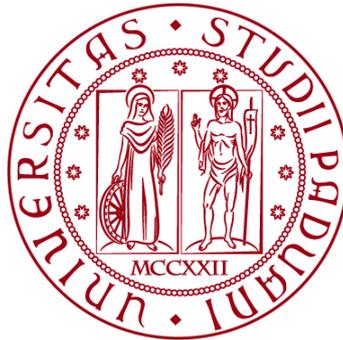


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Alterazioni epigenetiche correlate a una dieta ad alto  
contenuto di fruttosio in modelli di tumorigenesi  
pancreatica**

**Tutor: Dott. Alessandro Carrer  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Roberta Noè  
Dipartimento di Biologia**

**Laureando: Federico Pataconi**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# Sommario

Abstract.....	4
Stato dell'arte .....	5
L'adenocarcinoma duttale pancreatico .....	5
HFCS e conseguenze di una dieta ricca in fruttosio .....	7
Metabolismo del fruttosio .....	8
Il ruolo dell'acetile-CoA nella genesi e nello sviluppo del PDAC .....	11
Approccio sperimentale.....	14
Modelli murini di carcinogenesi pancreatica spontanea.....	14
Immunoistochimica (IHC).....	14
Immunofluorescenza (IF) .....	17
Analisi delle immagini ottenute al microscopio .....	20
RISULTATI.....	20
Un elevato consumo di fruttosio altera il livello di acetilazione della proteina istonica H4 (IHC).....	20
Un elevato consumo di fruttosio altera il livello di acetilazione della proteina istonica H4 (IF).....	22
Conclusioni.....	25
Bibliografia.....	27

# Abstract

Con l'introduzione sul mercato di bibite e cibi processati contenenti high-fructose corn syrup (HFCS), il consumo di fruttosio ha subito un incremento notevole negli ultimi decenni, portando con sé conseguenze non trascurabili per la nostra salute. Recenti studi, infatti, hanno evidenziato una correlazione tra una dieta ad alto contenuto di fruttosio e varie patologie, in primis disordini legati allo spettro della sindrome metabolica ma anche ad alcune forme tumorali. Si è visto che i prodotti metabolici del monosaccaride hanno un ruolo nell'oncogenesi dell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC), forma di neoplasia pancreaticca molto aggressiva e difficilmente diagnosticabile.

Il seguente studio si pone l'obiettivo di andare ad identificare alterazioni epigenetiche a livello di cellule tumorali pancreaticche riconducibili al metabolismo del fruttosio. Sono stati presi in esame modelli murini mutanti per il gene KRAS ai quali è stata somministrata, per via orale, una bevanda ricca in fruttosio ad libitum e altri a cui è stata somministrata acqua come controllo. Attraverso tecniche di immunofluorescenza e immunoistochimica si sono indagati i livelli di acetilazione della proteina istonica H4 nelle due diverse condizioni, osservando un aumento di acetilazione nei topi che hanno bevuto acqua arricchita con fruttosio.

# Stato dell'arte

## L'adenocarcinoma duttale pancreatico

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) è la più comune forma di tumore al pancreas, nonché una tra le neoplasie più aggressive e letali. È una tipologia di tumore presente, più comunemente, tra gli uomini rispetto alle donne, con un picco di incidenza che si aggira tra i 60 e gli 80 anni (80% dei casi) (1). La sua insorgenza in età avanzata, unita all'incremento della longevità umana nei paesi ricchi e in via di sviluppo, ci ha permesso di assistere ad un importante incremento nel numero annuo di diagnosi, che negli ultimi 20 anni si sono duplicate (2). Oltre all'età e al sesso, molteplici fattori di rischio sono stati associati all'insorgere del PDAC: tra questi si distinguono fattori ambientali, quali l'uso di tabacco e il consumo di alcohol, fattori legati alla dieta come un consumo eccessivo di carne, grassi, nitrati, e poi, ancora, fattori genetici, malattie croniche (tra cui diabete mellito e pancreatite cronica), l'esposizione a determinate sostanze chimiche, l'obesità e la scarsa attività fisica (1).

La scarsa efficacia dei test ad oggi disponibili rende la diagnosi dell'adenocarcinoma pancreatico particolarmente difficile, tanto che, in gran parte dei casi, questo viene identificato solamente una volta raggiunto uno stadio di sviluppo avanzato, momento in cui si rendono visibili i primi sintomi (1). Infatti, la mancanza di test diagnostici precoci che siano a basso costo, altamente sensibili e specifici, unita alla bassa incidenza della neoplasia pancreatico, fanno sì che vi sia una tendenza a effettuare screening frequenti (volti a individuare lesioni precoci) soltanto sugli individui geneticamente predisposti al suo sviluppo e affetti da malattie croniche. Attualmente la resezione chirurgica è l'unico trattamento che ha il potenziale di rimuovere questa forma di cancro, tuttavia, ricevuta la diagnosi, la percentuale di pazienti idonei alla pancreatectomia si aggira attorno al 15-20% (1). Tutto ciò contribuisce a giustificare il fatto che il tasso di

sopravvivenza osservato a 5 anni dalla sua identificazione, sebbene in aumento (negli anni novanta era inferiore al 5%, mentre nel 2019 è arrivato a raggiungere il 9% in Europa e USA), rimanga ancora basso (2).

La tumorigenesi del carcinoma pancreatico è caratterizzata da più step, a partire da lesioni preneoplastiche, fino ad arrivare al carcinoma vero e proprio. Le lesioni precancerose riconosciute come antecedenti lo sviluppo del PDAC sono due: di tipo cistico (IPMN, da intraductal papillary mucinous neoplasm) o meno (PanIN, da pancreatic intraepithelial neoplasia) (1). La loro formazione è associata a metaplasia acino-duttale (ADM), un processo che comporta la trasformazione anomala di cellule acinari in cellule con caratteristiche simili a quelle duttali e questo cambiamento è associato a una serie di alterazioni genetiche e molecolari che rendono le cellule più suscettibili a ulteriori trasformazioni maligne. Il contributo patogenetico della metaplasia acino-duttale è ancora dibattuto, ma si pensa che possa dar origine a una grossa fetta di tumori pancreatici.

L'adenocarcinoma duttale si presenta più frequentemente a livello della testa del pancreas, dove le masse cancerose possono crescere a tal punto da causare stenosi a livello del coledoco distale, e, addirittura, arrivare ad occupare strutture retroperitoneali, duodeno, peritoneo, stomaco, colon trasverso, digiuno e cistifellea. Si tratta di neoplasie epiteliali invasive che frequentemente suscitano una marcata reazione desmoplastica, causando fibrosi dense, ricche in collagene, miofibroblasti, linfociti e altre cellule infiammatorie. In alcuni casi si ha difficoltà a distinguere i carcinomi dalle aree fibrotiche tipiche della pancreatite cronica, e, spesso, la presenza di tessuti di granulazione e di frammenti di fibrosi con infiammazione si associa a quest'ultima. Il PDAC, inoltre, comporta la formazione di strutture ghiandolari che, a seconda del loro grado di differenziamento, spaziano da ghiandole ben formate a cellule infiltranti mal orientate, singole o organizzate in strutture solide. Queste ghiandole non presentano la normale conformazione diramata che è caratteristica delle ghiandole benigne, ma tendono

a crescere in maniera disordinata. La loro distribuzione risulta disorganizzata e possono essere adiacenti ai vasi, senza acini o stroma a mediare il contatto (cosa che non rispecchia la normale architettura del pancreas). L'adenocarcinoma duttale infiltrante si può estendere all'interno dei dotti biliari (emulando delle PanIN), si può infiltrare e crescere lungo i nervi (si dice espansione perineurale e avviene nel 75% dei casi), e può invadere il sistema linfatico (nel momento in cui sia ha una metastasi a livello dei linfonodi) (1).

A livello citologico, le cellule mostrano un elevato rapporto nucleo-citoplasma e questo determina una densità nucleare maggiore rispetto alle cellule facenti parte dei gruppi duttali benigni (1).

Varie alterazioni genetiche giocano un ruolo fondamentale nell'insorgenza della patologia. KRAS è l'oncogene più frequentemente alterato nel PDAC, con mutazioni identificabili in più del 90% dei campioni umani e osservabili già nella maggior parte delle PanIN di basso grado. Questo dato ci suggerisce una presenza precoce delle mutazioni KRAS e un ruolo chiave di queste ultime nei primi stadi di sviluppo della neoplasia pancreaticca. Altri geni identificati come fattori determinanti nella tumorigenesi sono p16/CDKN2A (una perdita di funzione di p16 è stata individuata nel 90% circa dei carcinomi), TP53, e SMAD4/DPC4, tutti geni tumor suppressor frequentemente alterati. Mutazioni a livello di questi geni, però, entrano in gioco più tardivamente rispetto a KRAS, essendo identificabili in lesioni pancreaticche in stadi di avanzamento inoltrati e PDA invasivo (1).

## HFCS e conseguenze di una dieta ricca in fruttosio

Il dolcificante che prende il nome di High Fructose Corn Syrup (HFCS) è un composto contenente glucosio e fruttosio e si può ottenere a partire dall'amido di mais impiegando idrolasi (che idrolizzano l'amido, a dare glucosio) e isomerasi (che convertono parte del glucosio precedentemente ottenuto in fruttosio).

Prodotto a partire dagli anni settanta del secolo scorso e perfezionato negli anni ottanta (portando il contenuto di fruttosio al suo interno dal 15%, che aveva in origine, al 55%), è, in poco tempo, diventato il favorito dall'industria alimentare, perché particolarmente conveniente a livello economico e dotato di un potere dolcificante superiore a quello del saccarosio (3).

L'ampia diffusione dell'High Fructose Corn Syrup, però, sembra aver portato con sé più di un risvolto negativo. Si ritiene, ad esempio, che il rapido incremento nei tassi di obesità e sovrappeso in USA (e, in generale, in gran parte dei paesi industrializzati), riscontrabile proprio a partire dagli anni ottanta, sia, almeno in parte, riconducibile a HFCS. Dagli anni settanta agli anni duemila l'assunzione media annuale di HFCS negli Stati Uniti è cresciuta da 0,23 Kg a 28,4 Kg e il consumo giornaliero di fruttosio è cresciuto del 26%, passando da 64 g/giorno a 81 g/giorno (3). A livello sperimentale è stato dimostrato che un'assunzione massiccia di fruttosio può essere collegata all'insorgenza di una serie di malattie metaboliche tra cui obesità, steatosi epatica non alcolica (NAFLD), malattie cardiovascolari (CVD) e diabete di tipo 2 (3) (4) (6). Si sono, quindi, trovati dei collegamenti tra il consumo di questo zucchero, le sue conseguenze a livello metabolico e lo sviluppo di varie tipologie di cancro, tra le quali figura anche quello al pancreas.

## Metabolismo del fruttosio

A seguito della sua assunzione, il fruttosio viene assorbito a livello dell'intestino tenue per diffusione facilitata, passando attraverso trasportatori GLUT5 (la cui espressione è stimolata dal fruttosio stesso), localizzati nella porzione apicale del polo luminale degli enterociti. Anche GLUT2 e GLUT8 sono coinvolti nel trasporto del monosaccaride, con GLUT2 che presenta una bassa affinità per il fruttosio e ne media la diffusione negli epatociti (passando per il sistema portale), e GLUT8 che è espresso a livello del fegato e del cuore (3) (4). Il fruttosio ingerito viene così

catturato dagli enterociti del tratto tenue, e processato da reazioni di fruttolisi. In minima parte, il fruttosio entra la circolazione portale, arrivando al fegato – l'organo deputato al processamento del fruttosio ingerito e alla omeostasi di quello circolante.

All'interno del fegato ha luogo la fruttolisi, una via metabolica che converte il fruttosio in due molecole di piruvato. Il primo step consiste nella fosforilazione del monosaccaride a fruttosio 1-fosfato (F1P) per mezzo dell'enzima chetoesochinasi (KHK). KHK esiste in due isoforme, frutto di splicing alternativo: KHK-A (dotata di bassa affinità per il fruttosio e espressa ubiquitariamente in diversi tessuti) e KHK-C (caratterizzata da una ben più alta affinità ed espressa principalmente nel fegato, nell'intestino e nei reni). Successivamente, l'aldolasi B converte il F1P in diidrossiacetone fosfato (DHAP) e gliceraldeide, poi convertita a sua volta in gliceraldeide 3-fosfato (G3P) dalla triochinasi. A questo punto la via metabolica del fruttosio si sovrappone a quella del glucosio e, dagli intermedi comuni (DHAP e G3P), si ottiene il piruvato (3) (4).

Vi sono alcune differenze sostanziali che distinguono la glicolisi dalla fruttolisi nelle fasi antecedenti il loro momento di convergenza, e che sono alla base di interessanti interazioni che coinvolgono glucosio e fruttosio. Per prima cosa il glucosio viene inizialmente fosforilato da una esochinasi (HK), generando glucosio 6-fosfato (G6P). L'espressione di questo enzima viene inibita dal suo stesso prodotto con un meccanismo di feedback negativo, cosa in cui la chetoesochinasi differisce, non avendo alcun controllo di retroazione negativa. Questo significa che, mentre G6P inibisce la sua stessa sintesi una volta raggiunta una concentrazione sufficiente, F1P tende ad accumularsi in maniera rapida all'interno del fegato, consumando molecole di ATP in gran numero.

Una seconda importante differenza si trova in uno degli step successivi della via glicolitica, in cui, a partire da fruttosio 6-fosfato, si ottiene fruttosio 1,6-bisfosfato per mezzo della fosfofruttochinasi (PFK). Questo enzima è, infatti, regolato da

insulina, citrato e ATP. Se si pensa, dunque, che, in presenza di grandi quantità di fruttosio assunte con la dieta, si assiste ad un consumo di ATP non indifferente a livello del fegato, allora si arriva alla conclusione che questo debba necessariamente comportare una variazione nell'espressione dell'enzima PFK, e, di conseguenza, una variazione nel metabolismo del glucosio. È stato dimostrato, infatti, che il processo di glicolisi, nello scenario appena descritto, si verifica più rapidamente, determinando un maggiore consumo di glucosio, che a sua volta può determinare un incremento nel processo di *de novo* lipogenesi (DNL) (5). Inoltre, numerosi studi hanno mostrato un incremento nell'insulino-resistenza a seguito dell'ingestione di fruttosio, che, insieme all'obesità indotta da un consumo prolungato del monosaccaride, induce iperinsulinemia e, conseguentemente, ipoglicemia o diabete di tipo 2 (4). Tutto ciò è cruciale per comprendere il legame tra HFCS e tumorigenesi pancreatiche, essendo il legame tra obesità, diabete e cancro ben dimostrato. (2).

Il piruvato, convertito in acetile-CoA, può entrare nel ciclo degli acidi tricarbossilici e generare citrato. Questo può, in situazioni anaplerotiche, uscire dal mitocondrio e, per mezzo dell'enzima ATP-citrato-liasi (ACLY), può generare acetile-coenzima A citosolico, centrale nel processo di sintesi *de novo* dei lipidi (DNL).

Quando il fruttosio è però consumato in grandi quantità, tanto da portare a saturazione i trasportatori GLUT5 che ne mediano il passaggio, non tutto viene assorbito a livello intestinale e si accumula nel lume del colon (5). Qui il monosaccaride viene convertito in acidi grassi a catena corta per opera del microbiota intestinale. In particolare, il prodotto principale è l'acetato, il quale viene convertito in acetile-CoA ad opera dell'enzima acetile-CoA sintetasi 2 (ACSS2).

Quanto appena detto assume una peculiare rilevanza nello studio che abbiamo condotto. Abbiamo, infatti, realizzato due esperimenti sul tessuto pancreatico di sei diverse cavie murine mutanti per il gene KRAS, con l'obiettivo di evidenziare

una correlazione tra una dieta ad alto contenuto di fruttosio e l'insorgenza del PDAC. Per farlo siamo andati ad operare a livello di sezioni di tessuto prelevate da topi a cui è stata somministrata differenzialmente, a tre a tre, acqua arricchita con fruttosio ad libitum oppure semplice acqua, per la durata di quattro mesi. Trovandoci quindi nella situazione in cui i nostri organismi modello hanno assunto fruttosio in grandi quantità, in base ai meccanismi descritti in precedenza, ci aspettiamo che nelle loro cellule sia stato prodotto acetile-CoA in parte per mezzo dell'enzima ACLY (a partire dal fruttosio assorbito a livello intestinale) e in parte per mezzo dell'enzima ACS2.

Il fruttosio, inoltre, agisce come attivatore della via di trascrizione lipogenica. Lo fa con la mediazione dei fattori di trascrizione ChREBP (principalmente di ChREBP- $\beta$ ) e delle sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), anche se il come non è ancora del tutto chiaro (3).

## Il ruolo dell'acetile-CoA nella genesi e nello sviluppo del PDAC

Acetile-CoA è un tioestere (ovvero un composto formato da un acido carbossilico e un tiolo) ottenuto dalla condensazione dell'acido acetico con il coenzima A. Come già menzionato è un metabolita centrale all'interno della cellula, e prende parte a molteplici processi metabolici di notevole importanza. Tra questi si ricordano il ciclo Krebs o ciclo dell'acido tricarbossilico (in cui entra una volta sintetizzato a partire dal piruvato) e le vie biosintetiche di acidi grassi, colesterolo, corpi chetonici e amminoacidi. Questo agisce anche come donatore di gruppi acetile. Questa sua caratteristica ne determina un'importanza chiave nell'acetilazione delle lisine istoniche, e, di conseguenza, nell'apertura della cromatina. Le principali modalità di sintesi dell'acetile-CoA a livello del citosol e del nucleo sono due. La prima coinvolge l'enzima ATP-citrato liasi (ACLY) che

converte il citrato di derivazione mitocondriale in acetile-CoA (e ossalacetato) in una reazione che richiede ATP. La produzione del citrato usato come substrato da ACLY è legata, tra le altre cose, anche alle reazioni di glicolisi e fruttolisi, che forniscono alla cellula le componenti necessarie perché si verifichi il ciclo di Krebs. La seconda coinvolge, invece, l'enzima acetile-CoA sintetasi 2 (ACSS2) che produce acetile-CoA a partire dall'acetato. Anche questa reazione richiede una molecola di ATP e l'acetato necessario affinché avvenga può essere fornito dal microbiota intestinale, che lo produce a partire dal fruttosio non assorbito dai canali GLUT5.

Una ricerca svolta da Carrer e colleghi ha portato alla luce interessanti scoperte sul peculiare ruolo di ACLY nella genesi del tumore pancreatico e su come l'acetilazione istonica, causata dall'acetile-CoA, possa influenzare la plasticità e la proliferazione nelle cellule cancerose. Per comprendere meglio in cosa consiste lo studio svolto dai ricercatori è importante considerare alcune delle conoscenze pregresse che hanno permesso loro di impostare questa indagine.

- Acetile-CoA, prodotto principalmente dagli enzimi ACLY e ACSS2, esercita una certa influenza sulla proliferazione e sopravvivenza delle cellule cancerose del pancreas agendo in due modi: ricoprendo un ruolo chiave nei processi di biosintesi di acidi grassi e colesterolo, fornisce alle cellule le componenti di cui necessitano per prosperare; essendo un donatore obbligato di acetile per le lisine istoniche, condiziona la segnalazione cellulare.
- I livelli dell'acetile-CoA intracellulare variano sulla base di un certo numero di stimoli ambientali e con essi varia anche l'acetilazione istonica (molto sensibile ai cambiamenti nella disponibilità del tioestere).
- Le proteine BET (bromodomain and extraterminal), legandosi a specifiche modificazioni degli istoni e reclutando fattori di trascrizione, svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica. È stato dimostrato che un'inibizione di queste proteine ha un'influenza negativa

sulla formazione e sulla crescita dei carcinomi pancreatici, suggerendo non solo che l'acetilazione istonica è regolata dinamicamente a livello dell'adenocarcinoma pancreatico, ma anche che contribuisce al suo sviluppo.

- ACLY può essere usata come substrato dalla serina/treonina chinasi AKT, che, fosforilandola, ne promuove l'attività enzimatica, portando ad un incremento nella produzione dell'acetile-CoA e, di conseguenza, anche nell'acetilazione istonica globale nelle cellule cancerose. Si è dimostrato, inoltre, che un'inibizione di AKT sopprime la metaplasia acino-duttale (ADM).
- La metaplasia acino-duttale è un evento metaplastico reversibile che si verifica a livello delle cellule acinari pancreatiche in risposta a ferite o infiammazioni. Si è visto però che nelle cellule mutanti per il gene KRAS la ADM è irreversibile e può progredire in lesioni PanIN. Le cellule mutanti per KRAS inoltre mostrano elevata acetilazione in corrispondenza dell'istone H4, questo prima ancora che appaiano lesioni.

I ricercatori hanno quindi condotto una serie di esperimenti con l'obiettivo di comprendere meglio in che modo la biosintesi dell'acetile-CoA influisca sullo sviluppo del tumore al pancreas, così da poter identificare dei processi acetile-CoA-dipendenti di rilevanza terapeutica (7).

Dallo studio è emerso che la produzione dell'acetile-CoA ACLY-dipendente riveste un ruolo chiave nella produzione di ADM e nella genesi del carcinoma.

Lo studio di Carrer et al. sembra, inoltre, aver evidenziato un differente ruolo di ACS2 nel processo di tumorigenesi pancreatico, rispetto ad ACLY. Infatti, mentre l'acetile-CoA prodotta da ACLY si è dimostrata essenziale nelle fasi precoci della malattia (con un'inibizione nella formazione del tumore che si verifica in sua assenza), l'espressione di ACS2 si è mostrata utile al suo progredire all'interno di lesioni neoplastiche già formate (7).

# Approccio sperimentale

## Modelli murini di carcinogenesi pancreatica spontanea

Il nostro studio è stato condotto in pancreas estratti da sei differenti topi geneticamente modificati, a cui è stato riservato un trattamento differente per la durata di quattro mesi: a tre di questi, infatti, è stata somministrata una bevanda contenente glucosio e fruttosio in rapporto 45:55 (volta a replicare gli effetti ravvisabili nei pancreas umani a seguito dell'assunzione, per un periodo particolarmente prolungato, di prodotti alimentari contenenti HFCS), agli altri tre della semplice acqua come controllo. In particolare, sono stati utilizzati modelli murini del tipo "KC", che esibiscono un pattern di sviluppo di PDAC paragonabile a quello di Homo sapiens. Il ceppo di topi LSL-KrasG12D gioca un ruolo fondamentale nell'ottenimento di questi modelli, fornendo l'allele mutante endogeno e condizionale KrasG12D, silenziato da una floxed transcriptional cease cassette che prende il nome di Lox-Stop-Lox (LSL). Questa cassetta genica non è altro che una sequenza di DNA (fiancheggiata, per l'appunto, da sequenze LoxP), che, inserita nel genoma del topo a monte dell'esone 1 del gene Kras, inibisce l'espressione dell'allele sopra menzionato. Sfruttando l'azione della DNA ricombinasi batterica sito-specifica Cre (specifico per le cellule epiteliali del pancreas), in grado di coordinare una ricombinazione genetica a livello di sequenze delimitate da siti LoxP (contenenti specifici siti di legame per Cre), la cassetta LSL può essere rimossa, con la conseguente espressione di KrasG12D, e, quindi, l'inizio della via di segnalazione Ras. I modelli KC si ottengono proprio dall'incrocio di topi PDX-1-Cre o p48-Cre con topi K-rasLSL<sup>G12D</sup> (8).

## Immunoistochimica (IHC)

L'immunoistochimica è una tecnica che permette di visualizzare, attraverso l'utilizzo di specifici anticorpi, antigeni di varia natura su campioni di tessuto.

Nello specifico della nostra sperimentazione questa indagine è servita ad identificare il grado di acetilazione delle proteine istoniche H4 all'interno dei tessuti pancreatici delle cavie murine sottoposte a trattamento differenziato (HFCS e H2O), in modo da permetterne un'osservazione comparativa. I campioni sono stati ottenuti tagliando gli organi paraffinati in fette dello spessore di 4 micron utilizzando sezioni di pancreas provenienti da coppie, sia di topi HFCS che di topi H2O.

Le sezioni così preparate sono poi state posizionate su vetrini da laboratorio e deparaffinate, eseguendo due immersioni in xylene, ciascuna della durata di 10 minuti.

Successivamente le sezioni sono state reidratate facendole passare in una serie di soluzioni alcoliche a concentrazione decrescente e, per finire, in acqua distillata.

La procedura seguita passo a passo è la seguente:

- 2x EtOH 100% per 1 min.
- 1x EtOH 95% per 1 min.
- 1x EtOH 70% per 1 min.
- 2x H2O per 5min.

A seguire i campioni sono stati inseriti in 800ml di soluzione buffer citrato + tween precedentemente portata a bollore, per poi essere lasciati, ancora immersi nel liquido, in microonde a 160W per 20 minuti. Questo step preparatorio serve a:

- preservare la struttura cellulare mantenendo ottimale il pH della soluzione;
- aumentare la permeabilità delle membrane cellulari facilitando l'accesso degli anticorpi;
- ridurre le interazioni non specifiche.

Il passaggio successivo è il blocco delle perossidasi endogene che è servito a limitare le interferenze da parte di fattori esterni; le sezioni sono state coperte di peroxidase block ed inserite in camera umida, per evitare l'evaporazione delle gocce di block, per 10 minuti.

È stata poi applicata una soluzione superbloc per prevenire legami aspecifici ed impedire agli anticorpi, che siamo andati ad utilizzare successivamente, di formare legami con elementi estranei all'indagine e rendere invece il legame tra antigene e anticorpo il più specifico possibile. I campioni così trattati sono stati inseriti in camera umida per 5 minuti.

Per il passaggio seguente della sperimentazione abbiamo scelto anticorpi rabbit Ach4 (in modo da sfruttare la diversità immunologica tra coniglio e topo, e permettere una maggiore selettività nel legame con l'antigene bersaglio), preparati in soluzione PBS-BSA al 2% ed incubato i campioni trattati a 4°C in camera umida overnight. L'albumina sierica bovina (BSA) ha il compito di ridurre ulteriormente il rumore di fondo, bloccando i siti di legame non specifici, e prevenire l'aggregazione degli anticorpi.

Per visualizzare gli antigeni di interesse, gli anticorpi primari specifici sono stati evidenziati con anticorpi secondari biotinilati, resi visibili da una reazione cromogena che coinvolge la biotina. Antipolyvalent yellow, hrp red e dab è il kit che è stato utilizzato e che contiene sia gli anticorpi secondari che gli agenti che permettono la reazione cromogena. Nello specifico:

- antipolyvalent yellow in camera umida per 15 minuti;
- hrp red in camera umida per 15 minuti;
- dab 40 secondi (tempo sufficiente perché si realizzi la reazione cromogena nel nostro specifico caso);
- lavaggio in acqua.

In ultimo, i tessuti sono stati trattati con ematossilina (colorante blu violetto utile a evidenziare componenti cellulari basofili, quali acidi nucleici e proteine di membrana) in modo da fornire alle sezioni una colorazione di contrasto necessaria per una più agevole lettura delle immagini. La procedura è la seguente:

- 1x Hematoxylin per 2 min.
- 1x EtOH 95% per 1 min.
- 2x EtOH 100% per 1 min.
- 2x Xylene per 1 min.

Successivamente i vetrini sono stati lasciati ad asciugare ed infine montati con drop mounting e fatti asciugare nuovamente.

## Immunofluorescenza (IF)

L'immunofluorescenza è una tecnica di microscopia ottica utile a evidenziare specifici antigeni all'interno di cellule e tessuti, sfruttando le proprietà dei fluorocromi (coloranti in grado di emettere luce di una determinata lunghezza d'onda quando eccitati da luce di lunghezze d'onda inferiori). Nella nostra indagine sperimentale questa procedura è servita ad identificare il grado di acetilazione delle proteine istoniche H4 all'interno dei tessuti pancreatici delle cavie murine sottoposte a trattamento differenziato (HFCS e H2O), in modo da permetterne un'osservazione comparativa. Come per l'immunoistochimica, i campioni sono stati ottenuti tagliando gli organi paraffinati in fette dello spessore di 4 micron, ma, questa volta, lo studio è stato effettuato utilizzando sezioni di pancreas provenienti sia da topi HFCS che da topi H2O in triplicato biologico.

Per prima cosa i campioni, adagiati su vetrini da laboratorio, sono stati inseriti in 800ml di soluzione buffer citrato + tween precedentemente portata a bollore, per

poi essere lasciati, ancora immersi nel liquido, in microonde a 160W per 20 minuti. Le motivazioni sono le stesse riportate per l'immunoistochimica.

Sulle sezioni è, successivamente, stata applicata una soluzione di blocking contenente goat serum per un minimo di 30 minuti. Questo passaggio è indispensabile perché, come vedremo, nel processo sono coinvolti anticorpi di capra, e le proteine contenute nel siero servono a ridurre i legami non specifici.

Per andare a delineare un'immagine in cui sia possibile apprezzare non soltanto l'acetilazione istonica, ma anche le strutture tipiche del pancreas, sono stati utilizzati tre diversi anticorpi primari, ciascuno con uno specifico target:

1.  $\alpha$  Ac-H4 pan :  $\alpha$  rabbit (anticorpo di coniglio specifico per l'acetilazione degli istoni H4);
2.  $\alpha$  CPA1 :  $\alpha$  goat (anticorpo di capra specifico per la carbossipeptidasi A1, enzima espresso a livello degli acini pancreatici e, quindi, utile per la loro identificazione);
3.  $\alpha$  Krt19 :  $\alpha$  mouse (anticorpo di topo specifico per la citocheratina 19, proteina espressa in grandi quantità nei dotti pancreatici e, quindi, adatta al loro riconoscimento).

Tutti e tre sono stati inseriti in una soluzione di blocking (funzionale alla prevenzione di legami aspecifici con le proteine endogene del topo) con cui i campioni sono stati incubati overnight in camera umida a 4°C.

Il perché della scelta di anticorpi provenienti da specie animali diverse si spiega considerando lo step successivo del protocollo, che prevede l'impiego di anticorpi secondari marcati con fluorofori di diverso colore. Questi, infatti, possono legarsi agli anticorpi primari riconoscendoli in maniera specie-specifica, permettendo di visualizzare contemporaneamente più antigeni in una stessa preparazione. Gli anticorpi secondari utilizzati nel nostro caso sono i seguenti:

1.  $\alpha$  rabbit  $\rightarrow$   $\alpha$  488 (anticorpo anti-rabbit che emette fluorescenza nel verde);
2.  $\alpha$  goat  $\rightarrow$   $\alpha$  647 (anticorpo anti-goat che emette fluorescenza nel rosso lontano);
3.  $\alpha$  mouse  $\rightarrow$   $\alpha$  Cy3 (anticorpo anti-mouse che emette fluorescenza nel rosso).

Anche questi, in soluzione di blocking, sono stati applicati sulle sezioni, che sono state lasciate ad incubare per un'ora in camera umida a temperatura ambiente e al buio.

Prima del montaggio i campioni sono stati trattati per 10 minuti con colorante Hoechst fluorescente nel blu e specifico per il DNA, al fine di evidenziare i nuclei delle cellule pancreatiche.

Per visualizzare le immagini è stato utilizzato un microscopio confocale, un tipo avanzato di microscopio ottico che utilizza un laser per illuminare un punto focale molto preciso nel campione. Un pinhole è posizionato nel percorso ottico per bloccare la luce diffusa dai piani fuori fuoco, migliorando così la risoluzione e il contrasto dell'immagine. Questo microscopio combinato con la tecnica dell'immunofluorescenza restituiscono immagini ad alta risoluzione, una visualizzazione tridimensionale ed immagini dettagliate e colorate di strutture cellulari e molecolari specifiche.

# Analisi delle immagini ottenute al microscopio

Per valutare se il consumo di fruttosio ha o meno una rilevanza significativa nel processo di acetilazione dell'istone H4, abbiamo condotto un'indagine comparativa a livello dei campioni ricavati dai topi trattati differenzialmente con HFCS o H2O, al fine di evidenziarne le differenze. L'utilizzo delle due tecniche di microscopia ottica descritte in precedenza (IHC e IF) ha reso possibile il confronto. Vediamo quanto è emerso.

## RISULTATI

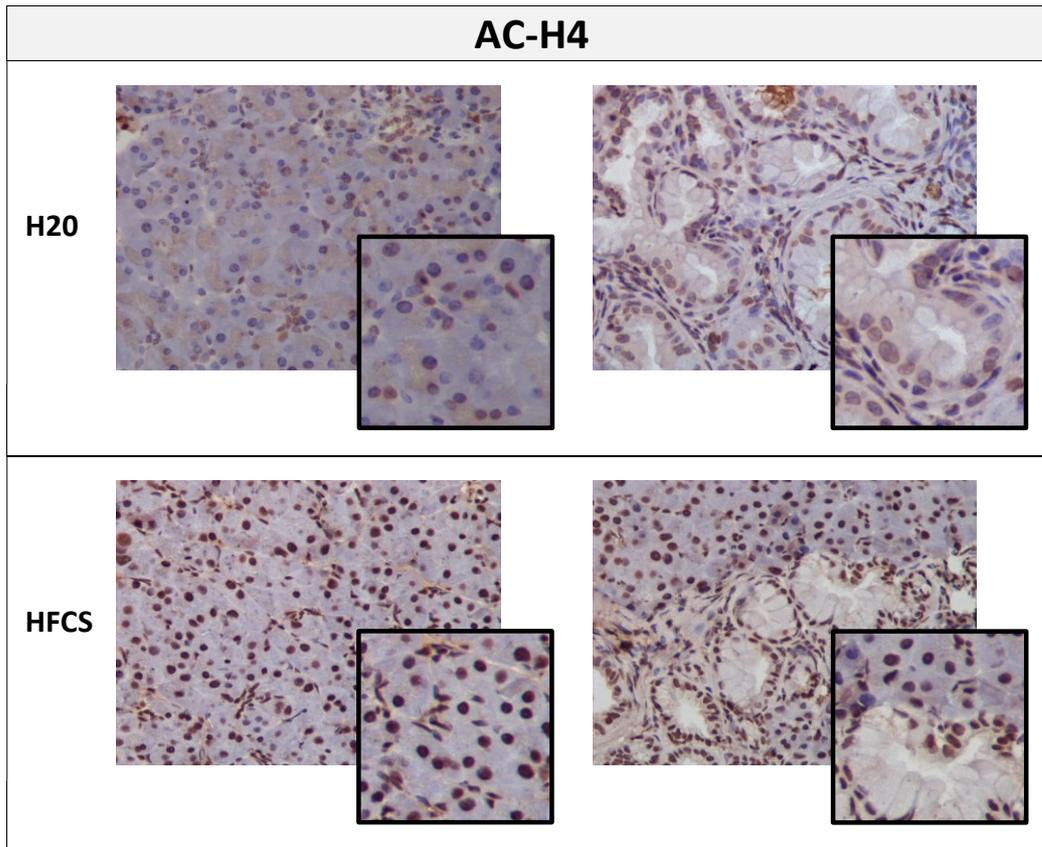
### Un elevato consumo di fruttosio altera il livello di acetilazione della proteina istonica H4 (IHC)

L'esperimento è stato svolto su soltanto due delle tre cavie murine trattate con la soluzione contenente fruttosio e glucosio in rapporto 55:45 e due di quelle trattate con acqua. Le immagini ottenute mostrano lesioni con vari gradi di differenziazione nei tessuti degli uni e degli altri, seppure sembrano più sviluppate in quelli dei topi HFCS.

Gli istoni sono proteine coinvolte nella determinazione della struttura della cromatina, che organizzano il DNA compattandolo in maniera ordinata. Il livello di acetilazione dell'istone H4 può essere, di conseguenza, apprezzato andando ad esaminare le cellule tumorali a livello del nucleo, dove gli anticorpi utilizzati esibiscono un caratteristico colore rosso-marrone.

Sono state analizzate sia sezioni di tessuto parenchimatico sia sezioni di tessuto che riportano lesioni, al fine di tracciare un quadro il più completo possibile della situazione relativa all'acetilazione istonica. Nei topi H2O la colorazione applicata con la tecnica di immunohistochimica si mostra più intensa a livello delle cellule duttali delle lesioni, rispetto a quelle acinari. Questo a dimostrazione della più intensa attività trascrizionale che accompagna le cellule tumorali più differenziate (in questo caso sono cellule che hanno subito una trasformazione da acinari a duttali). Questa eterogeneità nel colore dei nuclei non è evidente nelle cellule dei topi HFCS [Figura 1].

Operando un confronto tra le cavie appartenenti ai due gruppi di studio è possibile evidenziare una più marcata colorazione nei nuclei delle cellule (sia acinari che duttali) dei topi HFCS, suggerendo che vi può essere un legame tra un consumo di fruttosio per un periodo prolungato e un incremento nella proliferazione e nell'accrescimento delle cellule tumorali [Figura 1].



**FIGURA 1: Immunoistochimica contro Ac-H4 in sezioni di pancreas murino** – Sezioni di pancreas di topi KC su cui è stata svolta un'indagine immunoistochimica al fine di comparare i livelli di acetilazione della proteina istonica H4 esibiti dalle cellule. Sono messi a confronto n=2 topi a cui è stata fatta assumere per via orale una bevanda volta a simulare gli effetti di HFCS nell'arco di 4 mesi, con n=2 topi a cui è stata fatta assumere H2O nello stesso arco di tempo. Le immagini sulla sinistra mostrano tessuto parenchimatico, mentre quelle sulla destra esibiscono lesioni.

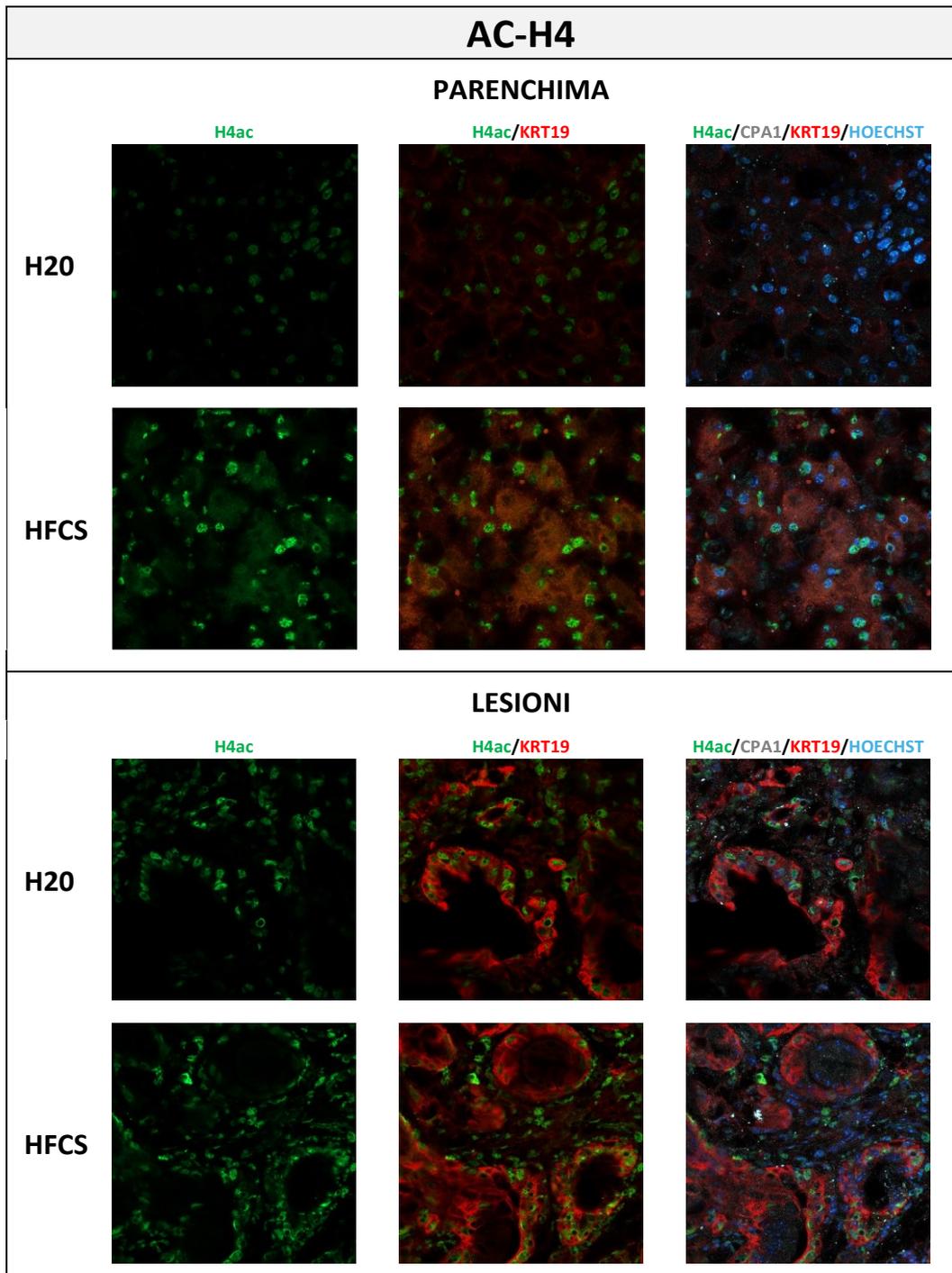
## Un elevato consumo di fruttosio altera il livello di acetilazione della proteina istonica H4 (IF)

Questo esperimento è stato svolto in triplicato biologico sia sui tessuti dei topi HFCS sia su quelli dei topi controllo H2O, sebbene in figura siano state selezionate soltanto due sezioni per tipo [Figura 2]. Anche in questo caso le lesioni si presentano più diffuse e differenziate nelle cavie trattate con fruttosio ad libitum, rispetto a quelle trattate con acqua.

Il dato di nostro interesse è lo stesso dell'immunoistochimica (l'acetilazione dell'istone H4), quindi, anche in questo caso, si devono analizzare i nuclei cellulari. Questa volta però, trattandosi di una immunofluorescenza, i nostri istoni acetilati sono contrassegnati da anticorpi dotati di fluorocromi che, esposti a luce di eccitazione, emettono radiazioni nel verde (reazione fluorimetrica). Oltre a questi sono stati marchiati anche KRT19 (proteina espressa nei dotti pancreatici) e CPA1 (enzima espresso a livello degli acini pancreatici) con dei fluorofori che emettono luce nel rosso e nel rosso lontano rispettivamente, in modo da rendere distinguibili anche dotti e acini. Sono inoltre stati colorati i nuclei con colorante Hoechst fluorescente del blu.

Anche in questo caso sono state analizzate due sezioni di tessuto parenchimatico e due sezioni di tessuto che presentano lesioni. Come visto nei campioni dell'immunoistochimica, le cellule duttali nei campioni dei topi H2O sembrano mostrare una più intensa fluorescenza rispetto a quelle acinari, mentre non si può dire lo stesso per i topi HFCS [\[Figura 2\]](#).

Anche comparando l'intensità della fluorescenza verde tra i nuclei acinari e duttali dei due gruppi di cavie si ottengono dei risultati che sono in linea con quelli ottenuti nell'esperimento precedente, sebbene la differenza non sia altrettanto marcata a livello delle cellule duttali dei topi HFCS rispetto agli H2O [\[Figura 2\]](#).



**FIGURA 2: Immunofluorescenza contro Ac-H4 in sezioni di pancreas murino** – Sezioni di pancreas di topi KC su cui è stata svolta un'indagine a immunofluorescenza al fine di comparare i livelli di acetilazione della proteina istonica H4 esibite dalle cellule. Sono messi a confronto n=2 topi a cui è stata fatta assumere per via orale una bevanda volta a simulare gli effetti di HFCS nell'arco di 4 mesi, con n=2 topi a cui è stata fatta assumere H2O nello stesso arco di tempo. Le immagini sulla sinistra mettono in risalto l'acetilazione dell'istone H4, quelle nella colonna centrale mostrano la posizione degli istoni acetilati rispetto alle cellule duttali e le immagini sulla destra presentano dotti, acini, nuclei e H4ac insieme.

## Conclusioni

L'obiettivo della presente ricerca era quello di trovare sperimentalmente delle alterazioni epigenetiche a livello delle cellule tumorali pancreatiche, riconducibili ad una dieta ad alto contenuto di fruttosio. Per farlo abbiamo condotto due diversi esperimenti: un'immunoistochimica (IHC) e un'immunofluorescenza (IF). Per entrambe abbiamo adoperato sezioni di tessuto pancreatico murino prelevate da cavie mutanti per il gene KRAS e trattate per quattro mesi o con una bevanda ricca in fruttosio o con acqua. In particolare, come target del nostro studio abbiamo scelto l'acetilazione della proteina istonica H4, cercando di trovare differenze nella sua espressione, correlabili alla differenziata alimentazione dei due gruppi di topi.

Le immagini ottenute da entrambi gli esperimenti hanno fornito risultati concordanti e validi ai fini della nostra indagine. Abbiamo infatti individuato livelli di acetilazione istonica più marcati nei campioni derivanti da topi nutriti con fruttosio ad libitum, rispetto ai campioni controllo. A livello visivo si è potuta constatare questa differenza nella maggiore intensità esibita dalle colorazioni nucleari ottenute applicando entrambe le tecniche istologiche. Il contrasto è risultato particolarmente accentuato tra i tessuti indagati adoperando l'immunoistochimica.

Le sezioni di pancreas prelevate dai topi trattati con H<sub>2</sub>O sembrano mostrare un colore più intenso a livello delle cellule duttali nelle lesioni, rispetto a quelle acinari. Questo è vero per entrambi i metodi di indagine operati. L'eterogeneità nella colorazione potrebbe essere giustificata dalla più intensa attività trascrizionale che caratterizza le cellule tumorali in attiva proliferazione nelle lesioni, rispetto alle cellule degli acini che invece non proliferano. Questa differenza non è identificabile nei campioni HFCS, dato positivo che ci suggerisce un'apertura della cromatina più diffusa nelle cellule di questi.

Sarebbe interessante approfondire lo studio quantificando numericamente, e non solo visivamente, i livelli di acetilazione istonica osservati all'interno dei due gruppi di indagine.

## Bibliografia

- (1) Sanchez, D., & Cheung, W.L. (2015). Pathology of pancreatic tumors. *Translational cancer research*, 4, 608-615.
- (2) Klein A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(7), 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- (3) Jung, S., Bae, H., Song, W. S., & Jang, C. (2022). Dietary Fructose and Fructose-Induced Pathologies. *Annual review of nutrition*, 42, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-062220-025831>.
- (4) Ang, Bernadine & Yu, Gracia. (2017). *The Role of Fructose in Type 2 Diabetes and Other Metabolic Diseases*. Nutrition & Food Science. 8. 1-4. 10.4172/2155-9600.1000659.
- (5) Goncalves, M. D., Lu, C., Tutnauer, J., Hartman, T. E., Hwang, S. K., Murphy, C. J., Pauli, C., Morris, R., Taylor, S., Bosch, K., Yang, S., Wang, Y., Van Riper, J., Lekaye, H. C., Roper, J., Kim, Y., Chen, Q., Gross, S. S., Rhee, K. Y., Cantley, L. C., ... Yun, J. (2019). High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6433), 1345–1349. <https://doi.org/10.1126/science.aat8515>
- (6) Zhao, S., Jang, C., Liu, J., Uehara, K., Gilbert, M., Izzo, L., Zeng, X., Trefely, S., Fernandez, S., Carrer, A., Miller, K. D., Schug, Z. T., Snyder, N. W., Gade, T. P., Titchenell, P. M., Rabinowitz, J. D., & Wellen, K. E. (2020). Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*, 579(7800), 586–591. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>
- (7) Carrer, A., Trefely, S., Zhao, S., Campbell, S. L., Norgard, R. J., Schultz, K. C., Sidoli, S., Parris, J. L. D., Affronti, H. C., Sivanand, S., Egolf, S., Sela, Y., Trizzino, M., Gardini, A., Garcia, B. A., Snyder, N. W., Stanger, B. Z., &

Wellen, K. E. (2019). Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer discovery*, 9(3), 416–435. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0567>

- (8)** Ariston Gabriel, A. N., Jiao, Q., Yvette, U., Yang, X., Al-Ameri, S. A., Du, L., Wang, Y. S., & Wang, C. (2020). Differences between KC and KPC pancreatic ductal adenocarcinoma mice models, in terms of their modeling biology and their clinical relevance. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 20(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2019.11.006>