Progetto di ricerca **“Studio dell’attività citotossica di derivati di origine marina su colture di cellule tumorali”**

Tutor: **Prof.ssa Carmela Fimognari**

**Introduzione**

Nonostante gli enormi investimenti nella ricerca e i progressi compiuti nella ricerca di nuovi farmaci antitumorali negli ultimi decenni, la cura e il trattamento del cancro continuano a rappresentare una sfida formidabile. Molte fonti, tra cui piante, animali e minerali, sono state esplorate in campo oncologico con l’obiettivo di identificare nuove terapie molecolari.

L'acqua ricopre il 71% della superficie del nostro pianeta e ospita una vibrante biodiversità. Più di 2 milioni di diverse specie abitano i mari, molte delle quali ancora attendono di essere scoperte [1]. I composti naturali terrestri hanno sempre rappresentato una fonte di molecole biologicamente attive, mentre l'ambiente marino è ancora un passo indietro. Finora, sono state scoperte e classificate solo 232.297 specie diverse [2]. Questo numero potrebbe essere considerato modesto, ma rispecchia il ritardo con cui gli oceani hanno iniziato a essere studiati rispetto agli ambienti terrestri. In effetti, la diffusione della storia naturale terrestre iniziò nel corso del 17° secolo e si intensificò attraverso i viaggi scientifici del 18° e 19° secolo, comprese le spedizioni di Charles Darwin, fino ai giorni nostri. Al contrario, l'esplorazione degli oceani è iniziata solo nel 20° secolo e ciò anche a causa del fatto che prima del secolo scorso le tecnologie disponibili non consentivano l’esplorazione delle acque più profonde [3].

Dal punto di vista del farmacologo, la biodiversità marina rappresenta la realtà ambientale ideale per la ricerca di nuove sostanze con potenziale terapeutico. In effetti, poiché gli oceani ospitano molte specie sessili o a mobilità limitata, è logico supporre che esse sintetizzino metaboliti spiccatamente attivi per proteggersi e che questi possano essere sfruttati terapeuticamente [4]. Soprattutto in ambito oncologico, l'ambiente marino rappresenta una vera miniera d'oro.

Fino al 2017, la Food and Drug Administration americana ha approvato sette farmaci antitumorali di origine marina, mentre molti altri composti sono attualmente allo studio in diverse fasi cliniche in ambito oncologico ed ematologico (4 in fase III, 6 in fase II, 8 in fase I) [5]. È stato stimato che 594.232 nuovi composti di origine marina sono in attesa di essere studiati e si ipotizza che tra 55 e 214 possano essere approvati come nuovi farmaci antitumorali [6].

L'apoptosi è la forma più caratterizzata di morte cellulare e appare come il meccanismo più frequentemente indotto dai farmaci chemioterapici attualmente utilizzati nella terapia anticancro. Il programma apoptotico richiede una cascata di attivazione di più endoproteasi chiamate caspasi e la generazione di una cascata di eventi di segnalazione che favoriscono la distruzione dei componenti cellulari [7].

Negli ultimi anni, però, evidenze sempre più numerose hanno dimostrato che varie forme non apoptotiche di morte cellulare programmata, chiamate anche non canoniche, possono essere innescate indipendentemente dall'apoptosi o quando il processo apoptotico sembra essere alterato o inibito. Le vie di morte delle cellule non apoptotiche differiscono dal processo apoptotico non solo in termini morfologici, ma anche in termini biochimici e includono varie vie necrotiche di morte cellulare programmata, come ferroptosi e necroptosi [8].

La necroptosi è una forma di necrosi altamente regolata [9]. Il percorso più noto di attivazione della necroptosi è mediato dai recettori della morte [10]. Il processo di necroptosi è controllato da due proteine, RIP1 e RIP3, e prevede l’entrata in gioco di MLKL, che viene fosforilata da RIP3 e quindi migra dal citoplasma alla membrana cellulare. Questo è seguito dalla permeabilizzazione della membrana cellulare e dalla probabile interazione di MLKL con i fosfolipidi e la cardiolipina, che a loro volta esitano in morte cellulare [11].

La ferroptosi è una forma non apoptotica di morte cellulare che può essere innescata da piccole molecole o condizioni che inibiscono la biosintesi del glutatione o l'enzima antiossidante glutatione perossidasi 4 (GPX4) [12]. Questo processo letale è caratterizzato dall'accumulo ferro-dipendente di perossidazione lipidica da parte di specie reattive dell'ossigeno e dalla deplezione degli acidi grassi polinsaturi della membrana plasmatica [12].

Una terza modalità di morte cellulare è la cosiddetta morte cellulare immunogenica (MCI). Il concetto di MCI è stato recentemente introdotto per descrivere la morte delle cellule cancerose dopo l'esposizione a determinati agenti citotossici, che è caratterizzata dal rilascio dei cosiddetti DAMPs (damage-associated molecular patterns), che sono riconosciuti da cellule presentanti l'antigene come le cellule dendritiche (DC) e stimolano l'immunità adattativa mediata dalle cellule T. I DAMP più studiati sono HMGB1, HSP, ATP, DNA mitocondriale, ecc. [13]. Per ottimizzare le risposte immunitarie antitumorali, la MCI richiede la precisa interconnessione tra lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [13].

**Obiettivi e Metodi**

L’obiettivo del progetto è valutare il potenziale citotossico di alcuni derivati di origine marina su diverse linee tumorali. Dal momento che gli approcci terapeutici basati esclusivamente sull'induzione di apoptosi sono spesso fallimentari a causa dell'attivazione di meccanismi di resistenza, l'identificazione e la caratterizzazione di ulteriori meccanismi di morte cellulare programmata rappresentano, quindi, un’importante strategia che potrebbe integrare o offrire approcci alternativi alle attuali terapie antitumorali basate esclusivamente sull’induzione del processo apoptotico. In particolare, si indagherà quale tipo di morte cellulare i derivati in studio promuovano, programmata (apoptosi) o non programmata (necroptosi, ferroptosi e/o MCI) e se ne analizzeranno i meccanismi d’azione a livello cellulare e molecolare.

Tutte le analisi saranno condotte per via citofluorimetrica utilizzando specifici reagenti. I composti in studio verranno testati a diversi livelli di concentrazione e la loro attività sarà comparata a quella di composti antitumorali standard, utilizzati come controlli positivi.

**Risultati attesi**

Si prevede, dopo una prima fase di attività, di presentare i risultati ottenuti attraverso comunicazioni a congressi e pubblicazioni su riviste specializzate.

**Piano di formazione**

Formazione di un ricercatore in grado di operare nel campo della ricerca farmacotossicologica applicata allo sviluppo di nuove strategie farmacologiche in ambito oncologico, di utilizzare metodologie e strumentazioni avanzate, di saper affrontare le problematiche connesse alle varie fasi del progetto di ricerca tramite la messa a punto di metodiche idonee alla loro risoluzione.

**Bibliografia**

1. <https://oceans.taraexpeditions.org/en/m/agenda/tara-museumnational-histoire-naturelle/>
2. World Register of Marine Species (WORMS). Available online: http://www.marinespecies.org.
3. Vermeulen, N. From Darwin to the census of marine life: marine biology as big science. PLoS ONE 2013, 8, e54284.
4. Calcabrini, C., Catanzaro, E., Bishayee, A., Turrini, E., and Fimognari, C. Marine sponge natural products with anticancer potential: an updated review. Mar. Drugs 2017, 15, 310.
5. Dyshlovoy, S.A., and Honecker, F. Marine Compounds and cancer: 2017 updates. Mar. Drugs 2018, 16, 41.
6. Erwin, P.M., López-Legentil, S., and Schuhmann, P.W. The pharmaceutical value of marine biodiversity for anti-cancer drug discovery. Ecol. Econ. 2010, 70, 445–451.
7. Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Garufi, A., and D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging 2016, 8, 603–619.
8. Guaman-Ortiz, L., Orellana, M., and Ratovitski, E. Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. Curr. Genomics 2017, 18, 132–155.
9. Sasaki, K., and Yoshida, H. Organelle autoregulation-stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. J. Biochem. (Tokyo) 2015, 157, 185–195.
10. Oliveira, S.R., Amaral, J.D., and Rodrigues, C.M.P. Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation. Cell Death Dis. 2018, 9, 903.
11. Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.-F., Wang, F.-S., and Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. Mol. Cell 2014, 54, 133–146.
12. Cao, J.Y., and Dixon, S.J. Mechanisms of ferroptosis. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 2016, 73, 2195–2209.
13. Krysko, D.V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer 2012, 12, 860–875.