



Università degli Studi di Padova
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina (DIMED)

Direttore: Chiar.mo Prof. Roberto Vettor

U.O.C. Clinicizzata Anatomia Patologica ULSS2

Direttrice: Chiar.ma Prof.ssa Maria Guido

TESI DI LAUREA

**RUOLO DELLA FERROPTOSI
NEL COLANGIOCARCINOMA INTRAEPATICO:
STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO E MOLECOLARE**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Maria Guido

Correlatore: Dr.ssa Samantha Sarcognato

Laureando: Davide Corna

Matricola: 1130849

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE	5
1.1. COLANGIOCARCINOMA	5
1.1.1. Visione generale:	5
1.1.2. Colangiocarcinoma Intraepatico (iCCA)	7
1.2. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE	18
1.2.1. Visione Generale:	18
1.2.2. Ferroptosi:	20
2. SCOPO DELLO STUDIO:.....	31
3. MATERIALI E METODI:.....	31
3.1. SELEZIONE DEI CASI:	31
3.2. DATI CLINICI:	32
3.3. STUDIO ISTOLOGICO:	32
3.4. STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO:	33
3.5. STUDIO MOLECOLARE:	38
3.6. ANALISI STATISTICA:	38
4. RISULTATI:	39
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:	49
BIBLIOGRAFIA.....	51

ABSTRACT

Background: Il colangiocarcinoma intraepatico (iCCA) è un tumore con una prognosi infausta e spesso caratterizzato da un microambiente anti-apoptotico, punto chiave della frequente resistenza alla chemioterapia. E' stato descritto un sottogruppo di iCCAs con mutazione dei geni isocitrato deidrogenasi 1 o 2 (*IDH1-2*), che ha dimostrato una prognosi migliore. La ferroptosi è una modalità di morte cellulare regolata ferro-dipendente attivata dall'inibizione dell'enzima glutatione perossidasi 4 (GPX4), che può essere indotta anche farmacologicamente. E' noto che GPX4 sia overespresso in molti tumori aggressivi, mentre la sua espressione risulta inibita in cellule con mutazione *IDH1^{R132C}*. Nel nostro studio abbiamo indagato l'espressione dei marker di attivazione della ferroptosi in casi di iCCA e la sua correlazione con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti e lo status di *IDH1-2*.

Materiali e Metodi: Sono stati selezionati 112 pazienti sottoposti a resezione epatica o biopsia epatica per iCCA. L'attivazione della ferroptosi è stata indagata tramite colorazioni immunohistochimiche per il recettore della transferrina 1 (TFR1) e GPX4, e colorazione istochimica di Perls per la valutazione dei depositi intratumorali di ferro. Su 90 pazienti sono state inoltre eseguite indagini molecolari per la ricerca delle principali mutazioni di *IDH1-2* tramite *real-time polymerase chain reaction*.

Risultati: Nel 79.5% dei casi GPX4 è risultato overespresso ed ha dimostrato una correlazione diretta con la presenza di fattori prognostici istologici sfavorevoli (alto grado di differenziazione, invasione vascolare e perineurale; $p < 0.005$ per tutti) e con una prognosi peggiore (OS $p = 0.03$; DFS $p = 0.01$). In circa il 12% dei casi abbiamo osservato il single nucleotide polymorphism (SNP) *IDH1^{105GGT}*, mai descritto finora nel iCCA, che è risultato correlare con un grado tumorale più basso ($p < 0.0001$), con una sopravvivenza globale più lunga ($p = 0.04$) e con livelli più bassi di GPX4 ($p = 0.001$).

Conclusioni: Il nostro studio ha dimostrato per la prima volta che nella maggior parte dei iCCAs la ferroptosi non risulta attiva, e che la sua attivazione correla

con lo status di *IDH1-2*. Questo supporta un possibile ruolo terapeutico dei farmaci induttori della ferroptosi nei pazienti con iCCA, soprattutto nei casi resistenti alle terapie.

ABSTRACT

Objectives: Intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA) has a dismal prognosis and often demonstrates an anti-apoptotic landscape, which is a key step to chemotherapy resistance. Isocitrate dehydrogenase 1 or 2 (*IDH1-2*)-mutated ICCs have been described and associated with better prognosis. Ferroptosis is a regulated iron-mediated cell death induced by glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibition, and may be triggered pharmacologically. GPX4 is overexpressed in aggressive cancers, while its expression is inhibited by *IDH1*^{R132C} mutation in cell lines. We investigated tissue expression of ferroptosis activation markers in iCCA and its correlation with clinical-pathological features and *IDH1-2* status.

Materials and methods: We enrolled 112 patients who underwent hepatic resection or diagnostic liver biopsy for iCCA. Immunostaining for transferrin-receptor 1 and GPX4, and Pearls' stain for iron deposits were performed to evaluate ferroptosis activation. Main *IDH1-2* mutations were investigated in 90 cases by real-time polymerase chain reaction.

Results: GPX4 overexpression was seen in 79.5% of cases and related to poor histological prognostic factors (grading and perineural and vascular invasion; $p < 0.005$ for all) and worse prognosis (OS $p = 0.03$; DFS $p = 0.01$). Nearly 12% of cases showed *IDH1*^{105GGT} single nucleotide polymorphism, which was never described in iCCA up to now, and was related to lower tumor grade ($p < 0.0001$), longer overall survival ($p = 0.04$), and lower GPX4 levels ($p = 0.001$).

Conclusions: Our study demonstrates for the first time that in most iCCAs ferroptosis is not active, and its triggering is related to *IDH1-2* status. This supports the possible therapeutic role of ferroptosis-inducer drugs in iCCA patients, especially in drug-resistant cases.

1. INTRODUZIONE

1.1. COLANGIOCARCINOMA

1.1.1. Visione generale:

Il colangiocarcinoma (CCA) è il secondo tipo di tumore epatico maligno più frequente dopo l'epatocarcinoma (HCC). Origina dalle cellule di rivestimento dei dotti biliari intra ed extra-epatici, i colangiociti, e rappresenta il 3% di tutti i tumori del tratto gastrointestinale. (1) In base alla sede anatomica da cui origina viene distinto in colangiocarcinoma intraepatico (iCCA), localizzato prossimalmente alla prima divisione dei dotti epatici destro e sinistro, colangiocarcinoma peri-ilare (pCCA), localizzato a livello dei dotti epatici destro e/o sinistro e/o dotto epatico comune, e colangiocarcinoma distale (dCCA), localizzato a livello del coledoco, quindi distalmente all'inserzione del dotto cistico (2), come mostrato in figura 1. Non rientrano in questa classificazione il cancro della colecisti e il cancro dell'ampolla di Vater. (4)

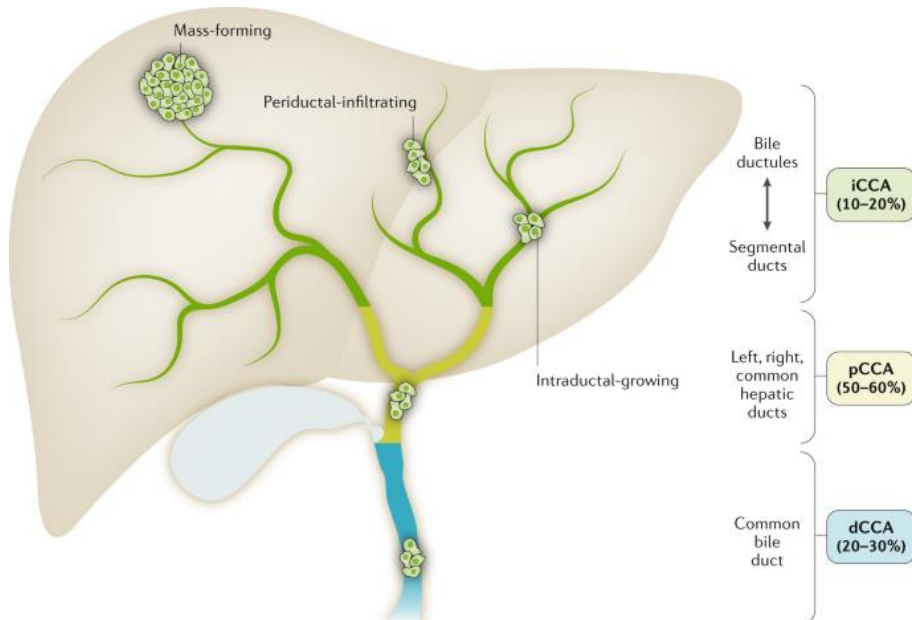


Figura 1: Classificazione del colangiocarcinoma. Tratto da (2)

Si tratta di un tumore raro prima dei 40 anni e il rischio è maggiore negli individui di sesso maschile. (3) L'incidenza risente di un grande variabilità, in base alle

regioni geografiche, in funzione dei fattori di rischio ambientali e genetici: è maggiore nei paesi asiatici (fino ad 85/100000 abitanti in Thailandia, dove il principale fattore di rischio è l'infezione da *Opisthorchis viverrini*) e minore nei paesi occidentali (0.4/100000 abitanti in Canada) (5), dove i principali fattori di rischio sono eccessivo consumo di alcol, fumo, infezioni virali (HBV e HCV) e obesità con conseguente NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) e possibile evoluzione in NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis). (6) Caratteristica comune a tutti questi fattori di rischio è la presenza di flogosi cronica dell'epitelio biliare. (7)

Tabella I: Fattori di rischio del CCA. Tratto da (4)

Fattori di rischio	OR (95% CI) iCCA	OR (95% CI) pCCA-dCCA
Cisti del coledoco	26.71 (15.80-45.16)	34.94 (24.36-50.12)
Colangite Sclerosante Primitiva	21.52 (7.21-26.90)	40.80 (34.96-47.60)
Coledocolitiasi	10.08 (5.50-18.49)	18.58 (11.07-31.18)
Cirrosi Epatica	15.32 (9.33-25.15)	3.82 (2.58-5.65)
Pancreatite cronica	6.61 (5.21-8.40)	2.66 (1.72-4.10)
Colelitiasi	3.38 (1.93-5.92)	5.92 (3.09-11.32)
Infezioni da HBV	4.57 (3.43-6.09)	2.11 (1.64-2.73)
Infezioni da HCV	4.28 (2.98-6.16)	1.98 (1.33-2.94)
Consumo Alcolico	3.15 (2.24-4.41)	1.75 (1.20-2.55)
NAFLD	2.22 (1.52-3.24)	1.55 (1.03-2.33)
Colecistolitiasi	1.75 (0.97-3.16)	2.94 (2.10-4.11)
IBD	2.68 (1.79-4.01)	2.37 (1.34-4.22)
DM tipo 2	1.73 (1.47-2.04)	1.50 (1.31-1.71)
Fumo di sigaretta	1.25 (1.05-1.49)	1.69 (1.28-2.22)
Ipertensione	1.10 (0.89-1.37)	1.21 (0.7-1.90)
Obesità	1.14 (0.93-1.39)	1.20 (0.84-1.70)

(HBV: Hepatitis B Virus; HCV: Hepatitis C Virus; NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease; IBD: Inflammatory Bowel Disease; DM: Diabetes Mellitus)

Nelle fasi iniziali il CCA (specialmente la forma intraepatica) risulta del tutto asintomatico, motivo per cui alla diagnosi si presenta spesso in stadio avanzato, riducendo di molto le opzioni terapeutiche e correlando con una prognosi sfavorevole. La sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi è infatti di circa il 7-20% (2), ed è peggiore nelle forme intraepatiche.

L'unica terapia potenzialmente curativa è rappresentata dalla chirurgia radicale, che tuttavia è riservata ai casi (30%) che vengono diagnosticati in fase iniziale. In casi selezionati, è possibile il trapianto di fegato, gravato tuttavia da possibile recidiva del tumore (fino al 50% dei casi). (9) Nei casi in cui il tumore non risulti resecabile sono attuabili chemioterapia, TARE (transarterial radioembolization), TACE (transarterial chemoembolization), ablazione con radiofrequenze ed infine le cure palliative. (8)

1.1.2. Colangiocarcinoma Intraepatico (iCCA)

1.1.2.1. Epidemiologia e fattori di rischio:

Il iCCA rappresenta il 20-25% di tutti i CCA, mentre la forma più frequente è quella peri-ilare (pCCA = 50-60%). (10)

A differenza del pCCA e del dCCA, la cui incidenza sembra essersi stabilizzata negli anni, quella del iCCA è in aumento a livello globale (11), con una maggiore predisposizione verso il sesso maschile (rapporto maschi:femmine = 1.5:1) (10) e con un picco attorno ai 70 anni (7); essa risente di una grande variabilità dal punto di vista geografico in funzione dei fattori di rischio ambientali e genetici. (5) Anche la mortalità per iCCA è aumentata negli ultimi anni, parallelamente all'andamento dell'incidenza (12).

Tra i fattori di rischio di iCCA accertati sono compresi Colangite Sclerosante Primitiva (PSC), Cirrosi Biliare Primitiva (PBC), cisti del coledoco, infezioni da *Ophistorchis viverrini* o *Clonorchis sinensis* (tipiche dei paesi del Sud-Est asiatico come la Thailandia), infezioni da HBV e HCV, obesità, NAFLD e NASH, malattie infiammatorie croniche intestinali, esposizione a tossine, colelitiasi ed eccessivo

consumo di alcol. (7) (10) Altri fattori probabilmente associati allo sviluppo di iCCA sono diabete, tireotossicosi, pancreatite cronica e fumo. (10) Esiste tuttavia una grande percentuale di iCCA che insorge *de novo* su fegati sani, in assenza di qualunque patologia sottostante. (13)

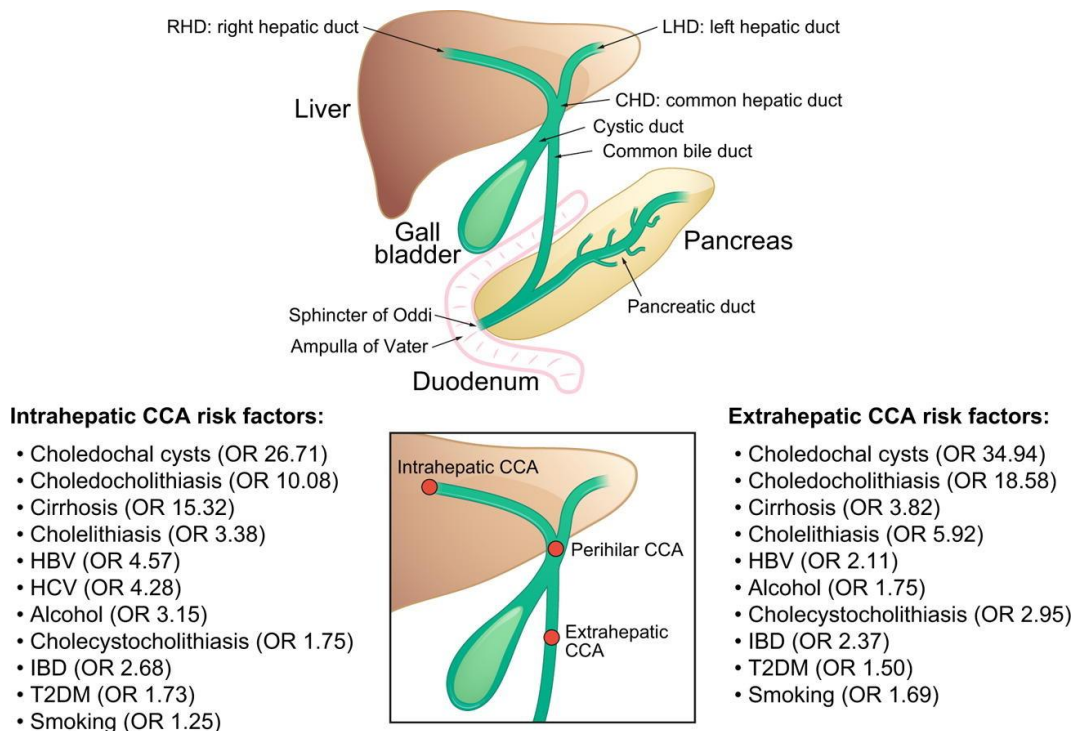


Figura 2: Fattori di rischio del iCCA e del eCCA. Tratto da (6)

1.1.2.2. Manifestazioni Cliniche e Diagnosi:

La maggior parte dei pazienti con iCCA è asintomatica, motivo per cui spesso la neoplasia si trova già in stadio avanzato alla diagnosi (15), quando non è più resecabile. (16) Quando sintomatici, i pazienti si presentano più frequentemente con dolore addominale generalizzato, mentre è più rara la presentazione con ittero ostruttivo e perdita di peso, tipici invece del pCCA e del dCCA per via dell'interessamento dei dotti biliari di maggior calibro. (14)

La diagnosi si basa sulla combinazione di *imaging*, esami di laboratorio ed istologia. Per l'*imaging* ci si affida alla tomografia assiale computerizzata (TC) (che rimane il *gold standard*) ed alla risonanza magnetica (RMN); alcuni elementi caratteristici riconoscibili alla TC sono: lieve aumento di contrasto a livello dei bordi in entrambe le fasi (arteriosa e venosa) e aree di lieve attenuazione al

contrasto circondate da aree con attenuazione più marcata (anche questo in entrambe le fasi). (17) Alla RMN si osserva invece ipointensità nelle sequenze T1-pesate, iperintensità nelle T2-pesate, e un aumento periferico di contrasto che progredisce con andamento concentrico. (19) TC e RMN risultano le tecniche migliori, soprattutto da un punto di vista preoperatorio, per studiare il tumore primario, per valutare l'eventuale coinvolgimento di strutture limitrofe e per indagare un'eventuale diffusione tumorale a livello toracico. La PET con 18-fluorodesossiglucosio non si è dimostrata dirimente nelle fasi iniziali della diagnosi, ma risulta utile nella valutazione preoperatoria per individuare eventuali localizzazioni metastatiche non visibili con le due tecniche precedenti. (20) Allo studio ecografico non ci sono caratteristiche particolari che permettono di differenziare un iCCA da una metastasi epatica secondaria o da un HCC, mentre può essere utile, sempre in fase preoperatoria, l'eco-doppler per valutare l'invasione dei rami venosi e arteriosi di maggior calibro. (20) (21)

Il parametro più ricercato a livello laboratoristico è il CA19.9, anche se è un marcatore molto aspecifico; infatti, un suo aumento può essere riscontrato in molte patologie benigne e maligne. Risulta invece molto utile in un contesto di Colangite Sclerosante Primitiva (PSC) con concomitante lesione intraepatica sospetta: in questi pazienti un valore di CA19.9 > 100 U/mL presenta sensibilità e specificità rispettivamente del 75% e del 80% per la diagnosi di colangiocarcinoma. (22) Un altro marcatore ricercato è l' α -fetoproteina, utile nel differenziare l'iCCA dall'HCC, orientando la diagnosi verso quest'ultimo.

L'elemento cardine per la diagnosi definitiva di iCCA rimane comunque la biopsia, che viene effettuata nella maggior parte dei casi per via percutanea sotto guida ecografica, adottando quindi un approccio minimamente invasivo. (8)

1.1.2.3. Caratterizzazione Molecolare

Nel corso degli anni sono stati eseguiti molti studi per sequenziare geneticamente il CCA in generale e per cercare di fare chiarezza sulla sua complessità a livello molecolare. Le alterazioni geniche più frequentemente riscontrate nel iCCA sono mutazioni di *IDH1/2* (10-20%) e fusioni di *FGFR2* (8-

14%), alterazioni quasi esclusive della variante di iCCA a piccoli dotti, che rappresentano un possibile bersaglio farmacologico (37). Sono state riportate inoltre mutazioni di *BAP1* e delezioni di *EPHA2*. La variante a grandi dotti di iCCA invece è caratterizzata da delezioni di *SMAD4* ed amplificazioni di *MDM2*, mentre condivide alcune alterazioni con il eCCA, tra cui mutazioni a livello dell'oncogene *KRAS* e del gene oncosoppressore *TP53*. (23) Altre alterazioni molecolari riscontrabili nel iCCA sono mutazioni dei geni implicati nel rimodellamento della cromatina, come *ARID1A*, *PBRM1*, *CDKN2A/B* ed *ERBB2/3*.

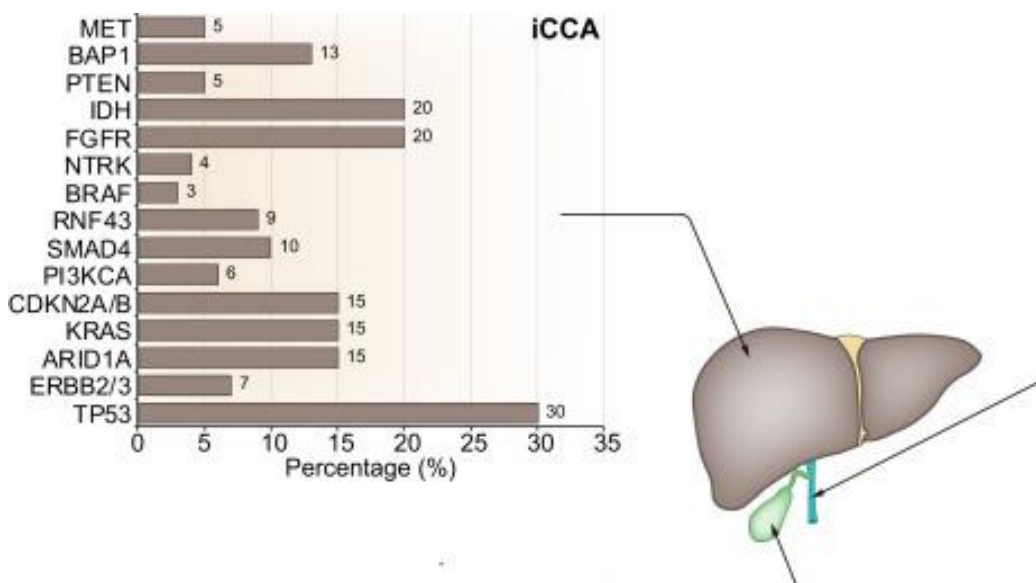


Figura 3: Geni più frequentemente alterati nel iCCA. Tratto da (25)

Uno studio condotto su iCCA ha dimostrato che il profilo genomico di iCCA insorti su fegato cirrotico è molto simile a quello di iCCA insorti su fegato sano, che condividono quindi le principali alterazioni molecolari. (24)

Studi molecolari approfonditi hanno permesso di classificare il iCCA in due principali sottoclassi molecolari, ovvero la sottoclasse infiammatoria e la sottoclasse proliferativa, che mostrano coinvolgimento di pathways oncogeniche diverse.

Nella sottoclasse proliferativa è stata evidenziata una maggior attivazione di vie di traduzione del segnale che inducono un'aumentata proliferazione cellulare,

che sono la via di *KRAS/RAF/ERK* e la cascata di *PI3K/AKT/mTOR*, e tra i geni maggiormente implicati in queste vie rientrano: *RTK*, *RAS*, *MET*, *VEGF*, *HDAC1*, *PI3K*, *RALA*, *IGF1R*, *NOTCH*, *EGFR* e *PDGF*. Gli iCCA di questa sottoclasse hanno dimostrato un comportamento clinico più aggressivo e sono geneticamente simili agli HCC con scarsa prognosi, suggerendo un possibile fattore comune tra queste due entità. (26) Gli iCCA di tipo proliferativo presentano inoltre una ridotta sopravvivenza libera da malattia. (26) (Figura 5)

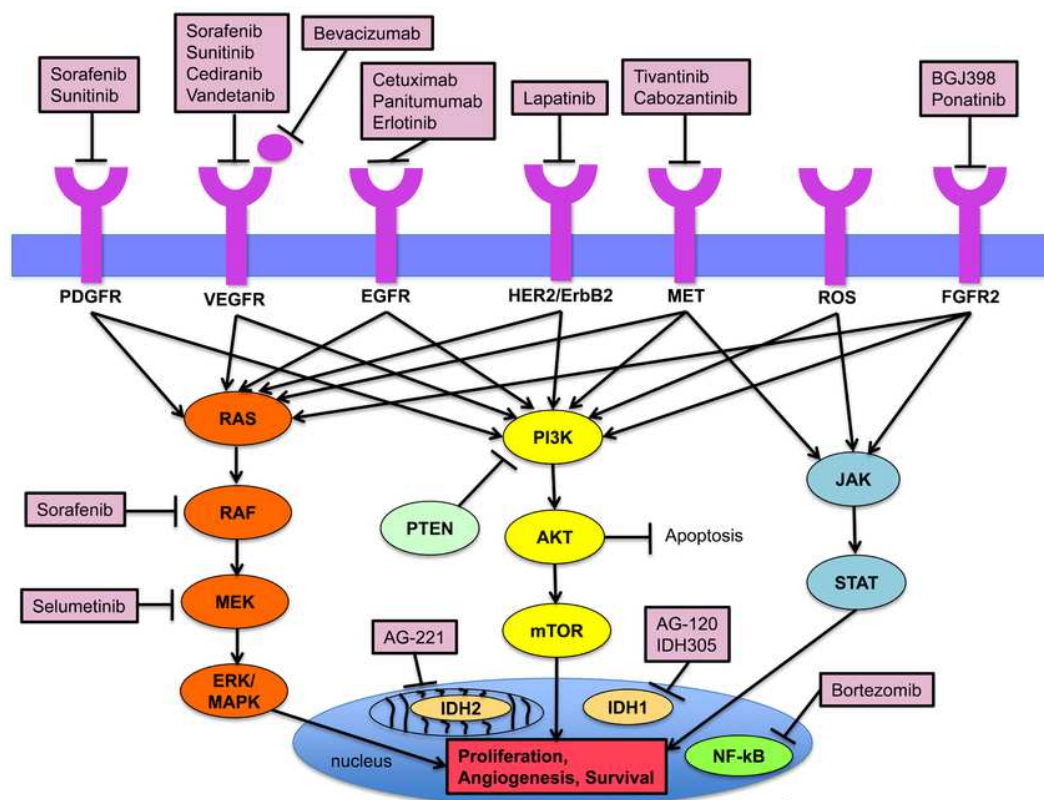


Figura 4: Pathways oncogeniche nel iCCA. Tratto da (32)

Parallelamente, la sottoclasse infiammatoria è caratterizzata da un'attivazione di pathway normalmente coinvolte nella risposta immunitaria, nelle quali hanno un ruolo fondamentale citochine come l'IL-4, l'IL-6 e l'IL-17. Il fattore chiave per la via di segnalazione delle citochine è l'oncogene *STAT3*, la cui controparte fosforilata (pSTAT3) è risultata aumentata a livello nucleare nel 77% dei tumori rientranti nella sottoclasse infiammatoria. (26)

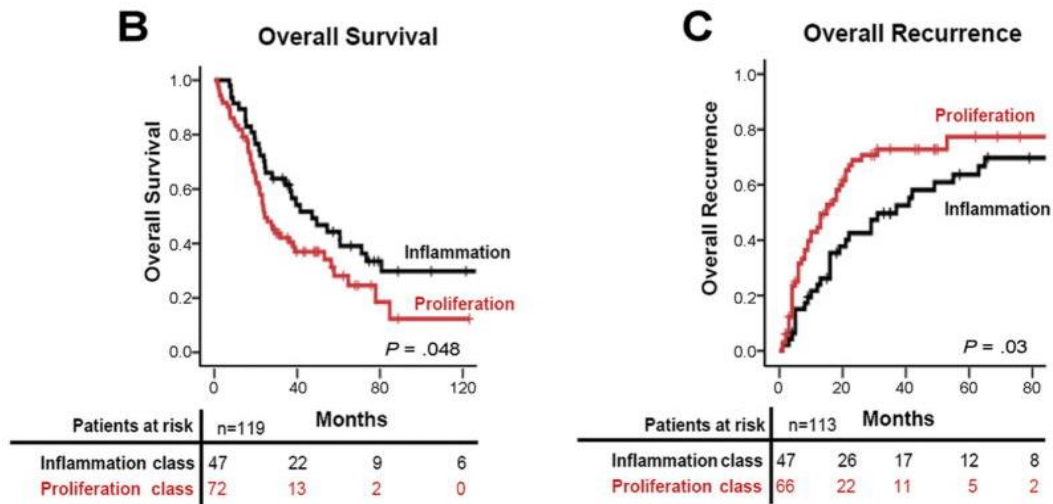


Figura 5: Tassi di sopravvivenza e recidiva delle due sottoclassi di iCCA. Tratto da (26)

1.1.2.4. Istologia e Stadiazione

Il iCCA può originare a qualunque livello dell'albero biliare intraepatico e, a differenza dell'HCC, solitamente insorge *de novo* in fegati non cirrotici. (13) Secondo alcune teorie, sembra che il iCCA possa potenzialmente originare da diversi tipi di cellule, tra cui colangiociti più o meno maturi, cellule staminali epatiche situate a livello dei canali di Hering, cellule progenitrici dei dotti biliari e probabilmente anche dalla dedifferenziazione degli epatociti. (31) In base al pattern di crescita, il iCCA viene distinto in 3 forme principali (10): quella *mass-forming* è la più comune e si presenta come un nodulo solido all'interno del parenchima epatico circostante. La forma periduttale-infiltrante invade invece il parenchima epatico lungo il decorso dei dotti biliari per poi metastatizzare ai linfonodi ilari e può causare un restringimento del dotto biliare interessato durante la crescita, con conseguente dilatazione a valle dei dotti biliari periferici ed eventuale comparsa di ittero. L'ultima forma è quella a crescita intraduttale e, come si deduce dal nome stesso, cresce all'interno del lume del dotto con aspetto polipoide o papillare e con possibile ulcerazione della superficie del dotto interessato. Essa rappresenta la degenerazione maligna della neoplasia papillare intraduttale del dotto biliare (IPNB) ed è la forma con comportamento meno aggressivo e con una prognosi più favorevole, ma tuttavia la meno frequente. (27) E' stata descritta anche una forma combinata *mass-forming* +

periduttale-infiltrante, caratterizzata da comportamento clinico molto aggressivo, con un peggioramento della prognosi. (28)

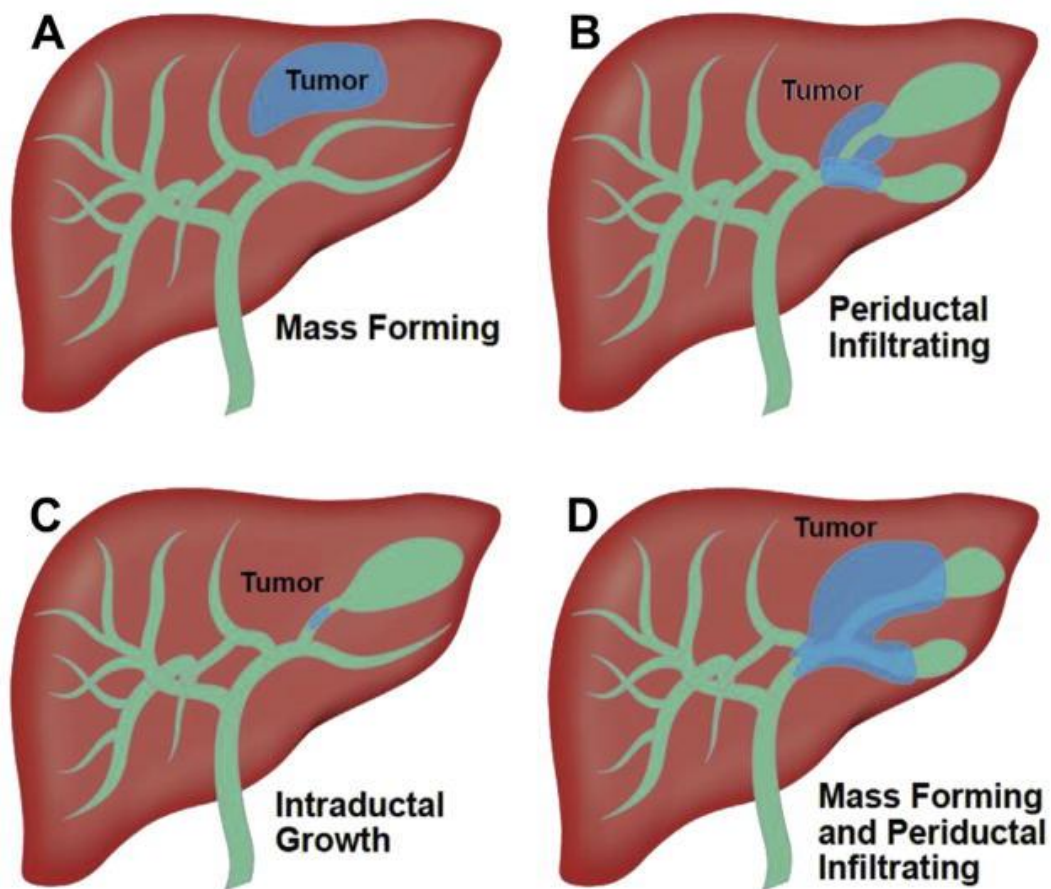


Figura 6: Pattern di crescita del iCCA. Tratto da (10)

Istologicamente, il iCCA è un adenocarcinoma che può essere ben, moderatamente o scarsamente differenziato, con un pattern architetturale di tipo duttale, tubulare o a cordoni, e molto frequentemente immerso in un abbondante stroma fibroso. Il iCCA viene suddiviso in due sottotipi principali che sono: iCCA a grandi dotti, che origina dai dotti biliari intraepatici di maggior calibro vicini all'ilo epatico, e iCCA a piccoli dotti, che origina dai dotti biliari intraepatici situati alla periferia dell'albero biliare. E' stato ipotizzato che il iCCA a grandi dotti derivi dalla degenerazione neoplastica dei colangiociti colonnari o delle ghiandole peribiliari, mentre il iCCA a piccoli dotti origina dalle cellule staminali epatiche o dalle cellule progenitrici e dai colangiociti dei dotti biliari.

Il iCCA a grandi dotti ricorda istologicamente il pCCA ed il dCCA ed è caratterizzato da strutture ghiandolari dilatate ed irregolari, immerse in un abbondante stroma fibroso costituito da tessuto connettivo denso e comprendente cellule fusate, fibre collagene ialinizzate ed un sistema vascolare del tutto disorganizzato. Le cellule tumorali sono di tipo cuboidale o colonnare, con nuclei ipercromici atipici, e frequentemente mucosecernenti. Il iCCA a grandi dotti presenta tipicamente invasione perineurale e vascolare portale e linfatica. Molto spesso, il iCCA a grandi dotti rappresenta l'evoluzione maligna di una lesione preneoplastica, i cui due tipi principali sono la neoplasia intraepiteliale biliare (BillN, Biliary Intraepithelial Neoplasia) e la neoplasia papillare intraduttale dei dotti biliari (IPNB, Intraductal Papillary Neoplasm of the Bile ducts). Da un punto di vista immunohistochimico, il iCCA a grandi dotti esprime S100P e TF1, a differenza del iCCA a piccoli dotti, e questo ne facilita la distinzione.

Il iCCA a piccoli dotti è istologicamente composto da piccole cellule cuboidali con nuclei uniformi e rotondi che si organizzano in strutture acinari o tubulari, ma con assente produzione di mucina. Le aree meno differenziate possono avere un pattern di crescita solido, a cordoni o cribriforme. Un iCCA di grandi dimensioni ed in fase avanzata presenta frequentemente un'area centrale necrotica, molto sclerotica e devascularizzata, con un fronte di crescita tumorale più marcato alla periferia. A differenza del iCCA a grandi dotti, per quello a piccoli dotti non è stata individuata una precisa lesione preneoplastica che ne giustifichi l'insorgenza in seguito ad una sua degenerazione maligna.

Esistono due principali sottotipi istologici del iCCA a piccoli dotti: il colangiolo carcinoma (CLC) (o CCA duttulare) ed il iCCA con pattern di crescita tipo malformazione della placca duttale. Il CLC ricorda istologicamente la reazione duttulare solitamente riscontrabile nelle colangiopatie croniche, nella Malattia di Caroli e nella fibrosi epatica congenita, e viene diagnosticato quando più dell'80% del tessuto tumorale presenta il pattern duttulare. In questo sottotipo tumorale, le cellule sono organizzate in strutture duttulari che originano da una triade portale e che sono immerse in uno stroma fibroso molto denso. Esse esprimono frequentemente CD56 e CAM. Il iCCA con pattern adi

crescita tipo malformazione della placca duttale è costituito da cellule che si organizzano in strutture ghiandolari molto simili alla malformazione della placca duttale, con bile intrappolata al loro interno, e circondate da un denso stroma fibroso. Anch'esse, come quelle del CLC, esprimono CD56 e CAM. (36)

Esistono inoltre delle varianti istologiche rare di iCCA, tra cui quella squamosa, l'adenosquamosa, la linfoepitelioma-*like* e la colangioblastica. (29)

La stadiazione del iCCA è determinante per la sopravvivenza del paziente, e tiene conto dell'estensione locale del tumore (T), del coinvolgimento linfonodale (N) e della presenza di metastasi a distanza (M). Il sistema di stadiazione globalmente riconosciuto è quello TMN dell'American Joint Committee on Cancer Staging for Hepato-Pancreato-Biliary Cancer (33), aggiornato all'ottava edizione. In fase pre-operatoria, la stadiazione è clinica (cTNM) e può essere effettuata tramite l'ecocolore doppler, anche se le tecniche di *imaging* più raffinate e maggiormente utilizzate rimangono la TC e la RMN con mezzo di contrasto; oltre ad indagare in modo preciso la sede primitiva del tumore sono in grado di valutare l'estensione tumorale anche a livello toracico. Per quanto precise, queste due metodiche possono non riuscire a vedere le metastasi di dimensioni minori, per questo motivo si completa la stadiazione tramite la PET con 18-Fluorodesossiglucosio. La stadiazione effettuata su pezzo operatorio è una stadiazione patologica e viene riportata come pTNM (Tabella II).

Tabella II: Stadiazione del iCCA secondo il AJCC Ottava Edizione. Tratto da (33)

Categoria T (pT)	
- Tis	- Carcinoma in situ
- T1	- Massa solitaria senza invasione vascolare
- T1a	- Massa solitaria < 5cm senza invasione vascolare
- T1b	- Massa solitaria > 5cm senza invasione vascolare
- T2	- Massa solitaria con invasione vascolare o masse multiple con o senza invasione vascolare
- T3	- Tumore che perfora il peritoneo
- T4	- Tumore che invade per contiguità le strutture extraepatiche limitrofe
Categoria N (pN)	
- N0	- Assenza di metastasi ai linfonodi locoregionali
- N1	- Presenza di metastasi ai linfonodi locoregionali
Categoria M (pM)	
- M0	- Metastasi a distanza assenti
- M1	- Metastasi a distanza presenti
Stadi secondo il JACC	
- 0	- Tis
- IA	- T1a, N0, M0
- IB	- T1b, N0, M0
- II	- T2, N0, M0
- IIIA	- T3, N0, M0
- IIIB	- T4, N0, M0; - qualunque T, N1, M0
- IV	- Qualunque T, Qualunque N, M1

1.1.2.5. Trattamento

L' unica opzione terapeutica curativa nel iCCA è la chirurgia. Purtroppo più della metà dei pazienti si presenta alla diagnosi già in stadio avanzato di malattia, quando il trattamento chirurgico non è più applicabile. (15) (34)

L'obiettivo della chirurgia è una resezione con margini negativi (chirurgia R0) cercando di lasciare più fegato residuo funzionale possibile. Molti pazienti richiedono una resezione ampia (emiepatectomia) con un'adeguata linfadenectomia. In seguito a questo tipo di intervento la mortalità a 90 giorni è di circa il 10%, di cui la metà per insufficienza epatica post-resezione. (36) La maggior parte delle linee guida raccomanda la resezione solo nei casi di tumori solitari, (38) che dimostrano una sopravvivenza media post-intervento di 43.2 mesi. (39) Dopo l'intervento, le linee guida internazionali raccomandano una chemioterapia adiuvante con Capecitabina per i 6 mesi successivi. (40)

Una strategia terapeutica alternativa alla resezione è rappresentata dal trapianto di fegato. I dati sono ancora troppo esigui per confermare la superiorità di questo approccio rispetto alla chirurgia classica, ma alcuni dati preliminari su un piccolo gruppo di pazienti con iCCA di grandi dimensioni e considerato non resecabile, ma stabile nel tempo, hanno rivelato che l'approccio trapiantologico, associato a chemioterapia neoadiuvante, mostra una sopravvivenza a 5 anni dell'83%. Nonostante questo dato incoraggiante, il tasso di recidiva della malattia post-trapianto arriva al 50%. (41)

I pazienti con malattia tumorale estesa sono sottoposti a chemioterapia. Molti dati supportano l'uso combinato in prima linea di Gemcitabina + Cisplatino piuttosto della monoterapia con la sola Gemcitabina. (42) Nei casi in cui si ha progressione della malattia durante una chemioterapia di prima linea, si passa alla terapia di seconda linea, alcuni studi hanno dimostrato che lo schema FOLFOX (Acido Folico + 5-Fluorouracile + Oxaliplatino) può essere preso in considerazione in quanto correlato ad un lieve aumento della sopravvivenza nei pazienti trattati. (43) Tuttavia, molto frequentemente il CCA sviluppa una resistenza ai farmaci chemioterapici.

Oltre alle terapie sistemiche esiste anche l'approccio locale, che si basa soprattutto su TARE e TACE.

Negli ultimi anni, sono state sviluppate terapie mirate verso bersagli molecolari: il capostipite di questo nuovo approccio è il farmaco Ivosidenib, che inibisce IDH1, mutato molto frequentemente nel iCCA. Dati da studi preliminari confermano un lieve aumento di sopravvivenza dei pazienti trattati con questo composto rispetto a quelli trattati con placebo. (44)

1.2. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

1.2.1. Visione Generale:

Da sempre la morte cellulare fa parte del normale funzionamento delle cellule che costituiscono la maggior parte dei tessuti all'interno di un organismo; infatti, quando esse si avviano verso la senescenza si innescano dei meccanismi per indurne la morte, in modo da evitare una possibile insorgenza di errori di replicazione a livello del DNA che possono esitare in una serie di patologie, tra cui anche quelle di tipo neoplastico.

Generalmente, la morte cellulare viene distinta in due maggiori tipologie: morte cellulare regolata e morte cellulare accidentale; mentre quest'ultima è dovuta ad una repentina perturbazione dell'ambiente extracellulare o direttamente ad un insulto diretto contro la cellula stessa; la prima modalità invece è un processo finemente regolato che possiamo trovare in cellule normali o danneggiate.

Quando presente in cellule normali parliamo di morte cellulare programmata (RCD), e il suo ruolo fisiologico risulta importante nel mantenimento del normale turnover cellulare all'interno di un tessuto, mentre quando la troviamo in cellule danneggiate parliamo di morte cellulare regolata-stress dipendente, dovuta ad un cambiamento dell'ambiente intra o extracellulare che impedisce ai sistemi di regolazione cellulare il mantenimento dell'omeostasi. (45) Negli anni più recenti, lo studio della morte cellulare si è sempre più ampliato fino a giungere alla prima classificazione redatta dal Nomenclature Committee on Cell Death, in cui venivano descritti i tre tipi principali di morte cellulare: il tipo I era rappresentato

dall'apoptosi, il tipo II dall'autofagia ed il tipo III dalla necrosi. (46) L'apoptosi è una modalità finemente regolata dall'equilibrio tra fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici, e si attiva quando questi ultimi sono maggiormente espressi. Le molecole che giocano un ruolo fondamentale sono i ligandi di morte, le caspasi, le proteine della famiglia *BCL-2* ed i loro effettori a valle. (48) La caratteristica principale è che il suo risultato non inficia l'omeostasi del tessuto circostante in quanto non vengono rilasciate molecole e sostanze riconosciute dal sistema immunitario; pertanto, essa viene considerata un tipo "pulito" di morte cellulare. La necrosi, al contrario, avviene in condizioni in cui è presente un danno diretto verso la cellula con conseguente rottura della membrana plasmatica. Oltre alla morte della cellula interessata, in seguito alla rottura della membrana vengono rilasciati dei fattori immunogeni, soprattutto i DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), che stimolano una risposta di tipo infiammatorio. (47) Infine, l'autofagia prevede la formazione di vacuoli autofagici intracitoplasmatici per l'eliminazione di molecole non più utili ai processi metabolici e dei vari organuli citoplasmatici senescenti o danneggiati. Essa può essere indotta da farmaci o digiuno, ed è una modalità sfruttata dalla cellula per il proprio rinnovamento. Ulteriori approfondimenti hanno portato all'attuale classificazione dei vari tipi di morte cellulare, aggiornata dal Nomenclature Committee on Cell Death nel 2018, in cui oltre ai tre tipi citati precedentemente, si sono aggiunti: ferroptosi, necroptosi, parthanatos, piroptosi, NETosi, morte cellulare entotica, morte cellulare immunogenica e morte cellulare lisosomadipendente. (45)

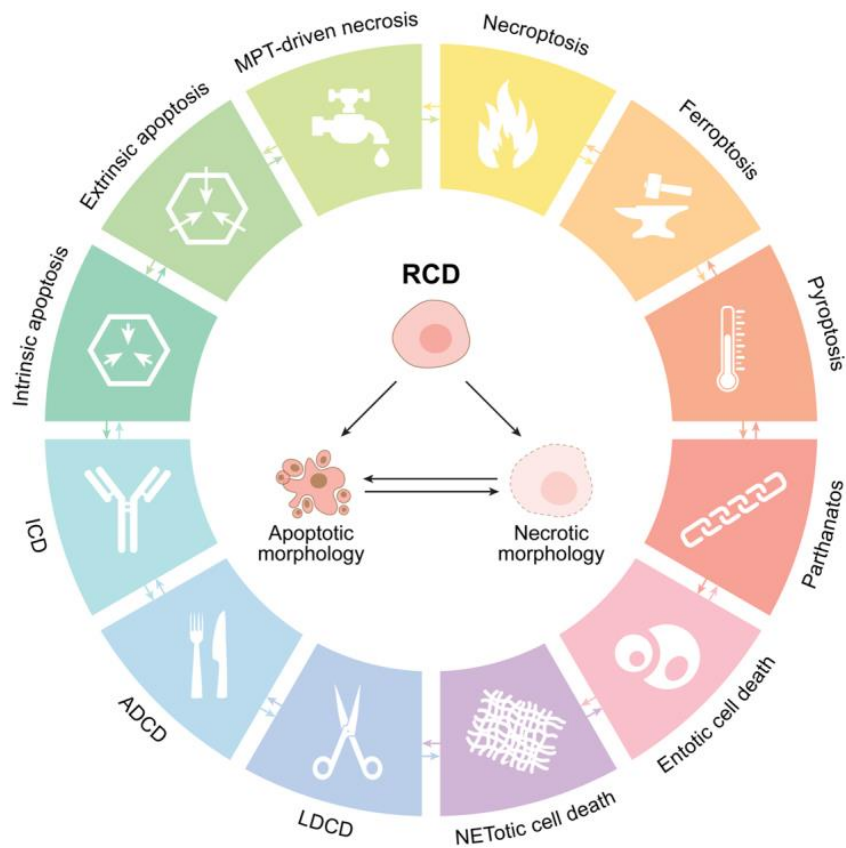


Figura 7: Meccanismi principali di morte cellulare. Tratto da (45)

Come evidenziato in figura 7, i vari tipi di morte cellulare non sono delle entità a sé stanti, ma sono connessi tra loro in termini di meccanismi di iniziazione del processo e della sua propagazione.

Lo studio della morte cellulare e dei suoi meccanismi ha suscitato un grande interesse anche da un punto di vista terapeutico: riuscire ad indurla farmacologicamente nelle cellule tumorali potrebbe essere una valida alternativa al classico trattamento dei tumori, che molto spesso porta all'insorgenza di resistenza alla terapia.

1.2.2. Ferroptosi:

1.2.2.1. Cascata ferroptotica e molecole coinvolte:

La ferroptosi è un tipo di morte cellulare dipendente dal ferro, il cui meccanismo è innescato da perturbazioni del microambiente intracellulare, in particolare dall'accumulo di prodotti derivanti dalla perossidazione lipidica ed alla

generazione di ROS (Reactive Oxygen Species). (48) La prima descrizione della cascata apoptotica risale al 2003, quando Dolma et al. scoprirono che l'erastina è in grado di indurre la morte di cellule con mutazione di *RAS*, legando SCL7A11. Tuttavia, solo nel 2012 Dixon et al. proposero per la prima volta il termine ferroptosi, notando che in quelle cellule con mutazione di *RAS* l'erastina induceva una morte regolata e dipendente dal ferro. Oltre al suo ruolo nelle patologie tumorali, essa è stata ritrovata anche in alcune patologie degenerative come la malattia di Parkinson e nei danni da ischemia-riperfusion. Le principali caratteristiche morfologiche che permettono il riconoscimento di questo processo riguardano i mitocondri; infatti, i mitocondri di una cellula ferroptotica appaiono ridotti in numero, con scomparsa delle creste, rottura della membrana mitocondriale esterna e aumento di densità di quella interna. (50) Va sottolineato come la ferroptosi avvenga in modo indipendente dalle caspasi, dal complesso del necrosoma e dal complesso molecolare dell'autofagia. Questa forma di morte cellulare è diversa dagli altri tipi descritti precedentemente, in termini morfologici, biochimici e genetici. (58) Nell'attivazione della ferroptosi sono coinvolti diversi attori:

1. Metabolismo del Ferro:

Il ferro ha un ruolo fondamentale nella ferroptosi, infatti un suo aumento di concentrazione in forma libera all'interno della cellula è indispensabile affinché si inneschi la perossidazione lipidica in seguito alla formazione di ROS. Il sovraccarico di ferro è quindi il risultato di un disequilibrio tra ferro importato a livello intracellulare ed il suo stoccaggio. Normalmente il ferro è presente in circolo legato alla transferrina, e quando questa si lega al suo recettore (TFR1) presente sulla membrana plasmatica, esso viene rilasciato a livello intracellulare come Fe^{3+} , viene poi ridotto da STEAP3 all'interno dei lisosomi in Fe^{2+} e rilasciato in forma libera tramite il trasportatore DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). Il ferro Fe^{3+} che invece non subisce una riduzione viene stoccato legandosi alla ferritina; qualora fosse necessario, esso verrà ridotto in seguito per poi essere rilasciato come Fe^{2+} in forma libera. (51)

Oltre ai classici ruoli fisiologici, il ferro è coinvolto in una serie di reazioni di ossidoriduzione favorevoli alla formazione di ROS attraverso le reazioni di Fenton e di Haber-Weiss (52):

Reazione di Fenton: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$

Reazione di Haber-Weiss: $\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ (1)

$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$ (2)

Queste reazioni coinvolgono solo il ferro libero a livello intracitoplasmatico; pertanto, si deduce il ruolo della ferritina nel contrastare la ferroptosi, stoccandolo e rendendolo quindi non disponibile.

2. GSH (Glutathione), sistema X_c^- e GPX4 (Glutathione Peroxidase 4):

Lo stress ossidativo è un trigger della ferroptosi. Il GSH gioca un ruolo importante poiché è il cofattore principale dell'enzima inibitore per eccellenza della ferroptosi: GPX4. Le cellule che attivano la cascata ferroptotica sono quelle in cui i livelli di GSH sono ridotti e in cui GPX4 risulta inibito. Il sistema X_c^- è un trasportatore a livello della membrana cellulare che permette l'ingresso della cistina in antiporto con il glutammato, che quindi esce dalla cellula, in rapporto 1:1. La sua struttura consiste in un eterodimero costituito dalle due subunità SLC7A11 e SLC3A2. (52) Un suo corretto funzionamento è fondamentale per mantenere l'omeostasi del bilancio ossidativo all'interno della cellula, infatti la cistina, una volta all'interno, viene ridotta a cisteina che è uno dei precursori principali per la biosintesi del glutathione. (53) Lo studio di questo trasportatore aminoacidico si è intensificato da quando è stato notato che l'Erastina è in grado di indurre un blocco permanente, impedendo quindi il mantenimento di una sufficiente concentrazione di GSH.

GPX4 è il principale enzima che inibisce la ferroptosi e la sua presenza è stata riscontrata all'interno dei mitocondri, a livello intracitoplasmatico e intranucleare. Il suo core catalitico contiene una selenocisteina e la sua attività consiste nell'ossidare il glutathione ridotto (GSH) in GSSG e contemporaneamente ridurre i perossidi lipidici citotossici in alcoli lipidici, considerati non tossici. Per completare il ciclo, il GSSG viene nuovamente ridotto dalla glutathione-reduttasi

in GSH secondo la reazione ($\text{NADPH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+ + \text{OH}^-$), in modo da poter continuare a fornire gli elettroni tramite cui GPX4 riduce i perossidi lipidici, mantenendo un costante potere antiossidante. (54) Tutto ciò evidenzia il ruolo fondamentale dell'asse GSH-GPX4 nella sopravvivenza cellulare; uno studio ha infatti dimostrato che modelli murini knockout per il gene di GPX4 vanno incontro a morte nella prima settimana di sviluppo embrionale. (55) Inibire GPX4 farmacologicamente ha suscitato negli ultimi anni grande interesse, in quanto può rappresentare una strategia terapeutica soprattutto in ambito oncologico. Sono state infatti sviluppate diverse molecole in grado di intervenire in varie fasi della cascata apoptotica, inducendola, quali ad esempio RLS3 (Ras Selective Lethal small molecule 3), un induttore della ferroptosi in grado di inibire direttamente GPX4.

3. Perossidazione lipidica:

Il danno ossidativo verso i lipidi di membrana è il risultato finale della ferroptosi, perché grazie a questo si crea un danno all'interno della membrana plasmatica che conduce la cellula alla morte. La perossidazione lipidica può interessare sia i PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acid) liberi sia i PUFA contenuti nella membrana plasmatica associati ai vari fosfolipidi di membrana, tra cui fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e cardiolipina. I PUFA associati a fosfatidiletanolamina si sono dimostrati più suscettibili alla perossidazione lipidica a causa della struttura geometrica della molecola. (52) La generazione dei perossidi lipidici prevede due modalità principali: una via spontanea non enzimatica, che è la più rilevante e che si sviluppa attraverso la reazione di Fenton in presenza di Fe e ROS (già discussa precedentemente), ed una via enzimatica tramite le lipossigenasi, che agiscono sull'acido arachidonico e sui vari acidi grassi polinsaturi generando i perossidi lipidici. I due regolatori chiave di questo processo sono i due enzimi deputati alla biosintesi dei PUFAs associati ai fosfolipidi di membrana: ACSL4 (Acyl-CoA Synthetase Long-chain family member 4) e LPCAT3 (Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3). (56) Un loro aumento, in particolare quello di ACSL4, sensibilizza le cellule alla ferroptosi. Inoltre, nonostante le cellule di modelli knockout per GPX4 risultassero sensibili alla

ferroptosi, è stato dimostrato che quelle con doppio knockout per GPX4 e ACSL4 crescevano normalmente, confermando il ruolo sensibilizzante di ACSL4 alla morte ferroptotica. (57) Il meccanismo della perossidazione lipidica può avvenire a livello di tutte le membrane presenti in una cellula, quindi oltre a quella plasmatica può interessare anche le membrane mitocondriali, del reticolo endoplasmatico (ER) e dei lisosomi. Il meccanismo con cui i prodotti della perossidazione lipidica causano un danno alla membrana plasmatica non è del tutto chiaro, ma sono state ipotizzate tre modalità: la prima prevede che l'accumulo di perossidi lipidici a livello del doppio strato fosfolipidico possa modificarne l'integrità e le proprietà biofisiche, la seconda che l'accumulo di perossidi lipidici possa modificare la posizione delle proteine associate alla membrana plasmatica ed alterarne l'attività, mentre la terza implica la trasformazione dei perossidi lipidici, accumulati sempre a livello della membrana, in prodotti di degradazione ancora più reattivi, che andrebbero ad alterare la permeabilità della membrana tramite un effetto tossico diretto. (59)

La figura 8 riassume le varie molecole coinvolte nella cascata della ferroptosi.

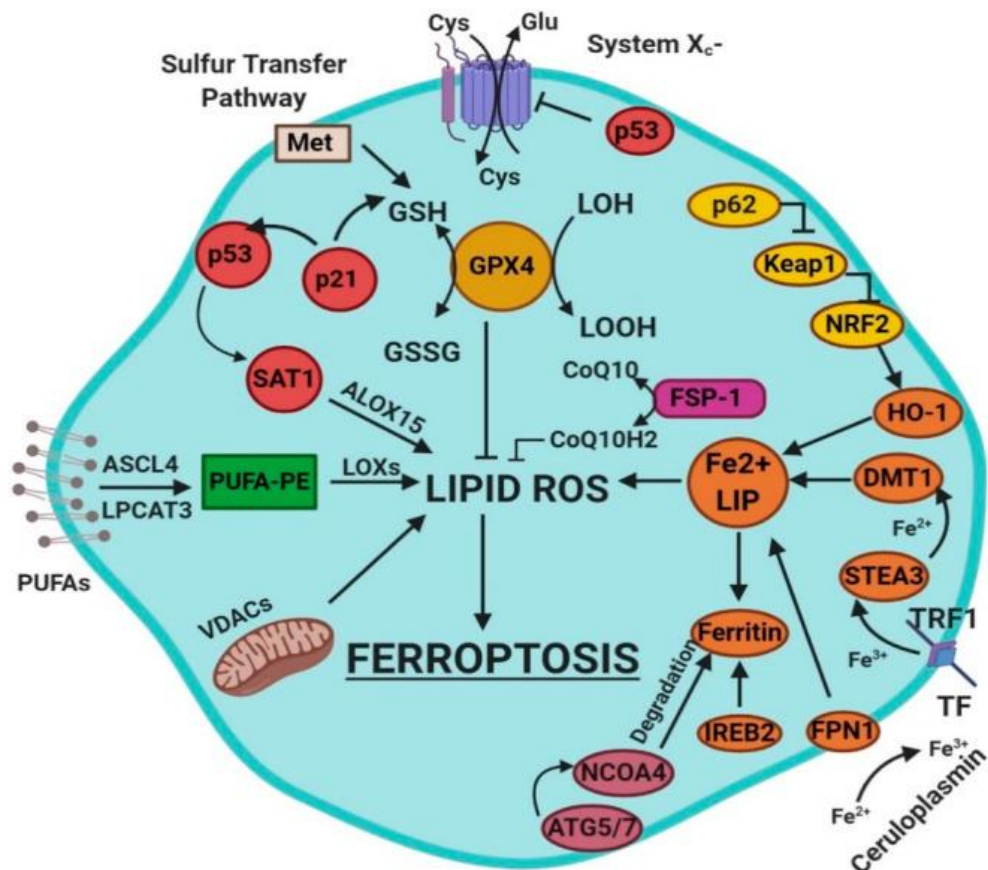


Figura 8: Riassunto delle molecole coinvolte nella ferroptosi. Tratto da (52)

Oltre a tutte le varie molecole descritte precedentemente, che sono fondamentali nell'ambito della cascata ferroptotica, esistono diversi fattori di trascrizione e cofattori che giocano un ruolo secondario ma comunque influente:

1. p53: è la molecola codificata da uno dei geni oncosoppressori più frequentemente mutati in ambito tumorale. Il suo ruolo nella ferroptosi risulta duale: da una parte sembra inibire a livello trascrizionale l'espressione di SLC7A11, che è una delle due subunità costituenti il trasportatore X_c⁻, con conseguente deplezione di GSH ed induzione della cascata ferroptotica. (60) Contemporaneamente però l'up-regolazione di CDKN1A/p21 mediata da p53 inibisce la ferroptosi.

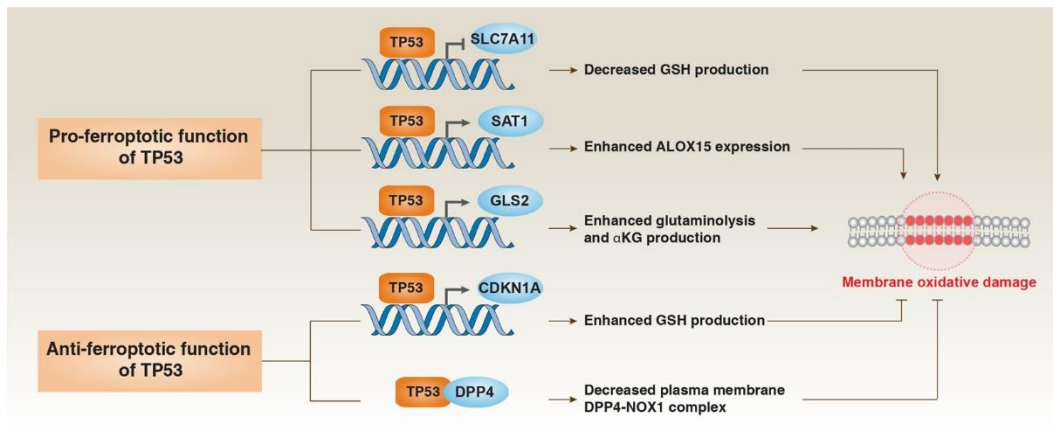


Figura 9: Ruolo di *TP53* nella ferroptosi. Tratto da (64)

2. NFE2L2: È un fattore trascrizionale regolatore di molti geni con effetti citoprotettivi coinvolti nel metabolismo del ferro e nella difesa ossidativa. I suoi effetti sembrerebbero inibire la ferroptosi.
3. HSF1 (Heat Shock transcription Factor 1): esso induce l'espressione delle HSPs (Heat Shock Proteins), le quali conferiscono resistenza alla ferroptosi diminuendo l'intake intracitoplasmatico di ferro. (61)
4. JUN: È un fattore di trascrizione coinvolto in diversi processi biologici. La sua overespressione induce la trascrizione di *PSAT1* e *CBS* per sopprimere la ferroptosi, quindi ne è un regolatore negativo. (62)
5. HIF1A: È un fattore di trascrizione indotto dall'ipossia che a sua volta stimola la trascrizione di *CA9* (Carbonic Anhydrase 9), il cui effetto è conferire resistenza sia alla ferroptosi sia all'apoptosi in situazioni ipossiche. (63)
6. NRF2: È un fattore di trascrizione fondamentale per l'omeostasi ossidoriduttiva dell'ambiente intracellulare in quanto induce la trascrizione di geni i cui prodotti proteggono la cellula dallo stress ossidativo. Un suo aumento di espressione protegge quindi le cellule dalla morte ferroptotica. (65)

1.2.2.2. La ferroptosi nelle patologie non neoplastiche:

È noto dalla letteratura che esistono varie malattie e condizioni che sono associate ad un danno tissutale causato da triggers che possono innescare la

ferroptosi. Essendo la ferroptosi una morte cellulare dipendente dal ferro, uno degli organi maggiormente coinvolti dalla ferroptosi è rappresentato dal fegato, che annovera tra i ruoli fisiologici anche quello di deposito della maggior parte del ferro dell'organismo. Un alterato equilibrio di questo elemento può pertanto portare all'attivazione della cascata ferroptotica, causando la morte epatocitaria ed il conseguente rilascio di DAMPs, con attivazione dell'infiammazione a livello del parenchima epatico, substrato morfologico di molte patologie epatiche che possono esitare, a lungo andare, in cirrosi. (77) La ferroptosi sembra avere un ruolo chiave nella DILI (Drug-Induced Liver Injury), in particolare in quella indotta da paracetamolo. Esso infatti viene metabolizzato dal citocromo p450 con produzione di NAPQI che lega il GSH causandone un'importante deplezione; questa condizione può predisporre quindi all'attivazione della cascata ferroptotica. (78) Contrariamente, la Vit-E, la Deferoxamina e la ferrostatina potrebbero avere un ruolo nel prevenire la ferroptosi indotta da DILI interferendo con la perossidazione lipidica e con la deplezione del GSH. (78)

La ferroptosi è coinvolta anche nel meccanismo del danno da ischemia-riperfusion, che può coinvolgere altri organi, oltre al fegato. Quando un tessuto diventa ischemico spesso ha un'alterazione dell'omeostasi del ferro con conseguente accumulo a livello intracellulare. Questo dato è coerente con i risultati di uno studio secondo i quali la somministrazione di chelanti del ferro nell'ambito di una riperfusion post-ischemia ridurrebbe il danno tissutale antagonizzando la ferroptosi. (79)

È interessante il ruolo della via ferroptotica anche nelle patologie neurodegenerative; l'accumulo di ferro e la perossidazione lipidica sono stati osservati nella Malattia di Parkinson (PD) e di Alzheimer (AD). Inoltre, il tessuto cerebrale è molto ricco di PUFAs, di per sé prone all'ossidazione, ed è molto sensibile allo stress ossidativo.

La ferroptosi sembra inoltre implicata nei meccanismi di tossicità di alcuni farmaci. La doxorubicina ad esempio è un chemioterapico molto usato in diversi tumori, come quello della mammella e nelle leucemie, il cui impiego è limitato a causa della spiccata cardiotossicità dose-dipendente, che sembrerebbe essere

dovuta ad un coinvolgimento della ferroptosi. Quest'ipotesi è avvalorata dal fatto che la somministrazione di inibitori della ferroptosi ridurrebbe la cardiotossicità doxorubicina-indotta. (80)

1.2.2.3. La ferroptosi nelle patologie neoplastiche:

Essendo la ferroptosi uno dei tipi principali di morte cellulare, è utile studiare il suo ruolo nelle patologie tumorali, in quanto potrebbe essere sfruttata per indurre farmacologicamente la morte delle cellule neoplastiche, rappresentando dunque un'ulteriore opzione terapeutica. L'uso terapeutico limitato di molecole che inducono la ferroptosi è tuttavia dovuto alla non-specificità dei bersagli: attivare la ferroptosi può indurre la morte delle cellule tumorali ma contemporaneamente danneggiare organi e tessuti sani come il midollo osseo, rappresentando quindi un limite all'impiego di queste sostanze. Non di meno, bisogna considerare che la ferroptosi copre un ruolo paradossale, in quanto essa può portare sì alla morte di cellule tumorali, ma contemporaneamente può avere un effetto di tumorigenesi in determinate neoplasie; infatti, dopo la morte cellulare indotta da ferroptosi vengono rilasciati DAMPs a livello extracellulare che sono in grado di attivare il sistema immunitario stimolando i meccanismi dell'infiammazione, che a loro volta creano un microambiente tumorale di tipo infiammatorio, e tutto ciò può contribuire alla progressione tumorale. (76)

Numerosi sono i tumori nei quali è stata osservata una correlazione con la ferroptosi:

1. Tumore polmonare: è uno dei più diffusi a livello globale. Le strategie terapeutiche comprendono chirurgia, chemioterapia sistemica, immunoterapia e radioterapia. Tuttavia, durante il trattamento il paziente può incorrere in una tossicità sistemica da farmaci, resistenza alla terapia ed evasione dal sistema immunitario da parte delle cellule neoplastiche. (66) Farmaci e radioterapia sono in grado di produrre un eccesso di ROS causando morte delle cellule tumorali tramite ferroptosi. E' stato inoltre dimostrato che alterando l'omeostasi del ferro vengono sensibilizzate le cellule di tumore polmonare alla ferroptosi. (67) Il tessuto polmonare è inoltre sottoposto ad un maggior stress ossidativo rispetto

agli altri tessuti, e per questo motivo è caratterizzato da un' aumentata espressione del sistema X_c^- . Il blocco di questo trasportatore tramite erastina e sorafenib per indurre la ferroptosi può essere una valida strategia terapeutica per provocare la morte delle cellule tumorali. Uno studio sul NSCLC (Non-Small Cells Lung Cancer) ha dimostrato un' aumentata espressione di GPX4 ed una correlazione con una prognosi peggiore (68), molto probabilmente dovuta ad una resistenza acquisita alla morte ferroptotica.

2. HCC: Il carcinoma epatocellulare è un tumore molto frequente che può avere svariate cause patogenetiche. Quando viene diagnosticato nelle fasi iniziali può essere aggredito con resezione chirurgica o trapianto, ma la prognosi rimane infausta quando viene scoperto in fasi avanzate di malattia. Per quest' ultima condizione è stata sviluppata una terapia mirata per l' induzione della ferroptosi: il farmaco sorafenib è in grado di indurla inibendo SCL7A11 e quindi causando una deplezione intracellulare di cisteina e conseguentemente di GSH. (69) È stato anche dimostrato che, nelle cellule di HCC, ha un ruolo fondamentale nella ferroptosi la pathway *p62/Keap1/NRF2*: inibendo *NRF2* geneticamente o farmacologicamente viene aumentato l' effetto antitumorale dell' erastina e del sorafenib up-regolando i livelli di ferro e ROS. (70) Altri due studi recenti hanno dimostrato che QSOX1 (Quiescin Sulphydryl Oxidase 1) è in grado di inibire l' attivazione di *NRF2* e quindi promuovere la ferroptosi sorafenib-indotta (71), e che lo stimolo della via *AMPK/SREBP1* inibisce la trascrizione di *BCAT2* contribuendo alla morte tramite ferroptosi nelle cellule di HCC. (72)

3. Tumore Mammario: il tumore della mammella rimane il tumore più frequente nel sesso femminile. Il suo trattamento prevede chirurgia, radioterapia, chemioterapia e terapia ormonale. Studiando il coinvolgimento della via ferroptotica in questa neoplasia, è stato osservato che lapatinib e neratinib sono in grado di indurre la ferroptosi nelle cellule di carcinoma mammario aumentando i livelli intracellulari di ROS. (73) (74) Importante è la dimostrazione che i tumori mammari "tripoli negativi", che presentano prognosi peggiore, risultano sensibilizzati alla ferroptosi, pertanto un suo impiego terapeutico nella

lotta contro questo tipo di neoplasia può rappresentare una valida alternativa terapeutica.

4. Cancro del pancreas: l'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è uno dei tumori maligni con prognosi e sopravvivenza peggiori, dovute anche all'alto tasso di metastatizzazione. La strategia terapeutica di prima linea rimane la resezione chirurgica, anche se purtroppo la maggior parte dei pazienti si presenta con neoplasia in stadio avanzato a causa della paucisintomaticità nelle fasi iniziali della malattia, rendendo vano l'impiego della chirurgia e orientando il trattamento verso la chemioterapia sistemica con gemcitabina. Sfortunatamente la sopravvivenza a 5 anni rimane ancora molto scarsa. Sembra che la ferroptosi giochi un ruolo importante nel PDAC e che possa essere indotta tramite varie modalità. Il farmaco artesunato, ad esempio, è in grado di indurre la ferroptosi nelle cellule di PDAC alterandone il metabolismo del ferro e la aumentando la produzione di ROS. (75) Farmaci che stimolano la deplezione del GSH potrebbero inoltre essere un'altra valida strategia terapeutica alternativa.

2. SCOPO DELLO STUDIO:

il iCCA è un tumore aggressivo a prognosi infausta, caratterizzato da un frequente sviluppo di resistenza ai farmaci chemioterapici utilizzati nel trattamento dei pazienti. Tale chemioresistenza è spesso dovuta a meccanismi che permettono alle cellule tumorali di evadere la morte per apoptosi. Farmaci per indurre l'apoptosi sono stati utilizzati ma con minimi benefici nei pazienti con iCCA. Per questo motivo, l'induzione di altri tipi di morte cellulare può rappresentare una valida alternativa per uccidere le cellule neoplastiche, in particolare quelle che hanno sviluppato resistenza ai farmaci. La ferroptosi è un tipo di morte cellulare regolata ferro-dipendente recentemente descritta. Per la sua attivazione essa richiede degli elevati livelli intracitoplasmatici di ferro e l'inibizione dell'enzima GPX4. Un recente studio in vitro ha dimostrato che linee cellulari che presentano la mutazione R132C di *IDH1*, una delle più frequenti mutazioni riscontrate nei iCCA, presentano livelli inferiori di GPX4 e di conseguenza una maggiore attivazione della cascata apoptotica. Nulla è riportato in letteratura finora riguardo il ruolo della ferroptosi nel iCCA.

Lo scopo di questo studio è stato pertanto quello di valutare l'espressione immunoistochimica tissutale dei marker principali di attivazione della ferroptosi e di correlarla alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti ed allo stato mutazionale dei geni *IDH1* ed *IDH2*.

3. MATERIALI E METODI:

3.1. SELEZIONE DEI CASI:

Abbiamo selezionato retrospettivamente un totale di 112 pazienti con diagnosi di iCCA, nel periodo compreso tra gennaio 2006 e maggio 2021. Novanta pazienti sono stati sottoposti a resezione epatica con intento curativo, mentre i restanti 22 sono pazienti con massa epatica sottoposta a biopsia, con diagnosi finale di iCCA, che successivamente sono stati sottoposti a intervento chirurgico in altra sede o che non sono risultati eleggibili al trattamento chirurgico per severe

comorbidità extraepatiche. Trenta dei pazienti inclusi nello studio attuale erano già stati precedentemente coinvolti in uno studio condotto sempre dal nostro gruppo. I criteri di esclusione per la selezione dei pazienti sono stati: I) la somministrazione di qualunque terapia sistemica o locoregionale prima della chirurgia o della biopsia; II) una sopravvivenza inferiore a 3 mesi dopo chirurgia (per pazienti sottoposti a resezione chirurgica) per escludere i decessi dovuti a complicanze chirurgiche; III) la carenza di tessuto tumorale residuo per l'esecuzione di indagini immunoistochimiche e molecolari. L'analisi molecolare è stata effettuata solo sui campioni operatori (90 pazienti). Lo studio è in accordo con le Linee Guida Etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 ed ha ottenuto l'approvazione dal Comitato Etico per la Ricerca Clinica – Azienda Ospedaliera Università di Padova, Italia; numero di protocollo: 0038038/17. Tutti i pazienti hanno firmato il rispettivo consenso informato per l'esecuzione di ogni procedura.

3.2. DATI CLINICI:

I dati clinici e di laboratorio dei pazienti sono stati recuperati dalle rispettive cartelle cliniche, ed includevano sesso, età, livelli sierici di ferritina, presenza di qualunque malattia epatica o biliare cronica sottostante, presenza di cirrosi e la somministrazione di chemioterapia adiuvante. È stata inoltre riportata l'eventuale esecuzione di linfadenectomia durante l'intervento chirurgico. Tutti i pazienti sottoposti a chirurgia hanno eseguito un follow-up clinico e strumentale con ecografia e TC periodiche, per rilevare eventuali recidive di malattia. Sono state inoltre ricavate dalle cartelle cliniche la sopravvivenza globale e quella libera da malattia dei pazienti.

3.3. STUDIO ISTOLOGICO:

Tutti i casi sono stati esaminati in cieco e contemporaneamente da tre diverse patologhe, e sono state riportate le principali caratteristiche istologiche, tra cui il pattern di crescita macroscopico, l'istotipo, il grado di differenziazione, il parametro T del sistema TNM (con riferimento all'Ottava Edizione del sistema di

stadiazione UICC), lo status dei margini chirurgici, la presenza di invasione vascolare e perineurale e la presenza di metastasi linfonodali.

3.4. STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO:

Per lo studio immunoistochimico sono stati realizzati dei TMAs (Tissue Microarrays) del diametro di 2 mm selezionando due o tre aree tumorali di iCCA rappresentative per ogni campione ottenuto da resezione epatica. I campioni erano tutti fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Per fare ciò è stata utilizzata la TMA Master Platform (3DHitech, Budapest, Hungary), un dispositivo semiautomatico e computer-assistito.

Le colorazioni immunoistochimiche sono state poi eseguite su sezioni di TMA e biopsie epatiche usando i seguenti anticorpi: anti-GPX4 (clone E-12; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; diluizione 1:400; anticorpo monoclonale murino) e anti-TFR1 (CD71) (clone 10F11; Leica Biosystem, Newcastle Upon Tyne, UK; diluizione 1:100; anticorpo monoclonale murino). Le colorazioni sono state eseguite con macchinario automatico Dako Omnis (Dako, Glostrup, Denmark), secondo protocolli standard forniti dal produttore, e tutte le sezioni sono stati contro-colorati con ematossilina. Per ogni colorazione sono stati inoltre inclusi i controlli positivi e negativi appropriati. Per la valutazione dell'espressione dei marker analizzati, è stata considerata solo la colorazione citoplasmatica.

L'espressione di GPX4 è stata valutata semi-quantitativamente nel seguente modo: 0 = negativa (figura 10); 1+ = espressione rilevata in $\leq 50\%$ delle cellule tumorali (Figura 11); 2+ = espressione rilevata in $> 50\%$ delle cellule tumorali (Figura 12).

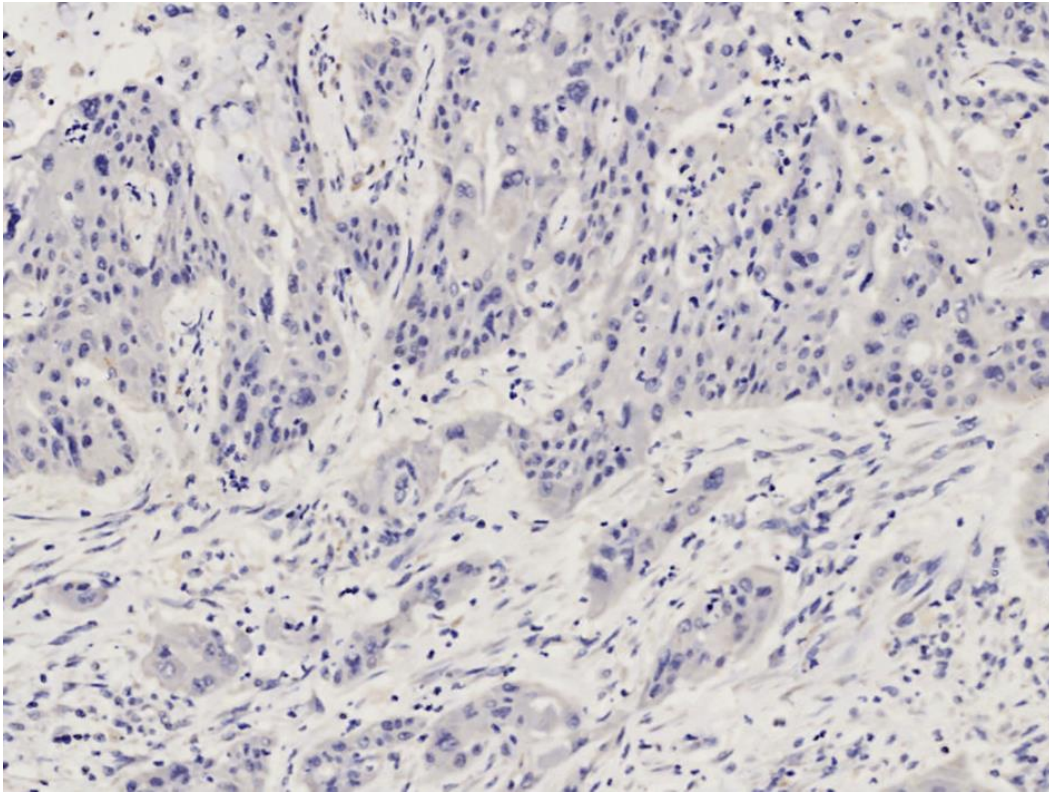


Figura 10: Esempio di espressione di GPX4 completamente negativa. Ingrandimento originale 10X.

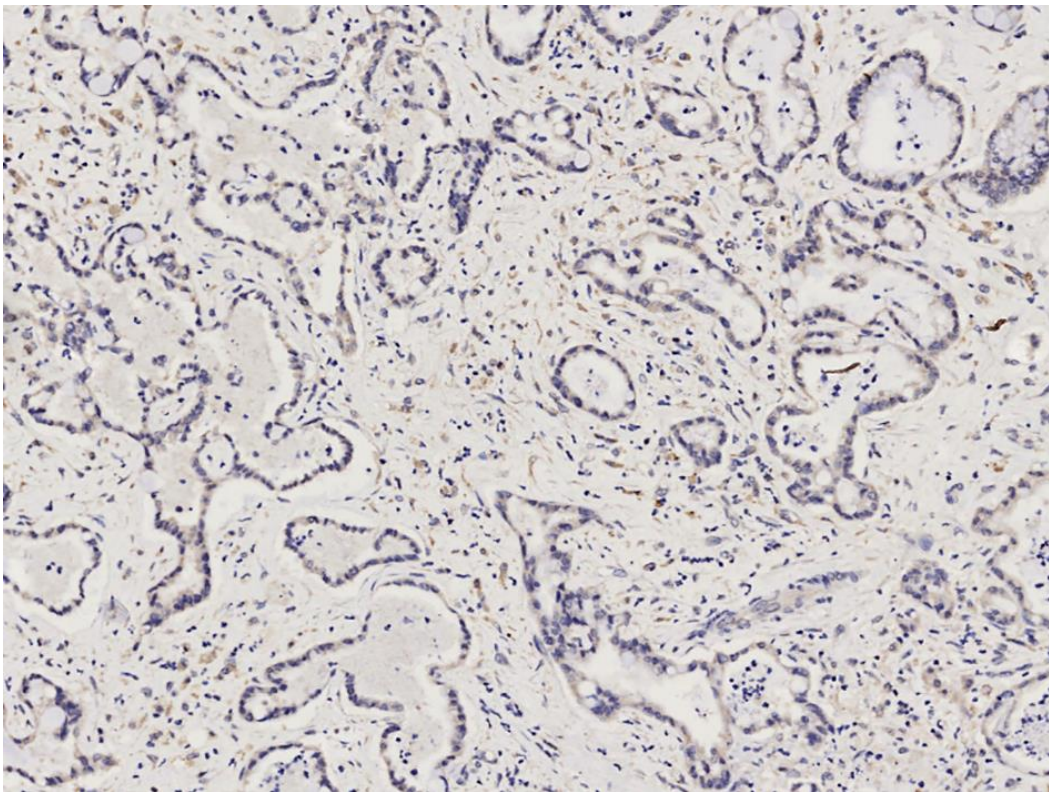


Figura 11: Esempio di espressione di GPX4 +1 secondo lo score di valutazione semi-quantitativa. Ingrandimento originale 10X.

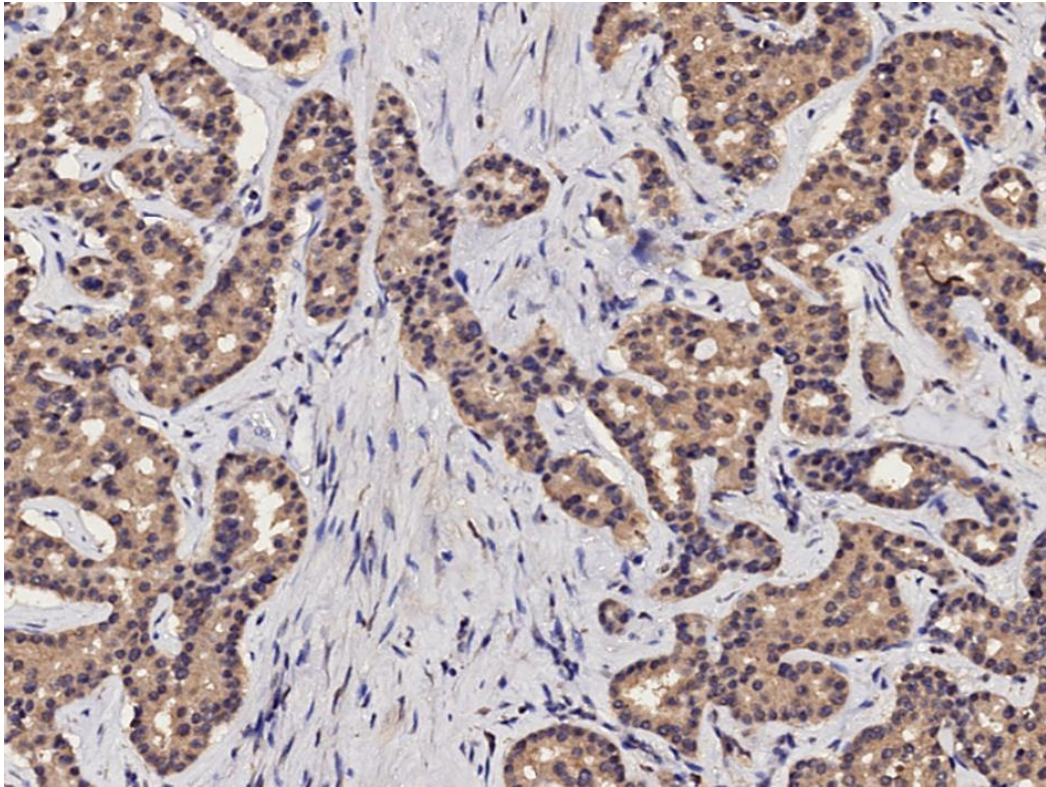


Figura 12: Esempio di espressione di GPX4 2+ secondo lo score di valutazione semi-quantitativa. Ingrandimento originale 10X

Anche l'espressione di TFR1 è stata valutata in modo semi-quantitativo, come segue: 0 = negativa o espressione rilevata in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali; 1+ = espressione rilevata tra l'11% e il 50% delle cellule tumorali (Figura 13); 2+ = espressione rilevata in $>50\%$ delle cellule tumorali (Figura 14).

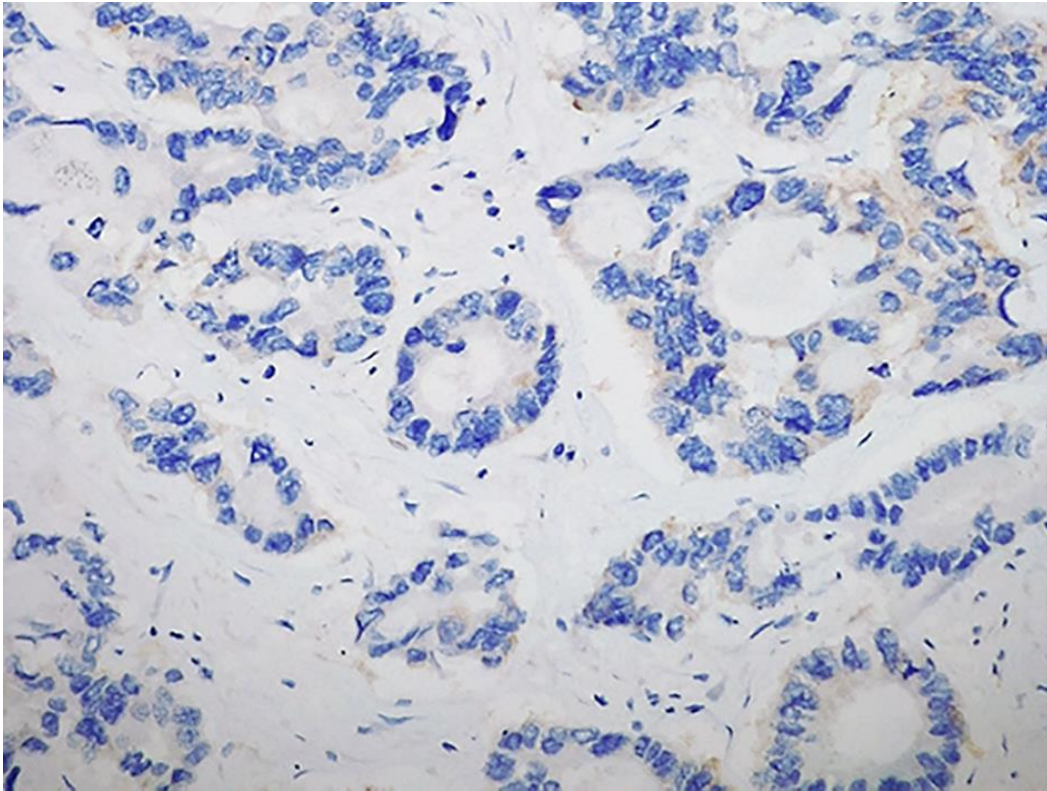


Figura 13: Esempio di espressione di TFR1 1+ secondo lo score di valutazione semi-quantitativa. Ingrandimento originale 20X.

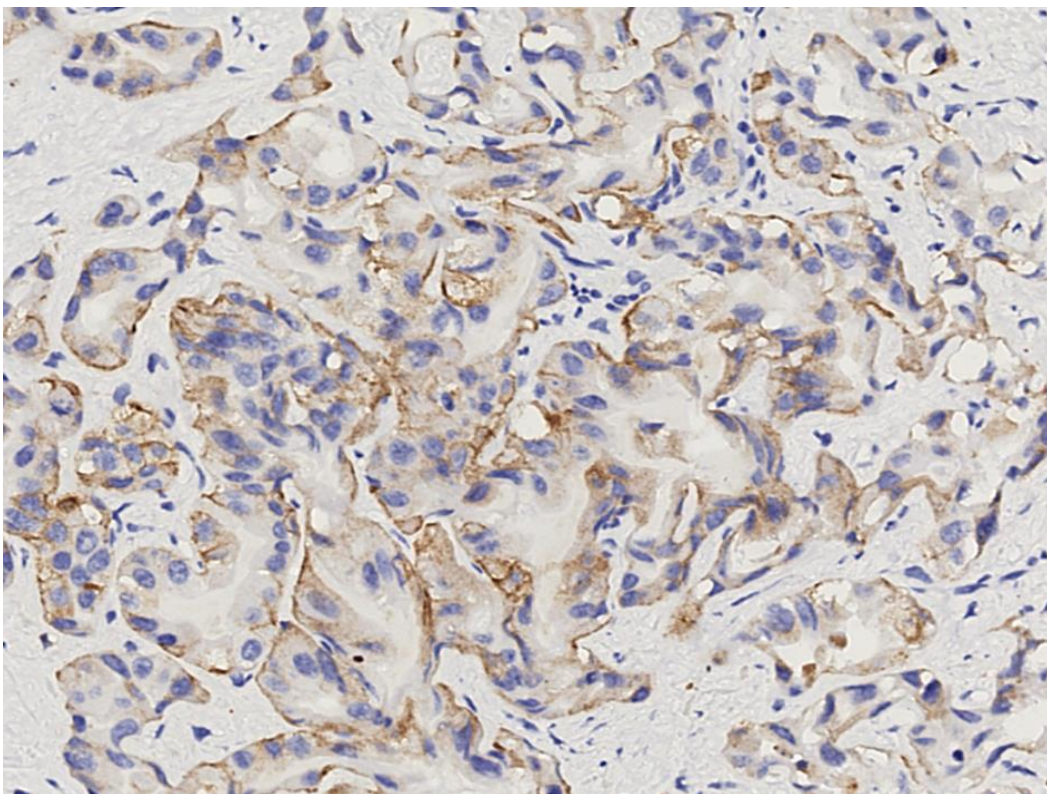


Figura 14: Esempio di espressione di TFR1 2+ secondo lo score di valutazione semiquantitativa. Ingrandimento originale 10X.

In tutti i casi è stata anche effettuata la colorazione istochimica di Perls (Artisan Iron Stain Kit, Dako, Glostrup, Denmark) per la rilevazione di depositi intratumorali di ferro, valutati come presenti (Figura 15) o assenti (Figura 16).

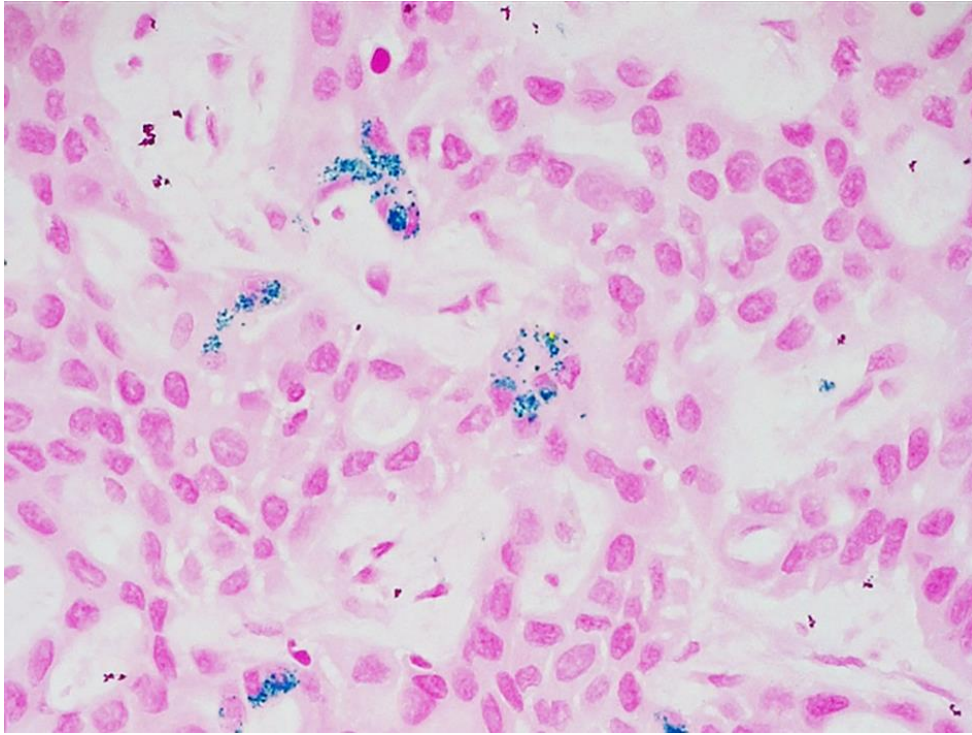


Figura 15: Esempio di depositi di Ferro presenti. Ingrandimento originale 40X.

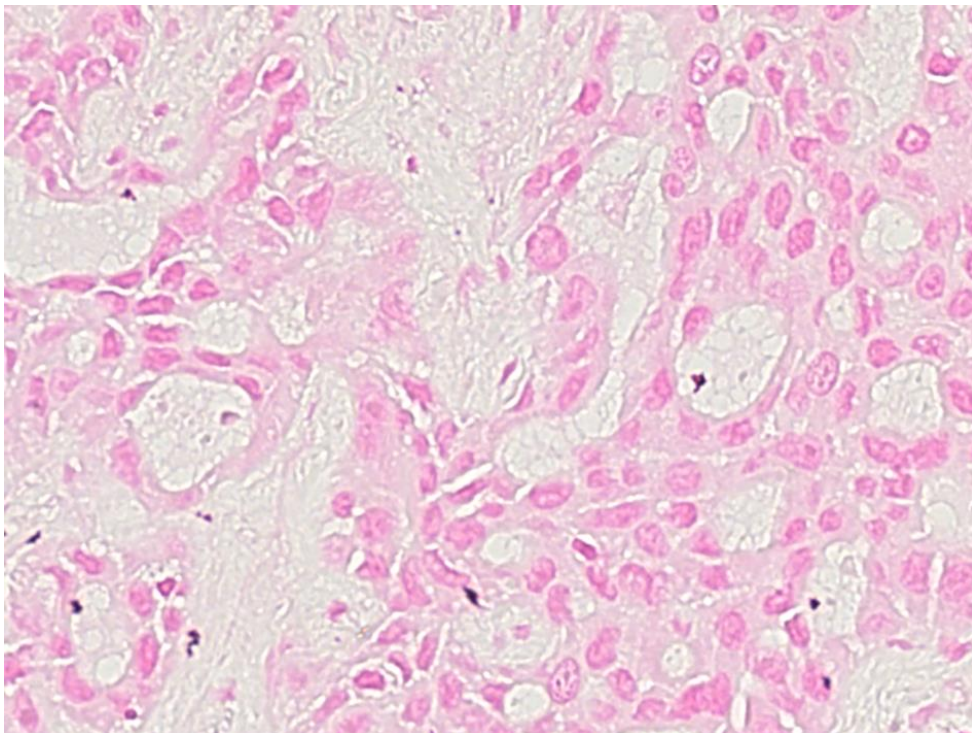


Figura 16: Esempio di depositi di Ferro assenti. Ingrandimento originale 20X

3.5. STUDIO MOLECOLARE:

Come già detto precedentemente, solo i pezzi operatori (90 casi) sono stati utilizzati per le indagini molecolari. Per ogni caso è stata eseguita l'estrazione del DNA su aree rappresentative di tessuto, fissato in formalina ed incluso in paraffina, utilizzando il kit Qiasymphony DSP DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). La quantità di DNA è stata misurata alla spettrofotometria usando lo spettrofotometro NanoDrop NS 100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La ricerca delle principali mutazioni genetiche di *IDH1* (codoni 105 e 132) e di *IDH2* (codoni 140 e 172) è stata eseguita utilizzando la metodica della rt-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) (Easy PGX ready *IDH1-2*, Easy PGX Platform, Diatech Pharmacogenetics, Jesi, Italy), nel rispetto delle istruzioni tecniche fornite dalla casa produttrice. Quando necessario, le mutazioni identificate con questa metodica sono state confermate con l'analisi PCR e con il sequenziamento Sanger, utilizzando lo strumento ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

3.6. ANALISI STATISTICA:

Le variabili continue sono state espresse in termini di mediana e range, mentre le variabili qualitative come frequenza e percentuale. Per l'analisi delle correlazioni clinico-patologiche sono stati utilizzati gli appropriati test statistici, tra cui il test T di Student, il test ANOVA, il test di correlazione per ranghi di Spearman e il test di probabilità esatta di Fischer. Le curve di sopravvivenza sono state create con il metodo di Kaplan-Meier, ed esse sono state confrontate tra loro usando i test di Breslow-Wilcoxon e il log-rank test. L'analisi multivariata è stata eseguita includendo tutte le variabili risultate significative alle analisi univariate, e sono stati calcolati i vari Hazard Ratios (HRs) con i rispettivi intervalli di confidenza (CIs) al 95%. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Le analisi dei dati sono state eseguite con i software statistici Statistical Package for the Social Science (SPSS, versione 25, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) e GraphPad (versione 6, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RISULTATI:

Caratteristiche Cliniche:

Complessivamente, la nostra coorte di 112 pazienti comprendeva 58 maschi (51.8%) e 54 femmine (48.2%), con un'età mediana di 68 anni (range 34-92 anni). Diciassette pazienti (15.2%) presentavano cirrosi epatica e 36 pazienti (32.1%) sono stati sottoposti a chemioterapia adiuvante dopo resezione o biopsia. I pazienti sono stati seguiti in follow-up per un periodo mediano di 1.7 anni (range 0.3-8.8 anni). La linfadenectomia è stata eseguita su 33 dei 90 pazienti sottoposti a trattamento chirurgico. Le caratteristiche cliniche e i dati di laboratorio dei pazienti con iCCA sono riassunti nella tabella III. Età, sesso, la presenza di sottostante epatopatia cronica e la somministrazione di chemioterapia adiuvante non sono risultate correlare con la sopravvivenza dei pazienti. La sopravvivenza totale e libera da malattia non è risultata diversa nei pazienti con o senza cirrosi epatica, probabilmente a causa dell'esiguo numero di pazienti cirrotici nella nostra casistica.

Tabella III: Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti

Caratteristiche	N = 112
Età (anni) Mediana (range)	68 (34-92)
Sesso N (%) Maschi Femmine	58 (51.8) 54 (48.2)
Ferritina [ng/ml] Mediana (range)	260.5 (53-943.5)
Patologie sottostanti N (%) Epatite HBV Epatite HVC Epatite alcolica NAFLD/NASH Cirrosi criptogenica	6 (5.4) 11 (9.8) 6 (5.4) 6 (5.4) 1 (0.9)
Cirrosi N (%)	17 (15.2)
Chemioterapia adiuvante N (%)	36 (32.1)
Recidiva N (%)	60 (53.6)
Exitus N (%)	73 (65.2)

Caratteristiche istologiche e correlazioni clinico-patologiche:

Macroscopicamente, tutti i casi presentavano pattern di crescita *mass-forming*, mentre istologicamente 83 casi (73.2%) presentavano l'istotipo di iCCA a piccoli dotti e 30 casi (26.8%) a grandi dotti. È stata osservata invasione vascolare in 78/112 pazienti (69.6%) ed invasione perineurale in 50/112 (44.6%) come riportato in tabella IV. Tra i 33 pazienti sottoposti a linfadenectomia, 15 presentavano metastasi linfonodali. Tra i 90 pazienti sottoposti a chirurgia, 47 (52.2%) presentavano margini di resezione negativi (R0), mentre 43 (47.8%) mostravano un'infiltrazione neoplastica del margine chirurgico (R1).

Tabella IV: Caratteristiche istologiche dei pazienti.

Caratteristiche	N = 112
Istotipo N (%) A piccoli dotti A grandi dotti	 82 (73.2) 30 (26.8)
Grading N (%) G1 G2 G3	 15 (13.4) 49 (43.8) 48 (42.8)
Stadio T [N = 90] N (%) T1a T1b T2 T3 T4	 13 (14.4) 11 (12.2) 46 (51.1) 13 (14.4) 7 (7.9)
Invasione vascolare N (%)	78 (69.6)
Invasione perineurale N (%)	50 (44.6)
Metastasi linfonodali [N = 33] N (%)	15 (45.4)
Status margini di resezione [N = 90] N (%) R0 R1	 47 (52.2) 43 (47.8)

Come prevedibile, un alto grado di differenziazione della neoplasia e la presenza di invasione vascolare e perineurale sono risultati correlati ad una peggiore sopravvivenza totale ($p = 0.009$, $p < 0.0001$ e $p = 0.004$, rispettivamente) e libera da malattia ($p = 0.01$, $p = 0.002$ e $p = 0.001$, rispettivamente). Anche un avanzato stadio T (T3 e T4) è risultato correlato ad una ridotta sopravvivenza globale dei pazienti ($p = 0.06$). Non è stata individuata alcuna correlazione tra la prognosi dei pazienti e l'istotipo tumorale o lo status dei margini di resezione e non sono state osservate differenze in termini di tempo di sopravvivenza tra i pazienti con o senza metastasi linfonodali.

Caratteristiche immunohistochimiche e correlazioni clinico-patologiche:

La maggior parte dei casi da noi esaminati ha mostrato espressione di GPX4, sia 1+ (43/112; 38.4%) che 2+ (46/112; 41.1%), mentre solo in 23 casi (20.5%) l'espressione di GPX4 è risultata completamente negativa. Ventidue pazienti su 112 (19.6%) hanno mostrato un'espressione 1+ di TFR1, mentre in 7 pazienti (6.3%) l'espressione di TFR1 era 2+. Depositi intratumorali di ferro sono stati osservati solo in 2 casi (1.8%), uno dei quali mostrava una deposizione focale, mentre l'altro diffusa. E' interessante notare che il caso che mostrava una diffusa deposizione intratumorale di ferro presentava anche una forte espressione di TFR1 e una completa assenza di GPX4.

Tabella V: Espressione immunohistochimica dei differenti marker nei casi di iCCA.

Marker	N = 112
GPX4	
N (%)	
0	23 (20.5)
1+	43 (38.4)
2+	46 (41.1)
TFR1	
N (%)	
0+	83 (74.1)
1+	22 (19.6)
2+	7 (6.3)
Depositi intratumorali di ferro	
N (%)	
Assenti	110 (98.2)
Presenti	2 (1.8)

Nel complesso, questi risultati suggeriscono una non attivazione della cascata ferroptotica nei nostri casi di iCCA. Le analisi statistiche hanno dimostrato una correlazione diretta tra l'espressione di GPX4 e fattori prognostici istologici sfavorevoli, come un grado di differenziazione ($p < 0.0001$) e la presenza di invasione perineurale ($p = 0.03$) ed invasione vascolare ($p < 0.0001$). Non è stata trovata nessuna correlazione tra queste caratteristiche istologiche e l'espressione di TFR1 o la presenza di depositi di ferro, così come non è stata trovata correlazione tra l'espressione dei marker studiati (compresi i depositi di ferro) e lo stadio T della neoplasia.

L'espressione dei marker studiati (compresi i depositi di ferro) non è risultata correlare con sesso, età, presenza di una sottostante epatopatia cronica, presenza di cirrosi, livelli di ferritina, istotipo tumorale e presenza di metastasi linfonodali.

E' interessante notare che abbiamo osservato una significativa riduzione della sopravvivenza globale ($p = 0.06$) e libera da malattia ($p = 0.04$) nei casi con un'elevata espressione di GPX4, come mostrato nelle curve di Kaplan-Meier.

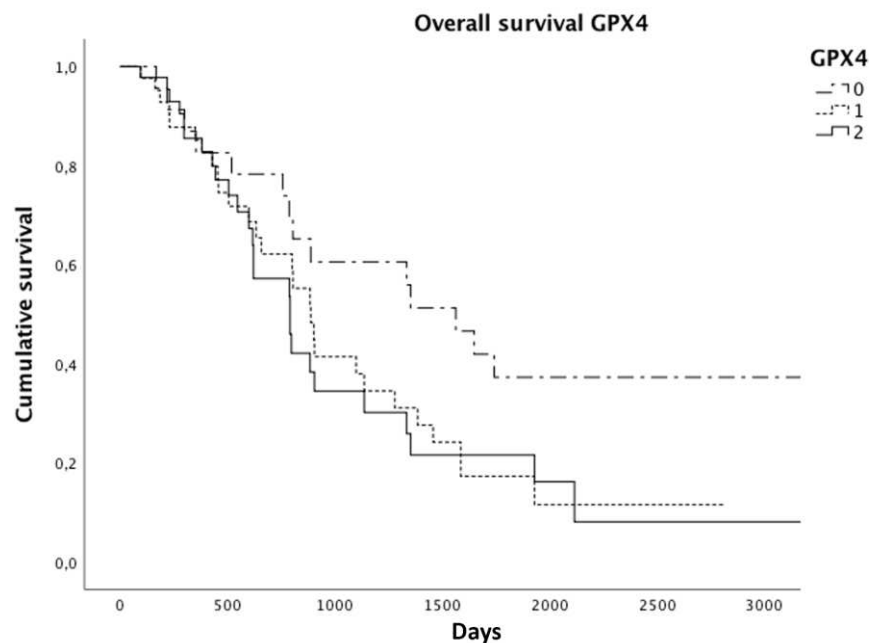


Figura 17: Sopravvivenza globale dei pazienti con iCCA considerando i vari livelli di espressione (0, 1+ o 2+) di GPX4 secondo gli score di valutazione semi-quantitativa.

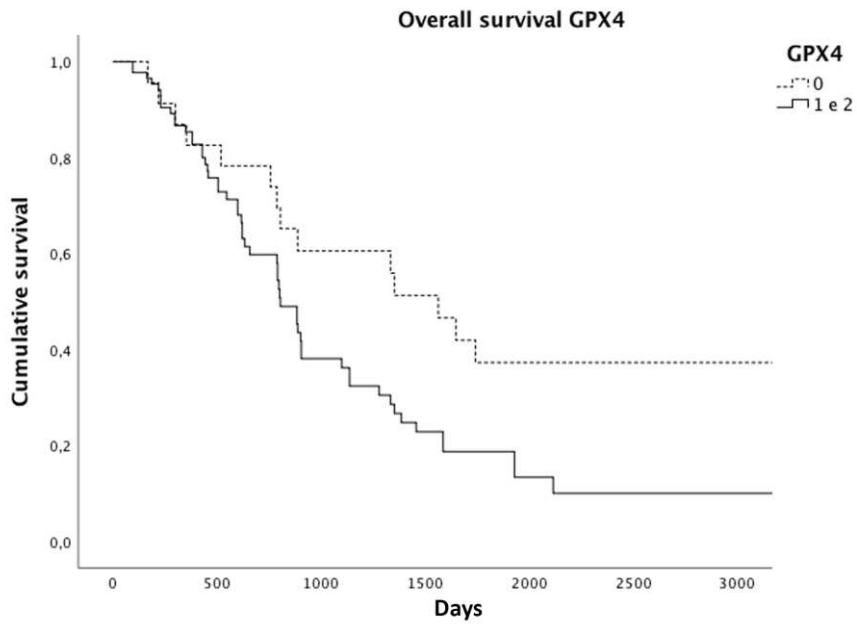


Figura 18: Sopravvivenza globale dei pazienti con iCCA considerando l'assenza o la presenza (1+ e 2+ assieme) dell'espressione di GPX4.

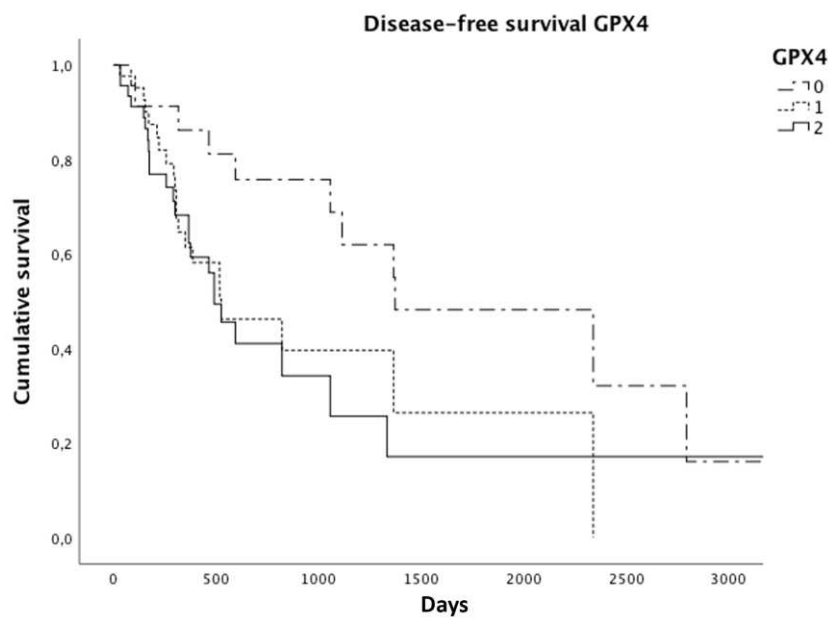


Figura 19: Sopravvivenza libera da malattia GPX4 nei pazienti con iCCA considerando i vari livelli di espressione (0, 1+ o 2+) di GPX4 secondo gli score di valutazione semi-quantitativa.

Inoltre, raggruppando assieme i casi GPX4-positivi, quindi mettendo assieme i casi con espressione 1+ e 2+, questa associazione si rafforza ulteriormente per entrambe le sopravvivenze (globale, $p = 0.03$; libera da malattia, $p = 0.01$), suggerendo come anche una bassa espressione di GPX4 possa essere sufficiente ad inibire la ferroptosi e a ridurre la sopravvivenza dei pazienti con iCCA.

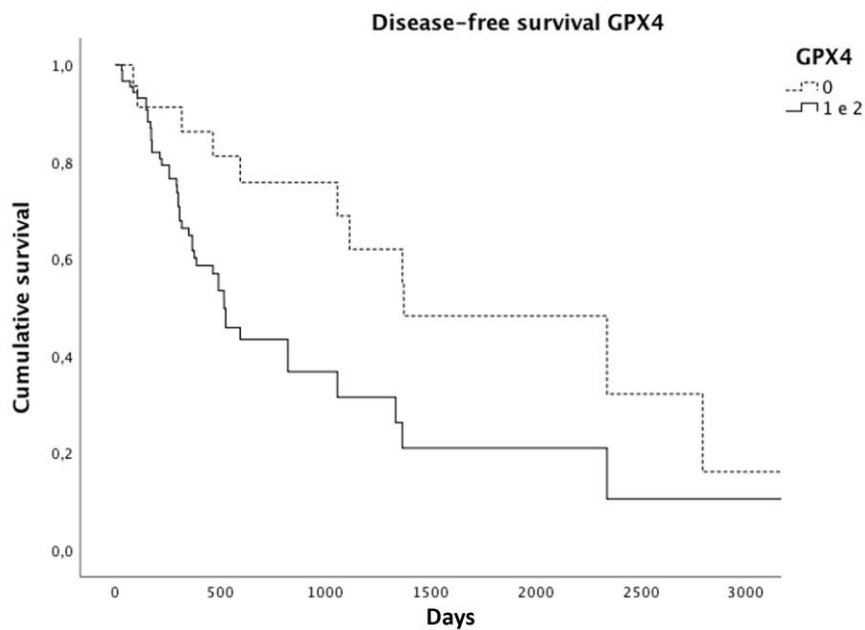


Figura 20: Sopravvivenza libera da malattia dei pazienti con iCCA considerando l'assenza o la presenza (1+ e 2+ assieme) dell'espressione di GPX4.

Nessuna correlazione è stata osservata tra i tempi di sopravvivenza e l'espressione di TFR1, né tra essi e la presenza di depositi intratumorali di ferro.

Caratteristiche molecolari e correlazioni clinico-patologiche:

I risultati delle analisi molecolari sono riportati in tabella VI.

Tabella VI: Status dei geni *IDH1* e *IDH2* nei casi di iCCA.

Adeguatezza	N = 90
Campioni inadeguati	14/90 (15.6%)
Campioni adeguati	76/90 (84.4%)
Alterazioni molecolari	N = 76
Mutazioni puntiformi di <i>IDH1</i>	15/76 (19.7%)
Arg132Cys	6/76 (7.9%)
Arg132His	2/76 (2.6%)
Arg132Val	1/76 (1.3%)
Arg132Ser	1/76 (1.3%)
Arg132X	4/76 (5.2%)
Gly105Asn	1/76 (1.3%)
<i>IDH1</i>^{105GGT} SNP	9/76 (11.8%)
<i>IDH2</i> Arg172X	1/76 (1.3%)
<i>IDH1-2</i> WT	53/76 (69.7%)

Come mostrato in tabella, sono state rilevate mutazioni puntiformi di *IDH1* in 15 dei 76 casi analizzati (19.7%), di cui 14 coinvolgono il codone 132 e una il codone 105. Solo un caso ha mostrato una mutazione puntiforme di *IDH2* nel codone 172 (1.3%). In 9 casi (11.8%) i test molecolari hanno descritto un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) nel codone 105 del gene *IDH1*, responsabile della modifica della sequenza nucleotidica da GGC (Gly) a GGT (Gly) (C>T). Tra questi, due casi hanno mostrato sia la presenza del SNP *IDH1*^{105GGT} che la mutazione puntiforme di *IDH1* nel codone 132. Non è stata trovata nessuna relazione statisticamente significativa tra la presenza di mutazioni puntiformi di *IDH1* e la presenza del SNP *IDH1*^{105GGT}.

Le analisi statistiche hanno mostrato una correlazione inversa tra la presenza del SNP *IDH1*^{105GGT} ed il grado di differenziazione tumorale ($p < 0.0001$). Al contrario,

è stata osservata una correlazione diretta tra il grado di differenziazione tumorale e la presenza di *IDH1-2 wild type* ($p = 0.004$). Non sono state trovate correlazioni tra il grado di differenziazione tumorale e la presenza di mutazioni puntiformi di *IDH1-2*. Non sono inoltre emerse correlazioni tra lo status di *IDH1-2* ed età, sesso, presenza di sottostante epatopatia cronica, presenza di cirrosi, livelli di ferritina, istotipo tumorale, presenza di invasione vascolare e perineurale, stadio T e presenza di metastasi linfonodali. L'espressione di GPX4 ha mostrato una correlazione inversa con la presenza del SNP *IDH1*^{105GGT} ($p = 0.001$) (figura 21), mentre ha mostrato una correlazione diretta con la presenza di una mutazione puntiforme di *IDH1-2* ($p = 0.06$) e con la presenza di *IDH1-2 WT* ($p = 0.04$). Non sono state trovate correlazioni tra lo status di *IDH1-2* e l'espressione di TFR1 o la presenza di depositi intratumorali di ferro.

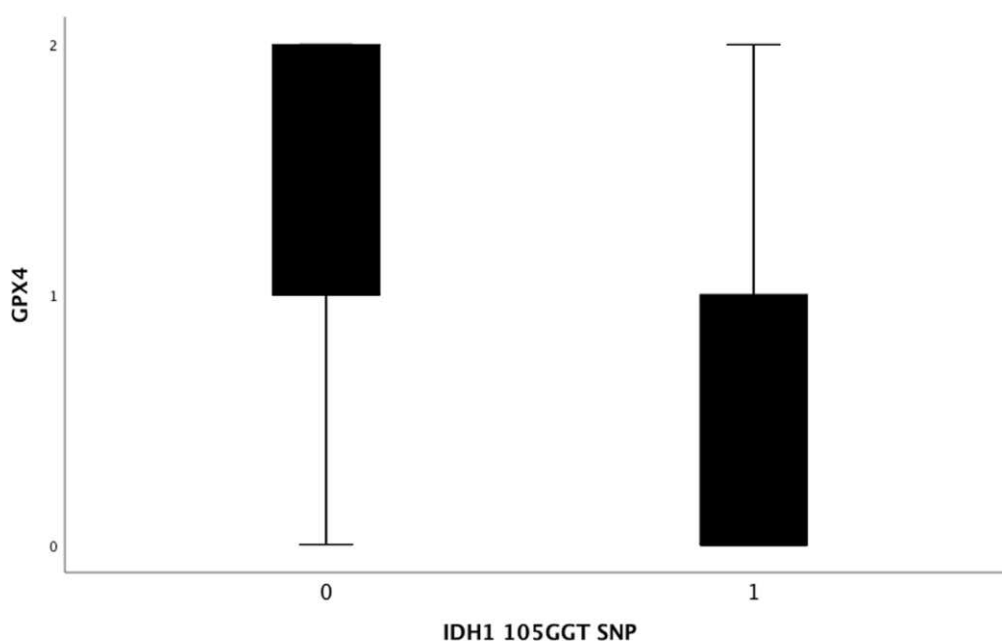


Figura 21: Correlazione inversa tra l'espressione di GPX4 e la presenza di *IDH1*^{105GGT} SNP.

Sorprendentemente, i casi con SNP *IDH1*^{105GGT} hanno mostrato una migliore sopravvivenza rispetto ai casi con *IDH1-2 WT* (1648 giorni contro 887 giorni; $p = 0.04$) e rispetto ai casi con mutazioni puntiformi di *IDH1-2* (1648 giorni contro 1333 giorni; $p = 0.09$) (Figura 22).

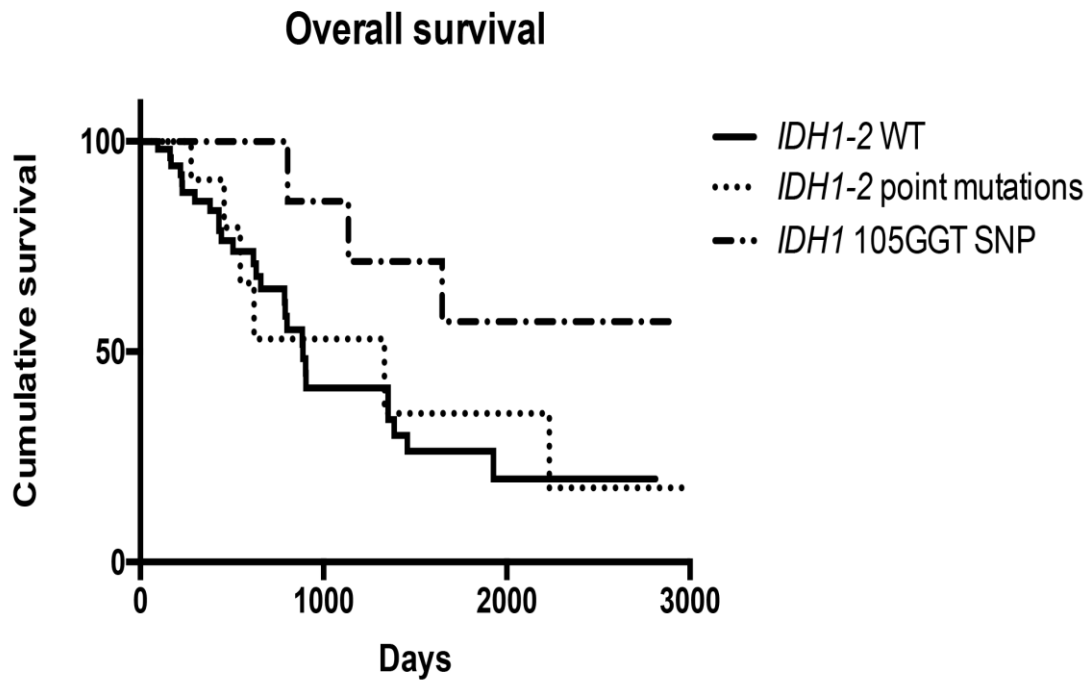


Figura 22: Sopravvivenza globale dei pazienti con iCCA considerando la presenza di *IDH1-2* WT, mutazioni puntiformi di *IDH1-2* e *IDH^{105GGT}* SNP.

Non sono state trovate correlazioni tra lo status di *IDH1-2* e la sopravvivenza libera da malattia. L'analisi multivariata, eseguita includendo le variabili risultate significative alle analisi univariate (grado di differenziazione, invasione vascolare e perineurale, espressione di GPX4 e presenza del SNP *IDH1^{105GGT}*) hanno dimostrato che solo la presenza di invasione perineurale rappresenta un fattore prognostico favorevole indipendente per la sopravvivenza globale [$p = 0.005$, HR = 3.3 (CI: 1.1-5.5)].

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:

In questo studio, è stato dimostrato per la prima volta che nella maggior parte dei iCCA la cascata ferroptotica non è attiva, e che la sua attivazione dipende dallo stato mutazionale dei geni *IDH1* ed *IDH2*. Si è osservato infatti che GPX4, il principale inibitore della ferroptosi, è risultato espresso in circa l'80% dei casi, e che un' aumentata espressione di GPX4 è associata alla presenza di fattori prognostici istologici negativi (alto grado di differenziazione e la presenza di invasione vascolare e perineurale) e ad una ridotta sopravvivenza globale e libera da malattia, suggerendo che l' inibizione della ferroptosi conferisce ai pazienti con iCCA una prognosi peggiore.

Nello studio molecolare, abbiamo osservato in circa il 20% dei nostri pazienti con iCCA mutazioni puntiformi di *IDH1* (codoni 132 o 105) o *IDH2* (codone 172), in linea con i dati presenti in letteratura (che riportano tra le mutazioni più frequenti nel iCCA quelle di *IDH1-2*, presenti tra il 10% e il 20% dei casi).

Abbiamo inoltre rilevato una caratteristica molecolare mai descritta prima d'ora nel iCCA, ossia la presenza di un SNP sul codone 105 del gene *IDH1* nel 12% dei nostri pazienti. Curiosamente, i pazienti con questa alterazione molecolare hanno dimostrato una migliore sopravvivenza rispetto ai pazienti con mutazioni puntiformi di *IDH1-2* o con *IDH1-2 wild type*. I SNP sono alterazioni molecolari che causano la sostituzione di un nucleotide ma che non alterano la sequenza amminoacidica della proteina. Tuttavia queste modifiche possono comunque conferire delle alterazioni a livello funzionale alla proteina. Il SNP *IDH1^{105GGT}* da noi trovato era stato precedentemente descritto in pazienti con leucemia mieloide acuta, in neoplasie gliali del sistema nervoso centrale e in tumori tiroidei, ma con significato biologico poco chiaro. Infatti nei pazienti con leucemia mieloide acuta e con glioblastoma la presenza di questo SNP sembra essere correlata ad una peggiore prognosi, mentre nei pazienti con gliomi di grado 2 e 3 sembra associato ad una maggiore sopravvivenza, come osservato nei nostri casi di iCCA. La spiegazione di queste differenze al momento non c'è, poiché non è ancora chiaro il modo in cui la presenza del SNP *IDH1^{105GGT}* agisce.

La correlazione inversa che abbiamo notato tra la presenza di questo SNP e i livelli di GPX4 suggerisce che nei pazienti con iCCA che presentano questa alterazione molecolare la cascata ferroptotica sia attivata, e questo dato spigherebbe la maggior sopravvivenza globale di questi pazienti. Con la nostra casistica non siamo riusciti invece a confermare la correlazione tra la mutazione *IDH1*^{R132C} e i ridotti livelli di GPX4 riportata nello studio di Wang et al. (81), ma questo può essere dovuto alle diverse condizioni sperimentali nei due studi. Il nostro studio è stato infatti condotto in vivo su tessuto di iCCA umani, mentre il loro è stato condotto in vitro su linee cellulari diverse da iCCA. Tenendo in considerazione i nostri dati relativi alla sopravvivenza, si evince come sia possibile che sia il SNP *IDH1*^{105GGT} sia la mutazione *IDH1*^{R132C} agiscano sull'espressione di GPX4, ma in modalità differenti o con intensità diverse. Infatti, sia i casi con la mutazione *IDH1*^{R132C} che con il SNP *IDH1*^{105GGT} hanno mostrato una sopravvivenza più lunga rispetto ai casi con *IDH1-2* WT. Il meccanismo molecolare con cui il SNP *IDH1*^{105GGT} trovato agisce riducendo i livelli di GPX4 rimane ad ora sconosciuto e saranno necessari ulteriori studi per chiarirlo. È importante notare che nei pazienti portatori di questo SNP *IDH1*^{105GGT} non è prevista la risposta a farmaci inibitori di GPX4, come RSL3, poiché in essi i livelli di GPX4 risultano già molto bassi, ma potrebbero invece rispondere agli induttori della ferroptosi che influenzano i livelli di GSH, come l'erastina. Perciò è importante conoscere il background genetico dei pazienti con iCCA in quanto necessario per scegliere la terapia farmacologica più appropriata per indurre la morte delle cellule tumorali, soprattutto nei casi che sviluppano chemioresistenza.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato per la prima volta che nella maggior parte dei iCCA la ferroptosi non risulta attiva, e che la sua attivazione dipende dallo stato mutazionale dei geni *IDH1* ed *IDH2*. Questo è importante per un possibile utilizzo dei farmaci induttori della ferroptosi nei pazienti con iCCA, in particolare in quelli che sviluppano chemioresistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergquist A, von Seth E: Epidemiology of cholangiocarcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015; 29(2):221-232.
2. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al: Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17(9):557-588.
3. Tyson GL, El-Serag HB: Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011; 54(1):173-184.
4. Alvaro D, Hassan C, Cardinale V, Carpino G, Fabris L, Gringeri E, et al: Italian Clinical Practice Guidelines on Cholangiocarcinoma - Part I: Classification, diagnosis and staging. *Dig Liver Dis*. 2020;52(11):1282-1293.
5. Strijker M, Belkouz A, van der Geest LG, et al: Treatment and survival of resected and unresected distal cholangiocarcinoma: a nationwide study. *Acta Oncol*. 2019;58(7):1048-1055.
6. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA: Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020;72(1):95-103.
7. Khan SA, Tavolari S, Brandi G: Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int*. 2019;39 Suppl 1:19-31.
8. Forner A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, Lamarca A: Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2019;39 Suppl 1:98-107.
9. Meyer CG, Penn I, James L: Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients. *Transplantation*. 2000;69(8):1633-1637.
10. Brown KM, Parmar AD, Geller DA: Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014;23(2):231-246.
11. Patel T: Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001;33(6):1353-1357.
12. Patel T: Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer*. 2002;2:10. Published 2002 May 3.

13. Sempoux C, Jibara G, Ward SC, et al: Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology. *Semin Liver Dis.* 2011;31(1):49-60.
14. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, et al: Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg.* 2007;245(5):755-762.
15. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ: Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(9):512-522. Published 2011 Aug 2.
16. Endo I, Gonen M, Yopp AC, et al: Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg.* 2008;248(1):84-96.
17. Kim TK, Choi BI, Han JK, Jang HJ, Cho SG, Han MC: Peripheral cholangiocarcinoma of the liver: two-phase spiral CT findings. *Radiology.* 1997;204(2):539-543.
18. Miller G, Schwartz LH, D'Angelica M. The use of imaging in the diagnosis and staging of hepatobiliary malignancies. *Surg Oncol Clin N Am.* 2007;16(2):343-368.
19. Ringe KI, Wacker F: Radiological diagnosis in cholangiocarcinoma: Application of computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015;29(2):253-265.
20. Wibulpolprasert B, Dhiensiri T: Peripheral cholangiocarcinoma: sonographic evaluation. *J Clin Ultrasound.* 1992;20(5):303-314.
21. Zhang H, Yang T, Wu M, Shen F: Intrahepatic cholangiocarcinoma: Epidemiology, risk factors, diagnosis and surgical management. *Cancer Lett.* 2016;379(2):198-205.
22. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, et al: Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver Int.* 2019;39 Suppl 1:7-18.
23. Joseph NM, Tsokos CG, Umetsu SE, et al: Genomic profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals similar genetics to hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2019;248(2):164-178.

24. Lamarca A, Barriuso J, McNamara MG, Valle JW: Molecular targeted therapies: Ready for "prime time" in biliary tract cancer. *J Hepatol*. 2020;73(1):170-185.
25. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, et al: Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology*. 2013;144(4):829-840.
26. Suh KS, Roh HR, Koh YT, Lee KU, Park YH, Kim SW: Clinicopathologic features of the intraductal growth type of peripheral cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2000;31(1):12-17.
27. Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Ojima H: Surgical outcomes of the mass-forming plus periductal infiltrating types of intrahepatic cholangiocarcinoma: a comparative study with the typical mass-forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg*. 2007;31(10):2016-2022.
28. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H: Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol*. 2010;2(12):419-427.
29. Kozaka K, Sasaki M, Fujii T, et al: A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology*. 2007;51(3):390-400.
30. Cardinale V, Carpino G, Reid L, Gaudio E, Alvaro D: Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol*. 2012;4(5):94-102.
31. Chong DQ, Zhu AX: The landscape of targeted therapies for cholangiocarcinoma: current status and emerging targets. *Oncotarget*. 2016;7(29):46750-46767.
32. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Form Supplement. In: AJCC Cancer Staging Manual. 2018
33. van Vugt JLA, Gaspersz MP, Coelen RJS, et al: The prognostic value of portal vein and hepatic artery involvement in patients with perihilar cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2018;20(1):83-92.
34. Doussot A, Groot-Koerkamp B, Wiggers JK, et al: Outcomes after Resection of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: External Validation and Comparison of Prognostic Models. *J Am Coll Surg*. 2015;221(2):452-461.

35. Nuzzo G, Giuliante F, Ardito F, et al: Improvement in perioperative and long-term outcome after surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma: results of an Italian multicenter analysis of 440 patients. *Arch Surg*. 2012;147(1):26-34.
36. Sarcognato S, Sacchi D, Fassan M, et al: Cholangiocarcinoma. *Pathologica*. 2021;113(3):158-169.
37. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al: Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2014;60(6):1268-1289.
38. Buettner S, Ten Cate DWG, Bagante F, et al: Survival after Resection of Multiple Tumor Foci of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2019;23(11):2239-2246.
39. Shroff RT, Kennedy EB, Bachini M, et al: Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(12):1015-1027.
40. Lunsford KE, Javle M, Heyne K, et al: Liver transplantation for locally advanced intrahepatic cholangiocarcinoma treated with neoadjuvant therapy: a prospective case-series [published correction appears in *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun;3(6):e3]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(5):337-348.
41. Valle J, Wasan H, Palmer DH, et al: Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(14):1273-1281.
42. Lamarca A, et al: A randomised phase III, multi-centre, open-label study of Active Symptom Control (ASC) alone or ASC with oxaliplatin/5-FU chemotherapy (ASC+mFOLFOX) for patients (pts) with locally advanced/metastatic biliary tract cancers (ABC) previously-treated with cisplatin/gemcitabine (CisGem) chemotherapy. [abstract ABC-06] *J. Clin. Oncol*. 2019;37(Suppl. 15):4003.
43. Lowery MA, et al: Phase I study of AG-120, an IDH1 mutant enzyme inhibitor: Results from the cholangiocarcinoma dose escalation and expansion cohorts [abstract] *J. Clin. Oncol*. 2017;35(Suppl. 15):4015.
44. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al: Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3):486-541.

45. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al: Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1237-1243.
46. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P: Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis.* 2021; 26(3-4):152-162.
47. Nirmala JG, Lopus M: Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* 2020; 36(2):145-164.
48. Mishra AP, Salehi B, Sharifi-Rad M, Pezzani R, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, et al: Programmed cell death, from a cancer perspective: an overview. *Mol Diagnosis Ther.* 2018; 22(3): 281–95.
49. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al: Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012; 149(5):1060-1072.
50. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y: Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci.* 2016; 41(3):274-286.
51. Capelletti MM, Manceau H, Puy H, Peoc'h K: Ferroptosis in Liver Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(14):4908. Published 2020 Jul 11.
52. Bridges RJ, Natale NR, Patel SA: System xc⁻ cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(1):20-34.
53. Su Y, Zhao B, Zhou L, et al: Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs. *Cancer Lett.* 2020; 483:127-136.
54. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, et al: Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(2):278-286.
55. Kagan VE, Mao G, Qu F, et al: Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 2017; 13(1):81-90.
56. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al: ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol.* 2017; 13(1):91-98
57. Jia M, Zhang H, Qin Q, et al: Ferroptosis as a new therapeutic opportunity for nonviral liver disease. *Eur J Pharmacol.* 2021; 908:174319.

58. Lee JY, Kim WK, Bae KH, Lee SC, Lee EW: Lipid Metabolism and Ferroptosis. *Biology (Basel)*. 2021; 10(3):184. Published 2021 Mar 2.
59. Jiang L, Kon N, Li T, et al: Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. 2015; 520(7545):57-62.
60. Sun X, Ou Z, Xie M, et al: HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene*. 2015; 34(45):5617-5625.
61. Chen Y, Zhu G, Liu Y, et al: O-GlcNAcylated c-Jun antagonizes ferroptosis via inhibiting GSH synthesis in liver cancer. *Cell Signal*. 2019; 63:109384.
62. Li Z, Jiang L, Chew SH, Hirayama T, Sekido Y, Toyokuni S: Carbonic anhydrase 9 confers resistance to ferroptosis/apoptosis in malignant mesothelioma under hypoxia. *Redox Biol*. 2019; 26:101297.
63. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res*. 2021; 31(2):107-125.
64. Bai T, Lei P, Zhou H, et al. Sigma-1 receptor protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(11):7349-7359.
65. Liu H, Kuang X, Zhang Y, et al: ADORA1 Inhibition Promotes Tumor Immune Evasion by Regulating the ATF3-PD-L1 Axis. *Cancer Cell*. 2020; 37(3):324-339.e8.
66. Kuang Y, Wang Q: Iron and lung cancer. *Cancer Lett*. 2019; 464:56-61.
67. Lai Y, Zhang Z, Li J, et al: STYK1/NOK correlates with ferroptosis in non-small cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 519(4):659-666.
68. Li Y, Xia J, Shao F, et al: Sorafenib induces mitochondrial dysfunction and exhibits synergistic effect with cysteine depletion by promoting HCC cells ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 534:877-884.
69. Sun X, Ou Z, Chen R, et al: Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 2016; 63(1):173-184.
70. Sun J, Zhou C, Zhao Y, et al: Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving

- EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation. *Redox Biol.* 2021; 41:101942.
71. Wang Q, Guo Y, Wang W, et al: RNA binding protein DAZAP1 promotes HCC progression and regulates ferroptosis by interacting with SLC7A11 mRNA [published correction appears in *Exp Cell Res.* 2021 Nov 15;408(2):112867]. *Exp Cell Res.* 2021; 399(1):112453.
 72. Ma S, Henson ES, Chen Y, Gibson SB: Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016; 7(7):e2307. Published 2016 Jul 21.
 73. Nagpal A, Redvers RP, Ling X, et al: Neoadjuvant neratinib promotes ferroptosis and inhibits brain metastasis in a novel syngeneic model of spontaneous HER2⁺ breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2019; 21(1):94. Published 2019 Aug 13.
 74. Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR: Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience.* 2015; 2(5):517-532. Published 2015 May 2.
 75. Dai E, Han L, Liu J, et al: Autophagy-dependent ferroptosis drives tumor-associated macrophage polarization via release and uptake of oncogenic KRAS protein. *Autophagy.* 2020; 16(11):2069-2083.
 76. Gautheron J, Gores GJ, Rodrigues CMP: Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol.* 2020; 73(2):394-408.
 77. Yamada N, Karasawa T, Kimura H, et al: Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure. *Cell Death Dis.* 2020; 11(2):144. Published 2020 Feb 24.
 78. Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P: Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(23):2875-2890.
 79. Fang X, Wang H, Han D, et al: Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116(7):2672-2680.
 80. Wang, TX., Liang, JY., Zhang, C. et al: The oncometabolite 2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 sensitizes cells to ferroptosis. *Cell Death Dis* 10, 755 (2019).

