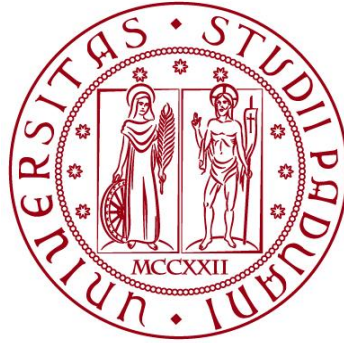


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**RUOLO DELLE AFLATOSSINE NELLO SVILUPPO
DELL'EPATOCARCINOMA E BIOMARCATORI ASSOCIATI**

**Tutor: Prof.ssa Marianna Pauletto
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Laureanda: Arianna Pistrino

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

ABSTRACT	2
CAPITOLO 1: Introduzione	3
1.1 Panoramica sulle aflatossine	3
1.2 Metabolismo delle aflatossine nel fegato	3
1.3 Cancro al fegato indotto dall’esposizione cronica alle aflatossine	4
1.4 Biomarcatori di esposizione ad AFB₁	5
CAPITOLO 2: Analisi articolo “Mutational spectra of aflatoxin B1 in vivo establish biomarkers of exposure for human hepatocellular carcinoma” (Chawanthayatham <i>et al.</i>, 2017)	7
2.1 Obiettivi dello studio	7
2.3 Risultati ottenuti	9
2.3.1 Determinazione degli spettri mutazionali	9
2.3.2 Spettro mutazionale a 10 settimane dalla somministrazione	10
2.3.3 Spettro mutazionale a 72 settimane dalla somministrazione	10
2.4 Biomarcatori degli stadi iniziali di cancerogenesi	12
CAPITOLO 3: Analisi articolo “Oncogenic and tumor supressor pathways in subchronic aflatoxicosis in rats: Association with serum and urinary aflatoxin exposure biomarkers” (Apolinário <i>et al.</i>, 2021)	13
3.1 Obiettivi dello studio	13
3.2 Materiali e metodi utilizzati	14
3.3 Risultati ottenuti	16
3.4 Biomarcatori molecolari di sviluppo tumorale associati a biomarcatori di esposizione	19
CAPITOLO 4: Conclusioni	20
4.1 Ruolo dei biomarcatori nella diagnosi dell’epatocarcinoma	20
4.2 Prospettive future di ricerca	21
Bibliografia	22

ABSTRACT

Le aflatossine sono micotossine prodotte da funghi appartenenti al genere *Aspergillus*, possono contaminare vari alimenti, tra cui noci e cereali, in particolare in regioni con clima tropicale e subtropicale. È stato dimostrato che l'esposizione cronica alle aflatossine, considerate un potente agente cancerogeno, è associata ad un aumento del rischio di cancro, in particolare quello al fegato. Il carcinoma epatocellulare rappresenta una delle principali cause di morte per cancro a livello globale e costituisce un serio problema nelle aree caratterizzate da un'elevata esposizione alle aflatossine. Attraverso l'analisi di due studi scientifici realizzati su topi, sono stati caratterizzati i principali biomarcatori coinvolti nell'alterazione dei pathway di segnalazione in oncogeni e oncosoppressori epatici, in seguito ad esposizioni prolungate e a dosi variabili di aflatossine. I risultati hanno portato all'elaborazione di uno spettro di mutazioni genetiche indotte dagli eventi di mutagenesi e cancerogenesi mediati dai prodotti del metabolismo delle aflatossine, è stata inoltre dimostrata la forte correlazione tra i biomarcatori di esposizione rilevati nel siero e nelle urine dei topi presi in esame e biomarcatori di meccanismi molecolari di sviluppo e progressione del cancro. L'individuazione di biomarcatori specifici si rivela, quindi, cruciale per sviluppare migliori strategie di diagnosi precoce.

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 Panoramica sulle aflatossine

Le aflatossine sono micotossine prodotte da diversi tipi di funghi, in particolare *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) e *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*). Queste tossine sono metaboliti secondari in grado di contaminare vari alimenti come noci, cereali, semi e spezie. La loro prima identificazione risale alla fine degli anni '50, periodo in cui si propagò un'epidemia mortale negli allevamenti di tacchini in Inghilterra. Questa malattia venne denominata "malattia X", stimolando numerosi studi volti alla ricerca dell'agente eziologico. I risultati degli esperimenti ricondussero questa epidemia alle tossine prodotte dai funghi del genere *Aspergillus*, da cui deriva la denominazione "aflatossina" (Long *et al.*, 2017).

L'esposizione a queste tossine può portare a numerose conseguenze. Nel caso di un'esposizione di breve durata ma a dosi molto elevate si parla di intossicazione acuta, che porta principalmente a danni epatici e nei casi più gravi alla morte. L'esposizione cronica, invece, è associata ad immunosoppressione e allo sviluppo di cancro (Marchese *et al.*, 2018). Queste tossine sono state infatti classificate dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogeni appartenenti al gruppo 1.

Nei prodotti alimentari sono state identificate principalmente quattro tipologie di aflatossine: aflatossina B1 (AFB₁), aflatossina B2 (AFB₂), aflatossina G1 (AFG₁) e aflatossina G2 (AFG₂). Le aflatossine di tipo B sono così denominate perché in grado di produrre una fluorescenza di colore blu se esposte a luce UV, mentre quelle di tipo G producono una fluorescenza di colore verde (Long *et al.*, 2017).

I livelli di contaminazione da parte di queste tossine sono maggiori nelle regioni tropicali e subtropicali, perché il clima umido e caldo ne promuove la diffusione e proliferazione, rappresentando un grave problema per la salute della popolazione. Inoltre, l'uso di tecniche agricole inadeguate, per esempio la raccolta e la conservazione incorretta del grano, contribuisce alla produzione e propagazione di queste micotossine (Marchese *et al.*, 2018).

In particolare, da studi epidemiologici risulta che l'AFB₁ sia la tossina maggiormente diffusa e nociva, in quanto può causare danni strutturali e funzionali in diversi organi, principalmente il fegato, portando a necrosi, emorragie, cirrosi ed eventi di mutagenesi (Marchese *et al.*, 2018).

1.2 Metabolismo delle aflatossine nel fegato

In seguito all'assorbimento gastrointestinale, le molecole di AFB₁ ingerite sono trasportate al fegato, sede primaria in cui avviene il loro metabolismo. Le biotrasformazioni alle quali AFB₁ va incontro sono ad opera del citocromo P-450 (CYP450), una superfamiglia di enzimi deputati alla detossificazione dell'organismo, in grado di riconoscere e metabolizzare numerosi substrati (esogeni

ed endogeni). Lo scopo di queste reazioni è di modificare chimicamente la tossina per ottenere molecole meno tossiche e di più facile eliminazione. Da queste reazioni si originano vari metaboliti, tra cui l'aflatossina M1 (AFM₁) e l'AFB₁-8-9-epossido, molecole oggetto degli studi che verranno analizzati in seguito. Più nello specifico, il metabolismo della tossina comprende reazioni di idrossilazione che portano alla formazione di metaboliti polari e meno tossici, principalmente AFM₁ e l'aflatossina Q1 (AFQ₁). Da reazioni di ossidazione, invece, si genera l'AFB₁-8-9-epossido, ovvero la forma attiva di AFB₁, responsabile dell'azione genotossica. Questo metabolita altamente reattivo è in grado di formare addotti con il DNA a livello della guanina, producendo AF-N⁷-guanina, oppure può essere convertito in dialdeide e legarsi a proteine attraverso legami covalenti, per esempio ad un residuo di lisina dell'albumina del siero, producendo addotti AFB₁-lisina. La tossina, inoltre, può subire reazioni di coniugazione con il glutatione (GSH) catalizzate dalla Glutathione-S-transferasi (GST) con conseguente produzione di AFB-marcapturato eliminato attraverso le urine (Marchese *et al.*, 2018).

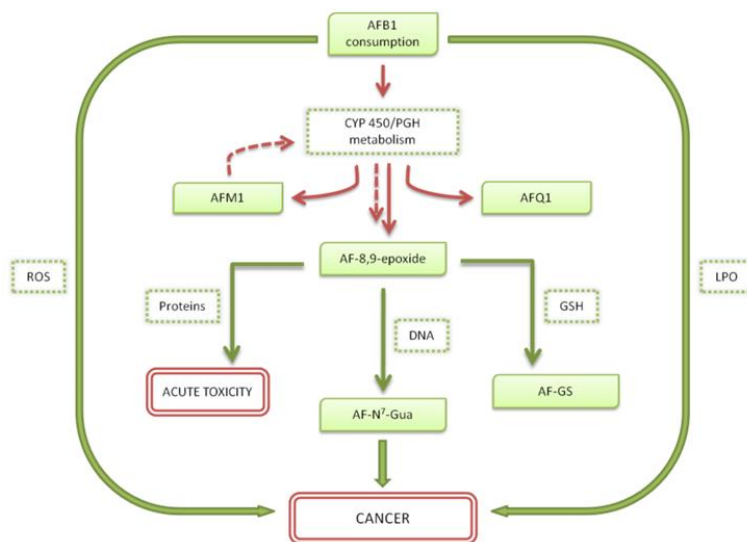


Figura 1 Rappresentazione schematica del metabolismo di AFB₁ (Marchese *et al.*, 2018).

1.3 Cancro al fegato indotto dall'esposizione cronica alle aflatossine

L'epatocarcinoma (HCC) è una delle principali cause di morte per cancro al mondo; si conta infatti che questo carcinoma sia responsabile di circa 700 mila morti all'anno. Il tasso di incidenza è particolarmente elevato in aree caratterizzate da un'alta contaminazione di aflatossine in prodotti alimentari, che determinano quindi un'esposizione cronica nella popolazione. È inoltre noto come l'azione sinergica delle aflatossine e quella del virus dell'epatite B e C induca un danno epatico cronico che frequentemente evolve in neoplasie (Apolinário *et al.*, 2021).

Gli effetti della tossicità delle aflatossine nel fegato dipendono dalla dose e dalla durata dell'esposizione. In particolare, l'esposizione cronica, (i.e., dosi basse per un

tempo prolungato), è prevalentemente responsabile dei danni al DNA, i quali si possono tradurre in effetti di tipo genotossico e cancerogenico (Long *et al.*, 2017). Il meccanismo molecolare di cancerogenesi implica danni al DNA e riparazioni aberranti, provocando mutazioni geniche nelle sequenze di geni oncogeni e oncosoppressori. Il danno al DNA indotto da aflatossine è provocato principalmente dalla formazione di addotti con la doppia elica; gli addotti più comuni sono l'AFB₁-N⁷-guanina, il cui processo di formazione è già stato chiarito precedentemente, e l'AFB₁ formamidopirimidina (AFB₁-FAPYA), risultante da una modifica chimica che genera rotture a doppio filamento. Questi complessi molecolari possono produrre depurinazioni, rotture a doppio filamento, sostituzioni di basi e mutazioni *frame-shift* (Long *et al.*, 2017). Gli studi *in vivo* ed *in vitro* effettuati negli ultimi decenni, hanno dimostrato che il 90% delle mutazioni indotte da AFB₁ sono trasversioni GC→TA localizzate principalmente in regioni ricche in GC, identificate come regioni *hotspot*. I *loci* genici più colpiti da queste mutazioni risultano essere le sequenze di geni oncogeni e oncosoppressori, tra i quali TP53 e Ras (Long *et al.*, 2017; Marchese *et al.*, 2018).

Il gene TP53 codifica per un fattore di trascrizione che agisce da oncosoppressore attraverso la regolazione del ciclo cellulare. Numerosi studi epidemiologici hanno messo in evidenza che nelle aree maggiormente esposte all'AFB₁, più del 40% dei pazienti affetti da HCC presentava una mutazione al codone 249 di questo gene, diventando quindi questa mutazione un marcatore molecolare di l'HCC indotta da AFB₁ (Long *et al.*, 2017).

È stato dimostrato come l'azione sinergica di altri agenti di rischio, come il virus dell'epatite B e C, può aumentare la probabilità di cancerogenesi del 60%. I meccanismi tossicologici alla base della sinergia tra aflatossine e virus non sono ancora noti completamente, ma una possibile spiegazione risiede nella presenza contestuale di fenomeni di infiammazione cronica causati dall'infezione virale e dalla necrosi indotta dall'AFB₁, con conseguente produzione elevata di specie reattive all'ossigeno (ROS) (Chawanthayatham *et al.*, 2017).

Infine, anche la componente genetica gioca un ruolo importante nella suscettibilità individuale alle aflatossine, influenzando così il rischio di sviluppare cancro (Long *et al.*, 2017).

1.4 Biomarcatori di esposizione ad AFB₁

L'evoluzione clinica sfavorevole dell'HCC è attribuibile alle difficoltà di diagnosi nelle fasi iniziali della malattia, caratterizzate dalla quasi assenza di sintomi rilevanti. Spesso la diagnosi è possibile solo nelle fasi tardive, quando il cancro ha già raggiunto stadi avanzati, limitando quindi le possibilità di successo nelle terapie. Pertanto, è di fondamentale importanza individuare molecole specifiche che agiscano da biomarcatori tumorali, rilevabili nelle fasi iniziali della malattia (i.e., diagnosi precoce), quando il carcinoma è ancora clinicamente affrontabile e consente la messa in atto di terapie immediate, le quali, potrebbero incrementare in

modo significativo le prospettive di sopravvivenza dei pazienti (Chawanthayatham *et al.*, 2017).

I biomarcatori, denominati anche *biomarkers*, sono variazioni biochimiche, cellulari o fisiologiche rilevabili nel sangue, nelle urine o in altre matrici biologiche, che danno evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più sostanze tossiche. I biomarcatori sono variazioni che si possono verificare a livello di proteine, acidi nucleici, anticorpi e di molti altri target, e sono solitamente specifici di un dato meccanismo d'azione tossicologico. Assumono, quindi, un ruolo essenziale nella diagnosi e nel monitoraggio (Das *et al.*, 2023). Successivamente, nel Capitolo 2 e nel Capitolo 3, verranno analizzati alcuni biomarcatori molecolari di suscettibilità associati allo sviluppo e all'evoluzione dell'HCC, con particolare attenzione alla loro correlazione con i biomarcatori di esposizione ad AFB₁.

Come illustrato nel paragrafo 1.2, i metaboliti AFM₁, AFB₁-N⁷-guanina e AFB₁-lisina possono essere considerati degli ottimi biomarcatori di esposizione ad AFB₁. In particolare, l'AFB₁-N⁷-guanina è un biomarcatore della dose effettiva dell'AFB₁ ingerita, ovvero un indicatore biologico che riflette la quantità di tossina effettivamente assorbita e metabolizzata dall'organismo, e rappresenta quindi una misura diretta della dose ingerita di AFB₁. Inoltre, questa molecola rappresenta un biomarcatore precoce di cancerogenesi nel fegato. Infatti, quando l'addotto di AFB₁-N⁷-guanina viene rimosso dal DNA, il sito danneggiato e vacante viene riparato con un'adenina causando una trasversione G→T e generando mutazioni puntiformi; questo evento solitamente si verifica nella sequenza genica del gene p53. Perciò, la concentrazione di questa molecola nelle urine è associata ad un aumento della probabilità di sviluppare cancro al fegato (Chawanthayatham *et al.*, 2017; Ramalho *et al.*, 2018).

I metaboliti AFB₁-N⁷-guanina e AFM₁ sono rilevabili dopo un breve periodo dall'ingestione di AFB₁, perché secreti nelle urine, mentre il rilevamento di un'alta concentrazione di AFB₁-lisina nel siero indica piuttosto un'esposizione cronica (Chawanthayatham *et al.*, 2017).

CAPITOLO 2: Analisi articolo “Mutational spectra of aflatoxin B1 in vivo establish biomarkers of exposure for human hepatocellular carcinoma” (Chawanthayatham *et al.*, 2017)

2.1 Obiettivi dello studio

Le aflatossine, dopo l'ingestione, vengono assorbite e trasportate al fegato dove sono metabolizzate, come è stato già illustrato precedentemente. I prodotti di questa via metabolica sono epatotossici, in quanto si legano al DNA, in particolare alla guanina, formando addotti e causando lo sviluppo di mutazioni somatiche. L'efficienza della formazione degli addotti non è omogenea lungo la sequenza, ma è strettamente correlata ai passaggi meccanici del processo di intercalazione e alla reattività dell'epossido, la forma attiva della tossina. Gli addotti formati presentano un'alta suscettibilità all'idrolisi, portando alla formazione dell'addotto AFB₁ formamidopirimidina (FAPY). Questo complesso molecolare è particolarmente mutageno e con alta probabilità è la causa maggiore di mutazioni indotte da aflatossine, formando principalmente trasversioni G → T.

In definitiva, il quadro mutazionale di un tumore allo stadio avanzato riflette i contributi e la combinazione di molti agenti mutageni, in primis le mutazioni indotte da AFB₁, a cui si sommano quelle causate da ulteriori agenti, quali lo stress ossidativo e le eventuali infezioni virali.

Lo studio di Chawanthayatham *et al.* (Chawanthayatham *et al.*, 2017) si pone come obiettivo la caratterizzazione delle mutazioni indotte da AFB₁ in modelli murini, al fine di ottenere spettri mutazionali ad alta risoluzione (HRMS), durante il processo di epatocancerogenesi, utilizzando il sequenziamento duplex (DS) ad alta fedeltà. Gli spettri mutazionali ottenuti possono, perciò, essere usati come marcatori di esposizione a questo agente cancerogeno, trovando applicazione nello sviluppo di strategie di prevenzione e diagnosi precoce. I biomarcatori, inoltre, trovano applicazione anche nelle fasi più avanzate di sviluppo del carcinoma, evidenziando l'importanza della valutazione di come gli spettri mutazionali variano o si mantengono nel tempo e durante la progressione della malattia.

Gli esperimenti sono stati condotti su modelli murini trattati con AFB₁, durante le fasi iniziali dello sviluppo dei soggetti. È stato utilizzato il protocollo DS, una tecnica avanzata di sequenziamento che impiega l'utilizzo di *barcode* molecolari in entrambi i filamenti ed effettua un sequenziamento ad alta profondità. Questa tecnologia permette di rilevare le mutazioni genetiche, anche quelle rare, in modo molto preciso e affidabile, sequenziando i due filamenti separatamente. In questo modo è possibile distinguere gli errori di sequenziamento, che saranno presenti solo su uno dei due filamenti, dalle mutazioni reali, che invece saranno visualizzabili su entrambi.

Grazie all'affidabilità di questa tecnica nel rilevare le mutazioni, in questo studio è stato possibile evidenziare mutazioni rare presenti nei tessuti pre-cancerogeni nelle fasi iniziali, subito dopo l'esposizione all'agente mutageno (in questo caso, 10 settimane di somministrazione).

2.2 Materiali e metodi utilizzati

Gli esperimenti del presente studio sono stati effettuati su topi γ -gpt Δ B6C3F1, una variante transgenica di B6C3F1 che è un animale modello molto usato per gli studi sulla cancerogenicità degli agenti ambientali. La variante transgenica è stata sviluppata per misurare la quantità e il tipo di mutazioni che si sviluppano nel target mutazionale della guanina fosforibosiltransferasi (gpt). I topi maschi di questa linea transgenica, nati da quattro giorni, sono stati iniettati con una singola dose (6 mg/kg) di AFB₁ in 10 μ L di DMSO¹. I topi, raggiunte le 10 settimane e le 72 settimane di vita, sono stati sacrificati in modo da poter prelevare il tessuto epatico. Successivamente, dal tessuto epatico prelevato sono state separate, con una soluzione contenente collagenasi, le cellule tumorali da quelle non tumorali; entrambe le tipologie sono state conservate per le analisi seguenti. Il tessuto, quindi, è stato polverizzato in azoto liquido e il DNA genomico è stato estratto usando *RecoverEase DNA isolation kit (Agilent Technologies)*. I fagi λ -EG10 sono stati impacchettati in vitro con DNA genomico utilizzando *Transpack packing extract (Agilent Technologies)*. I fagi, in seguito, sono stati trasfettati in *Escherichia Coli* YG6020 in grado di esprimere la Cre-ricombinasi, generando un plasmide di dimensioni 6.4 kb, contenente i geni gpt e cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT). I batteri sono stati seminati e coltivati in un terreno contenente cloramfenicolo; quindi, le colonie resistenti sono state recuperate e il DNA plasmidico contenuto è stato isolato attraverso *Miniprep Kit (Qiagen)*.

A questo punto sono stati preparati gli adattatori per il sequenziamento, caratterizzati da una coda poliT all'estremità e da sequenze barcode degenerate.

È stata, quindi, preparata la libreria di DNA: il DNA è stato frammentato per sonicazione e poi purificato; i frammenti di DNA vengono riparati alle estremità, in particolare, l'estremità 3' è stata modificata con l'aggiunta di una coda di poliA che può andare a legarsi alla coda poliT degli adattatori. Si procede con l'amplificazione delle sequenze attraverso PCR, utilizzando primer complementari contenenti sequenze barcode caratterizzanti ogni campione. Successivamente le librerie ottenute sono state sequenziate su piattaforma Illumina usando un approccio di tipo *paired-end*.

Alla fine del processo si sono ottenute sequenze con tag duplex intatti contenenti una sequenza casuale di otto nucleotidi. Le *reads* sono state allineate con la sequenza genomica di riferimento del fago λ -EG10: *reads* che condividono le stesse sequenze tag sono state raggruppate e allineate in sequenze consenso.

Infine, è stata svolta l'analisi di clustering HRMS con HCC umano. Gli spettri mutazionali ad alta risoluzione (HRMS) ottenuti sono il risultato del conteggio della frequenza delle mutazioni in ciascun contesto trinucleotidico canonico, ciò significa che le mutazioni sono state analizzate in base alla loro posizione nel DNA, tenendo in considerazione la frequenza con cui determinati trinucleotidi compaiono in una

¹ DMSO: il dimetilsolfossido è un solvente organico usato in laboratorio, impiegato nella preparazione di soluzioni e, in questo contesto, usato come veicolo per la somministrazione di composti chimici.

sequenza di riferimento; questo permette di identificare dei pattern specifici di mutazioni.

Sulla base dei dati raccolti si è svolta un'ulteriore analisi, *unsupervised clustering*, integrando i dati ricavati da campioni umani di HCC. È stato necessario effettuare una normalizzazione in base alla frequenza dei contesti trinucleotidici nell'esoma o nell'intero genoma umano, chiarendo se la mutazione presa in analisi è frequente o se è esclusivamente data dalla composizione della sequenza in esame.

2.3 Risultati ottenuti

2.3.1 Determinazione degli spettri mutazionali

Gli esperimenti di cancerogenesi sono stati condotti su topi maschi, nati da quattro giorni, della linea B6CF1 *gpt* Δ ai quali è stata somministrata una dose di AFB₁ corrispondente a 6 mg/kg, disciolta in DMSO. Una prima valutazione delle conseguenze è stata effettuata dopo dieci settimane dalla somministrazione, momento in cui non erano ancora evidenti i sintomi clinici della patologia. Sono stati definiti due spettri mutazionali: A-10, ovvero trattati con AFB₁; D-10, topi controllo trattati con DMSO. Successivamente, dopo 72 settimane, è stata condotta una seconda analisi, quando le masse tumorali erano visibili macroscopicamente. Attraverso un trattamento con collagenasi sono stati separati i tessuti tumorali da quelli circostanti e sono stati caratterizzati tre spettri mutazionali: A-72T, cellule tumorali derivate dall'isolamento dei tumori epatici; A-72H, cellule epatiche isolate dai tessuti circostanti le masse tumorali; D-72, spettro di controllo derivato dai topi controllo trattati solo con DMSO.

I tessuti corrispondenti ai diversi campioni prelevati sono stati trattati per estrarre il DNA, in quanto la linea di topi impiegata presenta 40 copie di un vettore derivato dal fago λ integrate nel suo genoma. Questo vettore contiene il gene *gpt* sul cromosoma 17, usato come marcatore di mutazione. Le sequenze genomiche, contenenti *gpt*, estratte dagli epatociti sono state recuperate e isolate attraverso il processo di packaging del fago λ e successiva trasfezione in *E. coli*. All'interno dei batteri infettati il sistema di ricombinazione sito-specifica CRE-LOX ha permesso di estrarre il gene *gpt* e inserirlo in un plasmide delle dimensioni di 6.4-kb.

Nelle applicazioni tradizionali di questa tecnica è possibile individuare le mutazioni solo se vanno ad interrompere la funzionalità del gene, limitando notevolmente il set di mutazioni rilevabili. La tecnologia DS supera questi limiti sequenziando entrambi i filamenti di DNA in modo indipendente, le mutazioni reali sono quindi identificate informaticamente, in quanto presenti nello stesso sito in entrambi i filamenti complementari; inoltre, il metodo DS consente di rilevare mutazioni di tutti i nucleotidi, non solo di quelli che vanno ad influenzare i domini funzionali dell'enzima *gpt*.

La tecnologia DS, quindi, è stata applicata a ciascun campione estratto (cioè A-10, D-10, A-72T, A-72H, D-72) con una profondità di copertura media di 15,000 *reads*

per base. Nella tabella 1 sono riportati i valori ottenuti da questa analisi, in particolare il numero di mutazioni puntiformi osservate.

Tabella 1 Output ottenuto da DS per ciascun campione animale analizzato (Chawanthayatham et al., 2017).

Sample	No. of animals	Total mutations	Unique mutations	Percent unique	Percent clonal	Total nucleotides sequenced ($\times 10^6$ bp)	Mutant fraction ($\times 10^{-6}$)
A-10	4	804	397	49.4	50.6	128.8	3.08
D-10	6	1,439	153	10.6	89.4	566.6	0.27
A-72H	2	224	197	87.9	12.1	52.9	3.72
A-72T	4	6,221	324	5.2	94.8	1,620.0	0.20
D-72	2	540	142	26.3	73.7	747.3	0.19

2.3.2 Spettro mutazionale a 10 settimane dalla somministrazione

Uno degli obiettivi dello studio è sfruttare l'alta risoluzione dell'analisi DS per rilevare il profilo mutagenico specifico dell'esposizione ad AFB₁ poco dopo la sua somministrazione. Per questo motivo sono stati analizzati i tessuti di 4 topi dopo 10 settimane dall'esposizione, quando erano ancora fenotipicamente indistinguibili dal controllo. I risultati ottenuti hanno evidenziato una prevalenza di trasversioni G:C → T:A nello spettro A-10, come previsto dal meccanismo di danno indotto dalla tossina. Al contrario, il controllo D-10 presentava una vasta gamma di mutazioni. Dalla normalizzazione dei risultati, considerando tutti i possibili contesti di sequenza delle mutazioni puntiformi rilevate, è emerso uno spettro mutazionale caratteristico dell'esposizione ad AFB₁; chiarendo che le trasversioni non erano equamente distribuite nei diversi contesti di sequenza.

Ciascuno dei 4 topi analizzati presentava come hotspot G→T nella sequenza CGC; le singole mutazioni sono uniche per ciascun topo, suggerendo una variabilità individuale, e uniformemente distribuite lungo i siti CGC all'interno cluster da 6.4kb.

2.3.3 Spettro mutazionale a 72 settimane dalla somministrazione

Un ulteriore obiettivo di questo studio è valutare se il tessuto, evolvendo in HCC, accumuli nel tempo ulteriori alterazioni genetiche rispetto a quelle presenti 10 settimane dopo l'esposizione. Sono stati prelevati i tessuti epatici dei topi dopo 72 settimane dall'esposizione, separando le cellule tumorali dagli epatociti circostanti, producendo due HRMS distinti (A-72T e A-72H). Confrontando gli spettri con quelli ottenuti a 10 settimane si è notato che A-72H presenta le stesse caratteristiche di A-10. Lo spettro A-72T, tuttavia, è risultato molto più complesso, mostrando una maggiore diversità mutazionale. La mutazione predominante si riconferma essere la trasversione G→T nel contesto CGC, ma risulta rilevante anche la periodicità delle mutazioni G:C→A:T. Questa mutazione puntiforme è solitamente attribuita alla deamminazione della 5'-metilcitosina nei siti metilati 5'-CpG-3', un meccanismo mutazionale indipendente da quello indotto da AFB₁, che potrebbe rappresentare un processo caratteristico dello sviluppo tumorale a prescindere dall'induzione.

Gli spettri di controllo (D-10 e D-72) sono risultati simili tra loro.

La relazione tra i diversi profili mutazionali è stata valutata informaticamente attraverso un'*unsupervised clustering* usando il metro della *cosine similarity*. In altre parole, sono stati individuati gruppi di dati con caratteristiche simili, senza che siano fornite *a priori* categorie di riferimento, consentendo di osservare le correlazioni tra i profili di mutazione e individuando un pattern. Questa analisi ha confermato che A-10 e A-72H mostrano un'alta similarità (0.96 *cosine similarity*, dove 1.00 denota l'identità) come anche D-10 e D-72 (0.79 *cosine similarity*). Nonostante A-72T risulti più simile ai due spettri di controllo (0.75 e 0.76 *cosine similarity*) se comparato con i due spettri ricavati dai tessuti non trasformati trattati con AFB₁ (0.66 e 0.67 *cosine similarity*), dall'osservazione dello spettro si nota un'alta corrispondenza nella porzione G→T tra i campioni ottenuti dai tessuti indotti con AFB₁ (A-72T, A-10 e A-72H). I dati ottenuti confermano, quindi, che il profilo mutazionale del tessuto tumorale a 72 settimane riflette processi mutagenici multipli, in quanto è composto dal contributo mutagenico indotto da AFB₁ (A-10), da processi di mutagenesi spontanea rilevabili dagli spettri di controllo e da altri processi coinvolti nello sviluppo tumorale.

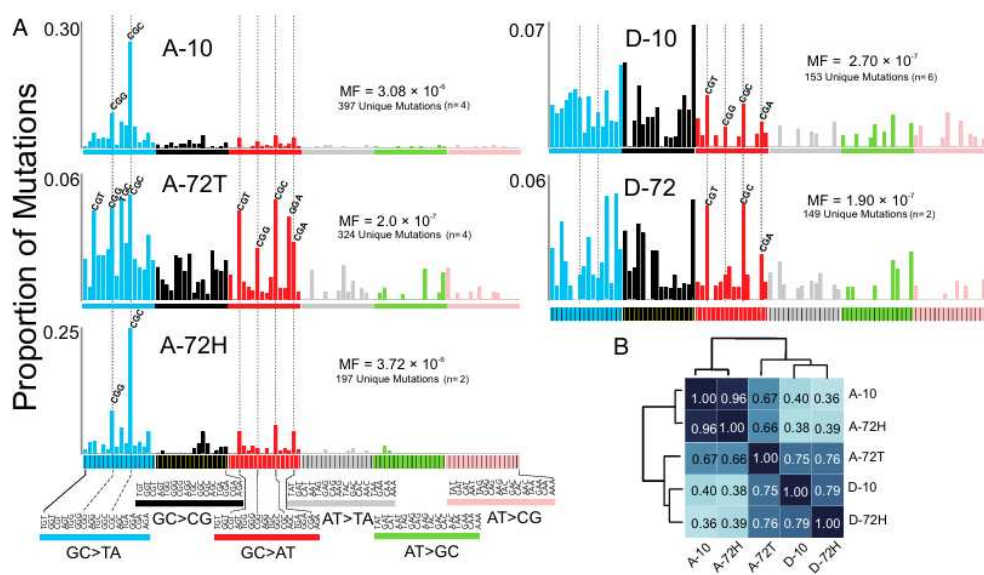


Figura 2 (A) HRMS di topi dopo 10 e 72 settimane dal trattamento con AFB₁. (B) La cosine similarity esprime quanto i diversi HRMS sono simili tra loro (Chawanthayatham et al., 2017).

I dati ottenuti suggeriscono che il profilo mutagenico di A-10 possiede le caratteristiche ideali per essere utilizzato come biomarcatore di esposizione ad AFB₁ per valutare campioni umani di HCC, in quanto rispecchia uno spettro mutazionale di riferimento la cui unica causa è l'esposizione alle aflatossine. A conferma di ciò è stata svolta un'ulteriore analisi, sulla base del sequenziamento dell'esoma di HCC umano svolto da Schulze *et al.* (2015) e da dati ricavati da *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC), *The Cancer Genome Atlas* e INSERM. I dati mutazionali, ricavati dalle diverse fonti, sono stati organizzati e normalizzati e integrati con i profili HRMS di A-10. Il risultato dell'analisi

unsupervised clustering ha rivelato un'associazione tra 13 tumori umani e lo spettro A-10. Questa somiglianza suggerisce che il modello murino sia un utile riferimento per l'identificazione di HCC umano potenzialmente causato dall'esposizione ad AFB₁.

2.4 Biomarcatori degli stadi iniziali di cancerogenesi

Un obiettivo fondamentale del presente studio è quello di definire il profilo mutagenico causato dall'esposizione alle aflatossine, in modo da sviluppare uno spettro mutazionale caratteristico utile come biomarcatore per diagnosi precoci dell'HCC. I risultati degli esperimenti hanno evidenziato che l'HRMS ottenuto dai topi esposti ad AFB₁ per 10 settimane rilette principalmente l'impronta mutagenica dell'esposizione alle tossine, rappresentando un ottimo biomarcatore precoce di esposizione. È emersa una preponderanza di trasversioni G→T nel contesto di base CGC, dimostrando l'esistenza di un pattern nella formazione degli addotti.

Questo studio ha così permesso di identificare regioni genomiche particolarmente suscettibili, *hot spot*, e resistenti, *cold spot*, alle mutazioni indotte da AFB₁, aprendo la strada a futuri esperimenti sui meccanismi molecolari implicati.

L'uso di un modello murino ha permesso di valutare le conseguenze alla sola esposizione alle aflatossine, eliminando altri agenti cancerogeni ambientali, e attraverso il confronto con i campioni umani di HCC si è potuta valutare la somiglianza degli spettri mutazionali.

L'analisi delle cellule circostanti la massa tumorale dopo 72 settimane dall'esposizione (A-72H) ha messo in evidenza la stabilità delle mutazioni nel tempo, in quanto lo spettro mutazionale osservato a 10 settimane era ancora presente e inalterato. Il tessuto non cancerogeno attiguo a quello tumorale può essere considerato un biomarcatore di esposizioni passate, utile quindi per studi epidemiologici.

Infine, l'HRMS derivato dal tessuto tumorale dopo 72 settimane ha dimostrato la complessità dei processi di progressione del cancro, in quanto è l'integrazione di più fattori a far progredire i tumori a stadi più avanzati. È importante sottolineare, quindi, che lo spettro A-10 nel fegato non è un predittore rigoroso di HCC, poiché per la cancerogenesi epatica sono necessari altri fattori, come ad esempio eventi infiammatori o modificazioni epigenetiche.

CAPITOLO 3: Analisi articolo “Oncogenic and tumor suppressor pathways in subchronic aflatoxicosis in rats: Association with serum and urinary aflatoxin exposure biomarkers” (Apolinário *et al.*, 2021)

3.1 Obiettivi dello studio

Il metabolismo dell'aflatossina B1 nel fegato produce diverse molecole note per la loro capacità di formare addotti con il DNA, provocando danni che possono portare all'epatocancerogenesi. Lo studio di Apolinário *et al.* (Apolinário *et al.*, 2021) ha lo scopo di valutare l'associazione tra i cambiamenti nei pathway di segnale in oncogeni e oncosoppressori nel fegato e i biomarcatori di esposizione ad aflatossine nel siero e nelle urine.

Nel processo di trasformazione neoplastica degli epatociti sono implicati molti pathway metabolici che giocano un ruolo cruciale nello sviluppo e nell'aggressività dell'HCC. Nel presente studio è stata posta l'attenzione su diverse vie di segnalazione oncogeniche e di inibizione tumorale che regolano la proliferazione cellulare e la progressione del ciclo cellulare, nel dettaglio, le vie Wnt/ β -catenina, retinoblastoma (Rb) e i regolatori del ciclo cellulare ciclina D1 e p27^{kip1}.

L'alterazione della via metabolica Wnt/ β -catenina è un fattore determinante negli stadi iniziali dello sviluppo tumorale. È stato riportato che nel 35-85% dei casi di HCC sono presenti accumuli anomali di β -catenina, inoltre l'attivazione aberrante della via Wnt è associata alla proliferazione, migrazione ed invasione, fattori che contribuiscono all'aggressività del tumore.

La ciclina D1, una proteina chiave nel controllo del ciclo cellulare, promuove la progressione dalla fase G1 alla fase S, attivando i complessi chinasi ciclina-dipendenti (CDK). La sovraespressione di questa proteina è frequentemente associata all'innescò della trasformazione neoplastica.

La capacità delle cicline di promuovere la divisione cellulare è regolata dall'oncosoppressore Rb che è in grado di arrestare il ciclo cellulare bloccando la transizione dalla fase G1 alla S, riducendo la trascrizione dei fattori necessari per l'ingresso nella fase S. La perdita di funzione di Rb risulta essere un evento cruciale nella trasformazione maligna degli epatociti (Knudsen *et al.*, 2020). Un ulteriore elemento coinvolto in questo processo è la proteina p27^{kip1}, la quale previene la fosforilazione, quindi l'inattivazione, di Rb, attraverso l'inibizione di CDK4. Questa proteina assume il ruolo di oncosoppressore, in quanto un incremento della sua concentrazione porta l'arresto del ciclo in fase G1, perciò la perdita della sua funzione è associata al comportamento maligno del tumore. L'abbassamento della concentrazione di p27^{kip1} è associato a una bassa differenziazione cellulare, a un aumento delle dimensioni del tumore epatico, alla presenza di metastasi intraepatiche e a una prognosi negativa.

Lo scopo del presente studio è valutare i cambiamenti nei livelli delle proteine β -catenina, ciclina D1, Rb e p27^{kip1}, nonché i livelli di espressione genica della ciclina

D1 e p27^{kip1} in tessuti epatici murini in seguito a esposizione cronica ad AFB₁. Inoltre, si vuole esaminare l'associazione di questi cambiamenti con i biomarcatori di esposizione alle aflatossine, presenti nel siero e nelle urine.

3.2 Materiali e metodi utilizzati

Gli esperimenti di questo studio sono stati condotti su ratti maschi del ceppo Wistar nati da tre settimane. Gli animali sono stati selezionati casualmente e divisi in tre gruppi, ogni gruppo composto da 15 ratti, in base alla quantità di AFB₁ somministrata: gruppo ricevente una dieta di 50 µg AFB₁ kg⁻¹ (AFB50), gruppo ricevente 100 (AFB100) e gruppo ricevente 200 (AFB200). È stato selezionato anche un quarto gruppo, un gruppo controllo composto da 10 ratti, a cui non è stato somministrato AFB₁ ma solamente una soluzione con 0.5% di DMSO. Il periodo di intossicazione è stato della durata di 90 giorni, durante i quali sono stati misurati quotidianamente il peso dei ratti e del cibo consumato. Sono state, quindi, stimate le dosi ingerite complessivamente da ogni animale appartenente ai tre gruppi: 0.5 mg AFB₁ kg⁻¹ di peso corporeo per il gruppo AFB50, 1.0 per il gruppo AFB100 e 2.0 per il gruppo AFB200. Durante l'ultima settimana, a partire dall'ottantatreesimo giorno, sono stati raccolti giornalmente campioni di urine sia dai gruppi intossicati che dal gruppo di controllo. Trascorsi i 90 giorni dell'esperimento i ratti sono stati sacrificati per esanguinazione² sotto anestesia con isofurano. Successivamente, i campioni di sangue sono stati fatti coagulare per 30 minuti a temperatura ambiente, dopodiché i campioni di siero sono stati centrifugati e aliquotati in microtubi. I campioni di fegato sono stati raccolti, fissati con formalina e inclusi in blocchi di paraffina, o, alternativamente, sono stati conservati a -80°C insieme ai campioni di siero e urine.

In seguito, è stata eseguita la misurazione dell'attività dell'alanina aminotransferasi (ALT) e dell'aspartato aminotransferasi (AST) nel siero, mediante spettrofotometria. Livelli elevati di questi enzimi nel sangue indicano un danno epatico. Inoltre, è stata eseguita l'analisi della creatinina nelle urine con lo scopo di correggere i livelli di AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina nei campioni.

A questo punto sono state svolte diverse analisi dei biomarcatori oncogeni e di inibizione tumorale con lo scopo di valutarne l'espressione.

Le proteine β-catenina, ciclina D1, Rb e GST-P sono state sottoposte a un'analisi immunohistochimica per determinarne la localizzazione utilizzando anticorpi specifici. In questa fase viene analizzata anche la proteina glutatione S-transferasi placentare (GST-P), in quanto è sfruttata come marcatore per identificare i foci preneoplastici di epatociti alterati (FAH), ovvero piccoli gruppi di cellule che stanno rispondendo al danno tossico e stando procedendo verso la trasformazione neoplastica. I vetrini con i campioni epatici sono stati inizialmente deparaffinati e

² Esanguinazione: processo di rimozione del sangue da un organismo vivente; in questo contesto è eseguita con lo scopo di ottenere campioni di sangue senza contaminazioni e per preparare l'animale all'autopsia.

reidratati con delle soluzioni tampone e, in seguito, si è passati alla colorazione immunostochimica. I vetrini sono stati incubati con anticorpi monoclonali specifici per β -catenina, ciclina D1, Rb o GST-P in una camera ad alta umidità a temperatura ambiente (25°C) per un'ora. Dopo l'incubazione con un anticorpo secondario biotilato, si è aggiunto il complesso avidina-biotina per sviluppare il segnale, è stata quindi usata l'ematossilina di Mayer come procedura di controcolorazione. Il siero normale è stato usato come controllo negativo, mentre 20 campioni sono stati casualmente selezionati e analizzati: sono stati considerati positivi per ogni proteina gli epatociti in cui erano chiaramente visibili i segnali di colorazione nel nucleo, citoplasma o membrana plasmatica. L'immunoreattività per β -catenina, ciclina D1 e Rb è stata espressa come percentuale di epatociti positivi, mentre per GST-P come numero di foci e di epatociti positivi per cm² di tessuto.

Il rilevamento della proteina p27^{Kip1} è stato svolto mediante Western Blot, una tecnica adatta per misurare l'espressione proteica e le variazioni delle quantità di proteine tra diversi campioni. I campioni di fegato sono stati omogenizzati in un tampone di lisi con inibitori delle proteasi e, dopo centrifugazione, è stato ottenuto il surnatante. A questo punto, 30 μ g di proteine, provenienti da ogni campione, sono stati separati mediante elettroforesi su gel SDS-poliacrilamide e trasferiti su membrane in polivinilidenefluoruro (PVDF). Le membrane sono state bloccate e incubate *overnight* con anticorpi monoclonali primari anti p27^{Kip1} e, in seguito, sono state trattate con anticorpi secondari coniugati con HRP per la rilevazione. La rivelazione è avvenuta con un sistema chemiluminescente usando il reagente ECL-plus e il trasferimento uniforme tra le corsie è stato confermato attraverso la colorazione con rosso Ponceau. Infine, è stato svolto un controllo interno della procedura sondando nuovamente le membrane con anticorpi anti-GAPDH, per ottenere una quantificazione relativa nel momento delle analisi delle immagini ottenute.

Un ulteriore esame effettuato è l'analisi dell'espressione genica della ciclina D1 e p27^{Kip1}. Il primo passaggio è stato l'estrazione dell'RNA dal tessuto epatico con un apposito *kit*, in seguito è stato effettuato un trattamento con DNasi per eliminare eventuali contaminazioni di DNA genomico. Successivamente, è stata sintetizzata la prima elica di cDNA e le sequenze ottenute sono state usate per la *quantitative real-time PCR* utilizzando le sonde TaqMan. Questa tecnologia permette di quantificare l'espressione genica in relazione al controllo.

Nella seconda fase del presente studio sono state svolte le analisi in merito ai biomarcatori di esposizione ad AFB₁, al fine di quantificarne la concentrazione nel siero e nelle urine.

L'estrazione dei biomarcatori di interesse è stata effettuata con la tecnica delle colonnine di affinità, in particolare, l'AFB₁-lisina è stata estratta dal siero, mentre l'AFM₁ e l'AFB₁-N⁷-guanina dalle urine. Successivamente, 10 μ l degli estratti sono stati iniettati in un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni (UPLC) accoppiato ad uno spettrometro di massa. L'analisi è avvenuta con la modalità Multi

Reaction Monitoring (MRM) con ionizzazione *elettrospray*, la quale monitora specifiche transizioni di massa (m/z) per i diversi metaboliti di AFB₁, escludendo i rumori di fondo e aumentando, perciò, la sensibilità e la precisione. Le transizioni MRM specifiche di ciascun metabolita sono risultate: 457 > 394 – 457 > 376 per AFM₁, 329 > 273 – 329 > 229 per AFB₁-lisina, 480 > 152 – 457 > 135 per AFB₁-N⁷-guanina. Sono state poi preparate le curve di calibrazione, ovvero grafici della relazione tra la concentrazione dei metaboliti e il segnale rilevato dallo spettrometro, per ciascun analita. Per la costruzione delle curve sono stati utilizzati campioni controllo ai quali sono state aggiunte soluzioni standard dei metaboliti.

Infine, sono state svolte le analisi statistiche dei risultati ottenuti: i dati relativi agli enzimi del siero, ai marcatori oncosoppressori e ai marcatori oncogeni sono stati riportati come media ± errore standard della media. I dati sono stati analizzati con test della varianza (ANOVA) per confrontare più gruppi indipendenti, inoltre è stata calcolata la correlazione di Pearson, ovvero un indice che misura la forza di una relazione lineare tra due variabili, tra le concentrazioni dei metaboliti di AFB₁ e i marcatori molecolari di sviluppo dell'HCC.

3.3 Risultati ottenuti

Gli esperimenti di intossicazione cronica con diverse dosi di AFB₁ hanno portato a diversi risultati. L'intossicazione con AFB₁ ha portato allo sviluppo di foci preneoplastici e di *balloning*, ovvero rigonfiamenti, degli epatociti (Fig. 3A e B). In particolare, i ratti del gruppo AFB200, esposti ad una dose più alta, hanno mostrato una quantità elevata di foci preneoplastici, dimostrando un'associazione tra le due variabili. Tutti i gruppi trattati con AFB₁ hanno presentato livelli elevati degli enzimi epatici ALT e AST (Fig. 3C) ma in nessun campione sono stati visualizzati cambiamenti necroinfiammatori significativi. Nei campioni AFB100 e AFB200 si sono osservati alti livelli di espressione di GST-P nei foci preneoplastici. È chiaro, quindi, che nei topi trattati con dosi più elevate la gravità dei danni indotti sia maggiore (Fig 4G e H).

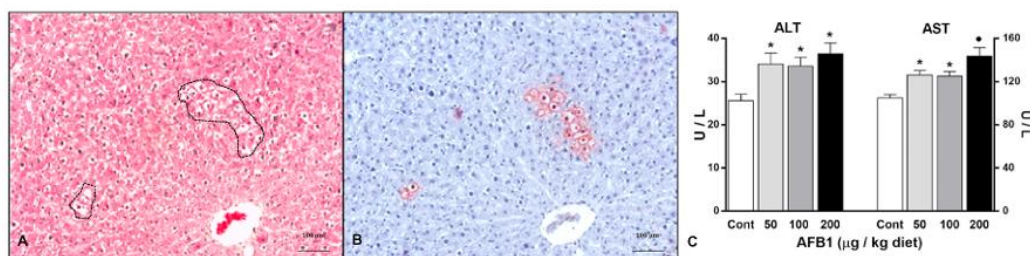


Figura 3 A: Sezione di tessuto epatico proveniente dal gruppo AFB200, in cui sono visibili i foci preneoplastici di epatociti alterati, colorati con ematossilina ed eosina. B: Sezione di tessuto epatico proveniente dal gruppo AFB200, processata con Glutazione-S-Transferasi placentare (GST-P). C: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 50, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sui livelli nel siero di alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST) (Apolinário et al., 2021).

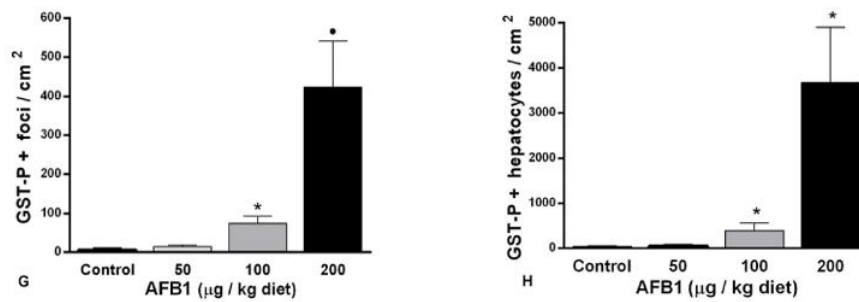


Figura 4 Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 50, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sul numero di foci positivi a GST-P (G) e di epatociti positivi a GST-P (H) per centimetro quadrato di tessuto epatico (Apolinário et al., 2021).

Questi dati sono avvalorati dai risultati delle analisi di immunomarcatura e delle misurazioni dell'espressione genica. L'immunoreattività della β-catenina nelle membrane cellulari è risultata elevata nelle sezioni epatiche dei gruppi AFB100 e AFB200, rispetto ai gruppi di controllo (Fig. 5D), così come la percentuale di nuclei positivi per la ciclina D1 (Fig. 5H), indicando un potenziale aumento della proliferazione cellulare. Dall'analisi di Rb, invece, è risultata una riduzione significativa della marcatura nucleare nei gruppi AFB100 e AFB200, rispetto ai controlli (Fig. 6D), suggerendo una perdita del controllo cellulare; inoltre non è stata rilevata una significativa differenza tra i due gruppi. L'espressione genica di p27^{kip1}, rilevata mediante real-time PCR, è risultata minore nei gruppi AFB100 e AFB200, indicando una riduzione nella regolazione inibitoria della proliferazione cellulare, fattore fondamentale per lo sviluppo di lesioni preneoplastiche (Fig. 6E e F).

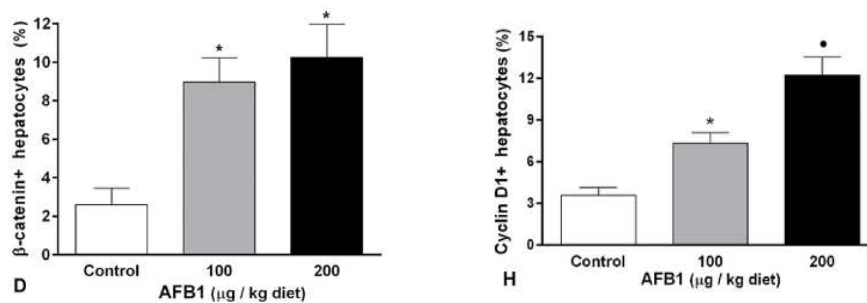


Figura 5 D: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 50, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sulla percentuale di epatociti positivi a β-catenina. H: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 50, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sulla percentuale di epatociti positivi a ciclina D1 (Apolinário et al., 2021).

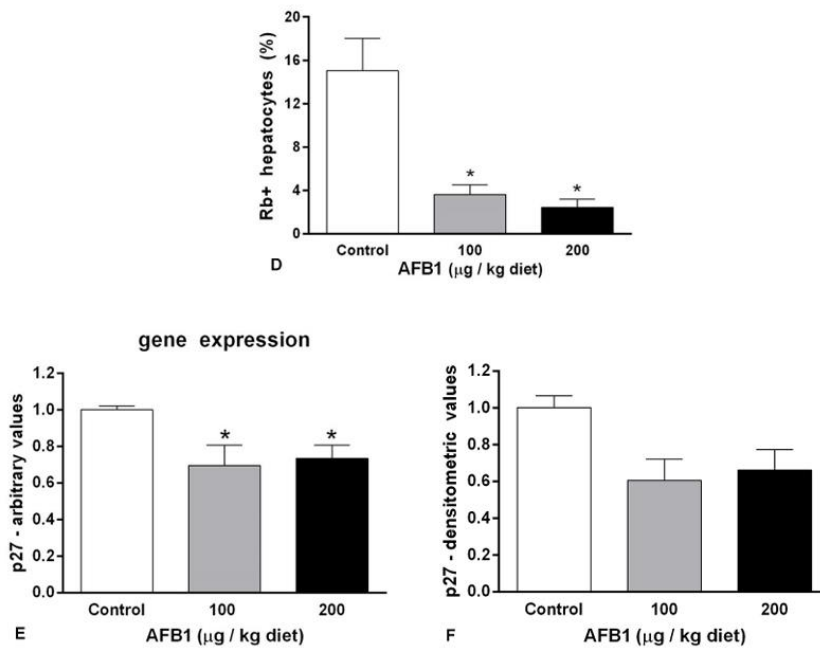


Figura 6 D: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sulla percentuale di epatociti positivi a Rb. E: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sull'espressione epatica di p27^{kip1}. F: Effetto dell'esposizione cronica ad AFB₁ in controllo, 100 o 200 µg AFB₁ kg⁻¹ dieta, sul contenuto epatico di p27^{kip1} (Apolinário et al., 2021).

Per quanto riguarda le analisi dei metaboliti di AFB₁ nelle urine e nel siero, nei gruppi di controllo non sono stati rilevati. In tutti i campioni provenienti da ratti contaminati, invece, sono stati registrati livelli quantificabili di AFB₁-lisina nel siero o di AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina nelle urine; i valori sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2 Livelli dei metaboliti di AFB₁ nel siero e nelle urine ricavati da topi Wistar alimentati con AFB₁ per 90 giorni (Apolinário et al., 2021). LOD: limit of detection

AFB ₁ level (µg kg ⁻¹)	Serum AFB ₁ - lysine (ng mL ⁻¹)	Urinary AFM ₁ (ng mg ⁻¹ creatinine)	Urinary AFB ₁ -N ⁷ - guanine (ng mg ⁻¹ creatinine)
Control	<LOD	<LOD	<LOD
50	20.42 ± 6.97	5.31 ± 1.89	39.15 ± 29.91
100	44.58 ± 11.74	11.19 ± 2.96	68.46 ± 20.04
200	50.34 ± 16.33	37.68 ± 12.91	126.37 ± 45.71

È evidente una correlazione tra dose e risposta, in quanto le concentrazioni dei metaboliti aumentano nei gruppi alimentati con dosi maggiori di AFB₁.

Dai risultati degli esperimenti del presente studio si evince una chiara correlazione tra i biomarcatori oncogeni e i metaboliti di AFB₁ nel siero e nelle urine. Nello specifico, è stata osservata una correlazione positiva ($p < 0.01$) tra i livelli urinari di AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina e il numero di epatociti GST-P+ e foci preneoplastici epatici. Inoltre, sono state riscontrate correlazioni positive ($p = 0.02$) tra l'AFB₁-

lisina nel siero o AFB₁-N⁷-guanina urinaria e la percentuale di epatociti positivi per β-catenina, così come è stata rilevata una correlazione positiva ($p < 0.01-0.02$) tra la percentuale di nuclei marcati con ciclina D1 e l'AFB₁-lisina nel siero e i metaboliti urinari. Gli epatociti positivi per Rb e i biomarcatori presi in esame hanno evidenziato, invece, una correlazione negativa ($p < 0.01$). I dati appena discussi sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3 Coefficienti di correlazione (r) tra AFB₁-lisina nel siero, AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina nelle urine e marcatori oncogeni ricavati da ratti Wistar alimentati con AFB₁ per 90 giorni (Apolinário et al., 2021).

Marker	Serum AFB ₁ -lysine		Urinary AFM ₁		Urinary AFB ₁ -N ⁷ -guanine	
	r	P value	r	P value	r	P value
GST-P+ foci	0.33	0.07	0.65	<0.01	0.69	<0.01
GST-P+ cells	0.23	0.19	0.54	<0.01	0.49	<0.01
β-catenin + cells	0.50	0.02	0.41	0.05	0.50	0.02
Cyclin D1+ cells	0.73	<0.01	0.61	<0.01	0.53	0.02
Rb + cells	- 0.75	<0.01	- 0.54	<0.01	- 0.66	<0.01

3.4 Biomarcatori molecolari di sviluppo tumorale associati a biomarcatori di esposizione

Nel presente studio sono stati valutati i danni epatici, le lesioni preneoplastiche e i cambiamenti nell'espressione genica indotti in ratti esposti a diverse dosi giornaliere di AFB₁ per 90 giorni, con l'obiettivo di esaminare gli effetti epatici di un'intossicazione cronica. I risultati ottenuti hanno evidenziato una forte correlazione tra la dose assunta e l'insorgenza di alterazioni legate ai processi di cancerogenesi.

Sono stati valutati i livelli di diversi biomarcatori di esposizione ad AFB₁ (AFB₁-lisina nel siero, AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina nelle urine) e parallelamente sono state analizzate le concentrazioni di biomarcatori molecolari, oncogeni e oncosoppressori, coinvolti in eventi preneoplastici. I risultati hanno riportato una sovraespressione dei marcatori oncogeni (β-catenina e ciclina D1) nei campioni ricavati dai ratti esposti a dosi più elevate (AFB100 e AFB200), mentre una sottoespressione dei marcatori oncosoppressori (Rb e p27^{kip1}).

Infine, le concentrazioni dei metaboliti AFB₁-lisina, AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina sono state confrontate con i dati ricavati dai biomarcatori molecolari. Attraverso interpretazioni statistiche è stata trovata un'associazione positiva con epatociti GST-P+, β-catenina+ o ciclina D1+, mentre un'associazione negativa con epatociti Rb+.

Gli esperimenti condotti nello studio confermano le proprietà cancerogene delle aflatoxine e il coinvolgimento dei pathway molecolari esaminati nei meccanismi di cancerogenesi indotta da AFB₁.

CAPITOLO 4: Conclusioni

4.1 Ruolo dei biomarcatori nella diagnosi dell'epatocarcinoma

Le analisi condotte in questa tesi hanno messo in luce l'importanza e l'esigenza di sviluppare *biomarkers* per la prevenzione dell'HCC indotto da AFB₁, sottolineando il loro ruolo sia come marcatori di esposizione che come strumenti di diagnosi precoce. Il tasso di incidenza e la mortalità associata a questa malattia sono estremamente elevati a causa, principalmente, dell'assenza di sintomi nelle fasi iniziali, il che rende i soggetti colpiti inconsapevoli dei rischi e causa ritardi nell'intervento medico. È quindi cruciale identificare molecole specifiche che permettano, in primo luogo, di evidenziare l'esposizione cronica di AFB₁, in modo da eliminare alla radice il problema monitorando i livelli di contaminazione e, in secondo luogo, di rilevare precocemente la presenza di cellule trasformate, prima che evolvano in HCC.

Il primo studio preso in considerazione (Chawanthayatham *et al.*, 2017) ha permesso di definire il profilo mutagenico conseguente all'esposizione ad AFB₁, consentendo di comprendere il tipo di mutazioni e le regioni *hotspot* caratteristiche dell'induzione da AFB₁. Risulta, perciò, possibile identificare i geni coinvolti nel processo e prevedere le funzioni cellulari che potrebbero essere alterate. Più nello specifico, viene confermato che l'alterazione genetica distintiva sia la mutazione G→T nel codone 249 del gene TP53, configurandosi come uno dei principali biomarcatori molecolari associati all'esposizione ad AFB₁. Gli esperimenti sono stati svolti utilizzando la tecnica del sequenziamento duplex che ha consentito di definire con grande accuratezza gli spettri mutazionali. Infine, viene evidenziato che i profili mutagenici ottenuti da rilevazioni precoci costituiscano strumenti preziosi per la diagnosi e la prevenzione, ma non garantiscono la certezza dello sviluppo di HCC. Questo perché le cellule tumorali di tessuti derivanti da esposizioni a lungo termine rivelano uno spettro più ampio di mutazioni, suggerendo la necessità di tenere in considerazione la sinergia di diversi fattori, come infiammazioni e infezioni, che insieme aumentano significativamente il rischio di insorgenza di HCC.

Gli esperimenti del secondo studio (Apolinário *et al.*, 2021) hanno evidenziato una forte correlazione tra dose e risposta, ovvero tra la quantità di aflatossine ingerite e l'espressione dei biomarcatori di esposizione presi in considerazione e rilevati nelle urine e nel siero (AFM₁, AFB₁-N⁷-guanina, AFB₁-lisina). Inoltre, sono state studiate le alterazioni nell'espressione dei soppressori tumorali (sottoespressione di Rb e p27^{kip1}) e degli oncogeni (sovraespressione di β-catenina e ciclina D1), confermando la loro rilevanza nella progressione neoplastica di HCC. Infine, viene sottolineato come le molecole prese in considerazione possano trovare applicazione come biomarcatori di esposizione ad AFB₁ e biomarcatori molecolari di HCC, diventando strumenti utili per la diagnosi, monitoraggio della malattia e dell'efficacia delle terapie.

I risultati portano alla luce un valore clinico dei biomarcatori trovati: gli spettri di mutazioni precoci ottenuti sono strumenti che offrono nuove opportunità per il monitoraggio del rischio di HCC in aree geografiche in cui l'esposizione ad AFB₁ è elevata. In aggiunta, in questi territori ad alto rischio, i biomarcatori di esposizione rilevati nelle urine e nel siero potrebbero essere integrati in programmi di screening su larga scala.

Il primo studio, quindi, si concentra sulla genetica delle mutazioni indotte da AFB₁, mentre il secondo approfondisce le conseguenze sistemiche dell'esposizione ad AFB₁. I due studi analizzati, dunque, forniscono due prospettive diverse ma complementari sul ruolo dei biomarcatori.

4.2 Prospettive future di ricerca

Negli ultimi anni si è vista una crescita esponenziale nello sviluppo e nell'utilizzo dei biomarcatori nella diagnosi, non solo nell'ambito dell'HCC indotto da AFB₁. Ad esempio, in una recente review (Dubois *et al.*, 2023), gli autori mostrano l'applicazione dei biomarcatori nell'ambito della malattia di Alzheimer, sottolineando nuovamente la necessità di rilevare precocemente, negli stadi iniziali, le alterazioni molecolari per migliorare le aspettative di vita. Anche in questo contesto viene evidenziata la necessità di combinare l'uso di più biomarcatori per una migliore precisione e una maggiore affidabilità dei risultati. È chiaro, perciò, che il tema dei biomarcatori non sia confinato solo nel quadro di AFB₁ e dell'HCC, ma possa trovare applicazione in diverse patologie.

Nonostante i progressi significativi nella ricerca sui biomarcatori, raggiunti nell'ultimo decennio, sono presenti ancora molti limiti, in particolare relativi ai marcatori tumorali precoci e alle tecnologie impiegate. Le prospettive future, quindi, debbono concentrarsi sull'integrazione di tecnologie avanzate per la rilevazione, ad esempio tecnologie bioinformatiche per l'analisi dei dati, sulla validazione di nuovi biomarcatori, come marcatori sintetici e sensori bioingegnerizzati, e sull'adozione di approcci non invasivi. L'obiettivo finale sarà quello di poter effettuare diagnosi precoci e terapie personalizzate migliorando le possibilità di guarigione (Das *et al.*, 2023).

In conclusione, un ulteriore ambito di ricerca interessante è quello della prevenzione della contaminazione, ovvero la mitigazione delle aflatossine. Si intende, dunque, ridurre i rischi per la salute derivanti dalla contaminazione di aflatossine nei prodotti alimentari, eliminando alla radice uno dei principali fattori causanti HCC. Sono stati sviluppati numerosi metodi alternativi applicati prima della raccolta e dopo la raccolta. In particolare, le tecnologie di ingegneria genetica, ambito in grande sviluppo, si concentrano sulla manipolazione genica di *A. flavus* al fine di ridurre la produzione di aflatossine, sul silenziamento genico mirato della produzione di queste tossine e sulla creazione di colture transgeniche resistenti ad infezioni fungine (Pickova *et al.*, 2021).

Bibliografia

Apolinario *et al.*, (2021). Oncogenic and tumor suppressor pathways in subchronic aflatoxicosis in rats: Association with serum and urinary aflatoxin exposure biomarkers. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112263.

Chawanthayatham *et al.*, (2017). Mutational spectra of aflatoxin B1 in vivo establish biomarkers of exposure for human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(15), E3101-E3109.

Das *et al.*, (2023). Biomarkers in cancer detection, diagnosis, and prognosis. *Sensors*, 24(1), 37.

Dubois *et al.*, (2023). Biomarkers in Alzheimer's disease: role in early and differential diagnosis and recognition of atypical variants. *Alzheimer's Research & Therapy*, 15(1), 175.

Knudsen *et al.*, (2020). Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway. *Communications Biology*, 3(1), 158.

Long *et al.*, (2018). Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma Related to Aflatoxins: An Update. InTech. doi: 10.5772/intechopen.72883

Marchese *et al.*, (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10(6), 214.

Pickova *et al.*, (2021). Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins*, 13(6), 399.

Ramalho *et al.*, (2018). Aflatoxin B1 residues in human livers and their relationship with markers of hepatic carcinogenesis in São Paulo, Brazil. *Toxicology reports*, 5, 777-784.