati GSE133060, GSE128682 e GSE87466; per il profilo di espressione dei miRNAs abbiamo esaminato un dataset GSE133059.

Abbiamo scoperto che miR-195-5p era significativamente ridotto nei pazienti con colite ulcerosa rispetto al gruppo di controllo (Figura A). Inoltre, i livelli di espressione di CLDN1 e CLDN2 erano significativamente più alti nei pazienti con colite ulcerosa rispetto ai controlli (Figura B-C) e i livelli di mRNA di Occludina erano ridotti nei pazienti con colite ulcerosa (Figura D).



## PROSPETTIVE FUTURE

Sono in corso studi funzionali in vivo per dimostrare che il miR-195-5p è responsabile del miglioramento della permeabilità intestinale in modelli murini di colite ulcerosa anche in fase cronica e in modelli di cancro coloretale.

Inoltre, sono in corso studi funzionali in vitro per dimostrare il ruolo del miR-195-5p in modelli cellulari di cancro coloretale e nello specifico il suo ruolo nella regolazione delle proteine dei desmosomi.

Recentemente è stato dimostrato che diverse patologie epatiche quali NASH e altre manifestazioni della sindrome metabolica sono associate a un' aumentata permeabilità intestinale. A questo scopo testeremo l'efficacia della terapia con miR-195-5p anche in modelli murini a cui verrà somministrata una dieta ricca di lipidi (HFD) e DSS che induce oltre alla colite, un'infiammazione a livello epatico.



## PUBBLICAZIONI

I risultati di questa parte del progetto sono oggetto di due pubblicazioni:

- Scalavino V, Piccinno E, Bianco G, Schena N, Armentano R, Giannelli G, Serino G. The Increase of miR-195-5p Reduces Intestinal Permeability in Ulcerative Colitis, Modulating Tight Junctions' Expression. *Int J Mol Sci.* 2022 May 23;23(10):5840. doi: 10.3390/ijms23105840 IF 6.208

- Scalavino V, Piccinno E, Lacalamita A, Tafaro A, Armentano R, Giannelli G, Serino G. miR-195-5p Regulates Tight Junctions Expression via Claudin-2 Downregulation in Ulcerative Colitis. *Biomedicines.* 2022 16;10(4):919. doi: 10.3390/biomedicines10040919. IF 4.757

Inoltre, è stato richiesto il deposito di brevetto italiano di cui abbiamo ottenuto parere dei revisori.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

Caratterizzazione funzionale dei miRNAs individuati in cellule epiteliali intestinali di linea continua.

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

Dopo la transfezione, si valuteranno gli effetti a livello di espressione genica del gene target predetto e i livelli della corrispondente proteina. Inoltre, si andrà anche a valutare



il meccanismo biologico in cui i miRNAs sono coinvolti (es. permeabilità intestinale, proliferazione, apoptosi, ecc.).

## Obiettivo specifico 2

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

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<sup>°</sup> 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 specifico 3

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

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



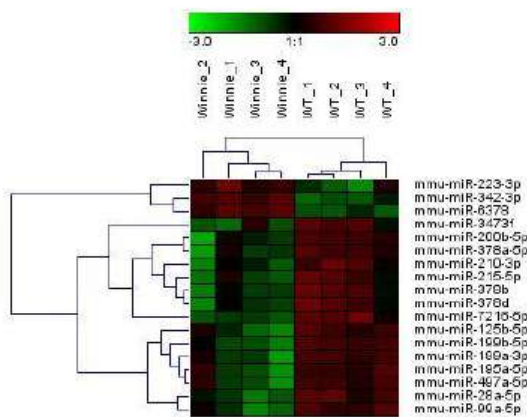
EpCAM-PE (Miltenyi Biotec). Sono stati utilizzati solo campioni con una purezza di cellule EpCAM+ superiore al 90%. Inoltre, visto che il marcatore EpCAM è espresso anche sulla popolazione leucocitaria, abbiamo anche valutato la presenza delle cellule CD45 positive nei nostri campioni mediante anticorpo 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).

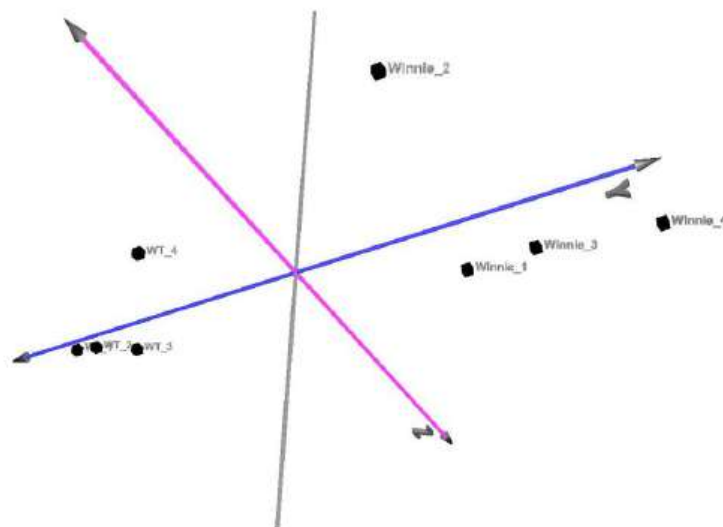
Il profilo di espressione totale dei miRNAs è stato, quindi, effettuato mediante la metodica del microarray su piattaforma Agilent. I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica. A partire dai 1881 miRNA 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.



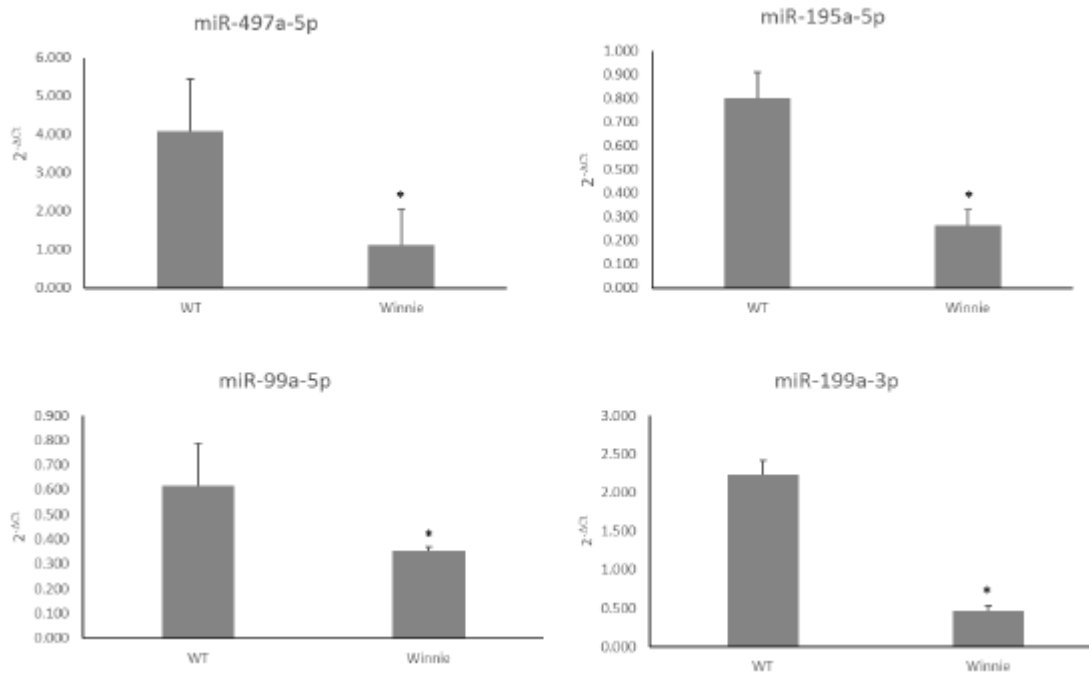


Hierarchical clustering



Principal Component Analysis

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



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



## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

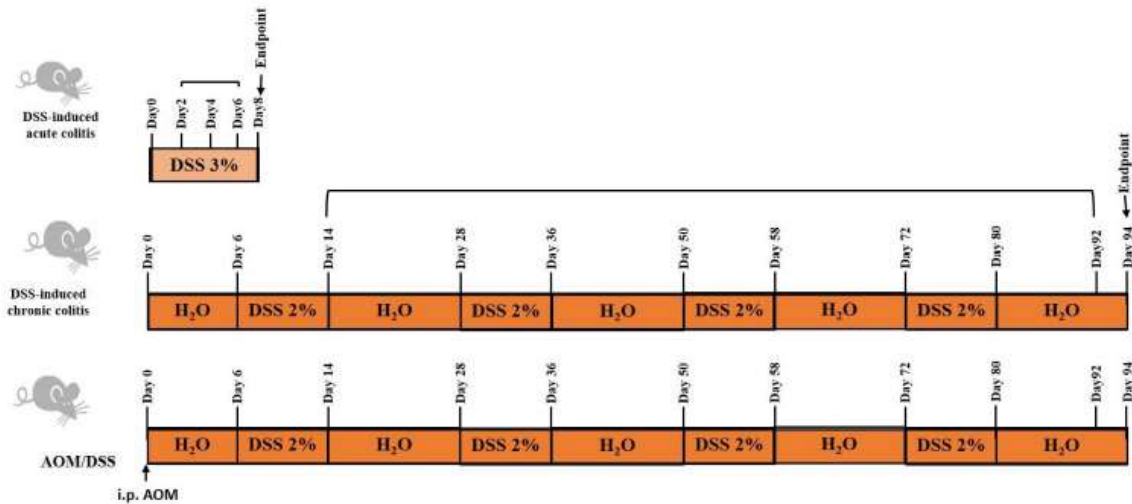
Gli esperimenti di transfezione sulle cellule epiteliali del colon a linea continua quali Caco-2 e HT-29 saranno effettuati utilizzando molecole di miRNA mimic. Queste molecole vanno ad aumentare i livelli del miRNA endogeno. Si utilizzerà un metodo di transfezione transiente a base di liposomi cationici.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

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

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

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

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



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

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

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

## RISULTATI ATTESI

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



## INNOVAZIONI

L'obiettivo di questo progetto è migliorare il trattamento della malattia infiammatoria cronica intestinale.

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

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

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

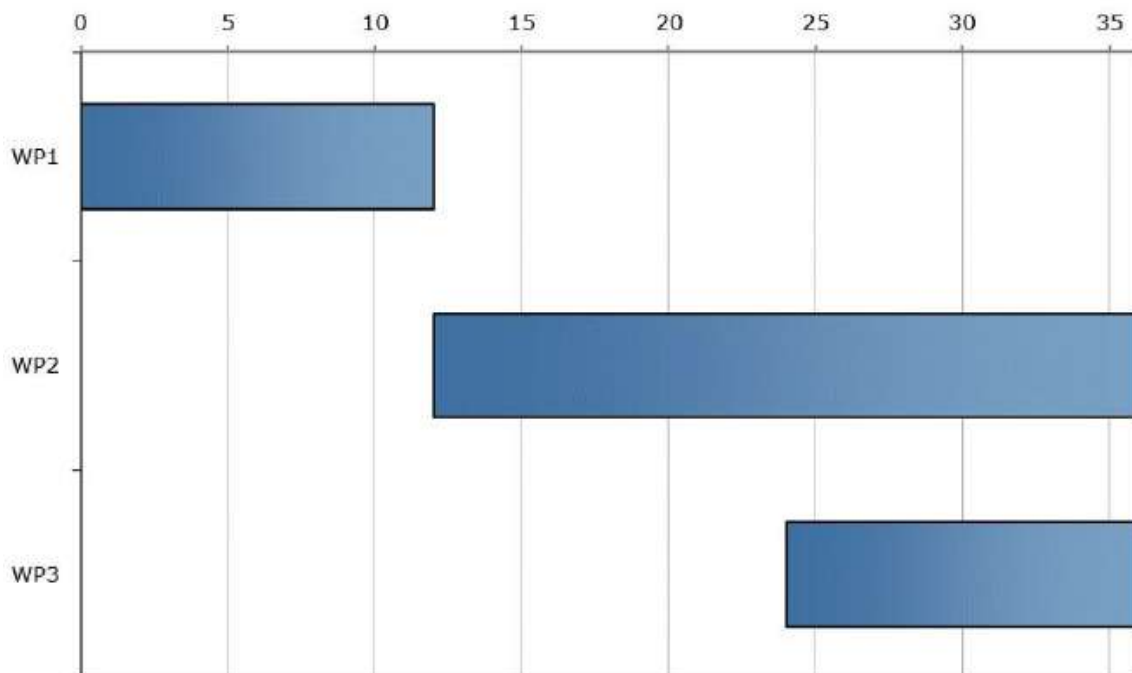
## BIBLIOGRAFIA

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 369(9573):1627-40, 2007.
2. Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 16(34):4264-71, 2010
3. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*. 1(2):123-35, 2009.
4. Ahmad R., Sorrell MF, Batra SK, Dhawan P & Singh AB. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol* 10, 307–317, 2017.
5. Hanahan D, Weinberget 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







## TITOLO DEL PROGETTO

### **HELICOBACTER PYLORI: ASSOCIAZIONE DEL FATTORE DI VIRULENZA CAGA E RESISTENZE ANTIBIOTICHE**

**Ricercatori responsabili:** Antonio Lippolis

**Settore di ricerca:** Patologia Clinica

**Parole chiave del progetto:** Helicobacter pylori, feci, genotipizzazione, resistenza antibiotica

## INTRODUZIONE

Helicobacter pylori (H. pylori) è un batterio gram-negativo che colonizza l'ambiente gastrico in oltre la metà della popolazione mondiale.

La sua prevalenza è influenzata da diversi fattori. È stato dimostrato infatti [1] quanto possa variare la sua distribuzione a seconda dell'età, dell'area geografica, delle condizioni igieniche e dello stato socio-economico [2].

Per quanto concerne il tipo di trasmissione, quella orale-orale sembra essere la principale via coinvolta; ciò spiega la facilità con cui questa infezione spesso si trasmetta tra membri della stessa famiglia [3].

La trasmissione oro-fecale rappresenta un'altra forma di infezione che si verifica tramite ingestione di acqua contaminata principalmente a causa di condizioni igieniche di base insoddisfacenti.

H. pylori si presenta come un bacillo Gram-negativo, non sporigeno, flagellato, della lunghezza di 2.25-5  $\mu\text{m}$  e con un diametro trasverso tra 0.5 e 1.2  $\mu\text{m}$ . Morfologicamente, il batterio si presenta ricurvo con conformazione elicoidale (da cui il nome), ma in culture di lunga data o esposte all'aria il batterio può assumere una forma coccoide, aspetto che si verifica in ambienti di crescita sfavorevoli [4], come può essere il microambiente gastrico che si presenta altamente acido.



I fattori di virulenza dell'*H. pylori* che ne aumentano la patogenicità sono principalmente la citotossina associata all'antigene A (CagA), la citotossina vacuolante (VacA), la proteina infiammatoria esterna (OipA) e la gamma-glutamil transpeptidasi (GGT) [5]. Nello specifico CagA è una proteina che induce modificazioni specifiche nella morfologia delle cellule epiteliali infettate dal batterio, in modo da alterare la polarità cellulare, portando a un fenotipo definito a "colibri" con evidente allungamento delle cellule [6]. Il gene CagA è contenuto in un'isola di patogenicità *cag*, regione che possiede anche una sequenza codificante del sistema di secrezione di tipo IV (T4SS) [5]. All'interno della cellula ospite, CagA subisce la fosforilazione della tirosina nel sito Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), una regione CagA C-terminale variabile che può essere composta da diversi segmenti EPIYA (EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C e EPIYA-D) [7]. I segmenti EPIYA-A e EPIYA-B sono stati ritrovati nella maggior parte dei ceppi di *H. pylori* CagA-positivi. I ceppi di *H. pylori* contenenti i segmenti EPIYA-D o almeno due segmenti EPIYA-C nel gene *cagA* sono associati ad un rischio più elevato di sviluppo di cancro gastrico. [8] Dopo la fosforilazione, CagA attiva SHP-2 (fosfatasi contenente proteintirosina SH2), che promuove i cambiamenti cellulari poc'anzi menzionati [9]. Come conseguenza, gli individui *H. pylori* CagA positivi sono maggiormente a rischio di presentare manifestazioni cliniche più severe [10].

Il decorso dell'infezione è variabile ed è fortemente influenzata dallo stato di salute dell'ospite. Lo sviluppo di una gastrite antro-predominante è associato ad ulcere duodenali, mentre una gastrite corpo-predominante con atrofia multifocale tende a trasformarsi in ulcere gastriche, atrofia gastrica, metaplasia intestinale che può evolvere in carcinoma gastrico [11].

L'aumento della resistenza agli antibiotici di prima linea è una delle principali sfide nell'affrontare le infezioni da *H. pylori* e dal momento che è stata suggerita la presenza di una stretta relazione tra i fattori di virulenza del batterio e la resistenza antimicrobica [12], gli studi di farmaco-resistenza sono importanti per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate e per una medicina di precisione.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

Effettuare la raccolta di tutti i campioni di feci che afferiranno al Laboratorio di Microbiologia dell'IRCCS S. De Bellis per la diagnosi di infezione da *H. pylori* nel



periodo gennaio – maggio. Tutti i campioni fecali H. pylori positivi saranno sottoposti ad analisi di genotipizzazione.

Saranno analizzate le feci dei pazienti afferenti all' U.O.C che afferiranno al Laboratorio di Microbiologia dell'IRCCS S. De Bellis per la diagnosi di infezione da H. pylori nel periodo gennaio – maggio. La ricerca di H. pylori verrà effettuata mediante un immuno-dosaggio a flusso laterale qualitativo per il rilevamento dell'antigene di H. pylori in campioni di feci umane.

### **Obiettivo specifico 2**

Verificare la patogenicità del batterio tramite lo studio dei fattori di virulenza.

Lo studio dei fattori di virulenza verrà effettuato su tutti i campioni fecali risultati positivi al H. pylori. L'estrazione del DNA batterico sarà effettuata con kit dedicato, al quale seguirà l'analisi molecolare per valutare l'eventuale presenza del gene CagA e VacA.

### **Obiettivo specifico 3**

Valutare l'associazione tra antibiotico-resistenza e fattori di virulenza del batterio.

Lo studio delle resistenze antimicrobiche dei campioni H. pylori positivi sarà effettuato mediante

un test genetico-molecolare basato su tecniche di ibridazione in situ. Inoltre, nei casi H. pylori positivi dove sia possibile recuperare il campione biotico prelevato in sede endoscopica, lo studio delle resistenze antibiotiche sarà effettuato anche su batteri vivi cresciuti dopo esame colturale.

## **DATI PRELIMINARI**

Gli antibiotici più comuni nel trattamento dell'H. pylori sono claritromicina, levofloxacina, metronidazolo, amoxicillina, tetraciclina e furazolidone. Tuttavia, a causa dell'aumento del tasso di resistenza agli antibiotici (AMR) per l'H. pylori, l'efficacia della maggior parte di questi antibiotici si è significativamente ridotta, portando ad un calo dei tassi di eradicazione. Uno studio clinico [12] ha riportato che la prevalenza aggregata dei tassi di resistenza per claritromicina, metronidazolo e levofloxacina ha raggiunto il 15% nelle principali regioni dell'OMS, in un periodo di 10 anni.

L'uso continuo degli antibiotici aumenta la pressione selettiva favorendo l'emergere, la moltiplicazione e la diffusione dei ceppi resistenti.



La resistenza antibiotica di ceppi di *H. pylori* è stata associata all'espressione di proteine batteriche con alta attività citotossica, caratteristica peculiare dei ceppi più virulenti.

In media, al mese, afferiscono al nostro Laboratorio circa 35 campioni di feci per la ricerca di *H. pylori* e un 10% di questi risultano positivi al batterio.

Alla luce di queste premesse, l'analisi del genotipo e la valutazione della possibile resistenza antibiotica dell'agente infettante risulta importante per il paziente e per il decorso dell'infezione, da momento che la comparsa di patogeni resistenti riduce ulteriormente la possibilità di un trattamento efficace.

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

### Antigenemia fecale

La ricerca di *H. pylori* sarà effettuata utilizzando il kit *H. pylori* (Beta Diagnostici), un immuno-dosaggio a flusso laterale qualitativo per il rilevamento dell'antigene di *H. pylori* in campioni di feci umane. La membrana è pre-rivestita con anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene di *H. pylori*, posti nella zona del test. Durante l'esecuzione del test, il campione reagisce con anticorpi anti- *H. pylori* pre-adesi alla card. La miscela si sposta lungo la membrana per azione capillare.

### Valutazione della virulenza mediante Real time PCR

Il DNA genomico verrà estratto mediante l'utilizzo di QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen).

Per la ricerca del gene di virulenza *CagA* vengono utilizzati i primers *cagA* F(5'-TCAAGAACCAGTTCATGTC-3') e *cagA* R (5'-TCTCTAGCTTCAGGCGGTAAGC-3) [13].

Le miscele di reazione verranno eseguite in un volume totale di 25 µL contenente 5 µL di DNA, 1 × SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (BioRad), 600 nM di primer Forward e Reverse, 300 nM di sonda.

L'amplificazione e l'analisi saranno eseguiti utilizzando il sistema di rilevamento in tempo reale CFX96 della Bio-Rad. I risultati del valore della soglia del ciclo (Ct) saranno analizzati utilizzando il software Bio-Rad CFX (Manager v3.1). Per ciascun target specifico di *H. pylori*, i carichi di DNA saranno arbitrariamente classificati nei



seguenti gruppi di intensità: alto ( $Ct < 30$ ), moderato ( $30 \leq Ct \leq 35$ ), basso ( $35 < Ct < 50$ ) e negativo ( $\geq 50$  cicli o nessuna amplificazione rilevata).

### Resistenza antimicrobica

Il GenoType HelicoDR si basa sulla tecnologia DNA•STRIP e permette l'identificazione genetica molecolare di *H. pylori* e la sua resistenza a fluorochinoloni (es. ciprofloxacina) e/o claritromicina partendo da campioni colturali o materiale bioptico. L'identificazione della resistenza ai fluorochinoloni viene effettuata tramite la rilevazione delle mutazioni più significative del gene *gyrA* (codoni 87 e 91). Per la rilevazione della resistenza alla claritromicina, viene esaminato il gene 23S rRNA (posizioni 2146 e 2147, numero di accesso GenBank NC\_000915). L'intera procedura è suddivisa in tre fasi successive:

- estrazione del DNA da materiale fecale
- un'amplificazione multiplex mediante primers biotinilati
- ibridazione inversa.

L'ibridazione è divisa nei seguenti passaggi: denaturazione chimica dei prodotti amplificati, ibridazione degli ampliconi biotinilati a singola elica con le sonde specifiche adese ad una membrana, lavaggio stringente, aggiunta di un coniugato streptavidina/fosfatasi alcalina (AP) e infine aggiunta di un substrato enzimatico cromogeno specifico per la AP. Una mascherina permette la facile e rapida interpretazione del pattern di bande ottenute.

### Analisi statistica

I dati saranno presentati come media e SD, salvo diversa indicazione. Le differenze saranno analizzate con metodi parametrici e/o non parametrici, dove applicabile. I valori di  $P < 0.05$  saranno considerati statisticamente significativi. Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software STATA 13.

## RISULTATI ATTESI

- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti genetici che sono alla base della patogenicità del *H. pylori*.
- Individuazione di antimicrobici mirati da utilizzare come terapia per contrastare l'infezione da *H. pylori*.



- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

## INNOVAZIONI

I risultati attesi dallo studio potrebbero essere rilevanti per la Sanità pubblica, portando all'attivazione di sistemi di sorveglianza per contrastare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza. La raccolta dei dati di laboratorio a livello locale, confrontata con quella nazionale, servirebbe a limitare in maniera sensibile il problema dello sviluppo e la diffusione di ceppi di *H. pylori* resistenti alle comuni terapie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 12767-12780
2. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: A systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci* 2014; 59: 1698-1709
3. De Brito, B. B., da Silva, F., Soares, A. S., Pereira, V. A., Santos, M., Sampaio, M. M., Neves, P., & de Melo, F. F. (2019). Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World journal of gastroenterology*, 25(37), 5578–5589.
4. M. La Placa – Principi di microbiologia medica. Società editrice Esculapio. 2005
5. Fischer W. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J* 2011; 278: 1203-1212
6. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA xSHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 2003; 278: 3664-3670
7. Kanada R, Uchida T, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Hijiya N, Matsuura K, Kodama M, Okimoto T, Murakami K, Fujioka T, Yanagisawa S, Moriyama M. Genotyping of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* on immunohistochemistry with East Asian CagA-specific antibody. *Pathol Int* 2008; 58: 218-225





8. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, Atherton JC. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135: 91-99
9. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; 295: 683-686
10. Malfertheiner P, Venerito M, Schulz C. *Helicobacter pylori* Infection: New Facts in Clinical Management. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2018; 16: 605-615
11. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 2014 Apr 10;345(2):196-202.
12. Brennan DE, Dowd C, O'Morain C, McNamara D, Smith SM. Can bacterial virulence factors predict antibiotic resistant *Helicobacter pylori* infection? *World J Gastroenterol.* 2018 Mar 7;24(9):971-981. doi: 10.3748/wjg.v24.i9.971. PMID: 29531461; PMCID: PMC5840472.
13. Leonardi, M., La Marca, G., Pajola, B. et al. Valutazione della PCR in tempo reale per il rilevamento del DNA di *Helicobacter pylori* nelle feci con coinfezione di parassiti intestinali: uno studio comparativo dei metodi di estrazione del DNA. *BMC microbiolo* 20 , 131 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01824-5>

**TIMELINE**

Attività	I anno												II anno												III anno											
Raccolta campioni e diagnosi di H. pylori	[Red blocks]																																			
Genotipizzazione dei campioni H. pylori positivi	[Blue blocks]																																			
Analisi di antibiotico-resistenza	[Yellow blocks]																																			
Analisi dei dati													[Green blocks]																							
Preparazione lavori scientifici													[Purple blocks]																							



## TITOLO DEL PROGETTO

### **EFFETTI DELL'ATTIVITÀ FISICA INDOOR SULL'INTEGRITÀ E FUNZIONE DELLA BARRIERA INTESTINALE DI PAZIENTI CON SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E FIBROMIALGIA**

**Ricercatori responsabili:** Francesco Russo

**Settore di ricerca:** Fisiopatologia della Nutrizione

**Parole chiave del progetto:** Attività indoor, Sindrome Fibromialgica, IBS, Permeabilità Intestinale

## INTRODUZIONE

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

Clinicamente, i sintomi principali della FM sono rappresentati dal dolore muscolo-scheletrico, la stanchezza cronica, oltre al sonno non ristoratore, la rigidità mattutina, nonché la depressione e l'ansia. Inoltre, i pazienti possono soffrire di



sensibilità tattile, e spesso si manifesta una “iperestesia” generalizzata con disturbi sensoriali come, ad esempio, sensibilità alla luce, ai rumori e odori. Può essere riferita una concomitante presenza di cefalea, emicrania, dolore toracico non cardiaco, pirosi gastrica, dismenorrea. Altri sintomi comprendono: parestesie, gambe senza riposo e sensazione di gonfiore dei tessuti [2, 3, 4]. Gli esami ematochimici e strumentali sono solitamente negativi.

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

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

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

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

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

Le multiformi espressioni cliniche della fibromialgia rendono difficile una determinazione dello stato di severità di malattia che sia del tutto oggettiva. Uno dei problemi principali è che la multifattorialità della sindrome richiede necessariamente una valutazione composita, che consideri non solo il sintomo dolore, ma anche altre manifestazioni quali il sonno, la fatica, lo stato globale di salute, l’impatto della malattia nella vita quotidiana. Gli strumenti più utili in questo senso sono la versione modificata



del Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR), il Fibromyalgia Assessment Status modified (FAS mod) e il Polysymptomatic Distress Scale (PDS).

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

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

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

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

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

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

La terapia farmacologica prevede l'impiego di analgesici, miorilassanti e farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) [5]. Le Linee Guida specifiche sul trattamento della FM pubblicate negli ultimi anni sono concordi nel raccomandare la terapia farmacologica nell'ambito di un approccio multidisciplinare, in particolare la terapia farmacologica deve essere riservata alla situazione in cui i segni/sintomi della FM non sono stati migliorati dalle strategie non farmacologiche (ad es., l'approccio comportamentale, dietetico, e motorio). Purtroppo, i farmaci maggiormente utilizzati nel trattamento della FM (i.e. Duloxetina e Pregabalin), non hanno soddisfatto l'EMA nella richiesta di estensione delle indicazioni al trattamento di questa patologia. L'agenzia regolatoria dopo aver valutato le prove di efficacia e sicurezza presentate a



supporto della registrazione, ha deciso di non autorizzare tale estensione, ritenendo le prove presentate non sufficienti a dimostrare una differenza clinicamente rilevante rispetto al placebo in termini di sollievo dal dolore e miglioramento della qualità di vita. Inoltre, il profilo di sicurezza è stato considerato critico, considerati gli eventi avversi osservati e l'uso prolungato nel tempo che l'indicazione implica [6].

Nel presente progetto, l'attenzione è rivolta proprio ai fattori che sottendono la sintomatologia dei pazienti con FM. Oltre la sintomatologia reumatologica, i pazienti fibromialgici spesso lamentano disturbi gastrointestinali (GI), in particolare quelli riconducibili all'IBS sono i più frequentemente riscontrati. Infatti, è noto come pazienti con IBS possano riferire compresenza di FM con una frequenza del 32.5%, e un range compreso tra il 26 e il 65%. [6]. La presenza di FM potrebbe, inoltre, contribuire alla predominanza di pazienti IBS di sesso femminile e le due sindromi condividono numerosi meccanismi fisiopatologici che riguardano la sensibilità al dolore, l'alterata regolazione del sistema nervoso autonomo, l'alterazione dell'asse intestino-cervello, nonché le alterazioni del sistema immunitario, del sistema di neurotrasmettitori, insieme ad alterazioni della permeabilità intestinale e la ricorrenza di disbiosi. Infine, non si deve trascurare il ruolo dei fattori psicosociali che rappresentano dei potenti trigger sia per la FM che per l'IBS [7]. Nella pratica clinica, gli specialisti che gestiscono la FM, specificamente i reumatologi, considerano i sintomi IBS - in particolare il dolore addominale - come uno dei 10 più rilevanti elementi per la diagnosi di FM [8].

Come accennato in precedenza, si può assistere ad una compromissione dell'integrità della parete intestinale. Diversi possono essere i meccanismi che sottendono tale fenomeno, ma sicuramente se ne possono isolare alcuni come l'alterata permeabilità intestinale (PI), l'infiammazione e la disbiosi. Tutti partecipano, in egual misura, al determinismo dell'alterazione di parete, inducendo un circolo vizioso che porta al passaggio di differenti sostanze, quali proteine proinfiammatorie, batteri, frammenti di alimenti non digeriti e altre particelle, nella sottomucosa o addirittura nel torrente ematico, provocando la conseguente attivazione del sistema immunitario e liberazione di neurotrasmettitori che svolgono effetti locali e sistemici. Tali effetti possono dare adito a patologie cardiovascolari, neurodegenerative, diabete, ma anche a patologie infiammatorie quali le artriti croniche. Una condizione di "low grade inflammation", se persiste nel tempo, può quindi portare alla comparsa di dolore e addirittura alla cronicizzazione del sintomo, la cui estensione dipenderà dal grado di diffusione dell'infiammazione [9].

Fortunatamente, a fronte di una parziale efficacia del trattamento farmacologico, vi sono evidenze che l'attività fisica regolare possa comportare un evidente



miglioramento della sintomatologia del paziente con FM. Diversi studi scientifici hanno dimostrato che (re-) introdurre l'attività motoria riduce la quantità e l'entità dei problemi di salute, migliorando la sintomatologia così come la socializzazione e il tono dell'umore [ ]. Dal punto di vista gastroenterico, la mancata attività fisica impedisce una stimolazione adeguata della muscolatura intestinale. La sedentarietà è un fattore determinante che porta, ad esempio, ad un indebolimento e ad una scarsa funzionalità del diaframma e dei muscoli addominali. Questi muscoli, se allenati, contribuiscono a un miglioramento dei valori pressori con miglioramento della defecazione. Fare quotidianamente esercizio fisico, oltre alla prevenzione delle malattie cardiovascolari, può dare grossi benefici all'intestino, contrastando disturbi comuni come il reflusso gastrico e l'IBS. E' stato dimostrato infatti che il movimento favorisce e/o regolarizza la motilità gastro-intestinale (peristalsi) e il transito intestinale [11].

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

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

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

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

**Obiettivo specifico 4:** esaminare gli outcomes dei suddetti approcci attraverso lo studio dei profili psicologici, nutrizionali e metabolici, al fine di comprendere quali alterazioni, deficit, carenze o componenti nutrizionali possono essere associate alla FM e IBS. I risultati dello studio potrebbero essere utili ad approntare strategie di intervento per riequilibrare i cambiamenti metabolici ritrovati.

**Obiettivo specifico 5:** confrontare l'effetto dell'attività indoor in pazienti FM con e senza IBS sui sintomi GI ed extra GI. Come riportato nell'introduzione, esiste, infatti,





un'evidente sovrapposizione fra FM e IBS, sia in termini di sintomatologia GI sia nei riguardi del profilo psicologico.

## DATI PRELIMINARI

Il progetto di ricerca si basa sulle competenze finora acquisite dalle figure professionali dell'istituto, coinvolte in un gruppo di studio multidisciplinare con un notevole know-how nel campo di diagnosi, terapia e conoscenze dei meccanismi fisiopatologici di quei quadri nosologici caratterizzati da alterazioni della funzionalità di barriera intestinale (nello specifico la malattia celiaca e, più in generale, i disturbi glutine-correlati) e nelle patologie funzionali GI, come ad esempio l'IBS. Queste patologie, a vario titolo, sono caratterizzate da modificazioni della PI e possono avvantaggiarsi di un approccio dietetico nonché fisico che rappresentano valide strategie. Tali aspetti sono stati già affrontati in parte in precedenti progetti di ricerca, con diverse pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con I.F. [13, 14].

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

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

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

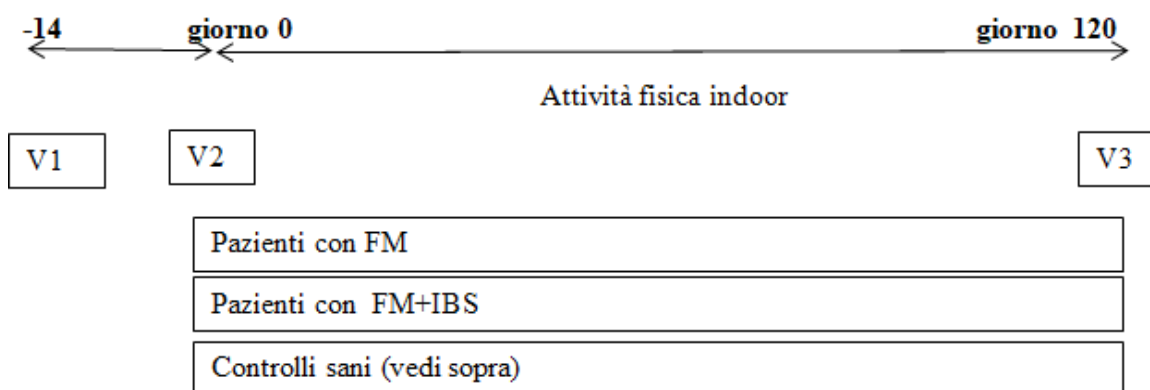
I soggetti sani saranno reclutati tra i partecipanti a concomitanti progetti di ricerca in essere presso il nostro Istituto. Questi ultimi non dovranno avere sintomatologia GI ed extra GI valutabile, nonché non saranno affetti da patologie cardiovascolari,

metaboliche, endocrine, autoimmuni, psicologiche. Inoltre, non dovranno assumere terapie croniche e non avranno eseguito interventi chirurgici maggiori.

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

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

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



V1. (Selezione). Durante la visita, i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte sullo studio e sottoscriveranno il loro consenso informato. I pazienti saranno inoltre informati sull'obiettivo dello studio e sul fatto che sinora nessun specifico trattamento si è dimostrato in grado di curare definitivamente la FM o di controllare completamente tutti i sintomi.

V2. (Verifica). Dopo la visita di screening, i pazienti torneranno per eseguire un prelievo ematico e la raccolta di campioni biologici (urine, feci) necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio. Nella stessa i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS Symptom Severity Scale - IBS-SSS e Gastrointestinal Symptom Rating Scale – GSRS) (vedi allegati) e quelli relativi alla FM. Nel corso della visita, i



pazienti completeranno anche i questionari relativi alla qualità della vita (Quality of Life - QoL).

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

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

V3. (giorno 120): (Fine periodo attività indoor). Durante questa visita i pazienti compileranno nuovamente i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e i questionari relativi alla QoL (IBS-QoL, SCL-90 e SF-36 – vedi paragrafo) così come i questionari sull'intensità dei sintomi FM. Si effettuerà la raccolta dei parametri di attività fisica e si valuteranno i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento. Saranno, infine, eseguiti prelievi ematici e dei campioni biologici necessari per le valutazioni laboratoristiche previste dallo studio.

## RISULTATI ATTESI

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

## INNOVAZIONI

- Formulazione di protocolli personalizzabili per pazienti con IBS e FM.



## BIBLIOGRAFIA

Barsky AJ, Borus JF. Functional somatic syndromes. *Ann Intern Med* 1999;130:910–21.

Clauw DJ. Fibromyalgia: a clinical review. *JAMA* 2014; 311(15): 1547–1555.

Martinez-Lavin M. Biology and therapy of fibromyalgia. Stress, the stress response system, and fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(4): 216.

Akkaya N, Akkaya S, Atalay NS, et al. Relationship between the body image and level of pain, functional status, severity of depression, and quality of life in patients with fibromyalgia syndrome. *Clin Rheumatol* 2012; 31(6): 983–988.

Goldenberg DL. Pharmacological treatment of fibromyalgia and other chronic musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:499–511.

Sarzi-puttini, P., Giorgi, V., Marotto, D. & Atzeni, F. Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* 16, 645–660 (2020)

Kim YS. Why should gastroenterologists know about fibromyalgia? Common pathogenesis and clinical implications. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17(1):1-3.

Silverman SL, Harnett J, Zlateva G, Mardekian J. Identifying fibromyalgia-associated symptoms and conditions from a clinical perspective: a step toward evaluating healthcare resource utilization in fibromyalgia. *Pain Pract.* 2010;10:520–529.

Hansson E and Skiöldebrand E. Low-grade inflammation causes gap junction-coupled cell dysfunction throughout the body, which can lead to the spread of systemic inflammation. *Scand J Pain* 2019; 19(4): 639-649.

Sanada K, et al. Effects of non-pharmacological interventions on inflammatory biomarker expression in patients with fibromyalgia: a systematic review. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:272.

Johannesson E, et al. Experiences of the effects of physical activity in persons with irritable bowel syndrome (IBS): a qualitative content analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53:1194-1200.

Goebel A, Buhner S, Schedel R, Lochs H, Sprotte G. Altered intestinal permeability in patients with primary fibromyalgia and in patients with complex regional pain syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:1223-7.



Russo F, Riezzo G, Linsalata M, Orlando A, Tutino V, Prospero L, D'Attoma B, Giannelli G. Managing Symptom Profile of IBS-D Patients With Tritordeum-Based Foods: Results From a Pilot Study. *Front Nutr.* 2022 Feb 15;9:797192.

Russo F, Riezzo G, Orlando A, Linsalata M, D'Attoma B, Prospero L, Ignazzi A, Giannelli G. A Comparison of the Low-FODMAPs Diet and a Tritordeum-Based Diet on the Gastrointestinal Symptom Profile of Patients Suffering from Irritable Bowel Syndrome-Diarrhea Variant (IBS-D): A Randomized Controlled Trial. *Nutrients.* 2022 Apr 8;14(8):1544.

Busch AJ, Webber SC, Brachaniec M, et al. Exercise therapy for fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 2011;15(5):358–67.

Fisher NM. Osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and fibromyalgia. In: Myers J, Nieman DC, editors. *ACSM's Resources for Clinical Exercise Physiology: Musculoskeletal, Neuromuscular, Neoplastic, Immunologic, and Hematologic Conditions.* 2nd ed. Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 132–47.

Jones CJ, Rakovski C, Rutledge D, Gutierrez A. A comparison of women with fibromyalgia syndrome to criterion fitness standards: a pilot study. *J Aging Phys Act.* 2015;23(1):103–11.

Bidonde J, Busch AJ, Bath B, Milosavljevic S. Exercise for adults with fibromyalgia: an umbrella systematic review with synthesis of best evidence. *Curr Rheumatol Rev.* 2014;10(1):45–79.

Häkkinen A, Häkkinen K, Hannonen P, Alen M. Strength training induced adaptations in neuromuscular function of premenopausal women with fibromyalgia: comparison with healthy women. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(1):21–6.

Jones KD, Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM, Potempa KM. A randomized controlled trial of muscle strengthening versus flexibility training in fibromyalgia. *J Rheumatol.* 2002;29(5):1041–8.

Jones KD, Clark SR, Bennett RM. Prescribing exercise for people with fibromyalgia. *AACN Clin Issues.* 2002;13(2):277–93.

Kingsley JD, McMillan V, Figueroa A. The effects of 12 weeks of resistance exercise training on disease severity and autonomic modulation at rest and after acute leg resistance exercise in women with fibromyalgia. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91(10):1551–7.



Rooks DS. Talking to patients with fibromyalgia about physical activity and exercise. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(2):208–12.

Valkeinen H, Alen M, Hannonen P, Häkkinen A, Airaksinen O, Häkkinen K. Changes in knee extension and flexion force, EMG and functional capacity during strength training in older females with fibromyalgia and healthy controls. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(2):225–8.

Valkeinen H, Häkkinen A, Hannonen P, Häkkinen K, Alén M. Acute heavy-resistance exercise-induced pain and neuromuscular fatigue in elderly women with fibromyalgia and in healthy controls: effects of strength training. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1334–9.

Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:153-6.

Foster C, Porcari JP, Anderson J, Paulson M, Smaczny D, Webber H, Doberstein SMS, Udermann B The Talk Test as a Marker of Exercise Training Intensity. *J Cardiopulm Rehabil Prev:* 2008; 28: 24-30.

Rachel C. Wilson P, Jones W. A comparison of the visual analogue scale and modified Borg scale for the measurement of dyspnoea during exercise *Clin Sci (Lond)* 1989;6:277–282.

Mannerkorpi K, Iversen MD. Physical exercise in fibromyalgia and related syndromes. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2003;17(4):629–47.

Laukkanen R, Oja P, Pasanen M, Vuori I. Validity of a two kilometre walking test for estimating maximal aerobic power in overweight adults. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity.* 1992;16(4):263-8.

Pearn J and Bullock K. A Portable Hand-Grip Dynamometer *Aust. Paediatr. J.*, 1979; 15:107–109.

Hoeger WW, Hopkins DR. A comparison of the sit and reach and the modified sit and reach in the measurement of flexibility in women. *Res Q Exerc Sport.* 1992;63(2):191-5.

Busch AJ, Barber KA, Overend TJ, Peloso PM, Schachter CL. Exercise for treating fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(4):CD003786.





Lee PH, Macfarlane DJ, Lam TH, Stewart SM. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2011 Oct 21;8:115. doi: 10.1186/1479-5868-8-115. PMID: 22018588 Free PMC article. Review.

Bennett RM, Friend R, Marcus D, et al. Criteria for the diagnosis of fibromyalgia: validation of the modified 2010 preliminary American College of Rheumatology criteria and the development of alternative criteria. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; 66(9): 1364–1373.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, et al. 2016 Revisions to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria. *Semin Arthritis Rheum*, 2016; 46(3): 319-329.

Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Fiorini T, Panni B, Randisi G, Turiel M, Carrabba M. Validation of an Italian version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ-I). *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Jul-Aug;21(4):459-64.

Crawford BK, Piau EC, Lai C, Bennett RM. Assessing fibromyalgia-related fatigue: content validity and psychometric performance of the Fatigue Visual Analog Scale in adult patients with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol.* 2011 Nov-Dec;29(6 Suppl 69):S34-43. Epub 2012 Jan 3.

Krumina A, Vasiljeva G, Ivanovs A, Logina I. Assessment of Value of Fatigue Severity and Symptoms in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis and Fibromyalgia. *British Journal of Medicine and Medical Research.* 2014 Aug; 4(36):5866-5877.

Cott A, Parkinson W, Bell MJ, Adachi J, Bédard M, Cividino A, Bensen W. Interrater reliability of the tender point criterion for fibromyalgia. *J Rheumatol.* 1992 Dec;19(12):1955-9.

Francis, C.Y.; Morris, J.; Whorwell, P.J. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 1997; 11: 395-402.

Blake, M.R.; Raker, J.M.; Whelan, K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2016;44: 693-703.

Ulijaszek SJ, Kerr DA. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *Br J Nutr.* 1999;82:165-77.



Khalil SF, Mohktar MS, Ibrahim F. The theory and fundamentals of bioimpedance analysis in clinical status monitoring and diagnosis of diseases. *Sensors (Basel)* 2014; 14:10895-928.

Midenfjord I, Polster A, Sjövall H, Törnblom H, Simrén M. Anxiety and depression in irritable bowel syndrome: Exploring the interaction with other symptoms and pathophysiology using multivariate analyses. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31:e13619.

Bertolotti G, Zotti AM, Michielin P, Vidotto G, Sanavio E. A computerized approach to cognitive behavioural assessment: an introduction to CBA-2.0 primary scales. *Journal of behavior therapy and experimental psychiatry* 1990; 21: 21-27.

Zung WW. A rating instrument for anxiety disorders. *Psychosomatics* 1971;12:371-9.

Zung WW. A Self-Rating Depression Scale. *Arch Gen Psychiatry* 1965;12:63-70.

Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Medical care* 1992; 30: 473-483.

Hildenbrand AK, Nicholls EG, Aggarwall R, Brody-Bizar E, Daly BP. Symptom Checklist-90-Revised (SCL-90-R). In: Cautin RL, Lilienfeld SO, eds. *The Encyclopedia of Clinical Psychology, First Edition*. Chichester, West Sussex; Malden, MA: John Wiley & Sons; 2015;1-5.

Patrick DL, Drossman DA, Frederick IO, Di Cesare J, Puder KL. Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure. *Digestive diseases and sciences* 1998; 43: 400-411.

Hoerger M, Quirk SW, Weed NC. Development and validation of the Delaying Gratification Inventory. *Psychol Assess.* 2011 Sep;23(3):725-38.

Rotter JB . Generalized expectancies for internal versus external control of reinforcement. *Psychological Monographs*, 1966, 80, No. 1.

Pengpid S and Peltzer K. Sedentary Behaviour, Physical Activity and Life Satisfaction, Happiness and Perceived Health Status in University Students from 24 Countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16(12).

Feeney J.A., Noller P., Hanrahan M., Assessing adult attachment, in: M.B. Sperling, W.H. Berman (Eds.), *Attachment in Adults: Clinical and Developmental Perspectives*, 21, Guilford Press, New York, NY; US, 1994, pp. 128–152.



Ryff CD, Keyes CL The structure of psychological well-being revisited. J Pers Soc Psychol. 1995 Oct;69(4):719-27.

Linsalata M, Riezzo G, D'Attoma B, Clemente C, Orlando A, Russo F. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. BMC Gastroenterol. 2018;18:167.

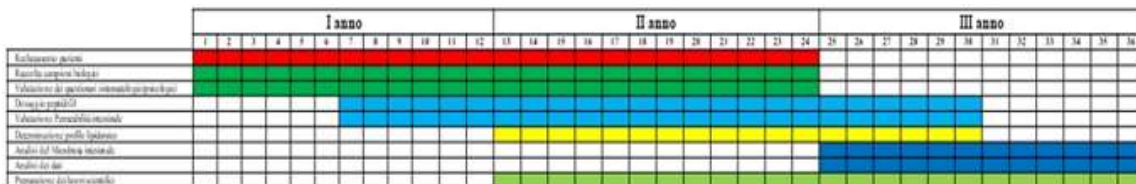
Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease. J Med Invest. 2016;63(1-2):27-37.

Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease. J Med Invest. 2016;63(1-2):27-37.

Regueiro JAG, Rius MA. Rapid determination of skatole and indole in pig back fat by normal-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography 1998; 809:246-251.

Russo F, Chimienti G, Riezzo G, Linsalata M, D'Attoma B, Clemente C, Orlando A. Adipose Tissue-Derived Biomarkers of Intestinal Barrier Functions for the Characterization of Diarrhoea-Predominant IBS. Dis Markers. 2018;28:2018.

**TIMELINE**





## TITOLO DEL PROGETTO

### **VALUTAZIONE RETROSPETTIVA PER L'INDIVIDUAZIONE DI BIOMARCATORI PREDITTIVI DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO CON VEDOLIZUMAB**

**Ricercatori responsabili:** Mauro Mastronardi

**Settore di ricerca:** Gastroenterologia (IBD)

**Parole chiave del progetto:** IBD, farmaci biologici , biomarcatori

## INTRODUZIONE

- Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), che includono la colite ulcerosa (UC) e la malattia di Crohn (CD), sono patologie severe del tratto gastro intestinale caratterizzate da andamento progressivo e recidivante. La UC e il CD 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.
- I sintomi più comuni 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.
- I pazienti IBD possono passare da periodi lunghi di remissione alla mancanza di risposta clinica alle terapie.
- I dati storici del reparto di Endoscopia Digestiva del nostro IRCCS indicano come il 30% dei pazienti trattati con farmaci biologici anti TNF $\alpha$  non rispondono alla terapia, mentre tra i responder, il 50% ha un calo/perdita di risposta con il prolungarsi dei trattamenti.



- Sappiamo che a queste percentuali contribuiscono in maniera fondamentale fattori ambientali, come il fumo; questo abbassa da 73% a 22% la percentuale dei responder e al 6% la percentuale dei pazienti con risposta prolungata nel tempo [2,3].
- L'insieme di variabili genetiche, immunologiche, microbiologiche ed ambientali possono influenzare l'andamento delle patologie infiammatorie croniche intestinali.
- 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 [4].
- Per pazienti affetti da UC e 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- $\alpha 4\beta 7$ ), Tofacitinib (Xeljanz®, inibitore delle Janus chinasi) e Ustekinumab (Stelara®, anti-IL12/23) per i pazienti che non hanno avuto risposta clinica indotta da Infliximab.
- Nel nostro IRCCS, la remissione clinica osservata dopo il passaggio a Vedolizumab è del 30% dopo 6 settimane (3 infusioni) e del 40% nella fase di mantenimento. Inoltre la risposta clinica (intesa come riduzione dello score MAYO per pazienti UC, CDAI per i CD) risulta superiore se osservata al termine del ciclo di induzione (14 settimane). Questi risultati sono in linea con quanto osservato da numerosi altri studi riportati in letteratura [5].
- Presso l'ambulatorio IBD vengono ogni anno reclutati 50 nuovi pazienti affetti da UC e 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%.
- Per i pazienti che falliscono la terapia biologica, la strategia terapeutica che viene attuata nella pratica clinica è l'intervento chirurgico.
- L'intervento chirurgico è raccomandato quando il trattamento conservativo è inefficace, in casi l'emorragia gastrointestinale sia intrattabile, nella stenosi ostruttiva del lume gastrointestinale (dovuta a tessuto cicatriziale fibrotico), o nel caso di ascessi, peritonite o complicata formazione di fistole [6,7,8].
- Pertanto, la ricerca di biomarcatori di risposta alla terapia biologica è di fondamentale importanza, al fine di prevenire e/o ritardare il ricorso a intervento chirurgico.



## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

- Nel corso del secondo anno di progetto, si è provveduto alla stesura e successiva valutazione da parte del Comitato Etico del protocollo di studio.
- La Richiesta di parere per la Sperimentazione clinica è stata sottoposta al Comitato Etico in data 3/05/2022.
- Dopo aver modificato il protocollo di sperimentazione, secondo le richieste di integrazione e chiarimento da parte del Comitato Etico, abbiamo ottenuto l'approvazione definitiva del protocollo di studio, in data 10/10/2022.
- Inoltre, si è provveduto alla individuazione di gruppi di pazienti dell'Ambulatorio di IBD già sottoposti a intervento chirurgico, che possano fungere da gruppo di studio.
- Contestualmente, si è provveduto alla ricerca di pazienti dell'Ambulatorio di IBD, che siano passati alla seconda linea di intervento con terapia biologica, in quanto non rispondenti alla terapia con Infliximab.
- Per i suddetti pazienti, si è provveduto alla raccolta di dati anamnestici e di parametri di laboratorio, laddove presenti.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

Creazione di una biobanca biologica di pazienti IBD non-responder al INFLIXIMAB e passati alla seconda linea di intervento.

Individuazione dei gruppi di pazienti IBD non-responder all' INFLIXIMAB e passati alla seconda linea di intervento.

Presso l'ambulatorio IBD vengono reclutati ogni anno circa 50 nuovi pazienti affetti da IBD (CD e UC). Vista la natura del nostro ospedale, la maggior parte di questi pazienti arriva in condizioni di gravità medio alta che richiede l'utilizzo dell'anti-TNF Infliximab come prima linea di intervento. Una percentuale vicina al 40% non risponde a questa strategia terapeutica e passa alla seconda linea di intervento con inibitori delle Janus chinasi (Tofacitinib), anti-IL12/23 (Ustekinumab) o inibitori dell'integrina  $\alpha4\beta7$  (Vedolizumab), come da protocollo clinico standard per il trattamento dei pazienti non responder agli anti TNF.





Dopo 22 settimane (5<sup>a</sup> infusione) i pazienti verranno nuovamente valutati mediante visita endoscopica. Lo score CDAI (Crohn's Disease Activity Index) e il MAYO score verranno utilizzati per la valutazione della risposta all'Infliximab insieme alla valutazione del gastroenterologo e a quella dell'anatomopatologo. Nel caso di una valutazione negativa, i pazienti entreranno nel gruppo di seconda linea di intervento. La somministrazione dei farmaci biologici avverrà con la tempistica standard (T0 seguito da Settimana 2, 6, 10, 14).

La valutazione del CDAI e del MAYO score avverrà alla 14esima settimana corrispondente alla 5<sup>a</sup> infusione.

A questo score verrà associata la valutazione endoscopica ed anatomopatologica effettuata subito dopo la 5<sup>a</sup> infusione di farmaco biologico.

In caso di fallimento della terapia biologica, anche successiva alla seconda linea di intervento, il paziente sarà sottoposto a intervento chirurgico. I campioni di tessuto prelevati durante l'intervento chirurgico, fissati e inclusi in formalina, saranno utilizzati per le analisi molecolari (Obiettivo 2).

### **Obiettivo specifico 2**

Valutazione comparativa del materiale raccolto mediante screening molecolare. La creazione dei gruppi responder/non-responder verrà accompagnata dalla valutazione istologica dell'infiltrato e della architettura dei vasi. L'approccio principale sarà la valutazione comparativa del pathway molecolare.

Sui campioni biotici raccolti, verranno effettuate analisi molecolari, utilizzando piastre Pre-designed 96-well panel con una selezione di 90 geni coinvolti nel processo infiammatorio e nella transizione epitelio-mesenchima, al fine di individuare marcatori potenzialmente predittivi di fallimento della terapia biologica.

L'individuazione di geni differenzialmente espressi nei gruppi di studio, sarà seguita da test immunoistochimici, effettuati su campioni di colon, con anticorpi specifici per le proteine selezionate.

### **Obiettivo specifico 3**

Individuazione dei biomarcatori per il monitoraggio della risposta alla terapia biologica. Individuazione e classificazione tramite pattern recognition analysis in deep-machine learning.

Mediante analisi statistiche individueremo biomarkers dal valore predittivo.



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 IBD afferenti all'ambulatorio, ancor prima del passaggio alla seconda linea di intervento.

### DATI PRELIMINARI

- Messa a punto della tecnica di estrazione di RNA da tessuto di colon fissato e incluso in paraffina.
- Screening molecolare su un primo gruppo di pazienti e controlli, mediante analisi di espressione genica di un gruppo di geni selezionati.
- Individuazione di geni differenzialmente espressi tra i gruppi di studio.

### METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

- Estrazione di mRNA da colon in FFPE.
- qPCR per valutazione dell'espressione genica di un gruppo di geni e immunohistochimica su tessuto con proteine selezionate.
- Per le valutazioni delle relazioni tra i pazienti responder e non responder alla terapia biologica (outcome primario) 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. Inoltre, mediante al 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 e l'utilizzo di analisi molecolari, rappresenta un grande sforzo di coordinamento che potrà ad una profonda conoscenza del paziente e sarà il punto di partenza per studi futuri.

## BIBLIOGRAFIA

[1] Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M,



Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S; IBD Section of the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2011 May;60(5):571-607.

[2] Parsi MA , Achkar J-P , Richardson S et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease . *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 707 – 13

[3] Rubin DT , Hanauer SB . Smoking and inflammatory bowel disease . *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000 ; 12 : 855 – 62 .

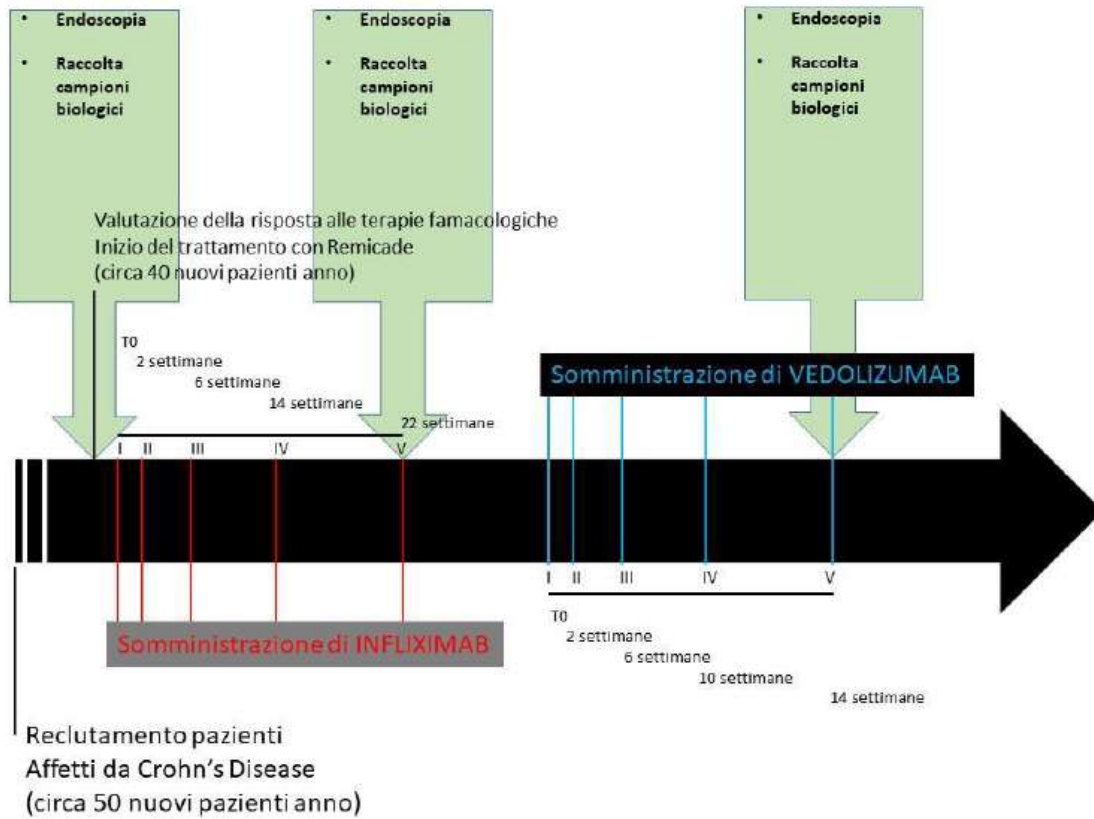
[4] Novel Pharmacological Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: Beyond Anti Tumor Necrosis Factor. Pagnini C, Pizarro TT, Cominelli F. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 18;10:671.

[5] Use of Vedolizumab for the Treatment of Crohn's Disease. Bressler B. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2019 Apr;15(4):204-206.

[6] Amosy Ephreim M'Koma "Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview" *Medicina* 2022

[7] Han Y et al. "Screening of characteristic genes in ulcerative colitis by integrating gene expression profiles" *BMC Gastr* 2022 [8] Castano Llano R et al. "Ileal reservoir-associated complications in ulcerative colitis versus familial adenomatous polyposis: Impact on patient quality of life" *Gastroenterol Hepat* 2022

**TIMELINE**





## TITOLO DEL PROGETTO

### UTILIZZO DEI BIOMARCATORI EMATICI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELL'EPATOCARCINOMA (HCC)

**Ricercatori responsabili:** Endrit Shahini e Raffaele Cozzolongo

**Settore di ricerca:** Gastroenterologia

**Parole chiave del progetto:** Biomarcatori sierici

## INTRODUZIONE

L'HCC insorge nel 70-95% dei casi in pazienti con un'epatopatia cronica, raramente su un fegato "sano" (1-4). Globalmente circa l'80% degli HCC sono associati all'infezione del virus dell'epatite B (HBV) oppure del virus dell'epatite C (HCV) e la loro distribuzione geografica correla strettamente con la loro epidemiologia (3). Circa 1/3 dei pazienti affetti da cirrosi epatica svilupperà l'HCC nel lungo termine, con un rischio annuale variabile tra l'1%-8% (3).

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il principale tipo di cancro primitivo del fegato (1). L'HCC rappresenta la sesta più frequente causa di cancro e la terza più frequente causa di morte per tumore originante dalla trasformazione neoplastica degli epatociti e la sua incidenza nella popolazione generale è in continuo aumento (2).

L'epatite cronica virale C (CHC) e l'epatite cronica virale B (CHB) assieme alla cirrosi epatica rappresentano rispettivamente nella realtà occidentale ed orientale i più importanti fattori di rischio e pertanto si raccomanda una prolungata sorveglianza e prevenzione in questi pazienti (1-3). Ulteriori fattori di rischio sono rappresentati da aflatossine (in particolare Asia orientale e Africa sub-Sahariana) assunte con l'alimentazione, emocromatosi, deficit di alfa-1-antitripsina, obesità (specie se complicata da presenza di diabete) e steatoepatite non alcolica (NASH).

Anche il fumo di tabacco è stato riconosciuto tra i fattori di rischio. Nei paesi occidentali, circa il 90% dei casi si sviluppa su fegati cirrotici, con picchi di incidenza tra i 40 e 60 anni, nei quali rappresenta la principale causa di mortalità (1). Pertanto la





diagnosi precoce dell'HCC è di fondamentale importanza per prolungare la sopravvivenza globale. Oggi solo il 30% circa dei pazienti in Europa viene diagnosticato in fase precoce, in cui sono possibili trattamenti curativi (1).

### **Incidenza, prevalenza delle epatopatie croniche e cirrosi**

L'epidemiologia delle epatopatie croniche (CLD) e della cirrosi epatica sta volgendo al cambiamento, riflettendo l'implementazione della vaccinazione su larga scala dell'epatite B e dei programmi di trattamento dell'epatite C, la crescente prevalenza della sindrome metabolica, l'aumento concomitante dell'uso di droghe iniettabili e l'incremento dell'abuso di alcol (5).

A livello mondiale, 1.5 miliardi di persone hanno avuto CLD in tutto il mondo nel 2017, la cui eziologia è stata rappresentata più comunemente dalla NAFLD (60%), HBV (29%), HCV (9%) e ALD (2%). Sulla base dei dati dello studio Global Burden of Disease, il tasso di incidenza standardizzato per età di cirrosi e CLD negli Stati Uniti era di 20.7 per 100.000 nel 2015, con un aumento del 13% dal 2000. Nei paesi europei, la prevalenza media di cirrosi era di 833 su 100.000 (range, 447-1100), ma i dati sulla prevalenza della cirrosi in altre aree, in particolare in contesti con risorse limitate, sono scarsi (5).

L'incidenza stimata della cirrosi in Europa è 26 per 100.000 e l'incidenza in Asia varia da 16.5 per 100.000 nell'Asia orientale a 23.6 per 100.000 nel sud-est asiatico. Ci sono stati piccoli aumenti nell'incidenza della cirrosi in Europa, Asia-Pacifico, Asia orientale, Sud-est asiatico e Asia meridionale dal 2000 al 2015 (5). Secondo uno studio, nel 2015 la prevalenza europea era di 23.710 per 100.000 abitanti (5).

Anche le stime che descrivono in dettaglio l'epidemiologia delle CLD nel Nord America sono limitate dalla scarsità di dati longitudinali basati sulla popolazione. I "baby boomer" (nati nel periodo 1945-1965) comprendono la metà dei casi di cirrosi nel Nord America, con una prevalenza relativamente più alta tra i neri, gli ispanici e quelli con livelli di istruzione inferiori. La prevalenza stimata della cirrosi varia da 300 a 1000 per 100.000 persone, condizionata al rischio variabile di CLD tra le popolazioni (5).

La prevalenza della cirrosi è aumentata da 1.5 a 2 volte negli ultimi 2 decenni. Sebbene i casi di cirrosi più prevalenti siano nella coorte dei "baby boomer", le diagnosi incidentali di cirrosi sono più elevate e aumentano in modo sproporzionato negli americani più giovani. Come si evince da una coorte basata sulla popolazione canadese in cui fattori di rischio come la sindrome metabolica e l'abuso di alcol sono in



aumento tra i giovani, l'incidenza della cirrosi specifica per età è aumentata del 22% dal 1997 al 2016 (5).

### **Incidenza mondiale di Epatocarcinoma (HCC)**

L'incidenza mondiale dell'HCC è maggiore nei Paesi asiatici e sub-sahariani, mentre è relativamente meno frequente in Europa e in Nord America essendo legata alla diffusione dei virus dell'epatite (HBV e HCV) (2-4).

Comunque negli ultimi anni si è verificato un incremento di incidenza dell'HCC nei pazienti con eziologia non-virale, principalmente di natura metabolica (1,3).

I pazienti con cirrosi di qualsiasi eziologia sono ad alto rischio di HCC, con un'incidenza annuale che varia dall'1% al 4%. Nel 2015, ci sono stati registrati circa 854.000 nuovi casi di cancro al fegato (aumento del 75% dal 1990) e 810.000 decessi correlati al cancro in tutto il mondo. Gli aumenti più significativi della mortalità correlata all'HCC si sono verificati in Nord America, Europa e Australia. Molti paesi, inclusa la Cina, hanno registrato una diminuzione di incidenza di HCC a seguito dei programmi di vaccinazione contro l'HBV e della diminuzione dell'esposizione all'aflatossina.

L'incidenza dell'HCC negli Stati Uniti è aumentata negli ultimi anni, ma il tasso di incremento è rallentato. Sulla base dei dati del registro US Cancer Statistics, l'incidenza dell'HCC corretta per l'età è aumentata dal 4.4 per 100.000 nel 2000 al 6.7 per 100.000 nel 2012 (5). Tuttavia, l'aumento annuo del 4.5% tra il 2000 e il 2009 è rallentato allo 0.7% annuo dal 2010 al 2012, suggerendo un possibile imminente plateau di nuovi casi di HCC. L'incidenza dell'HCC stratificata per categorie di età ha mostrato che gli aumenti dell'incidenza dell'HCC erano più pronunciati nella coorte con un picco di incidenza dell'HCV (nati nel 1945-1965), e sta diminuendo tra gli individui più giovani e gli americani asiatici (5). Tuttavia, i miglioramenti osservati nell'incidenza dell'HCC relativi all'attuazione della vaccinazione e della terapia dell'HBV o dei programmi di trattamento dell'HCV potrebbero essere mitigati o addirittura oscurati in futuro dall'aumento dell'obesità infantile e della NASH ad esordio precoce e dall'aumento dell'incidenza di epatopatia alcolica tra i giovani (5).

Infine, è probabile che la terapia per l'HCV migliori la sopravvivenza nei pazienti con la cirrosi, tuttavia, questi individui rimangono a rischio persistente di sviluppare l'HCC (5).

Ci sono anche diverse tendenze nell'incidenza dell'HCC per sottogruppi razzali e di etnia. I tassi di incidenza aggiustati per età sono più alti tra gli ispanici (6.3 per 100.000) e i neri (5.0 per 100.000) rispetto ai bianchi non ispanici (2.4 per 100.000).



Anche l'incidenza dell'HCC sta aumentando in modo sproporzionato negli ispanici (4.7%/anno dal 2000) rispetto ad altri gruppi razziali/etnici (5).

Inoltre, i neri e gli ispanici a cui è stato diagnosticato l'HCC hanno meno probabilità di ricevere una diagnosi precoce (5).

### **Incidenza di HCC in Italia**

In Europa, i Paesi in cui si registra il maggior numero di casi sono l'Italia e quelli del bacino del Mediterraneo (2-4).

Secondo i dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori sono 33.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumori del fegato (maschi = 25.300; femmine = 8.500) (6) Nel 2018 sono state 10.733 le nuove diagnosi all'anno segnalate per l'Italia (prima posizione in Europa) (1).

È stato stimato che nel 2020, sono attese circa 13.000 nuove diagnosi di tumori del fegato (rapporto M/F=2:1), mentre sono stimati 7.800 decessi (maschi=5.400; femmine=2.400) ed una sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi di 21% nei maschi e 20% nelle femmine (6).

La maggior parte degli HCC è causata da infezione cronica da HCV e abuso di alcool, seguita da HBV cronica e altri in Italia (1). Tuttavia si sta assistendo ad un forte incremento dell'HCC correlato a NASH/NAFLD (1,6).

I tumori del fegato, sono più frequenti nel Sud rispetto al Nord o al Centro Italia nelle donne e rispetto al Centro Italia negli uomini. Nelle aree del Nord Italia circa un terzo dei tumori del fegato è attribuibile all'abuso di bevande alcoliche (6).

Un impatto positivo sull'incidenza di questa patologia è riportato all'introduzione della vaccinazione anti epatite B e ai trattamenti antivirali anti epatite C.

### **Mortalità per cirrosi e HCC nel mondo**

Dopo diversi decenni di stabilità dal 1970 al 2008, la mortalità correlata alle CLD è aumentata costantemente, con relativi aumenti sproporzionati tra giovani, donne, non ispanici, bianchi e nativi americani. Uno studio del National Center for Health Statistics ha mostrato un aumento del 65% della mortalità per cirrosi dal 2009 al 2016. I tassi di mortalità aggiustati per età delle CLD e cirrosi hanno continuato ad aumentare, con stime di 14.2 (IC 95%, 14,0-14,3) e 9.2 (IC 95%, 9-1-9,3) per 100.000, rispettivamente, nel 2017 (5).



Le maggiori complicanze della cirrosi-CLD (1,2 milioni di decessi) e del cancro al fegato (790.000 decessi) rappresentano il 3.5% di tutti i decessi nel mondo. La mortalità correlata alla cirrosi è diminuita da 20 per 100.000 anni-persona nel 1980 a 15.8 per 100.000 anni-persona nel 2010 (5).

Ci sono stati circa 150.000 decessi correlati all'HCC (corretti per l'età, 2.3 per 100.000) negli Stati Uniti dal 1999 al 2017. I tassi di mortalità nel 2017 sono stati più alti tra i maschi, gli abitanti delle isole asiatiche/del Pacifico e quelli di età compresa tra 75 e 84 anni. La mortalità per HCC è aumentata complessivamente e in quasi tutti i gruppi, ad eccezione degli abitanti delle isole asiatiche/del Pacifico (5). Sebbene i tassi di mortalità diminuiti siano stati pronunciati in Asia orientale, Nord Africa/Medio Oriente e Asia Pacifico ad alto reddito, aumenti della mortalità sono stati osservati in molte altre parti del mondo, tra cui l'Asia meridionale, l'Asia centrale e l'Europa orientale. Secondo lo studio di Mokdad ed altri, nel 2014 la mortalità europea annuale per cirrosi per 100.000 persone è stata di 10.2–20 (5).

I decessi per cirrosi sono aumentati di 2 volte nell'Africa subsahariana tra il 1980 e il 2010, principalmente a causa dell'epatite virale e dell'ALD (5).

Le disparità razziali nella mortalità dell'HCC persistono e gli studi suggeriscono che ciò potrebbe essere correlato in parte ai fallimenti terapeutici, ai tassi più bassi di diagnosi precoce e alle minori probabilità di trattamento curativo, incluso il trapianto di fegato, tra le minoranze razziali/etniche rispetto ai bianchi non ispanici (5).

### **CLD, cirrosi ed HCC: Costi**

L'autore Younossi ed altri (2016), hanno riportato che in Germania, Francia, Italia e Regno Unito i costi diretti del CLD e della cirrosi sono stati complessivamente di 35 miliardi (354–1163 euro per paziente). Nel 2018 lo studio di Mellinger ed altri, ha analizzato i dati del database Truven Marketscan Commercial Claims and Encounters, riportando che la prevalenza per 100.000 abitanti di cirrosi alcolica negli Stati Uniti era di 100 (2015) mentre i costi erano di 44.835 \$ a persona (cirrosi alcolica) contro 23.319 \$ per-persona (cirrosi non alcolica) (5).

D'altra parte da una recente analisi di costo-efficacia (Parikh ND et al, 2020) che ha tenuto conto sia dei benefici che degli costi correlati alla sorveglianza, è risultato che l'ecografia e  $\alpha$ -FP sono più convenienti per la sorveglianza dell'HCC rispetto alla sola ecografia o all'assenza di sorveglianza nei pazienti con cirrosi compensata (7).



## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

lo studio si propone di valutare l'utilità clinica della combinazione di tre biomarcatori  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3 e DCP (misurati contemporaneamente mediante sistema diagnostico in vitro automatizzato  $\mu$ TASWako<sup>TM</sup> i30) in soggetti ad alto rischio di sviluppare tale neoplasia.

In particolare, ci proponiamo i seguenti obiettivi specifici:

**Obiettivo specifico 1:** valutazione dell'utilità clinica dell'uso combinato di  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3 e DCP nel predire l'insorgenza dell'EPATOCARCINOMA (HCC)

**Obiettivo specifico 2:** valutazione delle performance dei punteggi GALAD e GALADUS nella diagnosi precoce di HCC.

**Obiettivo specifico 3:** correlazione tra i livelli dei tre biomarcatori (singolarmente ed in combinazione tra loro) e lo stadio dell'HCC.

## METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE

Nello studio verranno arruolati, previo consenso informato:

1. Pazienti alla prima diagnosi di HCC
2. Pazienti in follow-up con cirrosi virale, NASH e/o alcolica che effettuano programmi di prevenzione per HCC presso il reparto di Gastroenterologia I del nostro Istituto.

All'arruolamento e ad ogni accesso al Reparto verrà effettuato un prelievo di sangue.

Il gruppo di controllo sarà composto da pazienti che saranno candidati alla sorveglianza dell'HCC, cioè quelli con cirrosi epatica o epatite cronica di qualsiasi eziologia senza HCC visitati presso il nostro Istituto 1) che saranno testati per  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3% e DCP come parte del loro follow-up regolare, o 2) avevano fornito il consenso a conservare un campione di siero in Biobanca che autorizzava la misurazione di  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3% e DCP. Ai pazienti controllo sarà richiesto di essere sottoposti ad un follow-up di almeno 6 mesi dopo la valutazione del punteggio GALAD per confermare l'assenza di HCC o avere una TC multifasica con mezzo di contrasto, una risonanza magnetica o una biopsia epatica negative al momento della valutazione del punteggio GALAD.



Il gruppo di casi sarà composto da pazienti con HCC di nuova diagnosi nel contesto di cirrosi o di qualsiasi altra eziologia durante lo stesso periodo di studio, 1) i quali saranno testati per  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3% e DCP come parte integrante della loro regolare assistenza clinica, o 2) avevano fornito il consenso a conservare un campione di siero in Biobanca che autorizzava la misurazione di  $\alpha$ -FP,  $\alpha$ -FP-L3% e DCP al momento della diagnosi del tumore. Eventuali pazienti sottoposti a terapia con warfarin saranno esclusi poiché il warfarin può incrementare i livelli di DCP in assenza di HCC, rischiando di dare falsi positivi.

Saranno utilizzati il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher per confrontare le variabili categoriali e il test T Student o Wilcoxon Rank sum per le variabili continue. Il punteggio GALAD (30) sarà calcolato mediante un calcolatore presente sul web e disponibile all'indirizzo:

<http://www.mayoclinic.org/medical-professionals/model-end-stage-liver-disease/galad>.

L'area sotto la curva AUC sarà calcolata per valutare le prestazioni del punteggio GALAD per la diagnosi di HCC. Saranno eseguite analisi di sottogruppi per studiare le prestazioni del punteggio GALAD in sottogruppi di pazienti con diverso genere, età,  $\alpha$ -FP, eziologie, BMI, stato di cirrosi, disfunzione epatica e stadio del tumore.

L'indice di Youden sarà utilizzato per trovare i cut-off GALAD ottimali da cui saranno calcolati la sensibilità, la specificità e i corrispondenti intervalli di confidenza (CI) al 95% e confrontati con quelli dell'ecografia (39). Il punteggio GALADUS (34) sarà sviluppato combinando il punteggio GALAD e l'ecografia per la rilevazione dell'HCC mediante analisi di regressione logistica multivariata contenente tutte le variabili nel punteggio GALAD e dell'ecografia epatica.

Poiché GALAD e GALADUS sono costruiti sulla base di test eseguiti sugli stessi individui, l'analisi statistica sulle differenze tra le curve dovrebbe tenere conto della natura correlata dei dati. Pertanto, il confronto degli AUC sarà eseguito utilizzando il test di DeLong, che è un test statistico non parametrico che confronta le aree sotto due o più curve ROC (40).

L'analisi statistica sarà effettuata utilizzando SAS 9.4 (SAS Institute, Cary NC) e R versione 3.0.2 (R Foundation, Vienna, Austria).

## INNOVAZIONI

Come auspicabile, se i risultati dimostreranno l'effettivo miglioramento del potere diagnostico e prognostico dell'HCC da parte dei 3 biomarcatori, potremmo offrire uno





strumento rapido e valido per migliorare la performance diagnostica dell'HCC in accordo con la "mission" del nostro Istituto.

## BIBLIOGRAFIA

1. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma [published correction appears in J Hepatol. 2019 Apr;70(4):817]. J Hepatol. 2018;69(1):182-236.
2. <https://easl.eu/wp-content/uploads/2021/06/1.-EASL-Open-Letter-on-Liver-Cancer-Care.pdf>. Demirtas CO, Brunetto MR. Surveillance for hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis: Is it time to personalize it?. World J Gastroenterol. 2021; 27: 5536-5554.
4. European Association For The Study Of The Liver, & European Organisation For Research And Treatment Of Cancer (2012). EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. [published correction appears in J Hepatol. 2012 Jun;56(6):1430]. J Hepatol. 2012;56(4):908-943.
5. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020;18(12):2650-2666.
6. <https://www.registri-tumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2020>.
7. Parikh ND, Singal AG, Hutton DW, Tapper EB. Cost-Effectiveness of Hepatocellular Carcinoma Surveillance: An Assessment of Benefits and Harms. Am J Gastroenterol. 2020;115(10):1642-1649.
8. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. Am J Gastroenterol. 2006;101(3):513-523.
9. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. J Hepatol. 2001;35(3):421-430.
10. Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2010;16(4):418-424.



11. Ikoma J, Kaito M, Ishihara T, Nakagawa N, Kamei A, Fujita N, et al. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-gamma-carboxy prothrombin: a prospective study. *Hepatogastroenterology* 2002;49:235–238.
12. Ono M, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M. Measurement of immunoreactive prothrombin precursor and vitamin-K-dependent gamma-carboxylation in human Hepatocellular carcinoma tissues: decreased carboxylation of prothrombin precursor as a cause of des-gamma-carboxyprothrombin synthesis. *Tumour Biol* 1990;11:319–26.
13. H.S. Kim, J.W. Park, J.S. Jang, H.J. Kim, W.G. Shin, K.H. Kim, et al., Prognostic values of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study, *J. Clin. Gastroenterol.* 43 (2009) 482e488.
14. J.Y. Choi, S.W. Jung, H.Y. Kim, M. Kim, Y. Kim, D.G. Kim, et al., Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP, *World J. Gastroenterol.:* WJG 19 (2013) 339e346.
15. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology* 2003;37:1114–21.
16. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, et al. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984;310:1427–1431.
17. Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M. Yet al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561–569.
18. Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for Hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int* 2008;2:17–30.
19. Toyoda H, Kumada T, Tada T, et al. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/mL. *Cancer Sci.* 2011;102(5):1025-1031.
20. Best J, Bilgi H, Heider D, et al. The GALAD scoring algorithm based on AFP, AFP-L3, and DCP significantly improves detection of BCLC early stage hepatocellular carcinoma. Der GALAD-Score, ein AFP-, AFP-L3- und DCP-basierter



Diagnosealgorithmus verbessert die Detektionsrate des hepatozellulären Karzinoms im BCLC-Frühstadium signifikant. *Z Gastroenterol.* 2016;54(12):1296-1305.

21. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130(7):417-422.

22. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124-31.e1.

23. Heimbach JK. Overview of the Updated AASLD Guidelines for the Management of HCC. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2017;13(12):751-753.

24. Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, et al. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int.* 2010;4(2):439-474.

25. Makuuchi M, Kokudo N, Aii S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res.* 2008;38(1):37-51.

26. Weinmann A, Koch S, Niederle IM, et al. Trends in epidemiology, treatment, and survival of hepatocellular carcinoma patients between 1998 and 2009: an analysis of 1066 cases of a German HCC Registry. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(3):279-289.

27. Ikai I, Kudo M, Aii S, et al. Report of the 18th follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatology Research* 2010; 40: 1043–1059.

28. Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, Takayama T, Kubo S, Shimada M, Nagano H, Hatano E, Izumi N, Kaneko S, Kudo M, Iijima H, Genda T, Tateishi R, Torimura T, Igaki H, Kobayashi S, Sakurai H, Murakami T, Watadani T, Matsuyama Y. Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC guidelines) 2019 update. *Hepatol Res* 2019; 49: 1109-1113.

29. Craig AJ, von Felden J, Garcia-Lezana T, Sarcognato S, Villanueva A. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17: 139-152.

30. Johnson PJ, Pirrie SJ, Cox TF, Berhane S, Teng M, Palmer D, Morse J, Hull D, Patman G, Kagebayashi C, Hussain S, Graham J, Reeves H, Satomura S. The detection of hepatocellular carcinoma using a prospectively developed and validated



model based on serological biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 144-153.

31. Berhane S, Toyoda H, Tada T, Kumada T, Kagebayashi C, Satomura S, Schweitzer N, Vogel A, Manns MP, Benckert J, Berg T, Ebker M, Best J, Dechêne A, Gerken G, Schlaak JF, Weinmann A, Wörns MA, Galle P, Yeo W, Mo F, Chan SL, Reeves H, Cox T, Johnson P. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14: 875-886.e6.

32. Caviglia GP, Abate ML, Petrini E, Gaia S, Rizzetto M, Smedile A. Highly sensitive alpha-fetoprotein, Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin for hepatocellular carcinoma detection. *Hepato Res.* 2016;46(3):E130-E135.

33. Best J, Bechmann LP, Sowa JP, et al. GALAD Score Detects Early Hepatocellular Carcinoma in an International Cohort of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(3):728-735.e4.

34. Yang JD, Addissie BD, Mara KC, et al. GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(3):531-538.

35. Ertle JM, Heider D, Wichert M, et al. A combination of  $\alpha$ -fetoprotein and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion.* 2013;87(2):121-131.

36. Makuuchi M, Kokudo N, Arai S, et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepato Res.* 2008;38(1):37-51.

37. Chang W. W. P. et al., *Microfluidic Immunoassays on Polymeric Microships*, IVD Technology Magazine, Spring 2010, p. 6-11.

38. Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, et al. Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem.* 2009;388(2):306-311.

39. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3(1):32-5.



## TITOLO DEL PROGETTO

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

**Ricercatori responsabili:** Maria Notarnicola

**Settore di ricerca:** Biochimica Nutrizionale

**Parole chiave del progetto:** arance, esperidina, polifenoli, lipidomica, enzimi deglicanti, steatosi

## INTRODUZIONE

Il termine MAFLD (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease) indica una patologia caratterizzata da una steatosi del parenchima epatico (>5% del tessuto interessato) associata ad alterazioni metaboliche, principalmente diabete di Tipo2 ed obesità. Da un punto di vista istologico la MAFLD si presenta con un moderato grado di infiammazione oppure con una necro-infiammazione associata a rigonfiamento degli epatociti. In genere, la prevalenza della MAFLD aumenta con l'età ed è più alta negli uomini o nelle donne in menopausa e viene diagnosticata nel 60% della popolazione con diabete di tipo 2 e nel 80% degli obesi. Pertanto la MAFLD a differenza del termine NAFLD, enfatizza il rischio metabolico e pone l'attenzione sulle alterazioni del metabolismo glucidico (vedi insulino-resistenza) e lipidico (lipotossicità, stress ossidativo, etc.) che si osservano nei soggetti con MAFLD.

Dato l'attuale aumento dell'incidenza delle dislipidemie e di obesità nella popolazione generale, c'è un forte interesse ad individuare fattori dietetici in grado di prevenire l'insorgenza delle patologie metaboliche o quanto meno capaci di ridurre il rischio metabolico. Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che il miglioramento del profilo glucidico e lipidico nei soggetti a rischio può ridurre la mortalità legata alle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e al cancro.

La dieta si pone, pertanto, come uno strumento di prevenzione efficace nel contrastare le malattie legate al metabolismo, come la MAFLD. In particolare la frutta con il suo alto



contenuto di polifenoli ha dimostrato di esercitare un'elevata azione anti-infiammatoria, antitrombotica ed antiproliferativa.

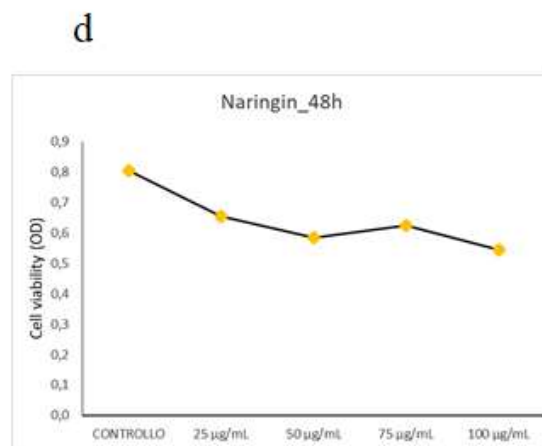
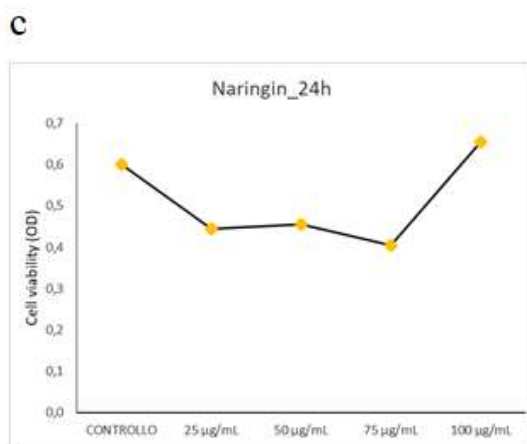
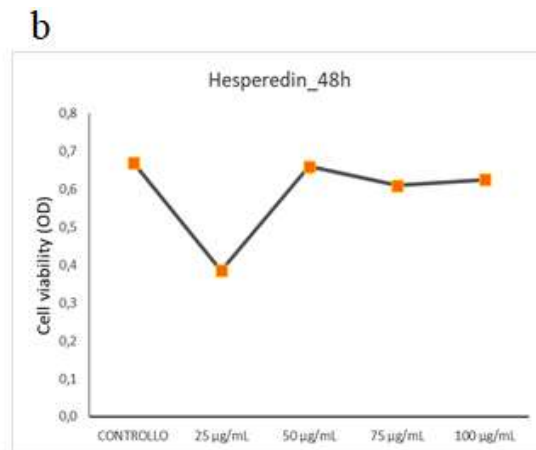
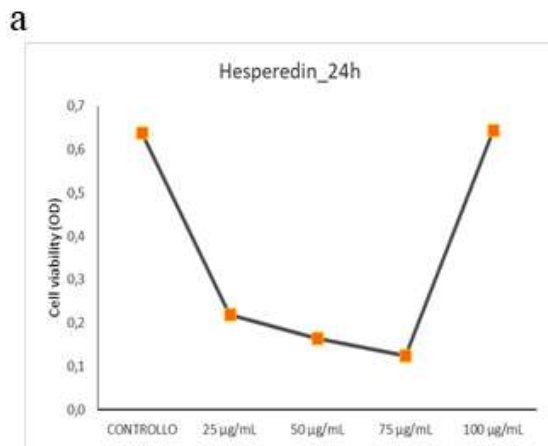
Tra gli alimenti tipici della Dieta Mediterranea con proprietà nutraceutiche, ci sono gli agrumi ed in particolare le arance, il cui consumo viene recentemente incoraggiato per gli effetti benefici sui livelli ematici del colesterolo e dei lipidi in generale. I polifenoli estratti dalle arance della varietà Tacle hanno dimostrato in vitro un'azione inibitoria della sintesi del colesterolo e l'esperedina, un flavonoide principalmente presente nelle arance, ha dimostrato in vitro un'attività antiproliferativa. Studi clinici hanno inoltre dimostrato che l'esperedina possiede anche attività anti-infiammatorie, anti-ipertensive.

Alla luce di questi dati, il presente progetto intende studiare sia gli effetti in vitro del composto bioattivo delle arance, quale l'esperedina, sia gli effetti del consumo di arance sul profilo lipidico e glucidico di soggetti con MAFLD. Attraverso l'analisi lipidomica si andrà a valutare la composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana delle cellule trattate con esperedina e il profilo lipidomico nel siero dei soggetti arruolati nello studio.

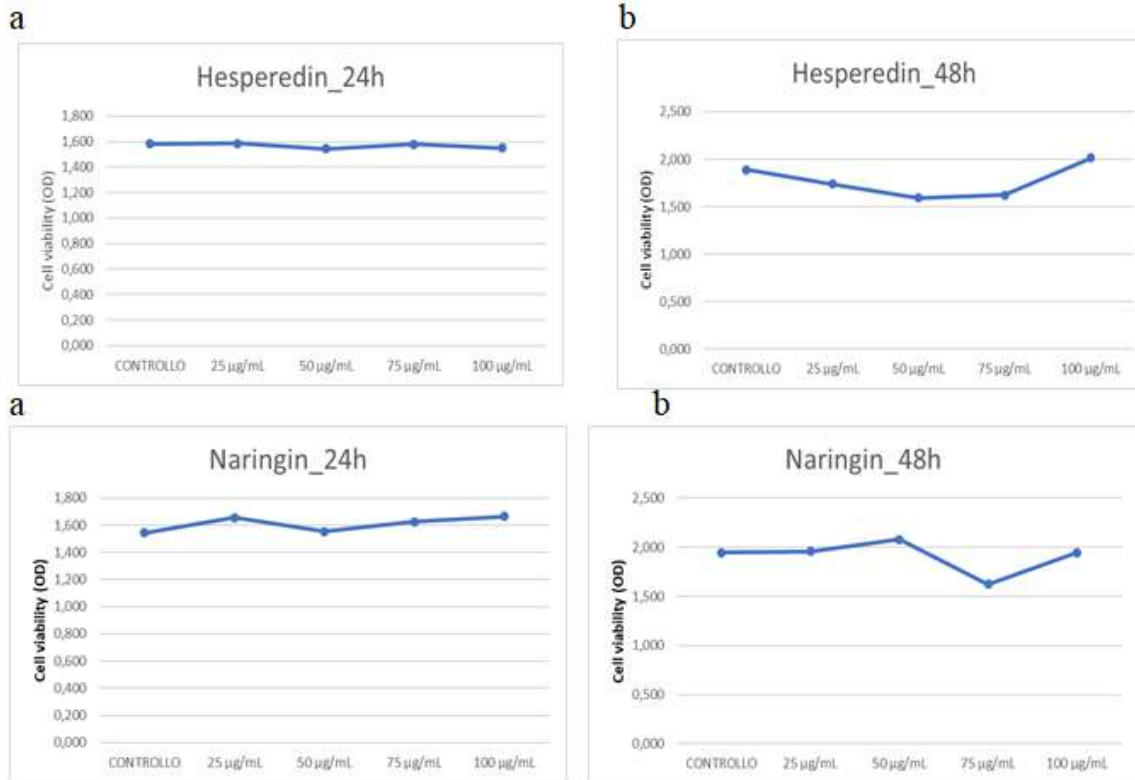
## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

Nel corso del primo anno di Progetto sono stati allestiti gli esperimenti in vitro per studiare gli effetti dei composti bioattivi presenti nelle arance. Sono state messe in coltura le cellule HepG2 (linea cellulare epatica) e le cellule SW480 e HT29 (linee cellulari di carcinoma coloretale). Esperimenti preliminari su cellule HepG2 hanno dimostrato che sia l'esperedina che la naringina (principali composti bioattivi delle arance) influenzano l'attività proliferativa cellulare. Come mostrato nei grafici che seguono, l'effetto antiproliferativo delle due molecole si osservava in maniera dose-dipendente già a 25 µg/ml.

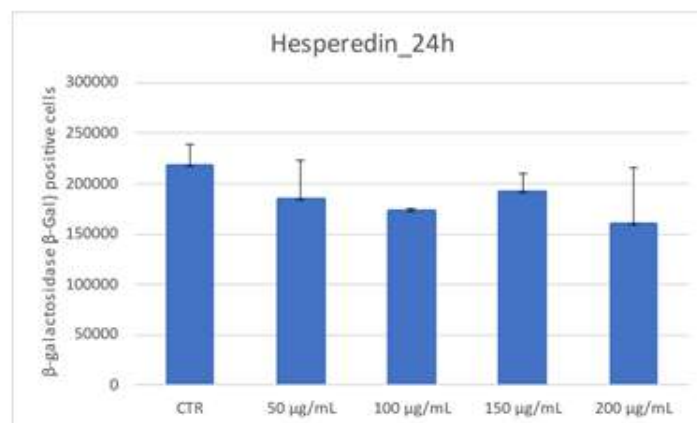




Nessun effetto era invece osservato sull'attività proliferativa delle cellule SW480 dopo trattamento con esperedina e naringina. I grafici dimostrano che le cellule SW480 sono "non responder" ai polifenoli esperedina e naringina. Questo dato, già presente in letteratura, ha necessità di essere maggiormente studiato nei nostri sistemi sperimentali.



Nessun effetto sulla proliferazione e crescita delle cellule del colon retto era osservato anche utilizzando concentrazioni più alte di esperedina e naringina (50,100,150 e 200 µg/ml, dati non mostrati). Sulle cellule SW480 trattate con esperedina ad alte concentrazioni è stato effettuato il dosaggio della beta-galattosidasi, noto marcatore di senescenza cellulare. Il grafico mostra che l’esperedina ha un lieve effetto senolitico su questa linea cellulare di carcinoma coloretta. Infatti, rispetto al controllo, le cellule trattate presentavo più bassi livelli di beta-galattosidasi.





Il Progetto prevede una parte clinica; a tale scopo, è stata fatta la registrazione del trial clinico sul sito ClinicalTrial.gov. I pazienti saranno reclutati dall'ambulatorio di nutrizione secondo le modalità previste dal Progetto e contestualmente sarà effettuata la raccolta del materiale biologico come da protocollo.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

**Obiettivo specifico 1:** studiare in vitro su cellule epatiche HepG2 gli effetti anti-infiammatori ed anti-proliferativi dell'esperedina, composto bioattivo presente nelle arance. Lo studio "in vitro" sulle cellule in coltura consentirà anche di valutare, mediante analisi lipidomica, la possibile variazione del profilo degli acidi grassi della membrana cellulare dopo trattamento con esperedina. (Esperimenti in corso)

**Obiettivo specifico 2:** studio della composizione chimica e polifenolica delle arance Navelina, varietà che verrà utilizzata nel trial clinico. La miscela di polifenoli estratti da questa varietà di arance verrà testata in vitro su cellule in coltura al fine di valutare gli effetti sulla proliferazione e crescita delle cellule. (esperimenti da pianificare nel II anno del progetto)

**Obiettivo specifico 3:** valutare gli effetti delle arance "Navelina" sulla variazione del profilo lipidomico e sul metabolismo glucidico e lipidico sierico di soggetti con MAFLD. (esperimenti da pianificare nel II anno del progetto).



## LINEA DI RICERCA 3

### INNOVAZIONE IN DIAGNOSTICA E TERAPIA DELLE NEOPLASIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

**Responsabile Scientifico:** Gianluigi Giannelli

#### Descrizione

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

#### Obiettivi

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



## TITOLO DEL PROGETTO

### VALUTAZIONE DI APPROCCI ALTERNATIVI PER IL MIGLIORAMENTO DEL PROFILO SINTOMATOLOGICO E LA QUALITÀ DELLA VITA IN PAZIENTI CON SINDROME DEL COLON IRRITABILE (IRRITABLE BOWEL SYNDROME – IBS)

**Ricercatori responsabili:** Francesco Russo

**Settore di ricerca:** Fisiopatologia della Nutrizione

**Parole chiave del progetto:** Attività fisica, Disturbi funzionali GI, IBS-D, Intolleranze alimentari, Lipidomica, Permeabilità Intestinale.

## INTRODUZIONE

La terapia della sindrome del colon irritabile (Irritable Bowel Syndrome, IBS) è prevalentemente di carattere sintomatico dato che non sono del tutto conosciuti i meccanismi che scatenano la sintomatologia. Si prospettano quindi delle terapie mirate alla riduzione della sintomatologia e al miglioramento della qualità della vita dei pazienti. Di conseguenza i trattamenti adottati sono guidati dalle condizioni del paziente e cioè nei casi meno gravi spesso si adotta 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 confermata da un nostro recente studio sugli effetti di una dieta lowFODMAPs (Frutto-Oligosaccaridi (fruttani e galatto-oligosaccaridi), Disaccaridi (lattosio), Monosaccaridi (fruttosio) ed



Polioli (es. sorbitolo, mannitolo e xilitolo) nella gestione clinica del paziente con IBS variante diarrea (IBS-D) [2].

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. Come largamente dimostrato dalla letteratura, l'attività fisica svolge un ruolo importante nella prevenzione e nel trattamento di molte patologie, ed inoltre induce numerosi effetti positivi sul tratto gastrointestinale [4]. Aumentando l'esercizio fisico, si può assistere ad un miglioramento dei sintomi nei disordini gastrointestinali come della sindrome del colon irritabile (IBS) [2].

È stato evidenziato 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 per ottimizzare la 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 evidenziato inoltre che il movimento favorisce e/o regolarizza la motilità gastro-intestinale (peristalsi) e il transito intestinale [3].

I dati evidenziano che pazienti fisicamente attivi, con esperienza di IBS, sviluppano sintomi minori rispetto ai pazienti sedentari o inattivi [3]. E' stato evidenziato infatti, che una attività di moderata intensità favorisce e regolarizza la motilità gastro-intestinale e il tratto intestinale [ ]. Alla luce di queste evidenze scientifiche, riteniamo che l'attività fisica possa essere un valido approccio per il trattamento dell'IBS

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO

Nel corso del 2022 si è proceduto ad analizzare e pubblicare i dati relativi allo studio condotto con gli approcci nutrizionali alternativi come previsto nel progetto. In prima istanza si sono, pertanto, valutati gli effetti della dieta FODMAPs somministrata in pazienti IBS-D su parametri fisiopatologici e sintomatologici. Sono evidenti il miglioramento della sintomatologia, del quadro psicologico e della qualità della vita (QoL), nonché il miglioramento del profilo immunologico e la permeabilità intestinale





Siccome i pazienti con IBS-D possono essere intolleranti all'assunzione di prodotti a base di grano, sarebbe utile poter disporre di prodotti alternativi che per le loro caratteristiche siano più facilmente digeribili. Il Tritordeum è un cereale ottenuto dalla ibridizzazione di grano e orzo e può sostituire il grano nella preparazione di diversi prodotti (pasta, pane, taralli e biscotti). Nello specifico può essere utile nella dieta dei pazienti IBS-D grazie al suo peculiare contenuto di fruttani e gliadina. Si è, pertanto, valutato anche gli effetti della dieta a base di Tritordeum somministrata per la stessa durata di 12 settimane sulle stesse variabili in modo da poter comparare gli effetti con quelli della dieta Low FODMAP.

I risultati degli studi sono stati oggetto di pubblicazioni scientifiche (vedi di seguito). Anche in questo caso, sono lampanti il miglioramento dei sintomi fisici, GI e psicologici, nonché il miglioramento della QoL, con un indubbio vantaggio di offrire un assetto dietetico avente una maggiore "compliance" rispetto a quello a basso contenuto di FODMAPs. Per ultimo, la comparazione delle due diete ha tenuto conto anche delle eventuali modifiche nel contenuto di metaboliti fecali conseguenti alla loro somministrazione. I risultati di questo studio, sono stati recentemente accettati su rivista internazionale ed evidenziano come entrambe i trattamenti inducano modificazioni significative per lo stato di salute dell'intestino, sebbene non con variazioni massive.

1. Russo F, Riezzo G, Linsalata M, Orlando A, Tutino V, Prospero L, D'Attoma B, Giannelli G. "Managing symptom profile of IBS-D patients with Tritordeum-based foods: results from a pilot study". *Front Nutr.* 2022 Feb 15;9:797192. doi: 10.3389/fnut.2022.797192. eCollection 2022.

2. Russo F, Riezzo G, Orlando A, Linsalata M, D'Attoma B, Prospero L, Ignazzi A, Giannelli G. "A Comparison of the Low-FODMAPs Diet and a Tritordeum-Based Diet on the Gastrointestinal Symptom Profile of Patients Suffering from Irritable Bowel Syndrome-Diarrhea Variant (IBS-D): A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* . 2022 Apr 8;14(8):1544. doi: 10.3390/nu14081544.

3. Caponio GR, Celano G, Calabrese FM, Riezzo G, Orlando A, D'Attoma B, Ignazzi A, Vacca M, Porrelli A, Tutino V, De Angelis M, Giannelli G, Russo F. Evaluation of the effects of Tritordeum-based foods compared to the low-FODMAPs diet on the fecal metabolome of IBS-D patients: a preliminary investigation" *Nutrients* 2022 (accettato)

Per quanto riguarda il reclutamento dei pazienti da sottoporre al programma di attività fisica, alla data di redazione del presente stato di avanzamento (31.10.22) sono stati reclutati, n. 95 soggetti totali. Di questi, 16 hanno abbandonato dopo aver eseguito gli

esami previsti per il T<sub>0</sub>. Complessivamente, nell'anno 2022, sono stati effettuati ulteriori 2 reclutamenti (3° e 4°):

3° reclutamento: n. 23 soggetti reclutati.

Nei giorni del 29.04.22 e 02.05.22 è stata effettuata la routine clinica prevista per il T<sub>0</sub>; nei giorni 03.08.22 e 05.08.22 la routine prevista per il T<sub>1</sub>. Tutte le indagini si sono svolte presso il Laboratorio dei Disturbi Funzionali.

Il protocollo di attività fisica è iniziato il 05.05.22 ed è terminato con i test da campo svolti l'1 e il 04.08.22. In seguito al reclutamento e alla routine al T<sub>0</sub> hanno abbandonato il progetto n. 2 soggetti. Hanno, pertanto, terminato il progetto n. 20 soggetti.

4° reclutamento: n. 18 soggetti reclutati.

Il 29 e il 31.08.22 è stata effettuata la routine clinica prevista per il T<sub>0</sub> e il 05.09.22 i soggetti hanno iniziato il programma di attività fisica.

Questa fase del progetto è ancora in corso e si prevede la conclusione dell'intervento di attività fisica e gli esami di routine del T<sub>1</sub> per il mese di dicembre 2022.

Di seguito la numerosità del campione (tabella 1), le caratteristiche antropometriche ed il profilo sintomatologico (tabella 2) dei soggetti sinora arruolati.

Tabella 1

	Totale	1° Reclutamento	2° Reclutamento.	3° Reclutamento.	4° Reclutamento.
Soggetti Arruolati	95	41	16	20	18
(M/F)	(40/55)	(22/19)	(5/11)	(7/13)	(6/12)
Drop-Outs	16	13	1	2	0
(M/F)	(7/9)	(6/7)	(1/0)	(2/0)	(0/0)
Età (aa) (Media ± DS)	52,2±8,4	53,1±8,2	52,81±6,5	48,9±10,4	53,2±7,6

Tabella 2

	1° Reclutamento		2° Reclutamento.		3° Reclutamento.		4° Reclutamento.	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
GSRS tot score (Mediana e Range)	27 (17-41)	19 (15-25)	29,5 (16-37)	20 (15-34)	32,5 (20-46)	20,5 (16-40)	27,5 (16-39)	
BMI (Media ± DS)	31,1±4,1	30,8±5,7	29,3±7,4	29,2±4,8	27,8±5,7	27,4±4,1	28,5±4,8	In Corso
Soggetti normopeso	3	1	5	5	8	8	5	
Soggetti sovrappeso	15	14	7	6	7	7	3	
Soggetti obesità 1°	17	8	1	1	2	2	7	
Soggetti obesità 2°	5	4	1	1	2	1	3	
Soggetti obesità 3°	1	1	2	2	1	0	0	



Sono previsti per il 2023 ulteriori due periodi di reclutamento, verosimilmente nei mesi di Aprile/Maggio e Settembre. Contestualmente, si è proceduto alla somministrazione e compilazione dei questionari sintomatologici e psicologici nonché al prelievo ed immagazzinamento dei campioni biologici previsti nel progetto.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

**Obiettivo specifico 1:** Stimare l'efficacia di un intervento di attività fisica controllato sui sintomi IBS come misurato dalla scala SSS.

**Obiettivo specifico 2:** Stimare l'effetto del programma di attività fisica controllato, mediante l'impiego di test non invasivi, sulla funzionalità e l'integrità dell'epitelio lungo tutto il tratto GI. Questo obiettivi comprende lo studio dell'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]).

**Obiettivi specifico 3:** descrivere eventuali cambiamenti nel microbiota intestinale a seguito dell'intervento di attività fisica controllato

**Obiettivo specifico 4:** Stimare l'effetto dell'intervento di attività fisica controllato sui livelli ematici di somatostatina, serotonina, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) al fine di valutare le eventuali influenze dell'intervento sulla secrezione di questi peptidi e la loro correlazione con la sintomatologia IBS.

## RISULTATI ATTESI

- Quantificazione dell'efficacia dell'intervento di attività fisica
- 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 terapeutici mirati.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.



## BIBLIOGRAFIA

Simrén M, Tack J. New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:589-605.

Orlando A, Tutino V, Notarnicola M, Riezzo G, Linsalata M, Clemente C, Prospero L, Martulli M, D'Attoma B, De Nunzio V, Russo F. Improved Symptom Profiles and Minimal Inflammation in IBS-D Patients Undergoing a Long-Term Low-FODMAP Diet: A Lipidomic Perspective. *Nutrients*. 2020;12:1652.

Johannesson E, et al. Experiences of the effects of physical activity in persons with irritable bowel syndrome (IBS): a qualitative content analysis. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53:1194-1200.

Johannesson E. et al. Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: A randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol*. 2011

Parodi G, De Luca R, Levetto M "Progetto fitwalking": dalla promozione dell'attività fisica all'esercizio-terapia Trapianti 2011;15:112-117

Sarah Hanson, Andy Jones. Is there evidence that walking groups have health benefits? A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med Actions*. 2015;49:710-5.

Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:153-6.

Foster C, Porcari JP, Anderson J, Paulson M, Smaczny D, Webber H, Doberstein SMS, Udermann B The Talk Test as a Marker of Exercise Training Intensity. *J Cardiopulm Rehabil Prev*: 2008; 28: 24-30.

Rachel C. Wilson P, Jones W. A comparison of the visual analogue scale and modified Borg scale for the measurement of dyspnoea during exercise *Clin Sci (Lond)* 1989;6:277–282.

Thompson PD, Arena R, Riebe D, Pescatello LS. ACSM's new pre participation health screening recommendations from ACSM's guidelines for exercise testing and prescription, ninth edition. *Curr Sports Med Rep*. 2013;12:215-7

Lee PH, Macfarlane DJ, Lam TH, Stewart SM. Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review *Int J Behav Nutr*



Phys Act. 2011 Oct 21;8:115. doi: 10.1186/1479-5868-8-115. PMID: 22018588 Free PMC article. Review.

Supa Pengpid and Karl Peltzer Sedentary Behaviour, Physical Activity and Life Satisfaction, Happiness and Perceived Health Status in University Students from 24 Countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16(12), 2084; <https://doi.org/10.3390/ijerph16122084>

J.A. Feeney, P. Noller, M. Hanrahan, Assessing adult attachment, in: M.B. Sperling, W.H. Berman (Eds.), *Attachment in Adults: Clinical and Developmental Perspectives*, 21, Guilford Press, New York, NY; US, 1994, pp. 128–152

Ryff CD, Keyes CL The structure of psychological well-being revisited. *J Pers Soc Psychol.* 1995 Oct;69(4):719-27. doi: 10.1037//0022-3514.69.4.719. PMID: 7473027

Laukkanen R, Oja P, Pasanen M, Vuori I. Validity of a two kilometre walking test for estimating maximal aerobic power in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:263-8.

Pearn J and Bullock K. A Portable Hand-Grip Dynamometer *Aust. Paediatr. J.*, 1979; 15:107–109.

Hoeger WW, Hopkins DR. A comparison of the sit and reach and the modified sit and reach in the

Francis, C.Y.; Morris, J.; Whorwell, P.J. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 1997; 11: 395-402

Ulijaszek SJ, Kerr DA. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *Br J Nutr.* 1999;;82:165-77

Khalil SF, Mohktar MS, Ibrahim F. The theory and fundamentals of bioimpedance analysis in clinical status monitoring and diagnosis of diseases. *Sensors (Basel)* 2014; 14:10895-928

Midenfjord I, Polster A, Sjövall H, Törnblom H, Simrén M. Anxiety and depression in irritable bowel syndrome: Exploring the interaction with other symptoms and pathophysiology using multivariate analyses. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31:e13619



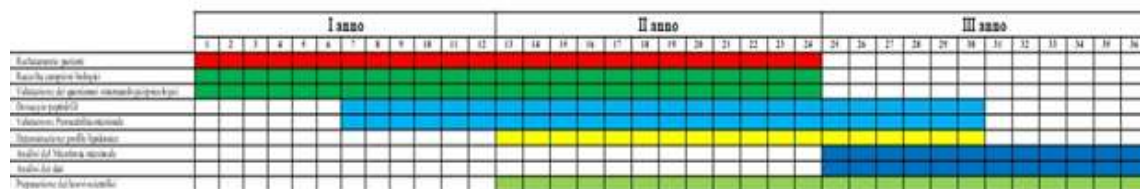
Linsalata M, Riezzo G, D'Attoma B, Clemente C, Orlando A, Russo F. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. BMC Gastroenterol. 2018;18:167.

Regueiro JAG, Rius MA. Rapid determination of skatole and indole in pig back fat by normal-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography 1998; 809:246-251

Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease. J Med Invest. 2016;63(1-2):27-37.

Regueiro JAG, Rius MA. Rapid determination of skatole and indole in pig back fat by normal-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography 1998; 809:246-251

**TIMELINE**







## TITOLO DEL PROGETTO

### **VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI AGENTI SENOLITICI NATURALI IN MODELLI SPERIMENTALI DI TUMORI GASTROENTEROLOGICI**

**Ricercatori responsabili:** Maria Notarnicola

**Settore di ricerca:** Biochimica Nutrizionale

**Parole chiave del progetto:** senescenza cellulare, senolitici, quercetina, resveratrolo

## **INTRODUZIONE**

La senescenza cellulare è un processo biologico in cui le cellule, in presenza di determinati stimoli, smettono di replicarsi e vanno incontro a modificazioni morfologiche e funzionali. Potrebbe essere considerato un meccanismo di difesa della cellula, ma sembra essere anche correlato all'invecchiamento e all'insorgenza di patologie legate all'età.

La senescenza cellulare è un processo dinamico ed eterogeneo, nel quale vengono prodotte molecole specifiche ad attività pro-infiammatoria, che accumulandosi nei tessuti possono essere la causa dell'insorgenza di patologie come l'Alzheimer, l'aterosclerosi e il cancro. Le cellule senescenti sono caratterizzate da alterazioni morfologiche, danni strutturali a carico della membrana nucleare e soprattutto possiedono aumentata espressione di citochine infiammatorie, fattori di crescita e proteasi, che insieme vanno a costituire il SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Questo specifico fenotipo cellulare, strettamente associato ad alterazioni delle normali funzioni cellulari, è in grado di agire anche in maniera paracrina, causando danni tissutali e di organo. L'infiammazione causata da SASP ha un ruolo chiave nello sviluppo di alterazioni a livello della matrice extracellulare che portano alla progressione di patologie infiammatorie croniche e/o degenerative. Le cellule senescenti diventano più suscettibili ad ulteriori deterioramenti quando sottoposti ad agenti "stressori" e quindi non sorprende l'idea che le cellule senescenti possono essere prodotte dalla patologia stessa. Alla luce di queste premesse, l'uso di farmaci senolitici capaci di indurre selettivamente la morte delle cellule "invecchiate" (apoptosi



selettiva) può essere considerato uno strumento utile per intervenire nel trattamento di patologie croniche legate all'invecchiamento. La rimozione delle cellule senescenti potrebbe evitare la loro trasformazione in senso neoplastico; i farmaci senolitici, come il dasatinib, un inibitore delle fosfochinasi,

si è dimostrato abile a migliorare le funzioni cardiache e vascolari in un modello animale di invecchiamento cellulare.

Recentemente, la senescenza cellulare è stata associata alla patologia epatica umana, infatti la senescenza negli epatociti causa modificazioni del profilo secretorio delle cellule epatiche che promuove la migrazione dei macrofagi e l'aumento della steatosi. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato la stretta relazione tra senescenza epatica e progressione clinica della NAFLD in NASH, dovuto ad un aumento della sintesi del glucosio, dell'ossidazione degli acid grassi, associati ad alterazioni a carico del metabolismo lipidico. Questi dati sperimentali supportano lo sviluppo di nuove terapie che hanno come target le cellule senescenti per il trattamento della NASH.

Molti principi attivi estratti da vegetali possiedono proprietà senolitiche; la quercetina, ad esempio, principio attivo di alimenti come mele, cipolle, capperi, etc. è un potente antinfiammatorio con spiccate proprietà senolitiche. La genisteina, allo stesso modo, possiede un'ampia gamma di proprietà farmacologiche: induce l'apoptosi di cellule senescenti e l'inibizione della proliferazione cellulare. Un'altra molecola utilizzata come farmaco naturale per la rimozione delle cellule senescenti è il resveratrolo, composto presente soprattutto nell'uva e nel vino, dotato di proprietà antiossidanti.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

**Obiettivo specifico 1:** studiare gli effetti di molecole senolitiche naturali in vitro su linee cellulari di carcinoma coloretale ed epatico. Lo studio sulle cellule in coltura consentirà di valutare, gli effetti dei senolitici sui principali biomarcatori di senescenza cellulare.

La senescenza delle cellule SW480 ed HepG2 sarà indotta con Doxorubicina alla concentrazione di 75 nM. Le cellule senescenti saranno caratterizzate per i loro cambiamenti morfologici, produzione di ROS e presenza di alte concentrazioni di beta-Galattosidasi. Successivamente, le cellule saranno trattate con diverse concentrazioni di Quercetina e/o Resveratrolo (senolitici naturali, nel range 20-100 µM) e confrontati con farmaci noti per la loro attività senolitica (Dasatinib, K5, etc.). Gli



effetti dei senolitici naturali saranno valutati studiando i livelli dei principali biomarcatori di senescenza cellulare.

**Obiettivo specifico 2:** valutare gli effetti del trattamento con senolitici sull'attività metabolica delle cellule trattate, studiando in particolare i pathways coinvolti nel metabolismo lipidico, glucidico ed energetico.

Lo studio del metabolismo cellulare dopo trattamento con i farmaci senolitici sarà effettuata studiando i principali metaboliti della glicolisi e del pathway degli acidi grassi attraverso l'analisi del metabolismo energetico della cellula.

**Obiettivo specifico 3:** valutare gli effetti dei senolitici naturali sulla variazione del profilo lipidomico della membrana cellulare.

Le cellule in coltura trattate con i senolitici saranno sottoposte ad analisi lipidomica per valutare possibili cambiamenti del profilo lipidomico di membrana.

## DATI PRELIMINARI

E' noto che i polifenoli sono in grado di modulare la crescita e la proliferazione di linee cellulari in coltura. Studi nel nostro laboratorio hanno dimostrato che i principali polifenoli dell'olio d'oliva l'idrossitirosole e l'oleuropeina, così come una miscela di polifenoli estratti dall'uva sono in grado di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali in maniera significativa, bloccando le cellule nella fase S del loro ciclo cellulare. Gli effetti antiproliferativi dei polifenoli dell'olio d'oliva sono stati anche dimostrati su un modello animale di carcinogenesi colo-rettale, inibendo la crescita e lo sviluppo dei polipi intestinali in topi APCMin+.

Lo studio con i polifenoli dell'uva ha dimostrato la capacità di questi polifenoli di inibire la proliferazione e la crescita di cellule di adenocarcinoma coloretale, così come influenzare la morfologia delle stesse cellule, inibendo la loro capacità di migrazione. Inoltre, anche il trial clinico effettuato con uva ha dimostrato che l'assunzione giornaliera di uva ha effetti antitrombotici ed è in grado di modificare il profilo lipidomico dei soggetti trattati con una dieta arricchita di uva. In particolare, l'uva nella dieta, determinava la down-regolazione dell'espressione sierica dei miRNAs, metabolicamente correlati al "metabolismo del cancro del tratto gastroenterico".

Gli studi di lipidomica effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che alterazioni del profilo lipidomico delle membrane cellulari siano strettamente associate all'aumento della loro attività proliferativa e a deficit funzionali. Pertanto, qualsiasi intervento che



vada a migliorare i livelli dei lipidi nelle membrane si traduce in un vantaggio funzionale della singola cellula e dell'intero organismo.

Infine, sono in corso nel nostro laboratorio esperimenti in vitro finalizzati a studiare gli effetti di una miscela polifenolica di un sottoprodotto della filiera vitivinicola, la cosiddetta vinaccia. La vinaccia ha dimostrato attività antiproliferativa e pro-apoptotica in cellule umane di carcinoma coloretale.

Alla luce di queste evidenze sperimentali, testare le capacità senolitiche di molecole naturali, quali la quercetina che è un flavonoide appartenente alla classe dei flavonoli, e il resveratrolo, molecola polifenolica non flavonoide, sarà interessante per elucidare i meccanismi molecolari che correlano la dieta e lo sviluppo di patologie neoplastiche gastrointestinali.

## **METODOLOGIE E ANALISI STATISTICHE**

### **Colture cellulari**

Le cellule umane SW480 ed HepG2 saranno coltivate utilizzando un terreno di coltura specifico ed incubate a 37°C e in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. La senescenza cellulare sarà indotta, secondo protocollo, con doxorubicina per 5 giorni.

### **Valutazione della senescenza cellulare**

Lo studio della senescenza sarà effettuato con un pannello di anticorpi capace di individuare i principali markers di senescenza cellulare. Verranno utilizzati il Kit di Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) Sampler Kit e/o Senescence Marker Antibody Sampler Kit forniti dalla Cell Signaling.

### **Trattamento delle cellule**

Le cellule in coltura verranno trattate con differenti concentrazioni di senolitici naturali (quercetina, resveratrolo). Dopo 24 ore e 48 ore di trattamento, le cellule verranno pellettate per le analisi di espressione genica e proteica, nonché per valutare il profilo lipidomico di membrana.

### **Vitalità cellulare**

La citotossicità delle sostanze saggiate negli esperimenti verrà valutata attraverso il test colorimetrico 3-(4,5 di-metiltiazol-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 CO<sub>2</sub>. Alla fine del periodo di incubazione, il medium viene rimosso e i restanti cristalli di blu formazano vengono solubilizzati con isopropanolo acido (0.1N HCl). La conversione dell'MTT in formazano da parte delle cellule metabolicamente attive viene misurata spettrofotometricamente ad una densità ottica di 570 nm.

### **Espressione genica e proteica**

L'espressione genica e proteica sarà effettuata su cellule in coltura trattate con i senolitici. Saranno valutati i livelli di mRNA e proteine delle principali proteine coinvolte nei processi di proliferazione, apoptosi e senescenza cellulare usando rispettivamente la PCR quantitativa (qPCR) con SYBR green e l'analisi di Western Blotting.

L'RNA totale cellulare viene estratto usando il Tri-Reagent (Mol. Res. Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA). L'RNA totale estratto sarà retrotrascritto. La trascrizione inversa (RT) viene effettuata in 20 l di volume finale a 42°C per 30', usando l'iScript Advanced cDNASynthesis kit (Bio-Rad, Milano, Italia). Real-time PCR viene effettuata in 25 l di volume finale contenente 2 l di cDNA, la master mix con SYBR Green (iQ SYBR Green SupermixBio-Rad, Milano, Italia) e i primers senso e antisenso di ogni gene. Il gene della -actina verrà utilizzato come controllo interno e come gene di riferimento in quanto housekeeping.

Per quanto riguarda l'analisi di Western Blotting, le cellule saranno raccolte e lisate in ghiaccio in RIPA buffer (Pierce Ripa buffer, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Dopo l'omogenizzazione e la centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C, la concentrazione delle proteine viene misurata tramite dosaggio Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia). Aliquote di 50 g di proteine totali sono separate in un 4-12% pre-cast gel di poliacrilammide (Invitrogen, Life Technologies, OR, USA) e trasferite su una membrana PVDF (Bio-Rad, Milano, Italia) mediante il Transblot Turbo (Bio-Rad, Milano, Italia). L'espressione di tutte le proteine da testare sarà valutata con anticorpi specifici e la loro rilevazione sarà effettuata mediante chemiluminescenza (ECL, ThermoScientific, Rockford, IL, USA) e mediante il Molecular Imager Chemidoc (Bio-Rad, Milano, Italia).

### **Analisi lipidomica**

L'analisi lipidomica sarà effettuata sulle membrane delle cellule in coltura. Gli acidi grassi, estratti mediante il Fatty Acid Extraction Kit della Sigma Aldrich, saranno derivatizzati e analizzati con un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici ottenuti saranno individuati confrontandoli con cromatogrammi di acidi grassi- metil esteri, usati come standards.



### Studio del metabolismo cellulare

La valutazione del metabolismo energetico cellulare, così come lo studio dell'ossidazione degli acidi grassi e della glicolisi nelle cellule trattate saranno effettuate con una piattaforma in real-time.

### Studio della morfologia cellulare

Lo studio della morfologia delle cellule SW480 ed HepG2 sarà effettuato mediante l'utilizzo di un microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FE-SEM). Le cellule vengono fissate con 3% gluteraldeide in PBS ed incubate a t.a. in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>). Dopo diversi lavaggi con 0.005 M di sodium cacodylate pH 7.2, vengono idratate con acetone per 10 minuti ed adese usando 208HR High Resolution Sputter Coater. Le cellule così fissate vengono osservate al microscopio Zeiss Sigma (FE-SEM) e le immagini vengono successivamente acquisite a tensione continua (constant Extra-High Tension (EHT) in un range di valori da 1.8 a 3 mm.

### Analisi statistica

I dati saranno presentati come media e SD, salvo diversa indicazione. Le differenze fra i gruppi di trattamento saranno analizzate con l'analisi della varianza (ANOVA) e Tukey's post test. I valori di  $P < 0.05$  saranno considerati statisticamente significativi. Per l'analisi statistica sarà utilizzato il software STATA 13.

## RISULTATI ATTESI

- Acquisizione di ulteriori conoscenze circa gli aspetti clinici, fisiopatologici e molecolari che sono alla base dell'azione dei senolitici naturali.
- Individuazione di nuovi biomarcatori di senescenza cellulare
- Pubblicazioni scientifiche su riviste con I.F.

## INNOVAZIONI

I risultati attesi dallo studio potrebbero essere rilevanti per la salute umana e fornire la base scientifica per validare l'uso di agenti senolitici naturali nel contrastare e prevenire i processi di invecchiamento cellulare che predispongono a patologie degenerative e al cancro.





## BIBLIOGRAFIA

1. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-1435. doi:10.1038/nm.4000
2. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
3. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77. doi:10.1083/jcb.201708092
4. Melo Pereira S, Ribeiro R, Logarinho E. Approaches towards Longevity: Reprogramming, Senolysis, and Improved Mitotic Competence as Anti-Aging Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4):938. Published 2019 Feb 21. doi:10.3390/ijms20040938
5. Gigante I, Milella RA, Tutino V, Debiase G, Notarangelo L, Giannandrea MA, De Nunzio V, Orlando A, D'Alessandro R, Caruso MG, Notarnicola M. Autumn Royal and Egnatia grape extracts differently modulate cell proliferation in human colorectal cancer cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020, 20(10), pp. 1740–1750
6. Tutino V, Gigante I, Milella RA, De Nunzio V, Flamini R, De Rosso M, Scavo MP, Depalo N, Fanizza E, Caruso MG, Notarnicola M. Flavonoid and non-flavonoid compounds of Autumn Royal and Egnatia grape skin extracts affect membrane PUFA's profile and cell morphology in human colon cancer cell lines. *Molecules* 2020, 25, 3352
7. Tutino V, De Nunzio V, Milella RA, Gasparro M, Cisternino AM, Gigante I, Lanzilotta E, Iacovazzi PA, Lippolis A, Lippolis T, Caruso MG, Notarnicola M. Impact of fresh table grape intake on circulating microRNAs levels in healthy subjects: a significant modulation of gastrointestinal cancer-related pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 2021, Sep 8;e2100428. doi: 10.1002/mnfr.202100428
8. Notarnicola M, De Nunzio V, Lippolis T, Tutino V, Cisternino AM, Iacovazzi PA, Milella RA, Gasparro M, Negro R, Polignano M, Caruso MG. Beneficial Effects of Table Grape Use on Serum Levels of Omega-3 Index and Liver Function: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Biomedicines* 2022,10,2310.
9. Caponio GR, Lippolis T, Tutino V, Gigante I, De Nunzio V, Milella RA, Gasparro M, Notarnicola M. Nutraceuticals: Focus on Anti-Inflammatory, Anti-Cancer, Antioxidant Properties in Gastrointestinal Tract. *Antioxidants*, 2022, 11(7), 1274.



**TIMELINE**

Attività	I anno												II anno												III anno											
Studi <i>in vitro</i>	[Red]												[Red]												[Red]											
Studio del fenotipo senescente	[Blue]												[Blue]												[Blue]											
Analisi Lipidomica	[Yellow]												[Yellow]												[Yellow]											
Analisi dell'espressione genica e proteica	[Green]												[Green]												[Green]											
Analisi del metabolismo cellulare	[Orange]												[Orange]												[Orange]											
Analisi dei dati		[Green]											[Green]												[Green]											
Preparazione lavori scientifici	[White]												[Blue]												[Blue]											



## TITOLO DEL PROGETTO

**CAMBIAMENTI NEL PROFILO LIPIDOMICO, IMMUNOLOGICO E DEI MICRORNA CIRCOLANTI IN PAZIENTI CON PATOLOGIA EPATO-BILIARE, AFFETTI DA OBESITÀ PATOLOGICA SOTTOPOSTI AD UN INTERVENTO DIETETICO E/O AD INTERVENTO DI CHIRURGIA BARIATRICA**

**Ricercatori responsabili:** Rossella Donghia

**Settore di ricerca:** Studio Trasversale e Longitudinale

**Parole chiave del progetto:** Obesità, Chirurgia Bariatrica, Dieta, Lipidomica, miRNAs.

## INTRODUZIONE

L'obesità è una malattia cronica caratterizzata fenotipicamente da un incremento del peso corporeo ( $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$ ) ed da una serie di patologie associate [1], come ipertensione, diabete, steatosi epatica, che compromettono la sopravvivenza del paziente affetto e la sua qualità di vita. L'origine multifattoriale dell'obesità rende la sua eziopatologia difficile da gestire con un'unica strategia terapeutica, soprattutto nel lungo termine. Un trattamento appropriato affinché il paziente possa godere di un notevole calo ponderale è la chirurgia bariatrica. A questo approccio deve essere associato un team multidisciplinare (il medico, il dietista, lo psicologo e il chinesiologo) affinché il paziente possa migliorare sensibilmente il suo stato di salute.

L'obesità si associa spesso con patologie epato-biliari, diagnosticate in circa il 75% dei pazienti in sovrappeso; fra questi, il 90-95 % è affetto da NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease), ma possono presentarsi anche patologie che coinvolgono la colecisti e i dotti biliari [2-5].

Ci sono pochi studi che descrivono le complicanze della chirurgia bariatrica in pazienti con tali disordini, ma sicuramente le tecniche mininvasive sono da preferire al fine di evitare complicanze, decompensazione epatica e mortalità post-operatoria [6-9].

Pertanto, le tecniche chirurgiche maggiormente adoperate nella comune pratica clinica sono i palloni intragastrici, il by pass gastrico (RYGB) e la sleeve gastrectomy [10].



La scelta del medico chirurgo è vincolante alla scelta di un intervento piuttosto che dell'altro.

Ogni paziente obeso che si affaccia dall'Ambulatorio di Nutrizione e con diagnosi di patologia epato-biliare (steatosi epatica, calcolosi della colecisti o infiammazione dei dotti biliari), diagnosticata mediante ecografia dell'addome completo e Fibroscan, verrà indirizzato verso la procedura più idonea al suo status di salute, ed ove questo non sia possibile con le tecniche chirurgiche sopra citate, si procederà con il trattamento mediante somministrazione di una dieta, perchè questi pazienti hanno un comportamento alimentare alterato (iperfagia, gorging, sweet eating, grazing, snacking).

La perdita di peso è solo l'aspetto fenotipico di un cambiamento metabolico che interessa la fisiologia cellulare.

L'analisi lipidomica sarebbe utile, in questo caso per valutare la composizione degli acidi grassi e delle membrane di un organismo, nonché comprendere l'alterazione dei pathway cellulari coinvolti [11-12]. Al profilo lipidomico si aggiungerà il dosaggio delle lipoproteine piccole e dense (sdLDL) che sono più comuni in alcune dislipidemie [13] e possono essere ossidate più facilmente rispetto alle LDL più grandi le quali LDL ossidate nella parete cellulare, stimolano la produzione di citochine e fattori di crescita, con conseguente reclutamento di monociti.

Da un punto di vista biologico, l'obesità, nonché l'alterazione del metabolismo, comporta oltre ad una variazione del pattern lipidomico, anche del pattern infiammatorio, con disregolazione delle citochine circolanti e la modificazione dell'espressione dei microRNA circolanti che dalla letteratura emerge siano associate all'insulino-resistenza nonché all'alterazione dell'omeostasi del glucosio, e regolatori della funzione endocrina [14].

Il tessuto adiposo possiede numerose funzioni endocrine, in grado di stimolare una risposta infiammatoria da parte dei linfociti T regolatori e dei macrofagi. L'attivazione di queste cellule immunitarie determina la secrezione di citokine pro-infiammatorie, come TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 [15-18].

Nei pazienti obesi è stata osservata la presenza di elevati livelli di citokine pro-infiammatorie in circolo, che possono determinare l'instaurarsi di un microambiente infiammatorio in diversi distretti corporei [19-21]. Studi in letteratura hanno dimostrato che la perdita di peso ottenuta con metodi terapeutici dietetici o chirurgici può produrre risultati diversi nella sintesi dei mediatori dell'infiammazione [22]. Pertanto, studi futuri



si rendono necessari per determinare il ruolo predittivo dei mediatori dell'infiammazione nei pazienti sottoposti a intervento di chirurgia bariatrica.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

L'avvio del progetto comprenderà la stesura del protocollo da sottomettere al Comitato Etico per l'eventuale approvazione.

In un primo step il paziente affetto da sovrappeso o obesità patologica, con associata patologia epato-biliare (criterio di inclusione per lo studio stesso), verrà valutato da un'equipe multidisciplinare che comprende il medico esperto in obesità, il medico chirurgo, il gastroenterologo, il dietista, il chinesio e lo psicologo, seguendo quanto descritto nel "Percorso diagnostico terapeutico assistenziale per il Trattamento integrato del paziente obeso (P.D.T.A)" dell'ente (Delibera n. 992/2022 del 27/10/2022). In seguito allo screening iniziale che consentirà l'inquadramento del paziente dal punto di vista clinico, sarà indirizzato alla procedura bariatrica (Gruppo 2 "Caso") oppure, se non idoneo verrà indirizzato verso un percorso nutrizionale (Gruppo 1 "Controllo"). Oltre ad una serie di valutazioni basate sulla somministrazione di questionari validati e presenti nelle linee guida, i pazienti saranno sottoposti a prelievo ematico, che oltre a valutare quantitativamente i parametri ematici clinicamente validati utili per il percorso terapeutico, andrà a valutare pattern-omici, infiammatori e i miRNA circolanti.

La scelta del prelievo ematico e di esami diagnostici è basata sulla propensione del paziente a ritornare in un tempo successivo, trattandosi di tecniche non invasive e non dolorose. Questo sarà possibile mediante il coordinamento dei laboratori e dei reparti dell'IRCCS "S. de Bellis".

La valutazione strumentale verterà su una ecografia dell'addome completa, mentre l'utilizzo del Fibroscan sarà utile per indagare in maniera più approfondita la funzionalità epatica, essendo una tecnica non invasiva e con una buona ripetibilità. Infatti, dati pubblicati in letteratura suggeriscono che la CAP (Parametro di Attenuazione Controllata) può essere confrontata persino con la biopsia epatica per la quantificazione della steatosi [23-24].

Verranno valutati i profili lipidomici quantificandoli con il software Cromequest. Dei 37 profili, si distingueranno gli acidi grassi saturi (SFA), i monoinsaturi (MUFA) e i polinsaturi (PUFA). Inoltre la loro quantificazione, consentirà di calcolare degli indici il cui rapporto è dato da particolari acidi grassi, consentendo di valutare il corretto



funzionamento delle vie biosintetiche. A questi lipidi si aggiungeranno le analisi delle lipoproteine piccole e dense (sdLDL).

La valutazione delle citochine infiammatorie circolanti, permetterà di classificare i gruppi di studio sulla base di un profilo immunologico ben distinto; inoltre, l'osservazione longitudinale dei mediatori dell'infiammazione, basata sul follow-up, fornirà ai clinici informazioni sullo stato immunologico del paziente nel tempo. I dati immunologici saranno poi associati con i parametri clinici e di laboratorio (profili lipidomici e valutazione dei miRNA circolanti) al fine di individuare una possibile interazione tra i diversi parametri. Infine, l'individuazione di biomarcatori dal possibile valore predittivo, getterà le basi per studi futuri sui pazienti obesi con patologie epato-biliari, sottoposti a intervento chirurgico, aventi come target terapeutico specifici marcatori dell'infiammazione.

La valutazione dell'espressione miRNA circolanti verrà effettuata mediante array di Real-time PCR e ci consentirà di identificare i miRNA differenzialmente espressi tra i gruppi analizzati. Si procederà, quindi, con l'individuazione dei target computazionali dei miRNA mediante diversi programmi bioinformatici. I livelli di espressione dei miRNA identificati saranno, in seguito, associati con i parametri clinici dei pazienti analizzati.

### **Obiettivo specifico 1**

Valutare la differenza dei parametri lipidomici, immunologici e genetici nei pazienti che si sottopongono ad intervento nutrizionale (non idonei all'intervento) rispetto a coloro che verranno sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica.

La prima fase prevede la creazione di due gruppi indipendenti di pazienti che afferiscono all'ambulatorio di nutrizione e hanno ricevuto diagnosi di patologia epato-biliare. Questa prima valutazione che avverrà con l'ausilio del team multidisciplinare, consentirà di valutare se i pazienti saranno indirizzabili verso il trattamento nutrizionale o la chirurgia bariatrica. Avendo in letteratura una eterogeneità di lavori basati sullo studio di efficacia della chirurgia bariatrica ma pochi su specifici profili lipidici che verranno qui analizzati, la grandezza campionaria verrà stimata come 30 pazienti per braccio ovvero un campione totale di  $n=60$ . L'utilizzo di tale strategia consente di calcolare seppur in modo fittizio, la grandezza minima del campione, rispettando il rigore metodologico del teorema del limite centrale, consentendo cioè, di avere almeno teoricamente una distribuzione normale dei parametri analizzati.





## Obiettivo specifico 2

Valutare la variazione dei parametri lipidomici, immunologici e genetici durante il follow-up, in entrambi i gruppi.

La seconda fase prevederà il dosaggio del profilo lipidomico, immunologico e dei miRNA circolanti al fine di cominciare a valutare un possibile cluster di molecole nei due bracci di trattamento durante il follow-up.

## Obiettivo specifico 3

Valutare il valore predittivo del patter lipidomico, immunologico e di microRNAs, dell'aumento di peso post-intervento in pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica.

L'ultima fase prevederà oltre ad incrementare i dati di follow-up dell'obiettivo 2 anche quello di costruire modelli predittivi dell'incremento di peso post-intervento nel gruppo dei pazienti trattati ed individuare tra le molecole dosate il predittore migliore o il cluster di predittori per predire questo outcome, anche mediante tecniche di machine learning.

## RISULTATI ATTESI

Questo progetto si propone di definire un profiling comune, ma anche personalizzato dei pazienti affetti da obesità patologica ed individuare terapie mirate al fine di migliorarne lo stato di salute.

## INNOVAZIONI

Questo studio rappresenta un'innovazione perché è la prima volta che il nostro Istituto, grazie all'attivazione del Centro di Chirurgia Bariatrica consente di effettuare queste prestazione e quindi studiare l'obesità patologica da un punto di vista non solo clinico ma anche chirurgico e sperimentale.

## BIBLIOGRAFIA

[1] Bischoff S.C.; Schweilin A. Obesity therapy. Clin Nutr ESPEN. 2020;38:9-18.



[2] Cerreto M.; Santopaolo F.; Gasbarrini A.; Maurizio Pompili M.; Ponziani F.P. Bariatric surgery and liver disease: general considerations and role of the gut-liver axis. *Nutrients*. 2021;13(8):2649.

[3] Neuschwander-Tetri, B. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. In *Handbook of Liver Disease*, 3rd ed.; Friedman, L.S., Keeffe, E.B., Eds.; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 106–114.

[4] Sasaki, A.; Nitta, H.; Otsuka, K.; Umemura, A.; Baba, S.; Obuchi, T.; Wakabayashi, G. Bariatric surgery and non-alcoholic fatty liver disease: Current and potential future treatments. *Front. Endocrinol.* 2014, 5, 164.

[5] Subichin, M.; Clanton, J.; Makuszewski, M.; Zografakis, J.G.; Dan, A. Liver disease in the morbidly obese: A review of 1000 consecutive patients undergoing weight loss surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2015, 11, 137–141.

[6] Dallal, R.M.; Mattar, S.G.; Lord, J.L.; Watson, A.R.; Cottam, D.R.; Eid, G.M.; Hamad, G.; Rabinovitz, M.; Schauer, P.R. Results of laparoscopic gastric bypass in patients with cirrhosis. *Obes. Surg.* 2004, 14, 47–53.

[7] Shimizu, H.; Phuong, V.; Maia, M.; Kroh, M.; Chand, B.; Schauer, P.R.; Brethauer, S.A. Bariatric surgery in patients with liver cirrhosis. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2013, 9, 1–6.

[8] Minambres, I.; Rubio, M.A.; de Hollanda, A.; Breton, I.; Vilarrasa, N.; Pellitero, S.; Bueno, M.; Lecube, A.; Marcuello, C.; Goday, A.; et al. Outcomes of bariatric surgery in patients with cirrhosis. *Obes. Surg.* 2019, 29, 585–592.

[9] Wolter, S.; Duprée, A.; Coelius, C.; El Gammal, A.; Kluwe, J.; Sauer, N.; Mann, O. Influence of Liver Disease on Perioperative Outcome After Bariatric Surgery in a Northern German Cohort. *Obes. Surg.* 2017, 27, 90–95.

[10] Neff K.J.H.; le Roux C.W. Bariatric surgery: a best practice article. *J Clin Pathol.* 2013;66(2):90-8.

[11] Lange M.; Angelidou G.; Ni Z.; Crisuolo A.; Schiller J.; Blüher M.; Ferrodova M. AdipoAtlas: a reference lipidome for human white adipose tissue. *Cell Rep Med.* 2021;2(10):100407.

[12] Mir S.A.; Chen L.; Burugupalli S.; Burla B.; Ji S.; Smith A.A.T.; Narasimhan K.; Ramasamy A.; Tan K.M.L.; Huynh K.; Giles C.; Mei D.; Wong G.; Yap F.; Tan K.H.; Collier F.; Saffery R.; Vuillermin P.; Bendt A.K.; Burgner D.; Ponsonby A.L.; Lee Y.S.;



Chong Y.S.; Gluckman P.D.; Eriksson J.G.; Meikle P.J.; Wenk M.R.; Karnani N.  
Population-based plasma lipidomics

reveals developmental changes in metabolism and signatures of obesity risk: a mother-offspring cohort study. *BMC Med.* 2022;25;20(1):242.

[13] Ivanova E.A., Myasoedova V.A.; Melnichenko A.A.; Grechko A.V.; Orekhov A.N.  
Small dense low-density lipoproteina as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;1273042.

[14] Sangiao-Alvarellos S.; Theofilatos K.; Barwari T.; Gutmann C.; Takov K.; Singh B.; Juiz-Valiña P.; Varela-Rodríguez B. M.; Outeiriño-Blanco E.; Duregotti E.; Zampetaki A.; Lunger L.; Ebenbichler C.; Tilg H.; García-Brao M.J.; Willeit P.; Mena E.; Kiechl S.; Cordido F.; Mayr M. Metabolic recovery after weight loss surgery is reflected in serum microRNAs. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020;8(2):e001441.

[15] Roubert A.; Gregory K.; Li Y.; Pfalzer A.C.; Li J.; Schneider S.S.; Wood R.J.; Liu Z.  
The influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the tumorigenic Wnt-signaling pathway in human mammary tissue from obese women. *Oncotarget.* 2017;8(22):36127-36136.

[16] Fischer-Posovszky P.; Wabitsch M.; Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res.* 2007;39(5):314–21.

[17] Tilg H.; Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772–83.

[18] Hotamisligil G.S.; Shargill N.S.; Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87–91.

[19] Ramos E.J.; Xu Y.; Romanova I.; Middleton F.; Chen C.; Quinn R.; Inui A.; Das U.; Meguid M.M. Is obesity an inflammatory disease? *Surgery.* 2003;134(2):329–35.

[20] Harvie M.; Hooper L.; Howell A.H. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev.* 2003;4(3):157–73.

[21] Carmichael A.R. Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev.* 2006;7(4):333–40.

[22] Bantulà M.; Tubita V.; Roca-Ferrer J.; Mullol J.; Valero A.; Bobolea I.; Pascal M.; de Hollanda A.; Vidal J.; Picado C.; Arismendi E. Differences in Inflammatory Cytokine

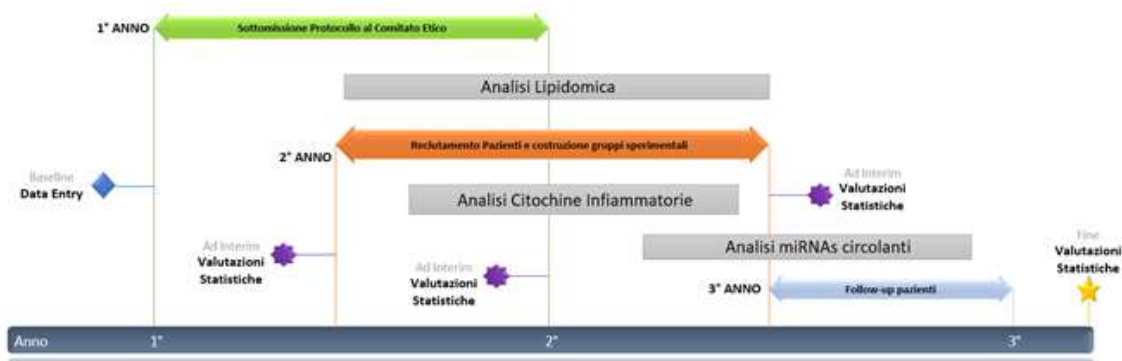


Profile in Obesity-Associated Asthma: Effects of Weight Loss. *J Clin Med.* 2022;29;11(13):3782.

[23] Franco I.; Bianco A.; Mirizzi A., Campanella A., Bonfiglio C., Sorino P., Notarnicola M.; Tutino V.; Cozzolongo R.; Giannuzzi V.; Aballay L.R.; Buongiorno C., Bruno I., Osella A.R. Physical activity and low glycemic index mediterranean diet: main and modification effects on NAFLD Score. Results from a randomized clinical trial. *Nutrients.* 2020;13(1):66.

[24] Singh, S.; Muir, A.J.; Dieterich, D.T.; Falck-Ytter, Y.T. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the Role of Elastography in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2017, 152, 1544–1577.

## TIMELINE





## TITOLO DEL PROGETTO

### **VALUTAZIONE DELLA PERMEABILITÀ INTESTINALE NEL PAZIENTE CON OBESITÀ E NAFLD: IMPATTO DELLA DIETA CHETOGENICA SUI MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI DI EPATOPATIA**

**Ricercatori responsabili:** Giovanni De Pergola

**Settore di ricerca:** Malattie Endocrine e Metaboliche

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

## INTRODUZIONE

La barriera intestinale è un sistema complesso multistrato, composto da una barriera fisica esterna e una barriera immunologica interna. L'interazione di queste due componenti consente di mantenere una equilibrata funzione di barriera intestinale. Questa previene la perdita di acqua ed elettroliti e l'ingresso di antigeni e microrganismi, consente lo scambio di molecole tra ospite e ambiente e l'assorbimento di sostanze nutritive dalla dieta. Molti fattori possono alterare la funzione di barriera intestinale come le modifiche del microbiota intestinale, le alterazioni dello strato mucoso e i danni a carico dell'epitelio, con conseguente traslocazione del contenuto luminale negli strati interni delle cellule epiteliali intestinali. Il microbiota intestinale interagisce strettamente con l'epitelio intestinale, con il sistema immunitario e nervoso, formando l'asse batteri-intestino-cervello. La rottura dell'equilibrio finemente sintonizzato tra microbiota e ospite è chiamato disbiosi e può contribuire alla perdita di integrità epiteliale, all'aumento della permeabilità intestinale (PI) e all'indebolimento dei meccanismi di difesa. A seguito di aumento dell'PI indotto da disbiosi, batteri, prodotti e metaboliti, come LPS, possono permeare la barriera epiteliale innescando una risposta infiammatoria [1]. I difetti della barriera intestinale, che includono l'aumento della permeabilità epiteliale, promuovono il trasferimento di antigeni degli alimenti o batterici attraverso la mucosa intestinale, alterando le risposte delle cellule immuni della mucosa stessa ed inducendo infiammazione locale e sistemica. Le citochine pro-infiammatorie prodotte localmente possono anche indurre disregolazione delle tight



junctions, coinvolte nel controllo del flusso paracellulare, inducendo un circolo vizioso locale pro-infiammatorio.

La sindrome da alterata permeabilità intestinale (leaky gut) che ne deriva non concerne soltanto le patologie gastrointestinali, ma si estende anche a patologie metaboliche, come per esempio la obesità. Un recente studio di Genser et al. ha dimostrato che i pazienti obesi manifestano alterazioni delle “tight junctions” a carico dell’epitelio del digiuno, che si associano ad aumento dei livelli circolanti di sostanze quali la zonulina e la LPS-binding globulin, tipico delle alterazioni della barriera intestinale, e simultanea riduzione delle concentrazioni ematiche di sostanze quali la occludina e tricellulina [2]. Non vi sono dati chiari circa la relazione tra permeabilità intestinale e composizione corporea nei soggetti obesi. Alcuni studi hanno dimostrato un’associazione tra aumentata PI e lo stato d’insulino-resistenza e le alterazioni metaboliche e cardiovascolari proprie della sindrome metabolica [3]. E’ interessante il dato che la resistenza all’azione dell’insulina è associata ad alterata permeabilità intestinale, anche indipendentemente dall’effetto della obesità sullo sviluppo della insulino-resistenza [4]. Per completezza, merita di essere riferito che non tutti gli studi condotti in pazienti obesi hanno osservato alterazioni della funzione della barriera intestinale ed aumento delle endotossine circolanti. Per quanto attiene agli effetti della restrizione calorica in tale ambito, uno studio ha esaminato gli effetti di un mese di trattamento con la very low calorie diet (800 kcal/die), dimostrando che questa ha indotto una riduzione della PI e dello stato infiammatorio generalizzato [5]. Non vi sono invece dati disponibili circa i possibili effetti della dieta chetogenica, modello caratterizzato da una quantità di carboidrati inferiore a 50 grammi al giorno e che induce un incremento della sensibilità insulinica epatica, indipendentemente dall’effetto della dieta ipocalorica e della perdita di peso [6].

La funzione e l'integrità della barriera intestinale possono essere misurate in modi diversi. Le tecniche utilizzati per queste valutazioni variano a seconda dell’ambiente (misurazioni in vitro vs in vivo), la specie (umani o animali), le molecole marker utilizzate (ioni, carboidrati di diverse dimensioni, macromolecole e antigeni, prodotti batterici), e i compartimenti utilizzati per la misurazione delle molecole marker (sangue o urina) [7]. Ciascuno metodo è specifico per una determinata sezione del tratto gastrointestinale e misura diversi aspetti funzionali e di integrità epiteliale dell'intestino. Valutazioni in vivo relative alla permeabilità e alla integrità della barriera intestinale nell'uomo sono attualmente possibili utilizzando differenti biomarcatori. Uno dei dosaggi più utilizzati è il test di permeabilità Lattulosio/Mannitolo, un test quantitativo non invasivo che misura direttamente la capacità di due molecole di zucchero non metabolizzate, lattulosio e mannitolo, di permeare la mucosa intestinale. Il lattulosio, un





disaccaride, è assorbito attraverso le giunzioni cellulari, mentre il mannitolo, un monosaccaride, è assorbito maggiormente attraverso le membrane delle cellule epiteliali. Una volta assorbiti, questi zuccheri vengono escreti non metabolizzati nelle urine, e la loro percentuale di escrezione è determinata mediante una metodica cromatografica. Il rapporto elevato Lattulosio/Mannitolo è un indicatore di disfunzione della permeabilità dell'intestino tenue. Altri zuccheri utilizzati per valutare la funzione di barriera intestinale includono il sucralosio e il saccarosio ed anche questi sono misurati nelle urine dopo somministrazione di una dose orale. Il grado di assorbimento del saccarosio e la sua successiva escrezione correla con la permeabilità gastroduodenale. Il sucralosio è resistente al metabolismo batterico nel colon e quindi è stato utilizzato per misurare la permeabilità del colon [8].

La barriera intestinale può essere considerata un sistema dinamico che risponde anche a segnali umorali e una pletora di differenti molecole è stata, a vario titolo, chiamata in causa. La zonulina è un peptide GI in grado di modulare la funzionalità delle tight junctions (TJs). E' stato dimostrato che i livelli di zonulina sierica correlano con l'entità della compromissione della barriera mucosale. Il danno cellulare e/o delle TJs può avere un notevole impatto sulla corretta funzione della PI. Le I-FABPs (intestinal-fatty acid binding proteins) sono proteine citosoliche presenti nelle cellule epiteliali deputate al trasporto degli acidi grassi. Possono essere rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana e sono rapidamente eliminate con le urine; pertanto, esse rappresentano markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell'epitelio intestinale. Allo stesso modo, la diamina ossidasi (DAO), un enzima intracellulare con elevato livello di attività nello strato superiore dei villi intestinali, è considerata un marker sierico di integrità dell'epitelio intestinale [9].

Le alterazioni della funzione di barriera possono favorire l'ingresso dei batteri e dei loro prodotti. Il lipopolisaccaride (LPS), componente predominante nella parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è risultato in grado di influenzare la funzione di barriera. In condizioni fisiologiche, LPS non è in grado di attraversare l'epitelio integro, ma, in presenza di una ridotta integrità epiteliale, riesce a attraversare la barriera GI. [10]. Il triptofano è un aminoacido essenziale, in quanto non è sintetizzato dall'uomo, ed i batteri commensali lo catabolizzano in diversi derivati, che vengono assorbiti dall'intestino ed eliminati con le urine. Due di questi composti, indossil solfato (altrimenti noto come indicano) e 3-metil-indolo (scatolo), sono attualmente utilizzati per formulare la diagnosi di disbiosi del piccolo intestino e del colon, rispettivamente [11].

E' stato suggerito che un'alterazione della barriera intestinale possa contribuire alla patogenesi della steatosi epatica non alcolica (NAFLD), patologia fortemente correlata



alla obesità [3]. In particolare, la maggiore esposizione epatica ai LPS batterici, derivati dalla eccessiva crescita di batteri gram-negativi e traslocati a seguito della maggiore permeabilità intestinale, favorirebbe la NAFLD dei pazienti con obesità [12]. Non sono disponibili chiare informazioni circa la relazione tra permeabilità intestinale e sia il grado di steatosi e sia il grado di una eventuale fibrosi nei soggetti con obesità. Infine, per quanto attiene ai modelli di dieta, studi recenti suggeriscono che gli individui che hanno una minore aderenza alla dieta mediterranea presentano una maggiore permeabilità intestinale.

## STATO DI AVANZAMENTO DEL PROGETTO (2° anno)

Oltre 20 pazienti obesi reclutati dallo studio sono stati sottoposti alle diverse valutazioni ematochimiche e strumentali previste dal protocollo, prima e dopo dieta chetogenica. Lo studio può pertanto essere considerato completo per quanto concerne molti aspetti. Peraltro, soltanto 14 dei pazienti reclutati sono stati sottoposti a valutazione della permeabilità intestinale prima e dopo dieta e, pertanto, lo studio necessita di ulteriori pazienti per raggiungere l'obiettivo

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

### Obiettivo specifico 1

Analizzare la influenza della obesità sulla permeabilità intestinale e sui diversi fenotipi di epatopatia (NAFLD, NASH), in termini di prevalenza e di effect size, in una popolazione di soggetti sani in eccesso ponderale.

Il primo obiettivo è quello di esaminare la influenza della obesità sulla prevalenza e sulla gravità dell'alterata permeabilità intestinale e dei diversi fenotipi di malattia cronica epatica (NAFLD, NASH) in una popolazione di soggetti obesi che non assumono abitualmente alcun tipo di farmaco, al fine di escludere l'interferenza di patologie associate alla obesità sullo stato di salute della barriera intestinale e del fegato. In particolare, l'integrità della barriera intestinale e la presenza ed il grado di steatosi e fibrosi epatica saranno esaminati in relazione a parametri di tipo clinico-laboratoristico-strumentale, inclusi variabili antropometriche, la composizione corporea (mediante densitometria), parametri energetici (mediante calorimetria indiretta), la insulino-resistenza, parametri ematochimici propri della sindrome metabolica e fattori circolanti pro-infiammatori, pro-fibrotici ed antifibrotici.



## Obiettivo specifico 2

Valutare l'impatto di un intervento dietetico di tipo ipocalorico e chetogenico, della durata di 6 settimane, sulle pathways coinvolte nella comparsa e nella progressione delle condizioni sopracitate (alterata permeabilità intestinale e fenotipi di epatopatia) nonché sui fattori di rischio ad esse associati.

Il secondo obiettivo è quello di valutare se un intervento dietetico di tipo ipocalorico e chetogenico, della durata di 6 settimane, possa influenzare le pathways coinvolte nella comparsa e nella progressione delle condizioni sopracitate (alterata permeabilità intestinale e fenotipi di malattia cronica epatica) nonché sui fattori di rischio secondari associati a tali esiti. Anche in questo caso saranno presi in considerazione gli stessi parametri antropometrici, della composizione corporea, energetici, ematochimici propri della sindrome metabolica e fattori circolanti pro-infiammatori, pro-fibrotici ed antifibrotici.

## DATI PRELIMINARI

Sono già disponibili i dati di circa 20 pazienti obesi relativi agli effetti della dieta chetogenica sui parametri che derivano dal fibroscan (steatosi e fibrosi epatica), sui parametri antropometrici e della composizione corporea e su numerosi parametri metabolici ed ormonali. Sono già evidenti numerosi effetti positivi della dieta chetogenica. Saranno a breve disponibili i dati relativi agli effetti della dieta chetogenica sulle citochine infiammatorie e sui fattori proinfiammatori e profibrotici. Alcune settimane saranno necessarie per completare i dati sulla permeabilità intestinale

## RISULTATI ATTESI

- 1) L'aumento del grado di obesità e del grasso addominale si associa ad un incremento della prevalenza e della gravità dell'aumento della permeabilità intestinale.
- 2) L'incremento del grado di obesità e del grasso addominale si associa ad un aumento della prevalenza e della gravità della steatosi e della fibrosi
- 3) L'incremento della permeabilità intestinale si associa ad un aumento della prevalenza e della gravità della steatosi e della fibrosi



- 4) L'aumento dei livelli circolanti dei fattori proinfiammatori e delle adipochine si associa ad una maggiore prevalenza e gravità dell'incremento della permeabilità e della steatosi epatica
- 5) L'aumento dei livelli circolanti dei fattori profibrotici si associa ad una maggiore prevalenza e gravità della fibrosi epatica
- 6) L'aumento dell'aderenza alla dieta mediterranea si associa ad una minore prevalenza e gravità sia dell'alterata permeabilità intestinale sia di steatosi e fibrosi epatica
- 7) La dieta chetogenica riduce il grado di alterazione sia della permeabilità intestinale sia della steatosi e fibrosi epatica

## INNOVAZIONI

- 1) nessuno studio è stato sinora realizzato in soggetti obesi sani, ossia che non assumo alcun farmaco in maniera cronica, al fine di esaminare simultaneamente permeabilità intestinale e steatosi e fibrosi epatica (mediante fibroscan)
- 2) nessuno studio è stato sinora realizzato in soggetti obesi sani al fine di esaminare la relazione tra permeabilità intestinale o steatosi e fibrosi epatica (mediante fibroscan) e variabili antropometriche, composizione corporea, parametri metabolici, marcatori d'infiammazione, adipochine, fattori profibrotici ed antifibrotici
- 3) nessuno studio ha sinora esaminato gli effetti della dieta chetogenica sulla permeabilità intestinale o sulla steatosi o fibrosi epatica in soggetti obesi

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Scaldaferri F et al. Journal of Clinical Gastroenterology 2012;46:S12-17, 2012
- 2) Genser L et al. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. J Pathol, 246: 217-230, 2018
- 3) Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. Am J Clin Nutr, 105: 127-135, 2017



- 4) Mkumbuzi Li, Mfengu MMO, Engwa GA, et al. Insulin resistance is associated with gut permeability without the direct influence of obesity in young adults. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 13: 2997-3008, 2020
- 5) Ott B, Skurk T, Hastreite L, et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Reports*, 7: 11955, DOI:10.1038/s41598-017-12109-9, 2017
- 6) Muscogiuri G et al. European Guidelines for Obesity Management in adults with a very low-calorie ketogenic diet: a systematic review and meta-analysis. *Obes Facts* 2021; 14: 222-245
- 7) Galipeau HJ et al. *Neurogastroenterol. Motil*, 28:957-965, 2016
- 8) Camilleri M, *Gut*, 68:1516-1526, 2019
- 9) Schoultz I et al. *Cells* 2020, 9,1909
- 10) Linsalata M et al. *Nutrients* 2021;13,1011
- 11) Linsalata M et al. *Disease Markers* 2020; ID 2886268
- 12) Ferro D, Baratta F, Pastori D, et al. New insights into the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: gut-derived lipopolysaccharides and oxidative stress. *Nutrients*, 12, 2762; doi:10.3390/nu12092762, 2020
- 13) Calabrese FM, Disciglio V, Franco I, Sorino P, Bonfiglio C, Bianco A, Campanella A, Lippolis T, Pesole PI, Polignano M, Vacca M, Caponio GR, et al. Low glycemic index mediterranean diet combined with aerobic physical activity rearranges the gut microbiota signature in NAFLD patients. *Nutrients*, 14(9), 1773, 2022



## TIMELINE

Work plane task	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Disegno e progettazione di studio	■	■											
Parere comitato etico		■	■										
Arruollamento		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Raccolta dati		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Inserimento dati ottenuti nel database elettronico		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Coordinamento, update e comunicazioni		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Analisi dati				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Monitoraggio, valutazione e implementazione							■	■	■	■	■	■	■
Scrittura lavori scientifici											■	■	■
Pubblicazione lavori scientifici												■	■





## TITOLO DEL PROGETTO

### **DIET-MAP: DIETA E DETERMINANTI METABOLICI NELLA CONVERSIONE DA PSORIASI AD ARTRITE PSORIASICA**

**Ricercatori responsabili:** Gaetana Laselva

**Settore di ricerca:** Reumatologia

**Parole chiave del progetto:** nutrizione, psoriasi, artrite psoriasica, sarcopenia, osteoporosi, epidemiologia, stato di salute

## INTRODUZIONE

La psoriasi è una malattia infiammatoria immunomediata e una delle malattie croniche della pelle più diffuse (0,1-12%) nel mondo. È caratterizzata da lesioni cutanee rosse, squamose e ispessite che possono verificarsi in qualsiasi sito del corpo. È una malattia multifattoriale con un'intima interazione tra suscettibilità genetica, stile di vita e ambiente. Numerose comorbidità sono riportate in letteratura, suggerendo che la psoriasi è una malattia sistemica piuttosto che una semplice malattia della pelle [1]. Le persone con psoriasi hanno un rischio aumentato di sviluppare malattie croniche intestinali e malattia celiaca. Il meccanismo esatto non è del tutto compreso, e anche se molte citochine pro infiammatorie giocano ruoli simili nelle malattie infiammatorie immunomEDIATE, le risposte ai trattamenti possono essere completamente diverse. I problemi di integrità nella psoriasi si trovano non solo nella pelle ma anche a livello intestinale [1]. L'aberrazione strutturale sotto forma di diminuzione della superficie nel digiuno è stata riportata nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani. Sono state segnalate anche altre aberrazioni, tra cui l'infiltrazione intestinale di linfociti. L'intolleranza al lattosio è significativamente più presente nella psoriasi ed è anche associata alla gravità psoriasica. La alterata permeabilità intestinale è stata segnalata nella psoriasi sulla base di un test di assorbimento dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) marcato con  $^{51}\text{Cr}$  e più recentemente attraverso un aumento dei livelli di proteine legate alla barriera come la claudina-3 e la proteina intestinale legante gli acidi grassi (I-FABP) nel siero [1]. Sono stati riscontrati livelli più alti di calprotectina fecale, correlati alla gravità della malattia, ed erano particolarmente aumentati quando era coinvolta l'infiammazione articolare. Un certo numero di studi ha



indagato il microbioma intestinale dei pazienti con psoriasi. Due studi hanno riportato un'abbondanza relativa più bassa di Bacteroidetes e più alta di Firmicutes nei pazienti con psoriasi rispetto ai controlli sani. Questi risultati suggeriscono un legame tra la psoriasi e la salute intestinale [1].

L'artrite psoriasica (AP) è una forma specifica di artrite infiammatoria associata alla psoriasi, solitamente caratterizzata dalla sieronegatività per il fattore reumatoide e da dolore, gonfiore, calore, rigidità articolare e a volte arrossamento. Questa condizione colpisce nella stessa misura uomini e donne, ma è stata rilevata sia per la prevalenza che per l'incidenza di AP una consistente variabilità geografica [2]. I dati più recenti sulla prevalenza della AP in Italia la attestano al 0.42% della popolazione adulta [3]. Circa 1 paziente su 4 con psoriasi sviluppa l'artrite psoriasica nel corso della sua vita. I pazienti con artrite psoriasica sono considerati più gravemente colpiti di quelli con psoriasi e spesso richiedono un trattamento sistemico [4]. La massima priorità per questi pazienti è quella di dare sollievo dal dolore, ma di fronteggiare le difficoltà date dalla fatigue, dal disagio psicologico. L'impatto della AP sembra essere infatti molto ampio, coprendo tutti gli aspetti della vita, ad es. sociali, fisici ed emotivi [5].

Lo stile di vita ha importanti implicazioni nella psoriasi (e quindi nella AP): il fumo e l'alcol, infatti, sono stati associati all'esacerbazione delle lesioni cutanee e anche a risposte non ottimali ai trattamenti, mentre l'obesità è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo della psoriasi. Inoltre, un'alimentazione ricca in grassi saturi e alimenti processati è stata associata alla riacutizzazione della psoriasi, mentre la riduzione del peso ha avuto un esito positivo sulla gravità della stessa [1]. Una migliore comprensione degli stili di vita e della qualità della stessa affrontati dai pazienti con AP potrebbe migliorare le traiettorie della conversione tra forma psoriasica non-artritica e artrite psoriasica [5].

Obiettivo: Indagare i pattern dietetici ed i marcatori nutrizionali ed antropometrici che influenzano la conversione in artrite psoriasica in una popolazione di pazienti con psoriasi dai 35 ai 65 anni afferenti agli ambulatori di nutrizione clinica, medicina interna dell'IRCCS e dei MMG della Casa Della Salute.

## OBIETTIVI SPECIFICI DELLO STUDIO

1. Indagare l'influenza della dieta (assunzione di differenti quantità di specifici nutrienti) sul livello ematico di differenti biomarcatori di infiammazione e sulla composizione corporea dei pazienti con artrite psoriasica



2. Definire un pattern dietetico peculiare, in grado di modificare la sintomatologia e le traiettorie di salute della popolazione in esame
4. Creare un modello clinico multidimensionale e multi parametrico di fragilità legata agli stili di vita (nutrizione, attività fisica etc.) che riesca a predire con accuratezza la traiettoria del paziente con psoriasi ed artrite psoriasica, per definire percorsi di intervento preventivi efficaci.
5. Descrivere correlati di imaging avanzato basato su tecnologia di densitometria ossea a bassissimo potere radiogeno, per la predizione di fenomeni degenerativi della massa muscolare e tessuto osseo associata al declino funzionale nei soggetti con psoriasi ed artrite psoriasica.
6. Indagare l'interplay tra fattori nutrizionali e metabolici e fenomeni microvascolari nei modelli coroidali tramite scansioni OCT-a e misura della soglia cocleare periferica, nella degenerazione artrosica della psoriasi.
7. Valutare la permeabilità intestinale e analizzare il microbioma intestinale dei pazienti in esame.

## DATI PRELIMINARI

È stato condotto uno studio osservazionale trasversale in una coorte di 211 pazienti con AP afferenti a 5 diverse Unità di Reumatologia: Università di Napoli Federico II, Università de L'Aquila, Università Campus Bio-Medico di Roma, Università di Roma Tor Vergata e Ospedale Sant'Andrea di Roma [6]. E' stata valutata l'attività della AP tramite l'indice di attività della malattia per l'artrite psoriasica (DAPSA) e l'indice composito di attività della malattia psoriasica (CPDAI). I criteri NCEP-ACT III sono stati utilizzati per identificare i soggetti con sindrome metabolica. Un questionario validato per la valutazione dell'aderenza alla dieta mediterranea (PREDIMED) è stato somministrato tutti i soggetti arruolati. I pazienti avevano un'età mediana di 55 (48-62) anni e la durata della malattia era di 76 (36- 120) mesi. Il 27,01% dei pazienti è stato classificato come affetto da sindrome metabolica. Un'aderenza moderata alla dieta mediterranea è stata riscontrata nel 66,35% dell'intera coorte; il 15,64% e il 18,01% dei pazienti ha mostrato un'aderenza bassa e alta al modello alimentare, rispettivamente. E' stata evidenziata un'associazione negativa tra DAPSA e aderenza alla dieta mediterranea (B=- 3,291; 95% CI - 5,884 a - 0,698). DAPSA era positivamente associato con BMI (B=0,332; 95% CI 0,047-0,618). I risultati di questo studio hanno evidenziato che nei pazienti con AP, livelli più alti di attività della malattia



misurati dal DAPSA sono correlati a una bassa aderenza alla dieta mediterranea, suggerendo un potenziale beneficio delle proprietà antinfiammatorie di questo modello alimentare [6].

## RISULTATI ATTESI

- Arruolamento di 203 soggetti di età dai 35 ai 65 anni, appartenenti ad un'area geografica ben definita (Comune di Castellana Grotte e comuni limitrofi) in un arco temporale di 36 mesi, secondo la metodologia descritta.
- Valutazione multidisciplinare dei soggetti arruolati attraverso visite specialistiche, esami strumentali e questionari ad hoc standardizzati, secondo la metodologia descritta.
- Inserimento delle informazioni acquisite su un database dedicato, disponibile in rete. - Analisi preliminare dei dati ed identificazione di differenti "classi di rischio" per sviluppo di comorbidità con focus su malattie metaboliche e vascolari, patologie neurodegenerative e psichiatriche, deficit di udito e vista e fragilità.
- Indagine farmaco-epidemiologica di questa peculiare coorte di pazienti.

## CRITERI ED INDICATORI PER LA VERIFICA DEI RISULTATI RAGGIUNTI

- Numero di soggetti arruolati a intervalli trimestrali con response rate non inferiore al 80% al t0 e 75% al t1 e 70% al t2 e t3 (Attrition rate minore del 20% medio).
- Report semestrali da parte dei responsabili del progetto;
- Database delle valutazioni effettuate nel progetto;
- Pubblicazioni scientifiche.

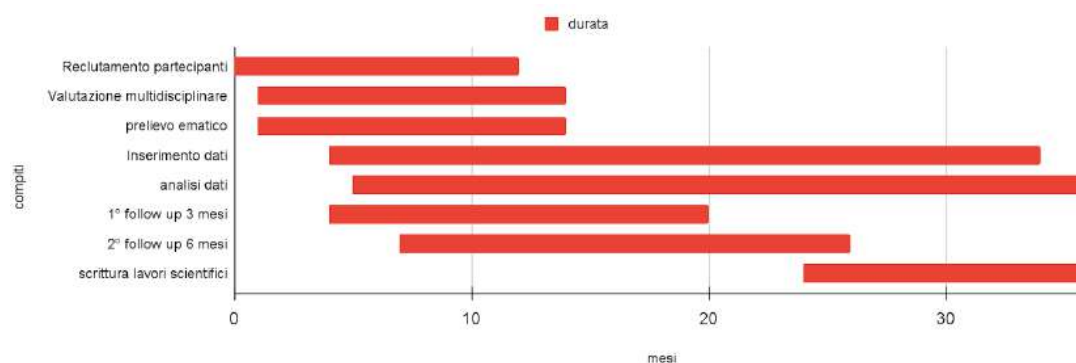
## BIBLIOGRAFIA

1. De Pessemier, B.; Grine, L.; Debaere, M.; Maes, A.; Paetzold, B.; Callewaert, C. Gut-Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. *Microorganisms* 2021, 9, doi:10.3390/microorganisms9020353.



2. Hanna, N.; Silverberg, O.M.; Reaume, M.; Gladman, D.; Davis, M.D.P.; Piguet, V.; Alavi, A. Incidence, Prevalence, and Predictors of Inflammatory Arthritis in Patients with Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Dermatol.* 2021, doi:10.1111/ijd.15860.
3. Salaffi, F.; De Angelis, R.; Grassi, W.; MARCHE Pain Prevalence; INVESTIGATION GROUP (MAPPING) study Prevalence of Musculoskeletal Conditions in an Italian Population Sample: Results of a Regional Community-Based Study. I. The MAPPING Study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2005, 23, 819–828.
4. Vaengebjerg, S.; Skov, L.; Egeberg, A.; Loft, N.D. Prevalence, Incidence, and Risk of Cancer in Patients With Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Dermatol.* 2020, 156, 421–429, doi:10.1001/jamadermatol.2020.0024.
5. Gudu, T.; Gossec, L. Quality of Life in Psoriatic Arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2018, 14, 405–417, doi:10.1080/1744666X.2018.1468252.
6. Caso, F.; Navarini, L.; Carubbi, F.; Picchianti-Diamanti, A.; Chimenti, M.S.; Tasso, M.; Currado, D.; Ruscitti, P.; Ciccozzi, M.; Annarumma, A.; et al. Mediterranean Diet and Psoriatic Arthritis Activity: A Multicenter Cross-Sectional Study. *Rheumatology International* 2020, 40, 951–958.

## TIMELINE





Castellana Grotte, 26/04/2024

**Il Direttore Scientifico**

Prof. Gianluigi Giannelli