

Newly synthesized isothiocyanates as a pharmacological strategy for colorectal cancer: study of their cytotoxic activity on in vitro models

Isotiocianati di nuova sintesi come strategia farmacologica per il tumore del colon-retto: studio della loro attività citotossica in modelli in vitro

Tutor: Prof.ssa **Carmela Fimognari**

Sedi di attività: Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita (QuVi) – C.so d'Augusto 237 – Rimini

Introduzione

Il cancro del colon-retto (CRC) è il tipo più comune di cancro gastrointestinale, il terzo tipo di cancro più comune e la seconda causa principale di mortalità correlata al cancro in tutto il mondo (1). Esso da solo è responsabile di un terzo dei casi diagnosticati e recentemente è stata osservata una tendenza verso un aumento della diagnosi di cancro del retto in età precoce (sotto i 50 anni), con una diminuzione dell'età di esordio nelle stime prospettiche per gli Stati Uniti e l'Europa (2). I fattori di rischio noti che promuovono lo sviluppo del CRC includono sia la mancanza di esercizio fisico che abitudini alimentari poco salutari, ovvero una dieta composta prevalentemente da alimenti trasformati, carni rosse, grassi da fonti animali e con un basso consumo di verdura, frutta, fibre e calcio (3,4). Nel 2016, l'Agenzia Internazionale per La ricerca sul cancro (IARC) ha concluso che l'obesità è associata ad un aumento del rischio di 13 tipi di cancro, incluso il CRC (5). Diversi studi suggeriscono anche che l'aumento di peso durante l'età adulta sia associato a un rischio elevato di sviluppare CRC rispetto agli adulti il cui peso rimane stabile (6). Numerosi studi epidemiologici hanno inoltre evidenziato una correlazione inversa tra rischio di cancro e consumo di vegetali appartenenti alla famiglia delle crucifere, imputabile alla presenza di componenti chiamati isotiocianati (ITC). Molti studi in vitro e in vivo hanno riportato che gli ITC esibiscono effetti farmacologici rilevanti attraverso molteplici meccanismi che includono la modulazione degli enzimi di fase I e II, l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare e dell'apoptosi, attività antiossidante, attività antinfiammatoria, effetti anti-angiogenici e modulazione epigenetica (7). Per questo motivo, gli ITC sono stati proposti come possibile terapia per il trattamento di alcuni tumori. Tra gli ITC, il più studiato è il sulforafano (SFR), che esibisce attività citostatiche e citotossiche mediate da una pletora di meccanismi diversi e in parte interdipendenti. Sono pochi gli studi sull'animale o sull'uomo che hanno valutato il ruolo di SFR sul CRC. Suzuki et al. hanno osservato che l'assunzione di SFR ha ridotto il numero l'assunzione ha portato a un ridotto sviluppo di cripte aberranti e di tumori macroscopici nei topi o nei pazienti con CRC (8). Recentemente, SFR è stato condensato con un analogo fluorurato idrofobo del rodolo, che ha una fluorescenza verde intrinseca, realizzando così una piattaforma teranostica. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che il rodolo riesce ad entrare nelle cellule e non induce effetti tossici. Inoltre, i nuovi coniugati hanno dimostrato una potenza citotossica maggiore rispetto al composto progenitore SFR: il valore di concentrazione inibitoria semimassimale (IC50) è di circa un ordine di grandezza inferiore rispetto a quello dei coniugati con rodolo. Il rodolo da solo non è citotossico, escludendo così la possibilità che gli effetti letali dei coniugati siano l'espressione unica delle proprietà intrinseche del rodolo.

Obiettivi e metodi

Il progetto di ricerca è indirizzato allo studio del potenziale citotossico e dei meccanismi che lo sottendono di alcuni derivati del SFR ottenuti dalla coniugazione con rodolo su cellule di tumore del colon-retto umane.

Dopo trattamento delle cellule con i coniugati, verranno esplorati i meccanismi di morte cellulare utilizzando inibitori specifici e la sonda nucleare fluorescente impermeabile alle cellule Sytox Green. In breve, le cellule saranno pretrattate per 1 ora con o senza l'inibitore pan-caspasico zVAD-fmk (50 μ M) o l'inibitore PARP olaparib (2 μ M), che bloccano l'apoptosi; l'inibitore RIPK1 nec-1s (20 μ M), che blocca la necroptosi; il chelante del ferro DFO (10 μ M), gli inibitori dei ROS vitamina-E (100 μ M) o fer-1 (1 μ M) che inibiscono anche la perossidazione lipidica, tutti e tre responsabili dell'inibizione della ferroptosi. Le cellule verranno poi trattate per 24 ore con i nuovi coniugati e la vitalità analizzata. Il meccanismo di morte cellulare sarà studiato attraverso un approccio sperimentale integrato che ne comprende diversi saggi e diverse tecniche tra cui microscopia a fluorescenza, Western blotting, citometria a flusso, ELISA.

Sebbene la chemioterapia citotossica classica sia stata tradizionalmente considerata immunosoppressiva, diversi studi clinici dimostrano che spesso interagisce positivamente con l'immunoterapia. Gli agenti antitumorali come l'oxaliplatino inducono morte cellulare accompagnata dal rilascio di segnali che rendono le cellule tumorali "visibili" al sistema immunitario. Questi segnali avviano una cascata di eventi che possono portare a risposte a lungo termine in ospiti immunocompetenti, un meccanismo descritto come morte cellulare immunogenica (ICD) (9). Pertanto, esso è di grande rilevanza terapeutica per esplorare il potenziale immunogenico dei farmaci antitumorali applicati clinicamente e di composti antitumorali di più recente sviluppo. In questo contesto, è di estremo interesse caratterizzare i meccanismi molecolari alla base della morte delle cellule in quanto ciò influenza successivamente l'insorgenza dell'ICD. Nel progetto verrà testata la capacità di coniugati selezionati di indurre ICD. Poiché l'ICD è caratterizzata dal rilascio di damage-associated molecular patterns (DAMP) da parte delle cellule tumorali morenti, con conseguente attivazione del sistema immunitario, verranno analizzati DAMP tra cui calreticulina, ATP e HMGB1 attraverso un lettore di micropiastre.

Risultati attesi

Si prevede, dopo una prima fase di attività, di presentare i risultati ottenuti mediante 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 molecole farmacologicamente attive per il trattamento del tumore del colon-retto, di utilizzare metodologie e strumentazioni avanzate, di valutare l'effetto dei nuovi analoghi del sulforafane a livello cellulare e molecolare, di saper affrontare le problematiche connesse alle varie fasi del progetto di ricerca tramite la messa a punto di metodiche idonee alla loro risoluzione.

Acquisizione da parte del beneficiario dell'assegno di competenze e tecnologie applicabili alla ricerca farmacotossicologica pre-clinica riguardante l'identificazione dei bersagli cellulari e molecolari di farmaci oncologici.

Coltivazione di cellule di tumore del colon-retto e ottimizzazione di metodiche colorimetriche e citofluorimetriche per verificare e valutare gli effetti cellulari dei composti in esame.

Il ricercatore, acquisite alcune informazioni sul profilo farmacotossicologico e sul meccanismo d'azione delle molecole in studio, sarà in grado di avanzare ipotesi sul loro potenziale impiego clinico in ambito oncologico.

Bibliografia

- 1 Cancer Obs. 2020;419:1-2
- 2 Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2020;17:414-29
- 3 Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016;13:691-706
- 4 Cancers 2020; doi:10.3390/cancers12061406
- 5 N Engl J Med 2016;375:794-8
- 6 IARC Handbooks of Cancer Prevention Vol 6,2002
- 7 Front Pharmacol 2020;doi:10.3389/fphar.2020.00567
- 8 Funct Foods Health Dis 2019;9:392-411
- 9 Metallomics 2019;11:1044-4