

INDICE

RIASSUNTO	2
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Anatomia e struttura del rene	3
1.2 Il carcinoma a cellule renali.....	6
1.3 Il carcinoma renale a cellule chiare	8
1.3.1 Epidemiologia ed eziologia	8
1.3.2 Diagnosi.....	8
1.3.3 Esame macroscopico e microscopico	10
1.3.4 Fattori prognostici.....	12
1.3.5 Terapia e trattamenti	16
1.4 Paraoxonasi-2.....	18
1.4.1 Funzioni della PON2.....	19
1.4.2 Ruolo della PON2 nell'infiammazione e nel cancro	19
1.5 Silenziamento genico: shRNA.....	21
1.6 Scopo.....	24
2. MATERIALI E METODI.....	25
2.1 Colture cellulari	25
2.2 Silenziamento genico della PON2 tramite shRNA.....	26
2.3 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione	27
2.4 Real-time PCR.....	27
2.5 Western Blot.....	30
2.6 Saggio di proliferazione cellulare: Trypan Blue	32
2.7 Saggio di vitalità cellulare: MTT.....	33
2.7.1 MTT e chemioterapici.....	33
2.8 Saggio di migrazione cellulare: Wound Healing	35
2.9 Analisi statistiche	35
3. RISULTATI	36
3.1 Il silenziamento della PON2 nelle linee cellulari 786-O e Caki-1.....	36
3.2 Impatto del silenziamento genico sulla proliferazione e vitalità cellulare.....	38
3.3 Effetto del silenziamento della PON2 sulla chemiosensibilità	40
3.4 Conseguenze del silenziamento genico sulla migrazione.....	44
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	46
5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	49

RIASSUNTO

Questo lavoro di tesi si concentra su una delle dieci neoplasie maligne più diffuse al mondo, ovvero il carcinoma renale. In particolare, il lavoro sperimentale si è focalizzato sul carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC), poiché rappresenta il sottotipo più comune e aggressivo tra i tumori renali primitivi maligni. Tale neoplasia è caratterizzata solitamente da una diagnosi tardiva, che si traduce in un'alta letalità poiché il tumore viene scoperto quando si trova già in uno stato molto avanzato. La gestione e il trattamento della neoplasia sono ulteriormente complicate dal fatto che il carcinoma renale a cellule chiare risulta essere un tumore intrinsecamente resistente a chemio e radioterapia, e pertanto le opzioni terapeutiche utilizzabili sono molto limitate. Alla luce di queste considerazioni risulta di fondamentale importanza l'individuazione di nuovi biomarcatori che possano essere utilizzati a scopo diagnostico e prognostico, nonché come target terapeutici.

In questo studio la nostra attenzione si è focalizzata su un enzima, la paraoxonasi-2 (PON2), il quale è risultato essere overespresso in diversi tumori maligni tra cui anche il carcinoma renale a cellule chiare.

Al fine di valutare il contributo di tale enzima nei confronti del metabolismo della cellula tumorale, linee cellulari modello di carcinoma renale a cellule chiare sono state trasfettate con plasmidi codificanti per shRNA diretti contro regioni specifiche dell'mRNA della PON2.

A seguito del silenziamento genico dell'enzima, è stato valutato l'impatto di tale downregolazione sulla capacità proliferativa, sulla vitalità, sulla capacità di migrazione e sulla chemiosensibilità delle cellule di carcinoma renale a cellule chiare.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la downregolazione sia in grado di ridurre sia la capacità proliferativa delle cellule che la loro migrazione. Inoltre, il silenziamento genico dell'enzima è stato in grado di sensibilizzare le cellule di carcinoma renale a cellule chiare all'azione dei chemioterapici cisplatino e 5-fluorouracile, permettendo quindi di candidare l'enzima ad essere un potenziale target terapeutico per il trattamento di questa neoplasia.

1. INTRODUZIONE

1.1 Anatomia e struttura del rene

I reni sono due organi parenchimatosi e retroperitoneali (a contatto con la parete addominale posteriore), compresi tra le vertebre T12 e L3 e contenuti nella loggia renale. Ogni rene pesa all'incirca 150 g e misura 11 cm di lunghezza ed è mantenuto nella propria posizione grazie alle fibre collagene che lo tengono sospeso. Medialmente presenta un'area concava dove risiede l'ilo renale (in cui entrano ed escono i vasi sanguigni) mentre la superficie laterale risulta essere più convessa. Il rene è rivestito da tre strati di tessuto connettivo: una fascia renale fibrosa, la capsula di grasso perirenale e la capsula fibrosa.

Per quanto riguarda il parenchima renale, possiamo distinguere due zone: una più esterna, denominata “corticale” e un'altra più interna, chiamata “midollare”, adiacente al seno renale comprendente vasi e nervi e tessuto adiposo. Il seno renale è circondato dalle cosiddette colonne renali, che rappresentano un prolungamento della corticale e permettono anche la separazione della midollare in 6-10 piramidi renali, che hanno la base rivolta verso la corticale e la punta smussata (papilla renale) che converge verso il seno. Le papille, proseguendo verso l'interno, si immettono nei calici minori; due/tre di questi ultimi costituiranno poi il calice maggiore, che confluisce verso il seno renale fino a formare la pelvi, ovvero il bacinetto di raccolta dell'urina, che viene trasportata fino alla vescica dall'uretere. L'unità morfo-funzionale del rene è il nefrone, che consta di due parti: il corpuscolo renale, che filtra il plasma sanguigno trattenendo le proteine e gli elementi corpuscolati del sangue, e il tubulo renale, che converte il filtrato in urina. Il corpuscolo renale a sua volta comprende:

- La **capsula glomerulare** (capsula di Bowman), che presenta uno strato parietale esterno, costituito da un epitelio squamoso semplice, e uno strato viscerale interno composto da podociti, che circondano i capillari e con i loro processi citoplasmatici formano le fessure di filtrazione. Tra i due strati vi è lo spazio capsulare in cui si raccoglie ciò che viene filtrato.

- Il **glomerulo**, che rappresenta la componente vascolare e presenta due poli opposti, uno vascolare e uno urinario. A livello del polo vascolare troviamo l'arteriola afferente, che trasporta il sangue dalla capsula al glomerulo, e l'arteriola efferente, che svolge l'azione opposta. Dal polo urinario si estende invece il sistema tubulare.

Il tubulo renale ha inizio nella capsula glomerulare e termina all'apice di una piramide midollare. Consta di quattro tratti, ognuno con un ruolo specifico nella produzione di urina: **tubulo contorto prossimale**, **ansa di Henle**, **tubulo contorto distale** e **dotto collettore**. Essi sono deputati al riassorbimento e alla secrezione tubulare. (Saladin et al.,2017)

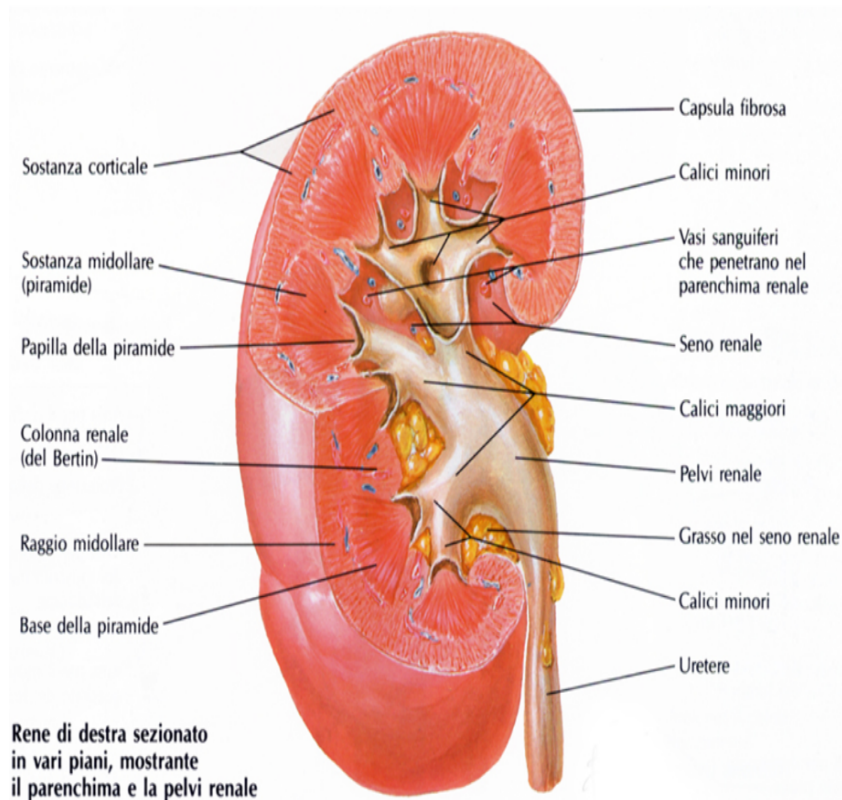


Figura 1. Disegno che mostra le principali caratteristiche anatomiche del rene.

[\(https://www.bmscience.net/blog/2018/01/10/anatomia-macroscopica-microscopica-del-rene/\)](https://www.bmscience.net/blog/2018/01/10/anatomia-macroscopica-microscopica-del-rene/)

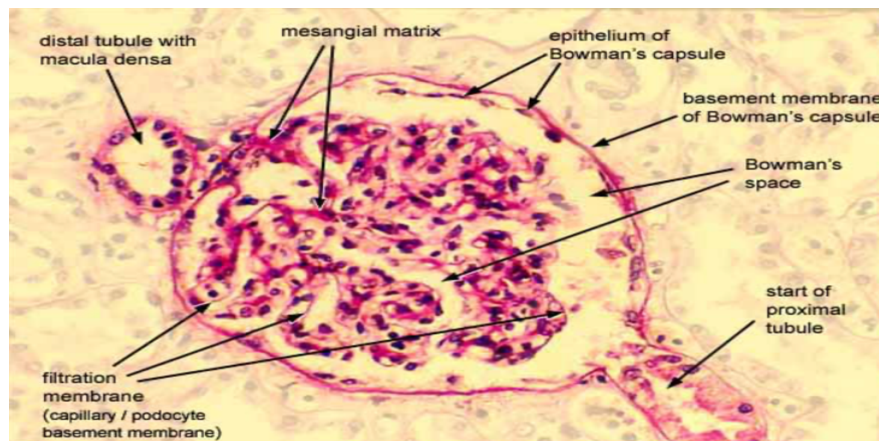


Figura 2. Fotografia al microscopio ottico di una sezione di rene in cui è possibile osservare i costituenti del glomerulo e l'inizio del tubulo prossimale.

[\(https://histology.siu.edu/crr/RN047b.htm\)](https://histology.siu.edu/crr/RN047b.htm)

1.2 Il carcinoma a cellule renali

Il carcinoma a cellule renali (RCC) è una neoplasia maligna che colpisce il 2%-5% della popolazione adulta e risulta essere il tumore più letale tra quelli che colpiscono l'apparato genito-urinario.

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-rene#:~:text=Per%20quanto%20riguarda%20il%20tumore,uomini%20e%204.80%20nelle%20donne>)

Oltre a presentare il maggior tasso di mortalità, è anche responsabile dell'80%-85% circa dei tumori renali primitivi maligni. Esso ha origine dalla zona corticale del rene, nello specifico dalle cellule epiteliali del tubulo renale, e si distingue dagli altri carcinomi che originano in aree diverse dell'organo e sono meno diffusi, come i carcinomi a cellule transizionali, che hanno una localizzazione a livello della pelvi renale e rappresentano l'8% circa dei tumori renali primitivi maligni; altri tumori epiteliali parenchimali, quali gli oncocitomi, i tumori dei dotti collettori, gli angioliomi e i sarcomi renali, sono ancora meno comuni. Ugualmente rari, anche se molto aggressivi, sono ad esempio i carcinomi renali midollari.

(Garfield, LaGrange, 2023)

Dalle indagini statistiche svolte dall'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM) emerge che il tumore renale colpisce perlopiù il genere maschile, con una frequenza quasi doppia rispetto a quello femminile. Nel 2022 sono stati riportati 12600 nuovi casi all'anno, di cui 7800 negli uomini e 4800 nelle donne. La probabilità di svilupparlo cresce all'aumentare dell'età, con un picco attorno ai 70 anni.

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-rene#:~:text=Per%20quanto%20riguarda%20il%20tumore,uomini%20e%204.80%20nelle%20donne>)

Ad oggi non è possibile prevenirlo, ma è possibile limitare la possibilità che esso si sviluppi; sono noti infatti dei fattori di rischio quali fumo, obesità, ipertensione, sindromi eredo-familiari (ad esempio la sindrome di Von Hippel-Lindau), insufficienza renale cronica, calcoli renali.

Si tratta di un carcinoma asintomatico, perlomeno fino alla fase tardiva, quando ormai il tumore è già grande e probabilmente metastatico. Nelle fasi precoci, quando la massa è piccola (meno di 3 cm), può essere rilevato incidentalmente durante degli esami radiologici di routine. Man mano che aumenta di dimensioni, iniziano a comparire i primi sintomi, quali ematuria, perdita di peso, dolore nella zona lombare e affaticamento. (Garfield, LaGrange, 2023)

In circa il 60% dei casi la diagnosi è pertanto incidentale. Qualora si avesse un sospetto, si inizia un percorso che prevede innanzitutto l'esecuzione di esami laboratoristici, quali: creatinina sierica, emoglobina, formula leucocitaria, lattato deidrogenasi, proteina C reattiva. In seguito si effettua un'ecografia, grazie alla quale è possibile distinguere una massa solida da una cisti. La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) ci forniscono invece delle informazioni sulla natura della massa e sulla sua estensione e mettono in evidenza la presenza di un interessamento dei linfonodi e di eventuali metastasi. Essenziale risulta inoltre essere una biopsia del tumore, per poter eseguire un'analisi istopatologica di approfondimento e poter caratterizzare il carcinoma nelle sue varianti.

Esistono diversi sottotipi di RCC, con istologia, caratteristiche genetiche e risposta alla terapia differenti; i più frequenti sono:

- Il **carcinoma a cellule chiare**, che rappresenta l'80% circa dei casi ed è il sottotipo più aggressivo.
- Il **carcinoma renale papillare** (15% dei casi), che rappresenta il secondo sottotipo più frequente di RCC. Si presenta nella maggior parte dei casi in forma sporadica, ma mostra due diverse forme ereditarie, ovvero il tipo 1 e il tipo 2, associate a mutazioni rispettivamente del gene MET e del gene che codifica per la fumarato idratasi.
- Il **carcinoma cromofobo** (5% dei casi), che rappresenta il terzo sottotipo più comune e presenta due varianti, cioè classica ed eosinofila.

(Schiavoni et al., 2023)

1.3 Il carcinoma renale a cellule chiare

1.3.1 Epidemiologia ed eziologia

Il carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC) origina dal tubulo contorto prossimale ed è il più frequente (80-90%) tra i tumori maligni del rene. Prevede una prognosi peggiore rispetto al carcinoma papillare e al carcinoma cromofobo, poiché possiede una maggiore tendenza allo sviluppo di metastasi (pari al 15%) rispetto ai sottotipi papillare e cromofobo (rispettivamente 3% e 4%). La diffusione delle cellule tumorali avviene perlopiù attraverso i vasi sanguigni e i siti maggiormente interessati dalle metastasi sono il cervello, il polmone, le ossa, i linfonodi, il fegato e le ghiandole surrenali (Hashmi et al., 2023)

La sopravvivenza a cinque anni dei pazienti che hanno la massa confinata all'organo è del 70%, mentre quella di coloro che presentano metastasi a distanza è solo del 13 % (Kase et al., 2023)

L'obesità, l'ipertensione e il fumo rappresentano i maggiori fattori di rischio modificabili. La maggior parte delle volte si tratta di casi sporadici, mentre il 2%-3% dei casi sono associati ad alterazioni genetiche, tra cui quelle che vedono coinvolto il gene Von Hippel-Lindau (gene VHL).

Questo tipo di cancro colpisce soprattutto il genere maschile, in cui l'incidenza è circa doppia rispetto a quello femminile e l'età media al momento della diagnosi è pari a 64 anni. (Hashmi et al., 2023)

1.3.2 Diagnosi

Il ccRCC si presenta già ad uno stadio avanzato al momento della diagnosi, che di frequente avviene nel corso di esami di routine; solo il 30% dei pazienti hanno dei sintomi che possono destare sospetto; tra questi il più comune è rappresentato dal dolore al fianco (dovuto all'ostruzione del sistema urogenitale, all'invasione dei visceri circostanti o alla presenza di una massa retroperitoneale); l'ematuria e la presenza di una massa palpabile a livello retroperitoneale si riscontrano meno frequentemente. Le condizioni paraneoplastiche che si osservano più frequentemente sono l'ipertensione e l'anemia; se viene coinvolto l'osso si può

riscontrare un'ipercalcemia indotta dal paratormone; in risposta all'ipossia si può avere la produzione di eritropoietina da parte del parenchima renale e ciò può portare al manifestarsi di policitemia.

Nel momento in cui si hanno dei sospetti o se il tumore viene scoperto casualmente, l'iter diagnostico prevede una valutazione laboratoristica, una radiologica e una bioptica, al fine di effettuare una stadiazione corretta. A livello laboratoristico si esegue un esame emocromocitometrico e si valutano la creatinina, la proteina C reattiva, la lattico deidrogenasi e il calcio. L'ecografia ci aiuta nella diagnosi presuntiva, permettendo l'evidenziazione di una massa renale. L'imaging ci consente di caratterizzare la massa e di valutare la presenza di metastasi addominali, l'invasione dei grandi vasi e la diffusione del tumore a livello locale. Per effettuare una valutazione completa delle eventuali metastasi si rende necessario eseguire una TC del torace, dell'addome e della pelvi, una RM dell'encefalo e un esame delle ossa. La biopsia renale consiste invece nel prelievo di frustuli di tessuto che vengono sottoposti ad analisi morfologica ed immunoistochimica (IHC) allo scopo di valutare l'estensione della lesione e la sua aggressività. (Hashmi et al., 2023)

In particolare, per quanto riguarda l'IHC, la neoplasia risulta positiva all'anidrasi carbonica IX e negativa per il marcatore CK7.

1.3.3 Esame macroscopico e microscopico

Macroscopicamente il carcinoma renale a cellule chiare si presenta come una massa multilobata altamente vascolarizzata, caratterizzata dalla presenza di aree gialle dovute all'accumulo di lipidi. Ha solitamente un aspetto variegato, che dipende dalla presenza di calcificazioni, cisti, emorragie e necrosi. Di solito il ccRCC presenta inoltre una capsula fibrosa o una pseudocapsula, ma in caso di infiltrazione dei tessuti circostanti è possibile osservare dei margini irregolari. L'esame microscopico evidenzia dei nidi cellulari circondati da un'estesa rete capillare. Le cellule tumorali, atipiche e di grandi dimensioni, presentano un citoplasma eosinofilo granulare ricco di glicogeno, a cui si deve l'aspetto chiaro. (Hashmi et al., 2023)

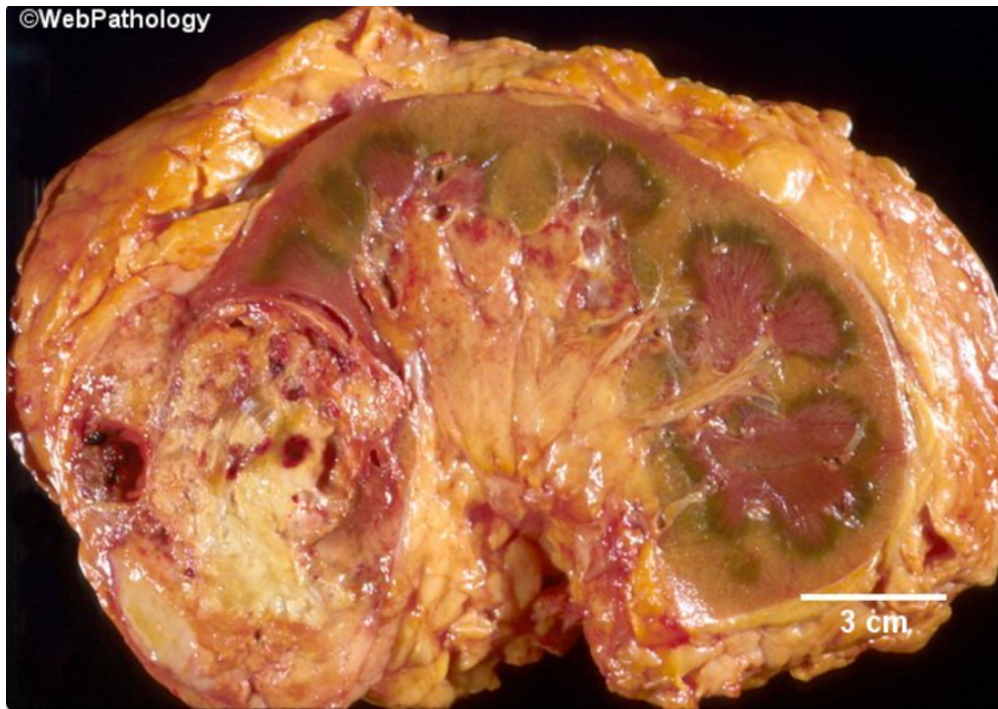


Figura 3. *Visione macroscopica di un rene che presenta un carcinoma renale a cellule chiare. Sono visibili diverse aree emorragiche e prevalgono le zone giallastre dovute all'accumulo di lipidi.*

(<https://www.webpathology.com/image.asp?n=10&Case=66>)

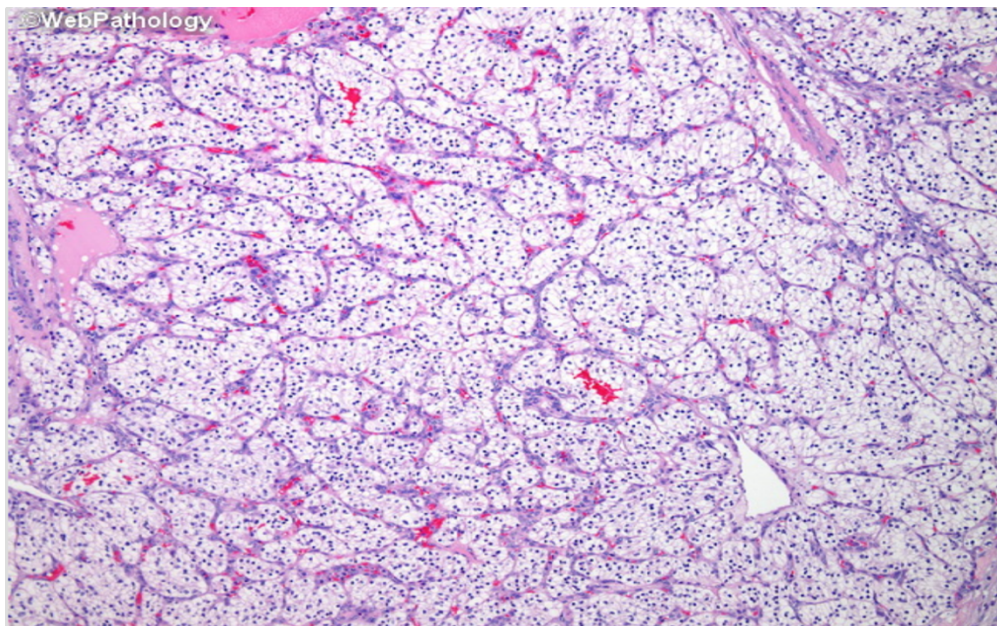


Figura 4. *Fotografia al microscopio ottico di un ccRCC. Si osserva la presenza di una complessa rete capillare che circonda cellule con citoplasma eosinofilo e granulare di aspetto chiaro.*

(<https://www.webpathology.com/image.asp?case=66&n=13>)

1.3.4 Fattori prognostici

I fattori prognostici ci informano riguardo gli esiti dei trattamenti medici e/o chirurgici. Possiamo distinguerli in anatomici, istologici, clinici e molecolari. Per quanto riguarda i fattori prognostici anatomici, si usano i sistemi di stadiazione. Secondo le linee guida dettate dall'AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica) nel 2020, il sistema di stadiazione più utilizzato per il carcinoma renale è il cosiddetto TNM (Tabella 1), proposto dalla International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer e utilizzato a partire dal 1977 per numerosi tumori solidi. Nello specifico T si riferisce alle dimensioni del tumore, N allo stato dei linfonodi adiacenti e M alla presenza di metastasi.

(https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/04/2020_LG_AIOM_Rene.pdf)

Tabella 1. Sistema TNM

T = tumore primario	
Tx	Tumore primario non valutabile
T0	Nessuna evidenza di tumore primario
T1	Confinato al rene, ≤ 7 cm T1a: ≤ 4 cm T1b: tra 4 e 7 cm
T2	Confinato al rene, > 7 cm T2a: > 7 cm ma ≤ 10 cm T2b: > 10 cm
T3	Infiltra le vene principali o i tessuti perirenali ma non attraversa la fascia del Gerota e non invade il surrene ipsilaterale T3a: si estende nella vena renale o invade il tessuto adiposo T3b: si estende nella vena cava sotto il diaframma T3c: si estende nella vena cava sopra il diaframma o invade la sua parete
T4	Va oltre la fascia del Gerota
N = linfonodi regionali	
Nx	Non possono essere individuati
N0	No metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in un unico linfonodo regionale
N2	Metastasi in più linfonodi regionali
M = metastasi a distanza	
Mx	Non valutabili
M0	Assenza di metastasi
M1	Metastasi a distanza

In base a ciò, è possibile identificare quattro stadi: stadio I (T1;N0;M0), stadio II (T2;N0;M0), stadio III (T3;N0;M0 oppure T1,T2,T3;N1;M0), stadio IV (T4; ogni N; M0 oppure ogni T;N2;M0 oppure ogni T; ogni N;M1).

Per quanto riguarda i fattori istopatologici, tra quelli che influenzano la prognosi dei pazienti c'è innanzitutto il grado. Il ccRCC, in particolare, può essere classificato secondo il grado Fuhrman, che prende in considerazione la forma e le

dimensioni del nucleo e la prominente nucleolare (Tabella 2); la stadiazione secondo WHO/ISUP (World Health Organization/International Society of Urological Pathology) si basa invece sulla visibilità del nucleolo al microscopio e sulla presenza di pleomorfismo nucleare, cellule giganti e differenziamento sarcomatoide/rabdoide (Tabella 3).

Tabella 2. Grading secondo Furhman

Grado	Nucleolo	Forma del nucleo	Dimensioni del nucleo
1	Poco evidente o assente	Piccolo, rotondo, uniforme, irregolare	10 µm
2	Visibile a un ingrandimento 400X	Contorno irregolare a 400X, dimensioni variabili	15 µm
3	Prominente/largo anche a 100X	Contorno irregolare, largo, ipercromatico, grande variabilità di forma e dimensioni	20 µm
4	Cellule larghe, pleomorfe con cellule giganti bizzarre e ammassi di cromatina, margini estremamente irregolari		

https://cdn.amegroups.cn/static/magazine_modules/imgRender/dist/index.html?imgSource=https://cdn.amegroups.cn/journals/amepc/files/journals/3/articles/54713/public/54713-PB9-4855-R1.png

Tabella 3. Sistema di grading WHO/ISUP

Grado 1	Nucleoli assenti o poco evidenti e basofili a un ingrandimento di 400X
Grado 2	Nucleoli evidenti ed eosinofili a 400X e visibili ma non prominenti a 100X
Grado 3	Nucleoli evidenti ed eosinofili a 100X
Grado 4	Pleomorfismo nucleare estremo e/o differenziamento sarcomatoide e/o rabdoide e/o cellule giganti

https://cdn.amegroups.cn/static/magazine_modules/imgRender/dist/index.html?imgSource=https://cdn.amegroups.cn/journals/amepc/files/journals/3/articles/54713/public/54713-PB8-1804-R1.png

Relativamente ai fattori prognostici molecolari, ad oggi non sono inclusi nei modelli prognostici che vengono utilizzati per il ccRCC. Nonostante i marcatori genetici o di altro tipo non vengano utilizzati di routine per predire la prognosi dei pazienti affetti da questo tipo di tumore, sono state descritte diverse alterazioni genetiche che potrebbero essere utilizzate non solo a fini prognostici ma anche per consentire una diagnosi precoce e per sviluppare delle terapie mirate.

Le anomalie cromosomiche che si riscontrano nel ccRCC riguardano soprattutto il braccio corto del cromosoma 3 (3p) e sono associate ad un'aumentata aggressività del tumore. (Sükösd et al., 2003)

Gli eventi mutazionali che si riscontrano più di frequente riguardano i geni PBRM1, BAP1 e SETD2 (rispettivamente nel 40%, 14% e 3% dei casi); i primi due sono associati ad una prognosi sfavorevole. Nella maggior parte dei pazienti con ccRCC sporadico si osserva l'inattivazione del gene oncosoppressore VHL (Kaelin et al., 2003), che comporta l'attivazione dei fattori Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α e HIF-2 α , i quali, a loro volta, portano ad un aumento dell'espressione di geni pro-angiogenici, come quello che codifica per il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). L'aumento della concentrazione del VEGF induce l'angiogenesi del tumore e di conseguenza si ha un aumento delle sue dimensioni, che incide sulla stadiazione. Molecole che si trovano a valle nel pathway del VEGF, come la fosfo-chinasi regolata da segnali extracellulari (pERK), potrebbero fungere da biomarcatori da utilizzare in ambito terapeutico, anche se sono necessari ulteriori studi confermativi.

Altri rilevanti fattori prognostici molecolari includono Ki-67, p53 e PTEN:

- ❖ Ki-67: è un indicatore di proliferazione cellulare la cui elevata espressione è legata ad un fenotipo più aggressivo e quindi ad elevati tassi di recidiva e ad una sopravvivenza ridotta.
- ❖ p53: è considerato un predittore indipendente della sopravvivenza libera da metastasi nei pazienti con ccRCC localizzato.
- ❖ PTEN: la perdita di questo oncosoppressore si verifica durante la carcinogenesi ed è associata ad una prognosi peggiore.

In aggiunta, sono stati analizzati diversi marcatori dopo l'introduzione dell'immunoterapia, al fine di valutare la risposta agli inibitori del checkpoint immunitario utilizzati da soli o in combinazione con gli inibitori dell'antigene 4 dei linfociti T citotossici, della tirosina chinasi o dell'mTOR.

(Schiavoni et al., 2023; Klatte et al., 2018)

1.3.5 Terapia e trattamenti

Per il ccRCC localizzato il gold standard è rappresentato dalla chirurgia. In particolare, le tecniche maggiormente utilizzate sono la nefrectomia radicale e la chirurgia “nephron sparing”, cioè con risparmio d'organo, che è raccomandata nei pazienti con tumore T1 o T2, perché permette di preservare il più possibile il tessuto sano circostante. Nei soggetti in cui il tumore ha iniziato a metastatizzare è invece indicata la nefrectomia citoriduttiva (CN), che può agire in modo sinergico con l'immunoterapia attraverso la rimozione di citochine e di proteine che inibiscono la risposta immunitaria. Nei soggetti anziani che si trovano in cattive condizioni fisiche il metodo più promettente consiste nell'ablazione del tumore perché è meno invasivo. Il ccRCC metastatico viene invece trattato con interleuchina 2 (IL-2) o interferone- α (IFN- α), anche se il tasso di risposta è compreso tra il 15% e il 25%.

La mancanza di sensibilità ai chemioterapici e alla radioterapia ha spinto i ricercatori a mettere a punto nuove strategie terapeutiche, tra cui quelle che prevedono l'utilizzo di farmaci che inibiscono l'angiogenesi, come Sunitinib e Pazopanib. Tra gli inibitori delle tirosin-chinasi che hanno mostrato particolare efficacia ci sono Cabozantinib e Lenvatinib; quest'ultimo soprattutto se impiegato in combinazione con Everolimus. Bevacizumab è invece un anticorpo monoclonale diretto verso il VEGF, efficace in particolare se associato con l'IFN- α ; nei pazienti che recidivano dopo precedenti trattamenti sistemici è stato recentemente proposto l'utilizzo del Tivozanib, che inibisce il recettore del VEGF. Un ulteriore target terapeutico è rappresentato da HIF-2 α . Sono stati identificati degli inibitori dell'HIF-2 α che interferiscono con il suo legame con l'HIF-1 β , come PT2385 e Belzutifan (MK-6482). Dal momento che in alcuni ccRCC sono

presenti mutazioni dei geni che codificano per i componenti del pathway mTOR, questi ultimi rappresentano dei validi bersagli terapeutici. L'mTOR è una proteinkinasi che fosforila la serina e la treonina e forma due complessi: mTORC1 e mTORC2 (Saxton et al., 2017). Farmaci come Everolimus e Temsirolimus, che inibiscono mTORC1, sono già impiegati nel trattamento del carcinoma renale avanzato, poiché diminuiscono l'espressione di proteine coinvolte nella sopravvivenza, nella proliferazione cellulare e nell'angiogenesi.

Un'altra strategia terapeutica per il trattamento del ccRCC è rappresentata dall'immunoterapia, che mira ad aumentare la risposta immunitaria del paziente contro le cellule tumorali. In particolare, farmaci come Pembrolizumab e Nivolumab, che agiscono sui checkpoint immunitari, hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza nei pazienti con ccRCC metastatico.

Negli ultimi quindici anni le terapie mirate verso il pathway del VEGF sono state quelle più utilizzate per trattare il ccRCC, nonostante la resistenza a questi farmaci sia un fenomeno comune. Si sta pertanto valutando la combinazione tra gli inibitori dei checkpoint immunitario e gli inibitori del VEGF, quale nuova frontiera nella lotta contro questa malattia.

Sebbene siano stati fatti dei progressi nello sviluppo di nuove terapie mirate per il carcinoma renale a cellule chiare, il tasso di sopravvivenza a 5 anni rimane basso. È quindi necessario identificare dei nuovi marcatori molecolari da utilizzare non solo a scopo diagnostico e prognostico ma anche per la messa a punto di trattamenti mirati efficaci.

(Schiavoni et al., 2023)

1.4 Paraoxonasi-2

La famiglia genica delle paraoxonasi (PON) consiste in un cluster di tre geni distinti e strutturalmente simili (PON1, PON2, PON3), disposti in tandem sul braccio lungo del cromosoma 7 umano. Essi contengono nove esoni che hanno approssimativamente la stessa lunghezza e, nell'ambito di una stessa specie di mammiferi, presentano il 70% di omologia a livello di sequenza nucleotidica e le proteine omonime che da essi derivano condividono il 60% della loro sequenza amminoacidica. Ogni gene/proteina mostra invece l'80-90% di omologia tra una specie e l'altra. Le analisi filogenetiche hanno individuato nel gene PON2 il membro evolutivamente più antico della famiglia.

Per quanto riguarda l'espressione e la localizzazione, presentano notevoli differenze. La PON1 e la PON3 sono infatti espresse principalmente nel fegato e, una volta sintetizzate, sono rilasciate nel circolo sanguigno in associazione con le lipoproteine ad alta densità (HDL) e prevengono l'ossidazione di quelle a bassa densità (LDL). La PON2 è invece maggiormente diffusa; la troviamo ad esempio nel cuore, nel polmone, nel fegato, nel rene, nella placenta, nella milza, nello stomaco, nelle cellule endoteliali. A differenza delle altre due non è rilevabile a livello sierico. Grazie alla sua lunga coda idrofobica a livello del dominio N-terminale, essa può comportarsi come una proteina transmembrana di tipo II, in grado di occupare l'intero spessore del doppio strato fosfolipidico. La possiamo ritrovare nella membrana plasmatica, nell'involucro nucleare, nel reticolo endoplasmatico e nelle membrane dei mitocondri. Data la sua localizzazione intracellulare concorre alla protezione della cellula dal danno causato dallo stress ossidativo.

Dal punto di vista dell'attività enzimatica, la PON1 presenta attività paraoxonasica (idrolizza metaboliti tossici presenti in numerosi insetticidi e in alcuni gas nervini), arilesterasica (idrolizza gli esteri aromatici) e lattonasica (idrolizza diversi lattoni aromatici e alifatici e catalizza anche la reazione inversa di lattonizzazione); la PON2 e la PON3 hanno invece una scarsa o nulla attività paraoxonasica e arilesterasica, mentre sono anch'esse in grado di idrolizzare lattoni come la PON1. (Campagna et al., 2024; Hegele, 1999)

1.4.1 Funzioni della PON2

La PON2 espressa a livello endoteliale è in gran parte legata al reticolo endoplasmatico dove, grazie alla sua capacità antiossidante, contribuisce a limitare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevenendo così l'inizio e la progressione dell'aterosclerosi, che è caratterizzata da un severo stress a livello del reticolo endoplasmatico e dall'attivazione dell'Unfolded Protein Response (UPR) che, a sua volta, può portare all'attivazione della caspasi-3, essenziale nell'indurre l'apoptosi. Anche la PON2 localizzata sulla membrana plasmatica ha un effetto anti-aterogeno. L'esposizione dell'estremità C-terminale verso il compartimento extracellulare permette di mantenere l'attività enzimatica e di inibire la perossidazione lipidica causata dallo stress ossidativo. La traslocazione della PON2 dalla membrana del reticolo a quella plasmatica è stimolata da segnali associati ad un aumento del calcio intracellulare, in risposta allo stress ossidativo a livello extracellulare. Anche la PON2 che si trova a livello mitocondriale svolge una funzione antiossidante; essa infatti è legata alla membrana interna dell'organulo e interagisce con il coenzima Q10, contribuendo a ridurre il rilascio di anione superossido dai complessi I e III della catena di trasporto degli elettroni. (Campagna et al., 2024)

1.4.2 Ruolo della PON2 nell'infiammazione e nel cancro

Le specie reattive dell'ossigeno sono coinvolte nell'eziopatologia di numerose patologie, sia neoplastiche che non. L'esposizione prolungata ai radicali liberi può determinare un'infiammazione cronica che a sua volta può promuovere lo sviluppo di malattie croniche cardiovascolari, neurologiche e polmonari, così come del diabete, che è associato ad un aumentato rischio di sviluppare un tumore.

In condizioni fisiologiche gli antiossidanti riescono a bilanciare i pro-ossidanti; tuttavia, in presenza di stress ossidativo, i pro-ossidanti prevalgono e ciò può determinare l'insorgere di patologie infiammatorie e neoplastiche.

La carcinogenesi indotta dall'infiammazione è associata ad una serie di tratti molecolari e fenotipici che promuovono l'insorgenza, la progressione e la disseminazione del tumore, tra i quali l'instabilità genomica, eventi epigenetici che

alterano l'espressione genica, un aumento nella proliferazione cellulare, la resistenza all'apoptosi, la formazione di nuovi vasi e la resistenza alla chemio e alla radioterapia.

Studi precedenti suggeriscono che l'enzima PON2 abbia un ruolo importante nel ridurre la produzione di ROS all'interno delle cellule e nel limitare i danni indotti dallo stress ossidativo nei vari compartimenti cellulari, inclusi i mitocondri, il reticolo endoplasmatico e la membrana plasmatica. Dal momento che lo stress ossidativo associato con una disfunzione mitocondriale è implicato nello sviluppo di numerose malattie derivanti da condizioni infiammatorie come l'aterosclerosi e il cancro, è immaginabile che gli effetti antinfiammatori della PON2 nei mitocondri e negli altri organelli possono influenzare in modo positivo l'insorgenza e la progressione di queste patologie. (Witte et al., 2012)

La capacità dell'enzima di promuovere la carcinogenesi deriva dal fatto che esso è in grado di smorzare gli effetti dannosi di uno squilibrio tra forze pro-ossidanti e antiossidanti, permettendo in questo modo alle cellule tumorali di sopravvivere, proliferare e invadere i tessuti circostanti. Rilevanti sono risultate delle ricerche sull'espressione della PON2 nei tumori solidi attraverso l'analisi del microarray di cDNA, che hanno messo in evidenza un aumento dell'espressione dell'enzima nel carcinoma epatocellulare, nell'adenocarcinoma pancreatico e nelle neoplasie renali, della vescica, della prostata, dei testicoli e dell'endometrio. Studi successivi hanno dimostrato la presenza di un'overespressione della PON2 anche nei tumori polmonari e del timo. Sono stati inoltre osservati livelli enzimatici significativamente elevati nella leucemia linfoblastica acuta, nella leucemia mieloide cronica e nel linfoma non-Hodgkin. Secondo alcuni studiosi, l'aumentata espressione della PON2 rappresenterebbe una strategia delle cellule tumorali per fronteggiare gli effetti dello stress ossidativo indotto dai farmaci chemioterapici. (Campagna et al., 2024)

1.5 Silenziamento genico: shRNA

La RNA interference (RNAi) è un meccanismo molto utilizzato per ottenere il silenziamento dell'espressione genica. Questo processo prevede il coinvolgimento di molecole di RNA a doppio filamento, microRNA (miRNA) e un silenziatore tra short interfering RNA (siRNA) o short hairpin RNA (shRNA).

Il primo consiste in un doppio filamento di RNA, un antisense e uno senso, costituito da 19 - 25 paia di basi circa con l'estremità 3' sporgente di due nucleotidi (Figura 5A). Tale complesso induce il silenziamento del gene andandosi a legare in maniera complementare all'mRNA bersaglio provocandone la degradazione. Il siRNA viene trasfettato nelle cellule tramite reagenti di trasfezione a base lipidica o polimerica, dall'elettroporazione o attraverso modifiche chimiche ai filamenti dell'RNA per migliorare l'assorbimento.

(https://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference;

<https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/sirna-applications>)

In questo lavoro di ricerca è stato utilizzato invece il secondo modello di silenziatore, ovvero **shRNA**. Si tratta di sequenze progettate a partire dal precursore microRNA, codificate da DNA vettori esogeni che possono essere introdotti nelle cellule tramite la trasduzione virale o la trasfezione plasmidica. Abbiamo due categorie di shRNA: simple stem loop e microRNA- adapted shRNA.

- ◆ I primi, di nostro interesse, vengono riconosciuti e trascritti, una volta entrati nella cellula, dalla RNA Polimerasi III (Pol III). I simple stem loop (Figura 5C) si presentano sottoforma di un unico filamento lungo circa 50-70 nucleotidi e costituiscono una struttura a forcina (hairpin) dove lo stelo (mostrato in grigio) è dato da 20-29 paia di basi di RNA a doppio filamento, a differenza dell'ansa (o loop o filamento senso, in blu) che è a singolo filamento al quale si appaia in maniera complementare all'antisense (in rosso) che si presenta con una sporgenza dinucleotidica al 3' (Figura 5B). Completata la trascrizione da parte della Pol III, gli shRNA prodotti escono dal nucleo e vengono frammentati da una nucleasi *Dicer* nel citoplasma e viene incorporato nel complesso di silenziamento indotto da RNA (*RISC*)

per la separazione e rottura secondaria dell'mRNA complementare. Gli shRNA sono molto efficaci nel promuovere il silenziamento genico.

- ◆ I *microRNA-adapted shRNA* hanno una struttura a forcina come gli shRNA circondati però da micro-RNA endogeni. Essi, a differenza degli shRNA, vengono trascritti non dalla Pol III ma dalla Pol II e divisi dall'enzima *Drosha/DGCR8* nel nucleo e poi fuoriescono nel citoplasma dove subiscono l'azione dell'enzima *Dicer*. Sono anch'essi introdotti nel sistema RISC. Sono efficaci per prevenire la tossicità nei sistemi in vivo. (Figura 6)

(<https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/shrna-applications>)

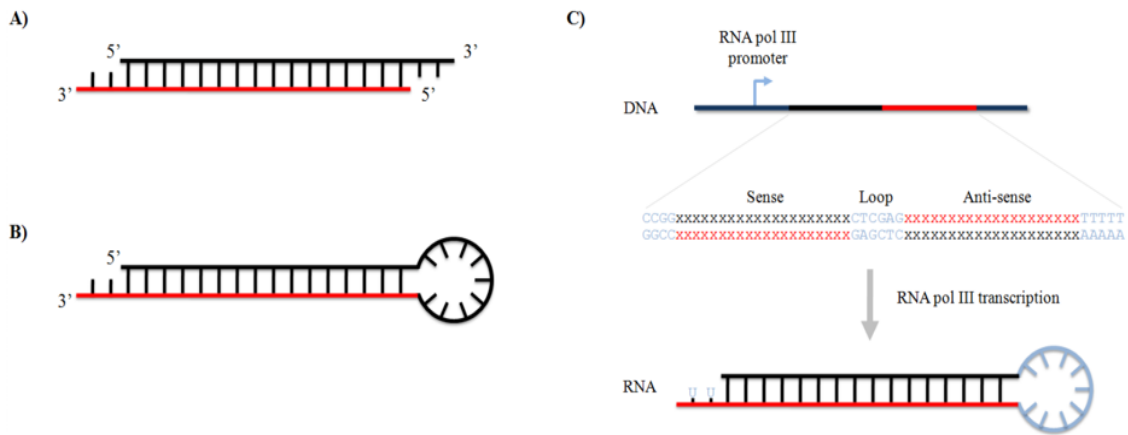


Figura 5. Struttura siRNA (5A) e shRNA (5B, 5C) dove in rosso si ha il filamento antisenso; in grigio lo stelo e in blu il filamento senso.

(<https://aws.labome.com/figure/te-197-1.png>)

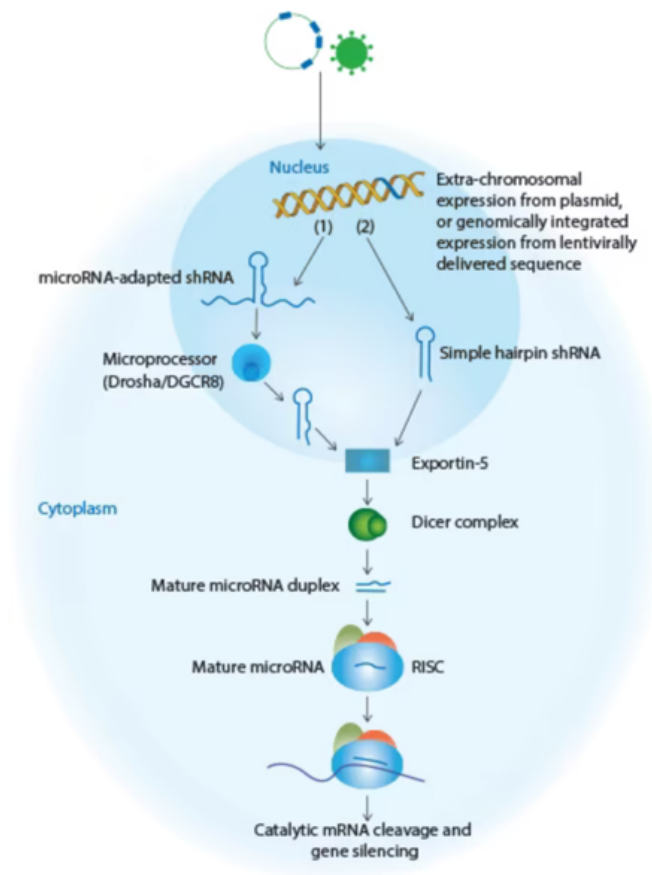


Figura 6. shRNA stem-loop e microRNA endogeno a confronto.

(<https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/shrna-applications>)

1.6 Scopo

Dal momento che il carcinoma renale a cellule chiare ha una incidenza non trascurabile e rappresenta il sottotipo più frequente tra i carcinomi renali, è importante identificare biomarcatori che possano essere utilizzati per una diagnosi precoce, per una prognosi più accurata o che possano essere utilizzati come target terapeutico. Le opzioni terapeutiche per il trattamento del carcinoma renale a cellule chiare sono limitate e questo si riflette su una prognosi negativa dei pazienti e una scarsa sopravvivenza. La gravità di tale neoplasia viene influenzata dal fatto che molto spesso si presenta già in uno stadio avanzato poiché risulta difficile diagnosticarlo in uno stadio iniziale in quanto generalmente asintomatica. Inoltre, l'alto tasso di mortalità è il risultato anche di una grande refrattarietà al trattamento chemioterapico, che si somma alla tendenza a metastatizzare precocemente.

Da qui nasce la necessità di ricerche mirate a identificare nuove molecole bersaglio che possano rappresentare il target delle terapie affinché quest'ultime diventino più efficaci e più selettive possibile.

In particolare, in questo studio, si è focalizzata l'attenzione sulla paraoxonasi-2 (PON2), un enzima intracellulare di membrana espresso in maniera ubiquitaria nei tessuti umani, che mostra una overespressione in vari tumori maligni tra cui il carcinoma renale a cellule chiare. Quindi lo scopo e l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di generare linee cellulari di carcinoma a cellule chiare downregolanti l'enzima al fine di valutare l'effetto di tale silenziamento nei confronti della capacità proliferativa, invasività e risposta ai chemioterapici della cellula tumorale. Questo studio *in vitro* ha utilizzato due linee tumorali umane di carcinoma a cellule chiare: 786-O e Caki-1.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Per questo studio *in vitro* sono state utilizzate le linee cellulari umane di carcinoma renale a cellule chiare 786-O e Caki-1 ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC). Per queste colture cellulari in adesione è stato utilizzato come terreno di coltura l'High Glucose Dulbecco-Modified Eagle's Medium (DMEM High Glucose), supplementato con 10% di siero bovino fetale (FBS) e con penicillina/streptomina 1X (Euroclone, Milano). Le cellule sono state coltivate in ambiente controllato in incubatore a 37°C e con un 5% di CO₂.

2.2 Silenziamento genico della PON2 tramite shRNA

Per ottenere il silenziamento genico della PON2 è stato necessario trasfettare entrambe le linee cellulari interessate (786-O e Caki-1) con plasmidi codificanti per shRNA diretti contro regioni specifiche dell'mRNA della PON2.

Per la trasfezione, sono state seminate 6.0×10^4 cellule/pozzetto in una piastra 24-well e con 500 μ L di DMEM High Glucose completo. La procedura di trasfezione ha utilizzato come reagente trasfettante il FuGENE HD (Promega) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Tale reagente permette la formazione di micelle che consentono l'ingresso e quindi l'incorporazione del plasmide all'interno della cellula eucariote.

Per procedere con la trasfezione nel giorno successivo alla semina, è necessario che le cellule abbiano raggiunto una confluenza pari all'80%. I vettori utilizzati per questo studio (0,5 μ g/pozzetto) sono stati pLKO.1-puro (vettore plasmidico privo di inserto) e pLKO.1-643 e pLKO.1-647 (vettori plasmidici codificanti per shRNA diretti contro l'mRNA della PON2), mentre il controllo è stato trattato col solo reagente di trasfezione FuGENE HD (Mock).

La mix di trasfezione è stata allestita utilizzando Opti-MEM (44 μ L), plasmide (2 μ L) e FuGENE in rapporto 3:1 con la quantità di plasmide (6 μ L). A seguito di una incubazione di 15 min a temperatura ambiente, sono stati aliquotati 25 μ L della mix a ciascun pozzetto, previa sostituzione del mezzo di coltura con terreno fresco. A seguito di una incubazione di 48h, si è proceduto alla selezione dei cloni cellulari che hanno incorporato correttamente il plasmide coltivando le cellule in presenza di puromicina (1 μ g/mL) in quanto il vettore plasmidico contiene al suo interno anche un gene che conferisce resistenza a questo antibiotico. Pertanto, i cloni cellulari che sopravvivranno alla selezione mostreranno una downregolazione del gene di nostro interesse.

L'efficienza del silenziamento del gene PON2 nelle linee cellulari 786-O e Caki-1, è stata verificata attraverso l'analisi dell'RNA messaggero e dell'espressione proteica, rispettivamente tramite la Real-time polymerase chain reaction (PCR) e il Western Blot.

2.3 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione

L'analisi dell'RNA messaggero condotta attraverso una Real-time PCR, richiede in prima istanza l'estrazione dell'RNA totale. L'estrazione dell'RNA è stata compiuta attraverso l'utilizzo del kit SV Total RNA Isolation System (Promega) partendo da un pellet cellulare pari a 1.0×10^6 cellule, seguendo il protocollo previsto dal produttore.

La purezza e la quantità dell'RNA estratto sono state valutate al termine della procedura, attraverso il nanodrop (uno strumento spettrofotometrico). Sapendo che gli acidi nucleici assorbono a 260 nm, le proteine a 280 nm e i contaminanti chimici a 230 nm, è stato possibile calcolare due rapporti:

- 260 nm / 280 nm → il risultato deve essere compreso nel range 1,8-2,0 per poter essere considerato l'RNA puro nei confronti delle proteine
- 260 nm / 230 nm → il risultato deve essere compreso nel range 2,0-2,2 per poter essere considerato l'RNA puro nei confronti dei vari contaminanti.

Una volta avvenuta l'estrazione, 2 µg di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando il kit di retrotrascrizione M-MLV (moloney murine leukemia virus) Reverse Transcriptase (Promega) per convertire gli mRNA estratti in cDNA. In particolare, ai 13,5 µl di campione di RNA sono stati aggiunti 1,5 µl di random primers, posti poi nel termociclatore con l'apposito programma pre-RT a 70°C per 5 minuti. Successivamente ad ogni campione sono stati aggiunti 10 µl di Master Mix costituita da Buffer 5X, dNTPs 10mM, M-MLV RT, inibitore delle RNAsi e acqua sterile utilizzando i volumi indicati dal produttore, ottenendo così un volume finale di 25 µl. I campioni sono stati incubati in termociclatore per 60 minuti a 37°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C e utilizzato per i successivi esperimenti.

2.4 Real-time PCR

Il cDNA generato come descritto nel paragrafo precedente è stato utilizzato come DNA stampo per una Real-time PCR al fine di valutare l'espressione genica. Tale metodica prevede tre fasi svolte all'interno del termociclatore, impostate a temperature differenti:

- **FASE 1**= denaturazione, dove avviene la separazione della doppia elica del filamento stampo, ad una temperatura pari a 95°C e tale fase dura 30 secondi.
- **FASE 2**= appaiamento o annealing, dove si ha il legame complementare dei primer alla sequenza di cDNA precedentemente retrotrascritta. La temperatura in questo caso equivale a 58°C per una durata di 30 secondi. Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate nella Tabella 4.
- **FASE 3**= estensione del primer, ottenuta dalla reazione di polimerizzazione catalizzata dalla Taq Polimerasi che lavora a 72°C; il terzo step ha durata di 30 secondi.

Le tre fasi sono state ripetute per **40 cicli**, in modo da permettere l'amplificazione del cDNA. Il cDNA è stato sempre conservato in ghiaccio durante la procedura insieme alla SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-rad), alla quale vengono successivamente aggiunti solo primers forward e reverse specifici per ogni gene (Tabella 4), acqua sterile. La miscela di reazione, insieme al cDNA, è stata aliquotata in strip apposite e caricate nel termociclatore. L'elemento che permette la rilevazione del prodotto di PCR, è una sonda fluorescente in grado di intercalarsi nel DNA ed emettere un segnale fluorescente.

Il segnale è stato rilevato attraverso il detector del CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) e identificato attraverso il ciclo soglia (C_t). Perciò, in tempo reale, è possibile monitorare la reazione e definire il primo ciclo in cui si è in grado di rilevare la fluorescenza (C_t), direttamente proporzionale al prodotto di amplificazione.

L'espressione dell'mRNA dei geni di interesse (GOI) è stata calcolata attraverso una quantificazione relativa, secondo la formula $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$, dove $\Delta C_t = C_t(\text{GOI}) - C_t(\beta\text{-actina})$ e $\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t(\text{pLKO.1-puro, pLKO.1-643, pLKO.1-647}) - \Delta C_t(\text{Mock})$.

La Real-time PCR è stata eseguita per i geni PON2, Ki-67, Caspasi-3 e β -actina.

GENE	PON2	Ki-67	Caspasi-3	β -actina
SEQUENZA	5'-TCGTGT	5'-GACATC	5'-TGGAAC	5'-TCC TTC
PRIMER	ATG ACC	CGT ATC CAG	CAA AGA TCA	CTG GGC A
FORWARD	CGA ACA ATCC-3'	CTTC-3'	TAC ATGG-3'	TGG AGT-3'
SEQUENZA	5'-AACTGT	5'-CCGTAC	5'-	5'-AGC ACT
PRIMER	AGT CAC	AGG CTC ATC	CAGACCGAGA	GTG TTG GCG
REVERSE	TGT AGG CTT CTC-3'	AATAAC-3'	TGTCATTCCA- 3'	TAC AG-3'

Tabella 4 In questa tabella sono stati riportati i geni con i rispettivi primers forward e reverse: il gene PON2 di interesse; la proteina Ki-67 responsabile della proliferazione cellulare; il gene caspasi-3 con funzione apoptotica; la proteina β -actina che rappresenta il gene housekeeping, ovvero il gene di riferimento espresso uniformemente in tutti i campioni.

2.5 Western Blot

Al fine di verificare l'effettivo silenziamento genico anche a livello di espressione proteica, è stato eseguito il Western Blot su estratti proteici di pellet cellulari, ottenuti da 2.0×10^6 cellule. L'omogeneizzazione dei campioni ha previsto l'utilizzo di un Buffer di Lisi costituito da PBS a pH 7.4 contenente 1% di Nonidet P-40, 0.5% sodio desossicolato, 1 mM di fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) ovvero un inibitore delle proteasi, 0.1% sodio dodecil solfato (SDS), 1mM sodio ortovanadato e 2 $\mu\text{g/mL}$ di aprotinina. La rottura del pellet è stata facilitata dall'utilizzo di una siringa con ago di calibro 30 Gauche. L'omogenato così ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione a 16000g per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato recuperato.

La concentrazione proteica totale è stata misurata mediante il Saggio di Bradford al fine di caricare la stessa quantità di proteine totali per i vari campioni. La corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando un gel elettroforetico SDS-poliacrilamide al 12.5%, caricando 20 μg di proteine totali per ciascun campione con sample buffer contenente β -mercaptoetanololo (riducente) e il tracciante Blu di Bromofenolo. I campioni caricati sono stati precedentemente denaturati al calore (95°C per 3 minuti), per permettere alle proteine di migrare unicamente sulla base del peso molecolare (100V 2h circa). A seguito della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel a una membrana in difluoruro di polivinilidene (PVDF) (250mA 40 min a +4°C). La membrana è stata lavata con una soluzione di PBS 1X e Tween 20 allo 0.05%. e sottoposta a bloccaggio con Everyblot Blocking Buffer (Bio-Rad Laboratories) in agitazione per 10 minuti. A seguito di 3 lavaggi da 5 minuti ognuno con PBS 1X e Tween 20 allo 0.05% la membrana è stata incubata overnight a +4°C con un anticorpo primario policlonale rabbit diretto contro la PON2 umana (Sigma-Aldrich) diluito 1:500 o con anticorpo policlonale mouse diretto contro la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) (Sigma-Aldrich). Il giorno successivo, a seguito di 5 lavaggi (ognuno di 5 minuti) con PBS 1X e Tween 20 allo 0.05% si è proceduto all'incubazione con l'anticorpo secondario anti-rabbit, una immunoglobulina G (IgG) diluita 1:150000 e coniugata

con la perossidasi di rafano (HRP) o IgG anti-mouse (Sigma-Aldrich) diluita 1:5000 e coniugata con HRP, per un'ora a temperatura ambiente.

A seguito di ulteriori 5 lavaggi, è stata effettuata la rilevazione del segnale incubando la membrana con il substrato Super-Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) per ottenere un segnale chemiluminescente che è stato rilevato tramite lo strumento ChemiDoc XRS+System (Bio-Rad Laboratories). L'intensità delle bande così ottenute è direttamente proporzionale all'espressione della proteina di interesse.

2.6 Saggio di proliferazione cellulare: Trypan Blue

Sulle linee cellulari di carcinoma renale a cellule chiare, 786-O e Caki-1, è stato eseguito un saggio di proliferazione cellulare che mette in mostra la percentuale di cellule vive rispetto al totale di cellule che vengono contate al microscopio a contrasto di fase invertito attraverso la camera di Burker. Tale procedura è il Trypan Blue, che permette di visualizzare la proliferazione cellulare a più timepoints e in questo caso ne sono stati considerati quattro, rispettivamente 0h, 24h, 48h e 72h.

Le cellule sono state seminate in una piastra six-well, nello specifico 3.0×10^5 per pozzetto. Il giorno successivo alla semina (che equivale al timepoint 0h), si è proceduto a staccare le cellule dal supporto utilizzando 500 μ L di tripsina, con successiva neutralizzazione con PBS 1X e centrifugazione a 500g per 3 minuti. Infine, il pellet cellulare è stato risospeso in 1mL di terreno DMEM High Glucose completo contenente il 10% di siero bovino fetale e antibiotico. Sono stati mescolati quindi 10 μ L di sospensione cellulare con 10 μ L di colorante Trypan Blue; di questa miscela, 10 μ L sono stati prelevati per essere caricati nella camera di Burker per la successiva conta cellulare al microscopio. Tale metodica permette la distinzione delle cellule morte che risultano colorate di blu dalle cellule vive che, avendo una membrana cellulare integra e impermeabile al colorante Trypan Blue, appaiono chiare. Questi passaggi sono stati ripetuti per ogni timepoint e in triplicato. Il numero delle cellule contate ad ogni timepoint, è stato riportato come percentuale rispetto alle 0h di ogni campione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard.

2.7 Saggio di vitalità cellulare: MTT

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che permette di valutare la vitalità cellulare. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, attivo solo nelle cellule vive, taglia l'anello di tetrazolio dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio), promuovendo la formazione di formazano. La conversione del sale di tetrazolio (giallo) a cristallo di formazano (blu) è indice, pertanto, della vitalità cellulare. L'analisi della vitalità cellulare è stata effettuata a diversi timepoints: 0h (il giorno dopo la semina), 24h, 48h, 72h, 96h.

Le cellule 786-O e Caki-1 sono state seminate in piastre 96-well (rispettivamente 2.5×10^3 cellule/pozzetto e 5.0×10^3 cellule/pozzetto) in presenza di terreno DMEM High Glucose e lasciate crescere fino al timepoint di interesse. Il saggio MTT ha previsto l'allestimento di una miscela costituita da 120 μ l di terreno DMEM High Glucose privo di FBS e 10 μ l di reagente MTT (5 mg/mL in PBS), dalla quale se ne prelevano 100 μ l che vengono aggiunti a ogni pozzetto. Dopo due ore di incubazione a 37°C, il terreno esausto è stato rimosso e i cristalli di formazano prodotti sono stati dissolti aliquotando 200 μ l di 2-propanolo a ciascun pozzetto. Il lisato cellulare mostrerà un colore blu-violaceo la cui intensità è proporzionale al numero e alla vitalità delle cellule che erano presenti. La misurazione dell'assorbanza a 540 nm è stata effettuata utilizzando un lettore di piastra.

I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo di riferimento (dove il controllo è rappresentato dal valore di assorbanza calcolato a 0h per ogni campione equivalente al 100%). Anche in questo caso, come nel saggio precedente, i valori sono presentati come media \pm deviazione standard e sono il risultato di esperimenti eseguiti in triplicato.

2.7.1 MTT e chemioterapici

La vitalità delle linee cellulari 786-O e Caki-1 è stata monitorata nel tempo anche a seguito del trattamento con specifici chemioterapici.

In particolare, sono stati presi in considerazione due farmaci a diverse concentrazioni: cisplatino (0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M) e 5-fluorouracile (1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M).

A tale scopo, sono state seminate su una piastra 96-well, 2.5×10^3 cellule/pozzetto per quanto riguarda le 786-O e 5×10^3 per la linea cellulare Caki-1. A seguito di una incubazione di 24h a 37°C e 5% di CO₂, per permettere alle cellule di aderire al supporto, è stato effettuato il cambio del mezzo di coltura utilizzato in precedenza con un nuovo terreno contenente i chemioterapici alle diverse concentrazioni.

Successivamente sono stati effettuati saggi MTT nei diversi timepoints considerati. Ciò ha permesso di analizzare l'impatto del silenziamento della PON2 sull'efficacia di questi farmaci.

2.8 Saggio di migrazione cellulare: Wound Healing

Il Wound Healing è una metodica appositamente utilizzata per verificare la capacità delle cellule di migrare e di riparare un danno al monolayer cellulare.

Le cellule sono state seminate e lasciate crescere in piastre six-well (5.0×10^5 cellule per pozzetto) in 2 mL di DMEM High Glucose con 10% di FBS fino ad arrivare all'80% di confluenza.

Il monolayer cellulare è stato quindi danneggiato creando un solco con un puntale da 200 μ L di una micropipetta. A seguito di 3 lavaggi con PBS 1X per rimuovere eventuali detriti cellulari, è stato aliquotato terreno DMEM High Glucose contenente lo 0.5% di FBS, al fine di bloccare la proliferazione cellulare.

Per monitorare la migrazione nel solco formato e quindi la capacità di riparare il danno, sono state scattate delle foto a 0h, 4h, 8h e 24h, fino alla completa chiusura del solco.

Le immagini sono state analizzate attraverso il software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018). Attraverso il software è stata misurata la larghezza del solco in tre punti distinti per poi calcolarne la media, operazione che è stata effettuata per ciascun timepoint. I valori sono riportati in percentuale calcolando la percentuale di riduzione del taglio rispetto al timepoint delle 0h per ciascun campione. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Tutti i valori sono espressi come media \pm deviazione standard.

2.9 Analisi statistiche

I risultati ottenuti sono stati analizzati con GraphPad Prism (GraphPad Software).

Le differenze tra i gruppi sono state valutate attraverso il test ANOVA one-way.

Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3. RISULTATI

3.1 Il silenziamento della PON2 nelle linee cellulari 786-O e Caki-1

Le linee cellulari di carcinoma renale a cellule chiare umane 786-O e Caki-1 sono state trasfettate con vettori plasmidici per ottenere il silenziamento dell'enzima PON2. La conferma dell'avvenuto silenziamento genico, è stata dimostrata valutando l'espressione sia dell'mRNA attraverso la Real-time PCR che delle proteine mediante il Western Blot.

La linea cellulare 786-O trasfettata con il plasmide pLKO.1-647 (Figura 7A) mostra un marcato decremento a livello di espressione di mRNA (0.41 ± 0.19), rispetto ai controlli (Mock 1.00 ± 0.19 ; pLKO.1-puro 0.88 ± 0.12). Il silenziamento genico è risultato efficace anche nel caso della linea cellulare Caki-1 (Figura 7B) trasfettata con il plasmide pLKO.1-647 (0.48 ± 0.005) rispetto ai controlli (Mock 1.00 ± 0.09 ; pLKO.1-puro 0.89 ± 0.11).

Per entrambe le linee cellulari, invece, la trasfezione con il plasmide pLKO.1-643 non si è tradotta in una downregolazione della PON2 sufficiente.

I risultati ottenuti tramite Real-time PCR, sono stati confermati a livello proteico con il Western Blot (Figura 7C, 7D) e la successiva analisi densitometrica delle bande immunoreattive (Figura 7E, 7F), poiché è stata rilevata una significativa espressione della PON2 sia nelle 786-O che nelle Caki-1 trasfettate con il plasmide pLKO.1-647 (rispettivamente, 0.42 ± 0.072 e 0.39 ± 0.003) contro i rispettivi controlli (1.00 ± 0.031 e 1.00 ± 0.024). Tutti i valori sono espressi come media \pm deviazione standard ($*p < 0.05$).

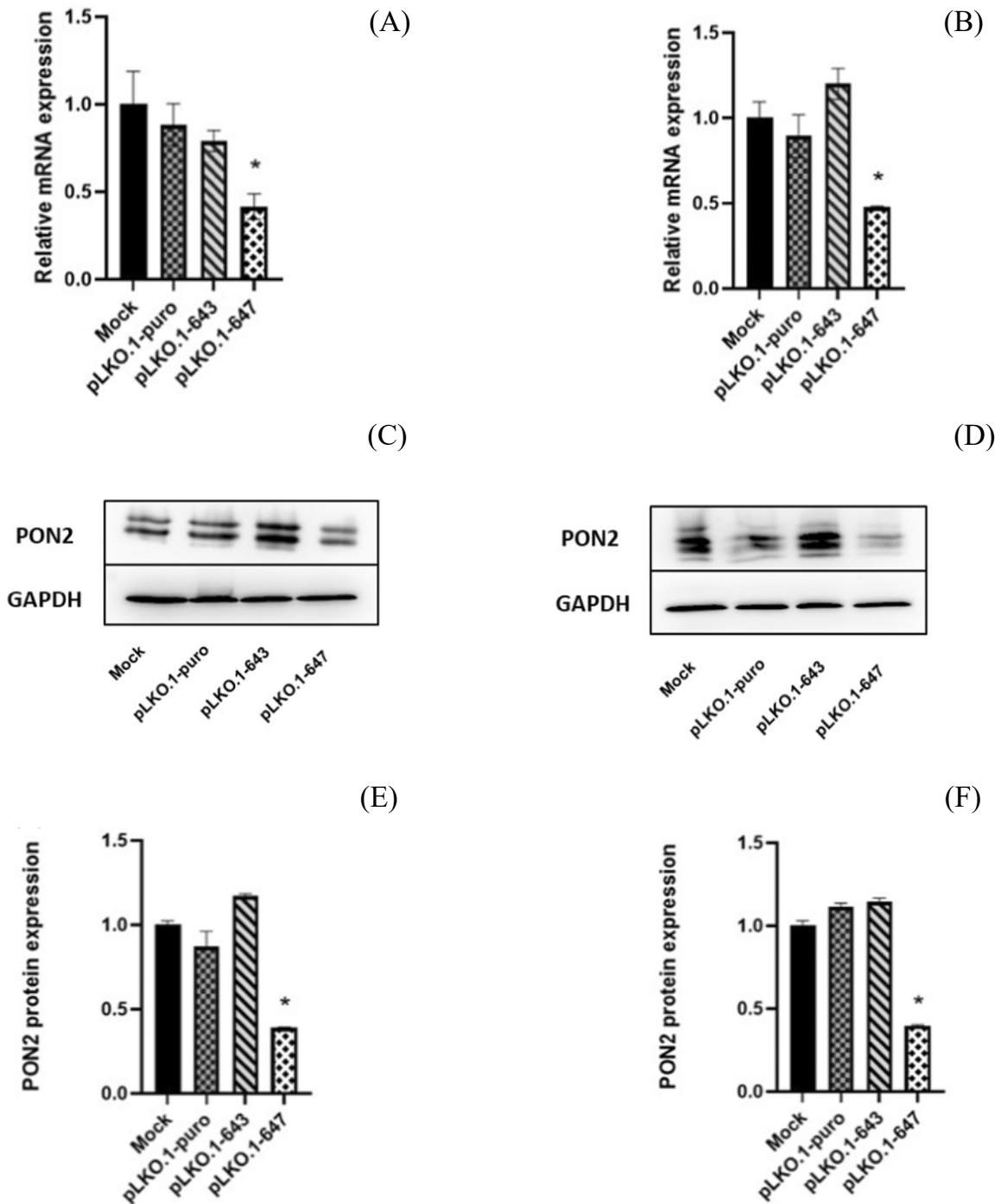


Figura 7. Silenziamento genico della PON2 nelle linee cellulari di ccRCC 786-O (A, C, E) e Caki-1 (B, D, F). Real-time PCR (A, B), Western blot (C,D), densitometria delle bande immunoreattive (E,F).

3.2 Impatto del silenziamento genico sulla proliferazione e vitalità cellulare

Verificato il successo del silenziamento genico *in vitro*, è stato valutato l'impatto della downregolazione della PON2 sulla proliferazione e vitalità cellulare, rispettivamente tramite saggio Trypan Blue e MTT, eseguiti a diversi timepoints. I risultati ottenuti hanno evidenziato come entrambe le linee cellulari 786-O e Caki-1 trasfettate col plasmide pLKO.1-647 mostrino una significativa riduzione della proliferazione cellulare a 48h e 72h rispetto ai controlli (Figura 8A, 8B). Coerentemente ai risultati mostrati dal Trypan Blue, anche il saggio colorimetrico MTT ha evidenziato un'inferiore vitalità cellulare per entrambe le linee cellulari trasfettate con il vettore pLKO.1-647: sia per la linea 786-O (Figura 8C) che per la linea Caki-1 (Figura 8D) si osserva una significativa riduzione della vitalità cellulare a partire dalle 48h.

La riduzione della proliferazione cellulare è stata supportata anche da dati molecolari.

Tramite Real-time PCR è stata valutata l'espressione dell'mRNA del marker di proliferazione Ki-67 (Figura 8E) e della proteina pro-apoptotica caspasi-3 (Figura 8F) nella linea cellulare 786-O. Il silenziamento genico della PON2 ha indotto una significativa riduzione dell'mRNA codificante per Ki-67 (0.56 ± 0.112) rispetto al controllo 786-O pLKO.1-puro, e un aumento dei livelli di mRNA della caspasi-3.

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard ($*p < 0.05$).

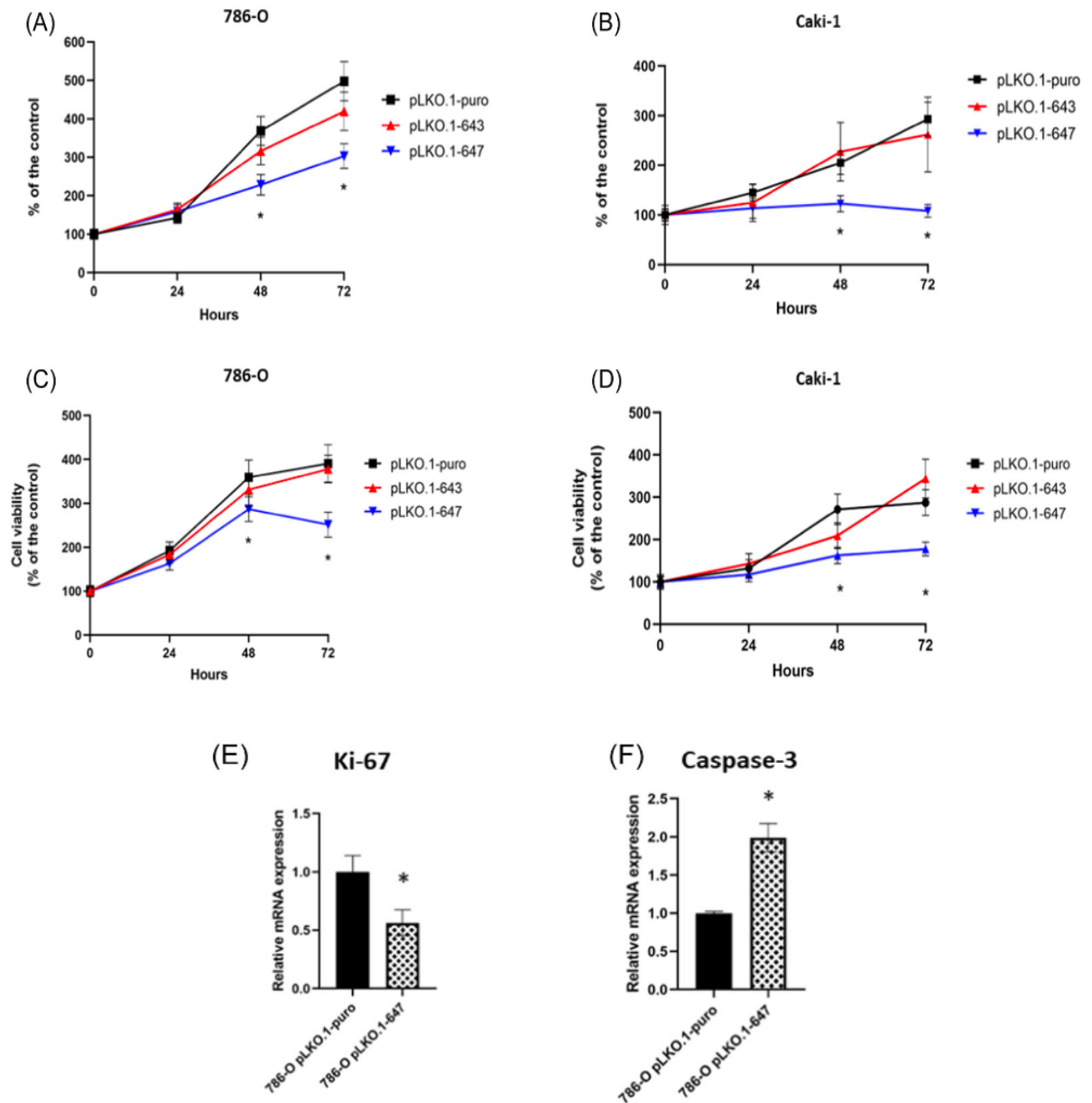


Figura 8. Proliferazione (A, B) e vitalità (C, D) delle linee cellulari 786-O e Caki-1 che downregolano la PON2. I grafici E e F mostrano l'espressione dell'mRNA della proteina Ki-67 e caspasi-3 nella linea cellulare 786-O.

3.3 Effetto del silenziamento della PON2 sulla chemiosensibilità

Le linee cellulari 786-O e Caki-1 sono state trattate con due diversi chemioterapici a differenti concentrazioni, ovvero cisplatino (0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M) e 5-fluorouracile (1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M), per monitorare la loro vitalità cellulare ed osservare l'effetto del silenziamento genico della PON2 sulla chemiosensibilità. Per seguire l'andamento nel tempo, sono stati presi in considerazione più timepoints: 0h, 24h, 48h e 72h.

Entrambi i farmaci alle diverse concentrazioni hanno contribuito a una significativa riduzione della vitalità cellulare nelle linee cellulari 786-O e Caki-1 con PON2 silenziata rispetto al controllo pLKO.1-puro. Il silenziamento dell'enzima dimostra di sensibilizzare la linea cellulare 786-O al trattamento con cisplatino 0,1 μ M (Figura 9A) rispetto al controllo a partire dalle 72h; un effetto ancora più evidente lo si evidenzia a 72h con cisplatino 1 μ M (Figura 9B). Alla concentrazione di cisplatino più elevata (10 μ M), non si osservano differenze significative nella vitalità delle cellule 786-O pLKO.1-647 rispetto al controllo pLKO.1-puro (Figura 9C) probabilmente a causa della concentrazione eccessiva del chemioterapico.

Coerentemente con i dati precedentemente esposti, il silenziamento della PON2 ha sensibilizzato la linea cellulare 786-O anche al trattamento con il 5-fluorouracile. In particolare, è stata osservata una riduzione della vitalità statisticamente significativa a 48h e 72h della linea 786-O pLKO.1-647 rispetto al controllo a seguito della somministrazione di 5-fluorouracile 5 μ M e 10 μ M (rispettivamente, Figura 9E, 9F). Basse concentrazioni di chemioterapico invece, pari a 1 μ M, non hanno determinato differenze in termini di vitalità (Figura 9D).

Risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso della linea cellulare Caki-1. In questo caso, è stata osservata una riduzione della vitalità statisticamente significativa a 48h e 72h per tutte le concentrazioni di cisplatino e 5-fluorouracile testate (Figura 10 A-F).

L'effetto del silenziamento della PON2 sulla proliferazione cellulare in seguito al trattamento chemioterapico è stato analizzato anche a livello molecolare, misurando i livelli di Ki-67 (Figura 11A, 11B, 11C) e caspasi-3 (Figura 11D, 11E, 11F) in seguito ai trattamenti con i chemioterapici a varie concentrazioni.

L'analisi è stata condotta ponendo a confronto le cellule 786-O trasfettate con il plasmide pLKO.1-647 e il controllo 786-O pLKO.1-puro, valutando i livelli di espressione di mRNA (Real-time PCR).

Analizzando nel dettaglio i dati riportati nei grafici, si riscontrano dei risultati significativi: a parità di concentrazione di chemioterapico utilizzata (cisplatino 1,0 μM e 5-fluorouracile 5,0 μM e 10 μM), la linea cellulare con PON2 silenziata mostra in ogni caso una minore espressione di mRNA relativamente a Ki-67 e un aumentato livello di mRNA per le caspasi-3, rispetto al controllo. Tali evidenze indicano che i trattamenti con i chemioterapici inducono una riduzione della proliferazione cellulare e un'aumentata apoptosi, promuovendo così la chemiosensibilità della cellula tumorale.

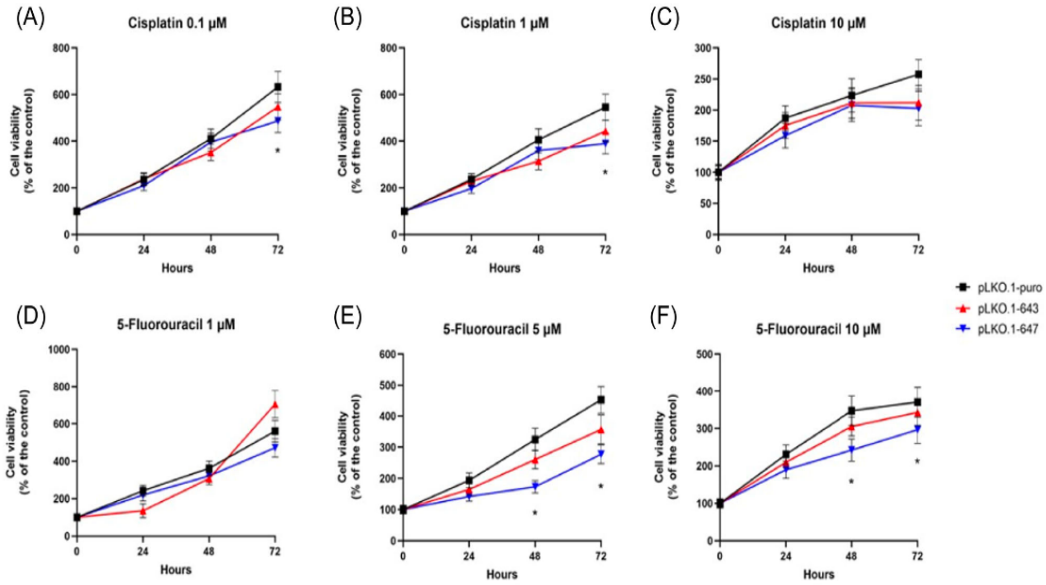


Figura 9. *Trattamento con i chemioterapici cisplatino (0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M) e 5-fluorouracile (1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M) attraverso il saggio MTT, ponendo a confronto la linea cellulare 786-O pLKO.1-647 e il controllo 786-O pLKO.1-puro a diversi timepoints (0h, 24h, 48h e 72h). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (* p <0.05).*

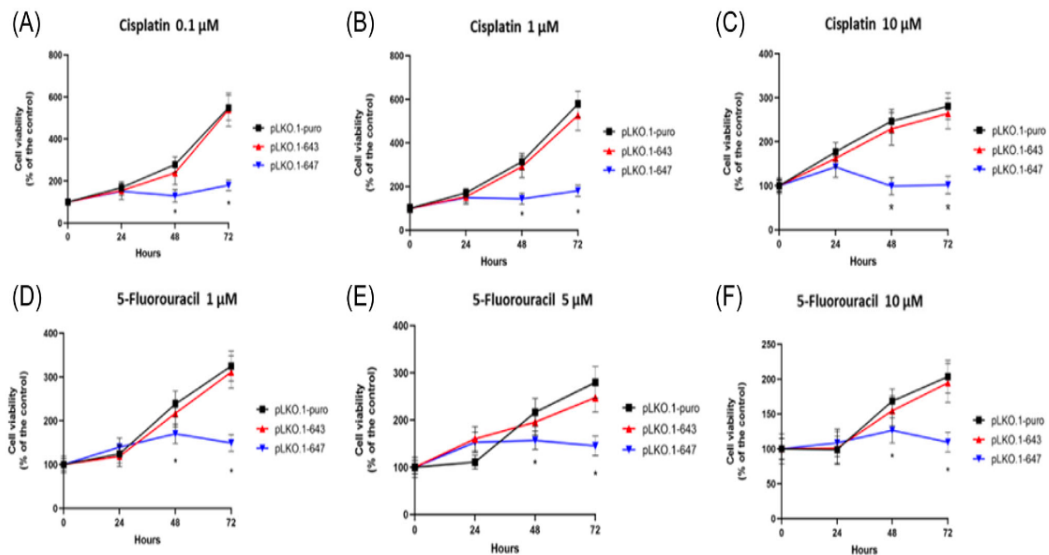


Figura 10. *Trattamento con i chemioterapici cisplatino (0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M) e 5-fluorouracile (1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M) attraverso il saggio MTT, ponendo a confronto la linea cellulare Caki-1 pLKO.1-647 e il controllo Caki-1 pLKO.1-puro a diversi timepoints (0h, 24h, 48h e 72h). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (* p <0.05).*

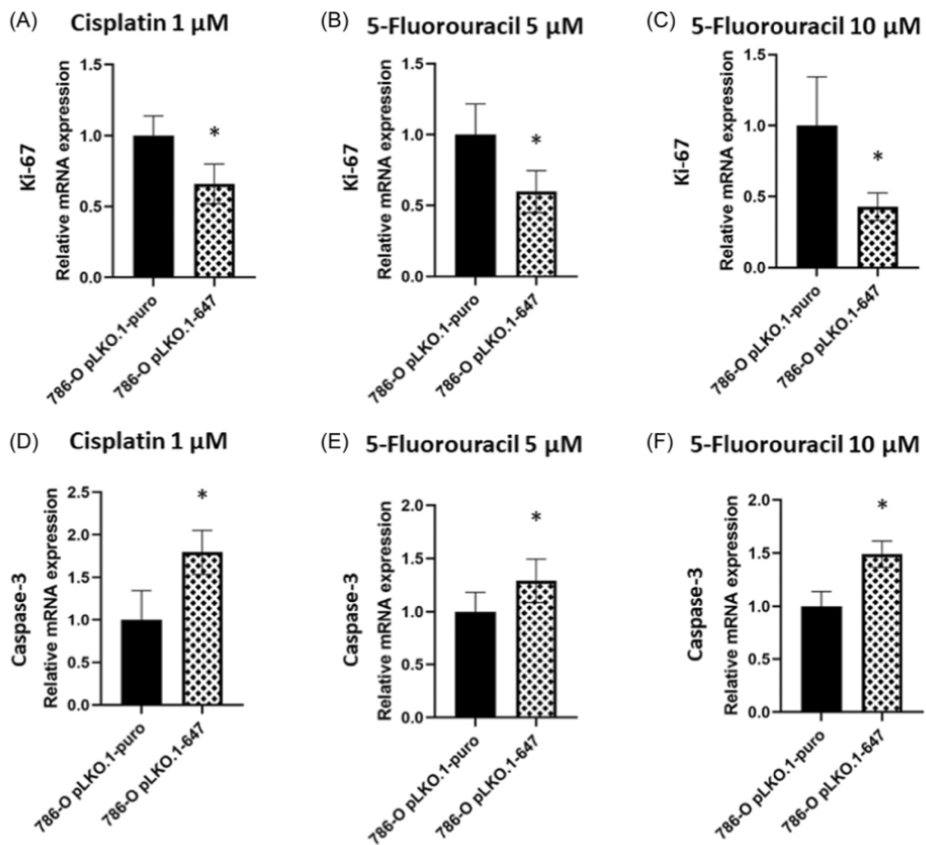


Figura 11. Valutazione dei livelli di espressione di mRNA attraverso la Real-time PCR sulle Ki-67 (A, B, C) e caspasi-3 (D, E, F) trattate con i chemioterapici (cisplatino 1 μ M, 5-fluorouracile 5 μ M e 10 μ M). Confronto tra 786-O trasfettate con il plasmide pLKO.1647 e controllo pLKO.1-puro. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (* p < 0,05).

3.4 Conseguenze del silenziamento genico sulla migrazione

Il saggio Wound Healing ha mostrato notevoli differenze relativamente alla capacità delle cellule di migrare e di riparare un danno. Nel grafico vengono riportati i valori espressi come media numerica \pm deviazione standard (* $p < 0.05$) e rappresentano la percentuale di rimarginazione del solco rispetto al timepoint delle 0h per ciascun campione. Il silenziamento della PON2 ha impattato negativamente sulla capacità di migrazione della linea cellulare 786-O trasfettata con il plasmide pLKO.1-647; infatti, come è possibile osservare dalle immagini, tali cellule hanno mostrato una percentuale di riduzione del solco pari a solo il 50%, laddove la linea cellulare 786-O pLKO.1-puro ha mostrato una completa chiusura del solco a 24h (Figura 12A, 12C). Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando la seconda linea cellulare Caki-1; dopo 24h le cellule Caki-1 pLKO.1-647 mostrano una percentuale di rimarginazione del solco al di sotto del 20%, laddove il controllo sfiora circa il 75% (Figura 12B, 12D).

Pertanto, tali risultati suggeriscono che la PON2 potrebbe essere coinvolta nel grado di aggressività del carcinoma renale a cellule chiare in quanto la sua espressione è correlata a una maggiore capacità migratoria delle cellule di carcinoma renale a cellule chiare.

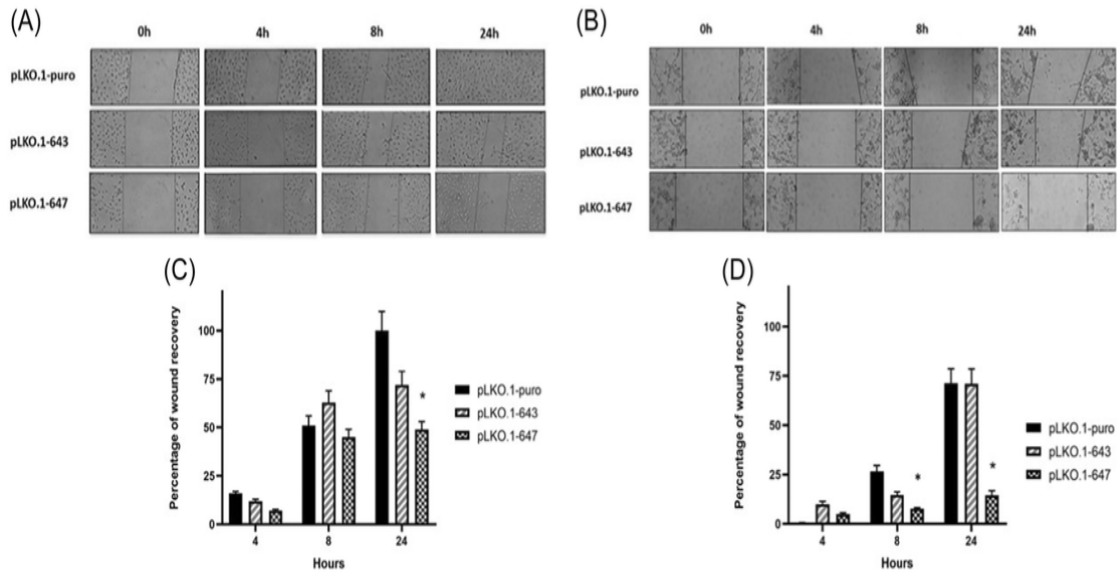


Figura 12. Le linee cellulari 786-O (A) e Caki-1 (B) sono state fotografate a 0h subito dopo la creazione del solco e poi a 4h, 8h e 24h, per monitorare la capacità di rimarginazione del solco. I dati sono stati riportati nei grafici sottostanti come percentuale di rimarginazione del solco, comparando così sia le 786-O (C) che le Caki-1 (D) trasfettate col plasmide pLKO.1-647 al pLKO.1-puro.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi mi sono focalizzata sul ruolo della paraoxonasi-2 nel carcinoma renale a cellule chiare. Studi precedenti hanno dimostrato un'elevata espressione dell'mRNA della PON2 nel ccRCC e ciò suggerisce che questo enzima possa giocare un ruolo importante nella progressione e nell'aggressività della neoplasia. Di conseguenza, abbiamo valutato l'impatto del silenziamento del gene della PON2 sul comportamento di linee cellulari di ccRCC, in termini di proliferazione, vitalità, invasività e sensibilità alla chemioterapia.

Dopo aver generato linee cellulari di ccRCC downregolanti la PON2, abbiamo analizzato come la downregolazione influenzasse la proliferazione e la vitalità cellulare attraverso i saggi Trypan Blue e MTT. I nostri risultati mostrano chiaramente che in entrambe le linee cellulari testate si assiste a una riduzione significativa della proliferazione e della vitalità cellulare, suggerendo un possibile ruolo dell'enzima nel promuovere la carcinogenesi. I nostri dati sono in linea con quanto riportato in precedenza in altre neoplasie, come ad esempio nel carcinoma orale a cellule squamose, nel carcinoma della vescica e nel melanoma, dove il silenziamento della PON2 è stato in grado di ridurre in maniera significativa la proliferazione e la vitalità cellulare delle cellule neoplastiche. (Parween et al., 2022; Campagna et al., 2022)

L'esatto meccanismo attraverso il quale l'enzima stimoli la proliferazione cellulare non è a tutt'oggi chiarito. Alcuni gruppi di ricerca hanno ipotizzato che il silenziamento del gene che codifica per la PON2 possa alterare la proliferazione cellulare stimolando l'apoptosi delle cellule neoplastiche. Nel nostro contesto sperimentale, la downregolazione della paraoxonasi-2 è associata ad una riduzione della proteina Ki-67, che rappresenta un marker di proliferazione cellulare, e a un aumento della caspasi-3, essenziale nell'indurre l'apoptosi, suggerendo così che l'enzima possa influire sia sulla proliferazione cellulare che sul tasso di apoptosi e giustificando in questo modo la riduzione della proliferazione e della vitalità cellulare che abbiamo osservato.

È stato recentemente messo in evidenza che l'espressione dell'enzima nelle cellule tumorali può influenzare anche la resistenza agli agenti chemioterapici o

all'immunoterapia. Dal momento che a tutt'oggi esiste un numero limitato di opzioni terapeutiche per il trattamento del ccRCC, la possibilità di rendere sensibili le cellule tumorali alla chemioterapia può rappresentare un'interessante strategia per consentire l'utilizzo di farmaci chemioterapici in una neoplasia che è caratterizzata da un'elevata resistenza intrinseca. Di conseguenza, nel mio lavoro di tesi, ho valutato se il silenziamento del gene della PON2 influenzasse la risposta delle cellule ai chemioterapici. In particolare, abbiamo utilizzato il cisplatino e il 5-fluorouracile. L'effetto citotossico di questi agenti chemioterapici sulla vitalità di linee cellulari di ccRCC è risultato essere significativamente aumentato nelle cellule con PON2 silenziata rispetto a quelle di controllo, a testimonianza dell'azione protettiva esercitata dall'enzima nei confronti del danno indotto dalla chemioterapia. I risultati ottenuti sono in accordo con vari studi effettuati in altre linee tumorali in cui è stato attuato il silenziamento per il gene della PON2 ed è stata valutata successivamente la chemiosensibilità delle cellule. (Fumarola et al., 2020)

Nelle cellule silenziate per l'espressione della PON2 e trattate con cisplatino o 5-fluorouracile abbiamo inoltre osservato dei livelli ridotti di Ki-67 e un aumento della concentrazione della caspasi-3 rispetto ai controlli. Nell'insieme, i risultati del mio lavoro di tesi supportano l'ipotesi che l'attività della paraoxonasi-2 possa contribuire a mitigare gli effetti citotossici dei farmaci chemioterapici, aiutando di conseguenza le cellule neoplastiche a sopravvivere alla chemioterapia.

L'aumentata chemiosensibilità delle cellule con PON2 silenziata potrebbe dipendere da un incremento della produzione di ROS, conseguente al venir meno dell'attività antiossidante esercitata dalla PON2. È noto infatti che, una volta entrati nelle cellule, il cisplatino e il 5-fluorouracile inducono una produzione massiva di radicali liberi. L'utilizzo combinato di potenti induttori dei ROS, come i farmaci chemioterapici, abbinato a una riduzione della capacità antiossidante, può consentire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. L'ipotesi che elevati livelli di PON2 possano indurre chemioresistenza, a causa della capacità dell'enzima di detossificare i radicali liberi intracellulari, è supportata anche da diversi studi che hanno messo in evidenza, nel carcinoma orale a cellule squamose, la presenza di

una correlazione tra una overespressione della PON2 e un aumento della radioresistenza. Infatti, le radiazioni ionizzanti determinano la morte cellulare attraverso la produzione di ROS. Sarebbe pertanto interessante valutare l'effetto del silenziamento della PON2 anche nella risposta delle cellule neoplastiche alla radioterapia, da sola o in associazione alla chemioterapia.

Infine, i risultati del mio lavoro mettono in evidenza una riduzione della migrazione delle cellule di ccRCC in seguito al silenziamento del gene della PON2; quest'enzima potrebbe quindi rappresentare anche un target per ridurre la disseminazione precoce delle cellule tumorali.

In conclusione, il presente studio dimostra un possibile coinvolgimento dell'espressione dell'enzima paraoxonasi-2 nella tumorigenesi, nella progressione e nella chemioresistenza del carcinoma renale a cellule chiare. Saranno necessarie ulteriori analisi per esplorare il ruolo prognostico di questo enzima nel ccRCC e per validarlo come marker terapeutico.

5. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Campagna R, Serritelli E.N., Salvolini E, et al. *Contribution of the Paraoxonase-2 Enzyme to Cancer Cell Metabolism and Phenotypes*. *Biomolecules*, 2024; 14 :208
- Campagna R, Belloni A, Pozzi V, et al. *Role Played by Paraoxonase-2 Enzyme in Cell Viability, Proliferation and Sensitivity to Chemotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines*. *Int J Mol Sci*, 2022; 24:338.
- Fumarola S, Cecati M, Sartini D, et al. *Bladder Cancer Chemosensitivity is Affected by Paraoxonase-2 Expression*. *Antioxidants (Basel)*, 2020; 9:175
- Garfield K, LaGrange C. A. *Renal Cell Cancer*, 2023
- Hashmi M, Limaiem, F. *Renal Clear Cell Cancer*. *StatPearls*, 2023
- Hegele, R.A. *Paraoxonase genes and disease*. *Ann. Med.*, 1999; 3:217–224.
- https://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference
- <https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/shrna-applications>
- <https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/sirna-applications>
- https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/04/2020_LG_AIOM_Rene.pdf
- <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-rene#:~:text=Per%20quanto%20riguarda%20il%20tumore,uomini%20e%204.800nelle%20donne>
- Kaelin W.G. Jr, *The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing*. *J. Am. Soc. Nephrol*, 2003; 14: 2703–2711.
- Kase, A.M., George D.J., Ramalingam S. *Clear Cell Renal Cell Carcinoma: From Biology to Treatment*. *Cancers*, 2023; 15.3:665
- Klatte T, Rossi S.H., Stewart G.D. *Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: A literature review*. *World J. Urol*, 2018; 36:1943–1952.

- Parween F, Gupta R.D. *Insights into the role of paraoxonase 2 in human pathophysiology*. J Biosci, 2022;47:4.
- Saladin, K.S., De Caro R, Galli S, et al. *Anatomia umana*. Vol.2 Piccin, 2017
- Saxton R.A., Sabatini D.M. *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017; 168: 960–976.
- Schiavoni V, Campagna R, Pozzi V, et al. *Recent Advances in the Management of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Novel Biomarkers and Targeted Therapies*. Cancers, 2023; 15:3207
- Sükösd F, Kuroda N, Beothe T, et al. *Deletion of chromosome 3p14. 2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma*. Cancer research, 2003; 63.2: 455-457.
- Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, et al. *Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer*. J. Lipids, 2012; 2012:342806.

RINGRAZIAMENTI

Arrivata al termine di questo intenso percorso di studi, vorrei ringraziare la mia relatrice, la Prof.ssa Salvolini Eleonora per avermi supportato fin dall'inizio nella stesura di questa tesi e non solo. Grazie per la pazienza e il tempo dedicatomi e per ogni dubbio chiarito di fronte ad ogni insicurezza.

Grazie anche al mio correlatore, il Dott. Campagna Roberto, per avermi trasmesso la passione per questo lavoro, per avermi insegnato tanto e fatto scoprire e approfondire un mondo che inizialmente era sconosciuto.

Inoltre, ringrazio tutte le ragazze del laboratorio. Per tutto l'anno mi avete fatta sentire a casa, a partire da tutti i pranzi fatti insieme. Mi avete trasmesso tanto e vi vorrei ringraziare per aver condiviso con me le vostre esperienze, i vostri momenti di gioia e anche i momenti difficili.

In particolare, vorrei ringraziare Valentina perché oltre ad essere stata una guida in questo percorso, sei stata anche la persona che mi ha trasmesso la sua determinazione, perseveranza e voglia di non accontentarsi mai. Ho avuto la possibilità di partecipare ai tuoi successi, arrivati dopo lunghe giornate di lavoro e tanti sacrifici che però, alla fine, hanno portato sempre a grandi risultati.

Grazie a tutti voi ho scoperto un nuovo mondo, quello affascinante della ricerca. Mi ha portato di giorno in giorno a voler conoscere sempre di più e ad essere sempre più curiosa, fino ad acquisire un bagaglio di conoscenze che mi porterò per sempre dietro.