



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

RUOLO DELL'ENZIMA PARAOXONASI-2 NEL CARCINOMA MAMMARIO:
COINVOLGIMENTO NELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E NELLA SENSIBILITÀ
AL TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO.

ROLE OF PARAOXONASE-2 IN BREAST CANCER: ENZYME INVOLVEMENT ON
CELL PROLIFERATION AND SENSITIVITY TO CHEMOTHERAPEUTIC
TREATMENT.

Tesi di Laurea Magistrale di:

Luca Mazzeo

Relatore Chiar.ma Dott.

Valentina Pozzi

Correlatore Chiar.mo Dott.

Roberto Campagna

Anno Accademico 2022-2023

INDICE

Capitolo 1 INTRODUZIONE	5
1.1 IL CARCINOMA DELLA MAMMELLA	5
1.1.1 Epidemiologia ed eziologia.....	6
1.1.2 Fattori di rischio e cause genetiche.....	9
1.1.3 Sintomatologia e diagnosi clinica	11
1.1.4 Classificazione macroscopica ed istopatologica	14
1.1.5 Stadiazione	16
1.1.6 Terapia.....	19
1.1.7 Prognosi e prevenzione.....	22
1.2 L'ENZIMA PARAOXONASI-2.....	23
1.2.1 Caratteristiche strutturali, espressione tissutale e localizzazione cellulare...	23
1.2.2 Regolazione dell'espressione genica della PON2.....	26
1.2.3 Catalisi e substrati della PON2	28
1.2.4 Stress ossidativo e cancro: ruolo della PON2	31
1.2.5 Altre funzioni della PON2	37

Capitolo 2 MATERIALI E METODI	40
2.1 CAMPIONI TISSUTALI.....	40
2.1.1 Selezione dei pazienti.....	40
2.1.2 Analisi immunoistochimica	42
2.2 CELLULE IN COLTURA... ..	43
2.2.1 Colture cellulari.....	43
2.2.2 Silenziamento di PON2.....	43
2.2.3 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale.....	47
2.2.4 Real-Time PCR	48
2.2.5 Western Blot.....	50
2.2.6 Saggio MTT e trattamento con i chemioterapici	52
2.2.7 Analisi statistiche.....	52
 Capitolo 3 RISULTATI	 53
3.1 CAMPIONI TISSUTALI.....	53
3.1.1 Espressione della PON2 nei sottotipi molecolari di carcinoma della mammella.....	53
3.2 ANALISI CELLULARI.....	56
3.2.1 Efficienza del silenziamento di PON2 mediato dagli shRNA in modelli cellulari di BC.....	56
3.2.2 Effetto del silenziamento di PON2 sulla proliferazione delle cellule di BC..	58

3.2.3 Impatto del silenziamento della PON2 sulla chemiosensibilità delle cellule di TNBC	59
Capitolo 4 DISCUSSIONE	62
Capitolo 5 CONCLUSIONI	67
Capitolo 6 BIBLIOGRAFIA.	68
Capitolo 7 ABBREVIAZIONI...	75

1 INTRODUZIONE

1.1 IL CARCINOMA DELLA MAMMELLA

Il carcinoma della mammella (BC) è la neoplasia più comune che colpisce le donne, comprendendo circa il 25% di tutti i casi di tumore, con un'incidenza che è in costante crescita¹: ad oggi, è la quinta causa di morte correlata ai tumori, con un numero stimato di oltre 2 milioni di nuovi casi solamente nel 2020. I decessi dovuti a questa malattia sono prevalentemente riportati nei paesi in via di sviluppo quali Africa occidentale, Caraibi, Polinesia, mostrando un tasso d'incidenza maggiore di circa l'88% rispetto ai paesi più industrializzati².

Il BC comprende una varietà di sottotipi, ciascuno dei quali caratterizzato da differente modalità di progressione, prognosi, sensibilità ai chemioterapici, responsività a terapie target mirate, ed altre caratteristiche correlate ad aberrazioni genetiche che si riscontrano frequentemente in questa neoplasia. Inoltre, il BC è contraddistinto da una elevata eterogeneità intra- e inter-tumorale che è una delle principali cause di fallimento delle terapie, soprattutto in stadi avanzati. Studi recenti hanno identificato precisi sottotipi molecolari di BC, ciascuno dei quali caratterizzato da una distinta prognosi, sopravvivenza e risposta a specifiche terapie: Luminal A, Luminal B, Luminal B HER2+, HER2+ e tumore della mammella triplo negativo (TNBC)³ Come illustrato nella Tabella 1, queste varianti si differenziano principalmente per l'espressione di alcuni geni quali: il recettore per gli estrogeni (ER), il recettore per il progesterone (PR), il recettore per il fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2) e per l'espressione della proteina Ki-67, una proteina nucleare strettamente correlata alla proliferazione cellulare. Il grado di espressione di questi geni permette non solo una diagnosi precisa del sottotipo molecolare e quindi l'elaborazione di una prognosi più accurata, ma è anche indicativo della risposta dei pazienti a specifiche terapie, quali la terapia endocrina, l'utilizzo di anticorpi monoclonali che hanno HER2 come target, l'utilizzo della chemioterapia, o una combinazione di questi trattamenti⁴.

Luminal A	ER e PR positivo HER2 negativo Basso rischio di recidiva (Ki-67 < 14%).
Luminal B	ER positivo HER2 negativo ed almeno uno tra: PR negativo o poco espresso; Alto rischio di recidiva (Ki-67 ≥ 14%).
Luminal B HER2+	ER positivo HER2 positivo PR negativo
HER2+	HER2 positivo ER e PR negativi
TNBC	HER2 negativo ER e PR negativi

Tabella 1. Differenze molecolari nelle varianti di BC.

1.1.1 Epidemiologia ed eziologia

Il TNBC rappresenta circa il 10-15% di tutti i BC, ed è epidemiologicamente associato a donne di giovane età, donne portatrici di una mutazione del gene di suscettibilità al BC (BRCA), donne che abbiano avuto un menarca precoce, breve durata dell'allattamento, obesità in fase di premenopausa, ed etnia afroamericana⁵. Nonostante la relativa bassa incidenza rispetto ad altri sottotipi molecolari di BC, il TNBC mostra un comportamento estremamente aggressivo, è spesso associato ad un alto grado istologico, ed è caratterizzato da rapida proliferazione e precoce coinvolgimento dei linfonodi locali. Inoltre, il TNBC si contraddistingue per un elevato tasso di recidiva, spesso precoce, alta invasività e potenzialità metastatica, fattori che sono responsabili di una prognosi infausta^{6,7} Nel TNBC la frequenza con cui si presentano le metastasi è comparabile a quella riscontrata nel sottotipo molecolare HER2+, anch'esso considerato molto aggressivo, ma è maggiore di circa il 50% rispetto ai sottotipi Luminal A e B⁸.

A causa della sua rapida proliferazione, il TNBC è solitamente diagnosticato quando ha ormai raggiunto dimensioni considerevoli e in molti casi ha già coinvolto i linfonodi al momento della diagnosi. Il TNBC è caratterizzato dall'assenza di espressione per ER, PR, e HER2. Queste caratteristiche rendono il TNBC particolarmente difficile da trattare, poiché le pazienti affette da questa neoplasia non possono beneficiare di alcune opzioni terapeutiche, quali terapie endocrine o a bersaglio molecolare dirette contro HER2.

Nonostante nell'ultima decade ci siano stati importanti progressi nell'ambito delle opzioni terapeutiche applicabili a molti sottotipi di BC, il trattamento del TNBC prevede ancora la chemioterapia come prima opzione terapeutica da accoppiare alla chirurgia, a causa della mancanza di target terapeutici specifici.

Inoltre, il quadro è complicato dal fatto che il TNBC in sé è scarsamente omogeneo: indagini genetiche hanno identificato una significativa eterogeneità intertumorale, che si riflette nell'esistenza di almeno 6 sottogruppi di TNBC⁹:

- 2 tipi di Basal-Like (BL 1 e BL2);
- Immuno-modulatorio (IM);
- Mesenchimale (M);
- Staminal mesenchimale (MSL);
- Con recettori per gli androgeni (LAR).

I diversi sottotipi di TNBC sono caratterizzati da patterns d'espressione diversi. Il tipo BL1 mostra un'augmentata espressione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella divisione cellulare e nella riparazione del DNA. Il BL2 mostra un profilo di espressione genica peculiare, che coinvolge vari fattori di crescita, marker per la glicolisi e la gluconeogenesi. Entrambi i sottotipi BL sono caratterizzati da una risposta positiva alla chemioterapia neoadiuvante. Il TNBC mesenchimale è caratterizzato da un'augmentata espressione dei geni coinvolti nella motilità cellulare. I sottotipi LAR

mostrano le stesse vie di regolazione metabolica dei classici Luminal e sono influenzati dalla risposta agli androgeni conseguente all'elevata presenza di recettori molecolari per steroidi, porfirine, estrogeni, e soprattutto androgeni. La classificazione dei restanti sottogruppi è incerta, in quanto mostrano delle similarità che pongono dubbi sul fatto che questi siano effettivamente gruppi biologici differenziabili, o che essi rappresentino la stessa entità¹⁰. E' stato ipotizzato che il sottotipo immunomodulatorio e lo staminale mesenchimale derivino rispettivamente da Linfociti infiltranti il tumore (TILs) e da cellule stromali associate al tumore¹¹. I due Basal like, noti anche come Basal like immuno-soppressi (BLIS) e Basal like immuno-attivati (BLIA), mostrano rispettivamente la migliore e la peggiore aspettativa di vita.

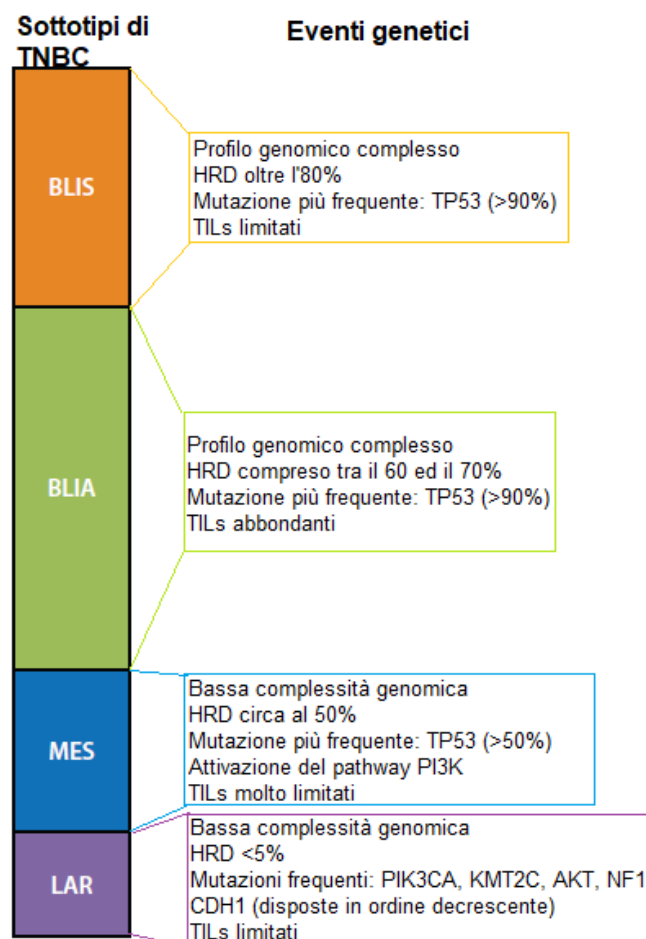


Figura 1. Interazioni tra alterazioni genetiche e micro-ambienti nei diversi sottotipi di TNBC.

Come illustrato nella Figura 1, i BLIA rappresentano la maggioranza dei tumori al seno tripli-negativi, con un profilo genomico complesso che mostra mutazioni al gene TP53 in più del 90% dei casi, ed un'alta frequenza di ricombinazione omologa, associata ad una scarsa efficienza di riparazione dei danni al DNA (HRD). Anche i BLIS mostrano mutazioni a carico del gene TP53 e modifiche nell'HRD, ma sono associati ad una quantità di TILs significativamente più bassa rispetto ai BLIA¹². Insieme, rappresentano la maggior parte dei tumori che presentano una mutazione del gene BRCA a carico della linea germinale e/o somatica. Il sottotipo mesenchimale è caratterizzato da una complessità genomica più bassa e dall'attivazione della Fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). I tumori LAR sono quelli con complessità più bassa tra questi gruppi, con mutazioni a livello di vari pathway metabolici e mostrano mutazioni simili a quelle ritrovate nei Luminal B¹¹.

1.1.2 Fattori di rischio e cause genetiche

Il TNBC è associato ad una serie di fattori, che possono essere modificabili o non modificabili. Tra i fattori non modificabili ritroviamo:

- Età – si rileva un'incidenza che varia dal 23,3% nelle donne sotto i 30 anni, fino al 10% in pazienti con più di 70 anni¹³. La giovane età è stata anche associata al sottotipo Basal-like, mentre le pazienti che superano i 65 anni mostrano maggiormente sottotipi diversi¹⁴.
- Mutazione del gene BRCA – quasi il 70% dei casi di BC, nelle donne in età di premenopausa portatrici della mutazione BRCA, appartengono al sottotipo triplo negativo¹⁵. È stato stimato che l'incidenza del TNBC, nel corso della vita di queste donne, è maggiore del 18% rispetto a chi non è portatrice di questa mutazione¹⁶.
- Età al menarca – un menarca con esordio in giovane età è correlato ad un maggior rischio di sviluppare tumori del seno. Sebbene non vi sia una netta correlazione con lo sviluppo del TNBC, metanalisi effettuate su più di 100000 donne hanno dimostrato un maggior rischio di sviluppare tumori ER negativi in donne che hanno mostrato un menarca precoce¹⁷.

- Densità del tessuto mammario – frazionando il tessuto in relazione alla sua densità, è possibile classificare il tessuto mammario come ad alta densità, bassa densità, e in tessuto ricco di adipe. Un tessuto mammario ad alta densità predispone maggiormente allo sviluppo di un cancro al seno sia in donne pre- e post-menopausa.
- Storia riproduttiva ed allattamento – le gravidanze portate a termine (specialmente in giovane età) sono associate ad un ridotto rischio di contrarre il BC; questo rischio si riduce maggiormente in caso di preeclampsia. Tale riduzione del rischio sembrerebbe dipendere dai livelli ormonali non regolari, quali un incremento di progesterone ed un decremento di estrogeni, insulina, cortisolo, IGF1, ecc. Anche l'allattamento risulta essere un fattore protettivo, nei confronti di tumori ER/PR positivi o negativi.
- Etnia – c'è una maggiore prevalenza di TNBC in donne di etnicità nera, con ulteriori distinzioni fatte tra popolazione dell'Africa occidentale, dell'Africa orientale, Afro-americani e popolazioni ispaniche. Tale prevalenza potrebbe dipendere totalmente o in parte da fattori quali il tenore di vita ed il numero di gravidanze⁴.
- Mutazioni geniche – diverse mutazioni sono associate a un aumento del rischio di sviluppare un BC. I due geni più importanti correlati con la carcinogenesi sono il gene BRCA1 (localizzato sul cromosoma 17) e il gene BRCA2 (localizzato sul cromosoma 13). Le mutazioni citate, vengono trasmesse con modalità autosomica dominante. Altre mutazioni significative sono a carico dei geni TP53, CDH1 (caderina epiteliale), PTEN (omologo della fosfatasi) e STK11 (serina-treonina chinasi).

Tra i fattori modificabili si annoverano:

- Obesità – l'elevato peso corporeo è correlato ad una moltitudine di tumori, a causa delle conseguenti alterazioni nel metabolismo degli ormoni sessuali e ad una diversa produzione di citochine ad opera del tessuto adiposo¹⁸. Valutando il rischio nelle donne in età fertile, le pazienti in sovrappeso mostrano un rischio maggiore di sviluppare tumori ER/PR negativi¹⁹.

- Uso di farmaci – l'utilizzo di varie tipologie di farmaci è correlato allo sviluppo di BC; se questi vengono assunti in gravidanza (e.g. Dietilstilbestrol per prevenire l'aborto), aumentano il rischio anche nel bambino. Tra questi farmaci si annoverano la terapia ormonale sostitutiva, o l'uso di alcune classi di antidepressivi. Il rischio aumenta con l'età, con un rischio che diventa 1,9 volte maggiore nelle donne che superano i 40 anni.
- Attività fisica – è stato osservato che in donne con familiarità al BC l'attività fisica è associata ad un rischio ridotto di sviluppare un BC. Questo potrebbe dipendere da una ridotta esposizione agli ormoni sessuali in grado di alterare la risposta del sistema immunitario o i livelli circolanti di IGF1 (insulin-like growth factor 1).
- Alcol e fumo – il consumo eccessivo di alcol aumenta il rischio di sviluppare un BC a causa dei livelli di estrogeni che aumentano in seguito all'utilizzo di alcolici, causando uno squilibrio ormonale negli organi sessuali. Analogamente, il fumo aumenta il rischio di carcinogenesi a causa di mutazioni oncogene dovute all'inattivazione di alcuni geni soppressori (in particolare p53); inoltre, non solo il fumo attivo, bensì anche quello passivo aumentano tale rischio.
- Esposizione ad agenti chimici – l'esposizione cronica ad alcuni agenti chimici può promuovere la carcinogenesi inducendo modifiche epigenetiche; ad esempio, il Diclorodifeniltricloroetano (DDT) è tra gli agenti più studiati, poichè l'esposizione ad esso interrompe lo sviluppo delle ghiandole mammarie².

1.1.3 Sintomatologia e diagnosi clinica

La sintomatologia del BC può essere divisa in sintomi associati a noduli e sintomi non associati a noduli. Nelle fasi iniziali, il BC è spesso asintomatico. Nella maggior parte dei casi, le formazioni neoplastiche non sono dolenti, anche in caso di lesione maligna. Intervalli lunghi tra i vari screening diagnostici spesso comportano una diagnosi tardiva e sono associati a una sopravvivenza inferiore ai cinque anni.

Sintomi	N° di donne	Frequenza relativa (%)
Nodulo al seno	1922	83
Anormalità ai capezzoli	158	6,8
Dolori al seno	149	6,4
Anomalie pelle del seno	46	2
Noduli ascellari	27	1,2
Ulcerazioni	25	1,1
Dolori alla schiena	24	1
Anomalie contorni seno	17	0,7
Infiammazioni al seno	15	0,6
Rigonfiamenti del seno	14	0,6
Dolori muscolo/scheletrici	14	0,6
Mancanza di fiato	11	0,5
Sfoghi sul seno	10	0,4
Noduli al collo	9	0,4
Dolori addominali	8	0,3
Altre anomalie mammarie	8	0,3
Dolori al petto	8	0,3
Affaticamento	7	0,3
Perdita di peso	6	0,3
Tosse	6	0,3
Dolori ascellari	5	0,2
Lividi al seno	5	0,2
Edema del tronco	5	0,2
TOTALE	2316	100

Tabella 2. Sintomatologia correlata al BC.

I sintomi non associati a noduli sono spesso confusi con altre cause non correlabili ad un tumore, quali cambiamenti ormonali, urti e traumi, o dolori da allattamento nel caso di donne che hanno

partorito da poco. È stato quindi effettuato uno studio su un campione ampio di donne affette da BC raggruppando le pazienti sulla base dei sintomi presentati, come riportato nella Tabella 2.

È interessante notare come i sintomi siano di tipologie diverse: si possono infatti suddividere in nodulari, non associabili al nodulo, sintomi che coinvolgono il seno, e sintomi che non coinvolgono il seno²⁰. Circa 1 donna su 6 affetta da BC, presenta una sintomatologia diversa dalla presenza di noduli, che si traduce in un importante ritardo nella diagnosi.

La diagnosi di BC avviene tramite valutazione clinica senologica e con immagini radiologiche specifiche. La visita senologica inizia con una valutazione fisica, in cui si cercano eventuali irregolarità, addensamenti e/o noduli palpabili, valutazione che però non è in grado di evidenziare lesioni maligne di dimensioni molto piccole tanto da essere accompagnata da tecniche di imaging quali la mammografia e l'ecografia mammaria.

La mammografia è una delle modalità di imaging usata per valutare le pazienti con sintomi clinici rilevabili, e la sua utilità è stata ormai ben stabilita. Il suo utilizzo fornisce un ottimo contributo nella scoperta e nel trattamento del BC già dalle fasi iniziali. Nonostante le sue limitazioni, tra cui una ridotta sensibilità nelle donne in fase di premenopausa o con tessuto mammario molto denso, rimane una delle tecniche più importanti utilizzate per la diagnosi di BC²¹.

L'ecografia mammaria è un altro importante esame di diagnostica per immagini utilizzato per la diagnosi di BC. Sebbene in passato fosse considerata utile solo per la diagnosi di cisti, ad oggi si ritiene più efficace rispetto alla mammografia in specifiche situazioni quali, ad esempio, seno con tessuto parenchimale denso, che è anche associato ad un rischio più alto di sviluppo di BC. Gli ultrasuoni sono utili per valutare anche la presenza di lesioni di piccole dimensioni, andando ad adiuvarle le immagini mammografiche migliorandone le capacità diagnostiche²².

1.1.4 Classificazione macroscopica e istopatologica

Definire la progressione del BC non è possibile a causa di una mancanza di marcatori che possono definire iperplasie, carcinomi *in situ* e tumori invasivi. Il carcinoma *in situ* si distingue in duttale o lobulare, con modelli di crescita e divergenze citologiche che consentono di differenziare queste due tipologie. La forma di carcinoma duttale *in situ* (DCIS) è più comune rispetto alla forma lobulare (LCIS). Tra i BC invasivi, il carcinoma duttale infiltrante (IDC) è il sottotipo più comune, arrivando a rappresentare il 70-80% del totale dei tumori infiltranti²³. Tale sottotipo viene ulteriormente classificato in: ben differenziato (grado 1), moderatamente differenziato (grado 2) o scarsamente differenziato (grado 3), basandosi sul livello di pleomorfismi nucleari, formazioni tubulo/glandolari, e tasso di divisione mitotica²⁴. Morfologicamente, la maggior parte dei TNBC sono carcinomi duttali non altrimenti specificati (NST); ne esistono però anche altre tipologie sebbene meno frequenti (Figura 2). Tra queste ritroviamo:

- carcinoma di tipo midollare – è un raro e distinto sottogruppo di carcinoma che conta meno del 5% dei BC invasivi. Questo sottotipo istologico ha un modello di crescita sinciziale che copre almeno il 75% dell'intero tumore, un grado intermedio/alto, un'infiltrazione linfocitaria diffusa ed una mancanza di componenti intra-duttali²⁵.
- carcinoma metaplastico della mammella – sottogruppo riscontrabile in meno dell'1% dei casi. È caratterizzato da elevata eterogeneità, con differenziazione dell'epitelio neoplastico in cellule squamose e/o dall'aspetto mesenchimale. Questo sottotipo è molto aggressivo e mostra prognosi peggiori rispetto ad altri tumori del seno²⁶.
- carcinoma adenoide cistico della mammella – ricopre appena lo 0,1% dei tumori della mammella. Questa tipologia è comune nelle ghiandole salivari, ma può svilupparsi in tessuti diversi come naso-faringe, polmoni, utero e mammella. I pattern di crescita possono essere cribriformi, ghiandolari, trabecolari e solidi²⁷.

- carcinoma secretorio della mammella – molto raro, è generalmente diagnosticato in bambini e giovani adulti. Solitamente è unifocale anche se in letteratura sono presenti casi di carcinoma secretorio multifocale. Data la modalità di invasione “a isolotti” e le sue strutture cribriformi, spesso viene confuso con DCIS nelle biopsie ad ago aspirato²⁸.

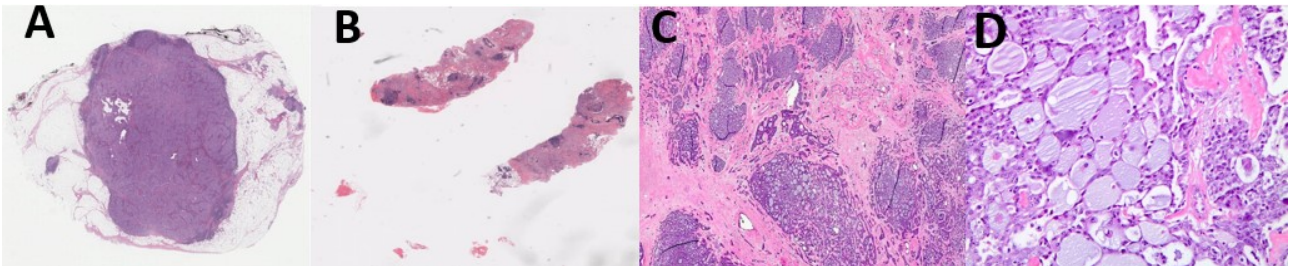


Figura 2. Colorazioni immunoistochimiche di carcinoma Midollare (A), Metaplastico della mammella (B), Adenoide cistico (C) e Secretorio (D). Immagini ottenute da www.pathologyoutlines.com.

A causa della rapida crescita, i TNBC sono diagnosticati più facilmente in maniera clinica (e.g. con palpazione) e meno spesso con screening. Da immagini di risonanza magnetica, quasi il 77% dei TNBC appare come una massa ovale o tondeggianti, con margini irregolari (Figura 3).

I TNBC si differenziano dagli altri tumori della mammella anche per modalità di diffusione e per esiti clinici. Il rischio di recidiva e morte nei pazienti con TNBC mostra un picco a circa tre anni dalla diagnosi, ma superato questo arco temporale, diminuisce rapidamente. Le metastasi comunemente si diffondono nei tessuti extra-scheletrici come cervello, sistema nervoso centrale, polmoni e fegato; la sopravvivenza media in caso di metastasi al cervello, è inferiore a sei mesi²⁹.

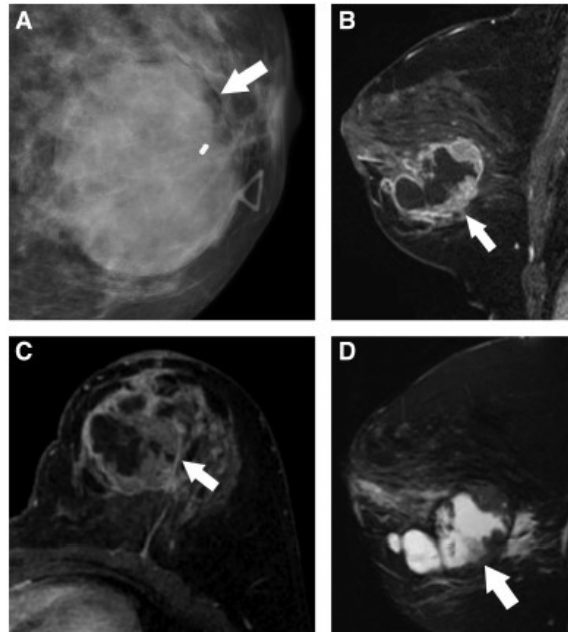


Figura 3. Mammografia (A) che mostra una massa rotonda parzialmente oscurata. Immagine sagittale (B) ed assiale (C) ottenute con risonanza magnetica. Bordi tumorali messi in evidenza (D).

1.1.5 Stadiazione

Lo stadio di un tumore è la rappresentazione sintetica dell'estensione anatomica della neoplasia. Stabilire lo stadio di un tumore è necessario in quanto consente al clinico di elaborare un trattamento appropriato, fornisce elementi utili alla prognosi e consente una più chiara valutazione dei risultati del trattamento. La stadiazione dei BC utilizza il sistema TNM che si basa sulla valutazione di tre elementi:

- T – estensione del tumore primitivo. A sua volta si divide in:
 - TX – Tumore primitivo non definibile
 - T0 – Tumore primitivo non evidenziabile
 - Tis – Carcinoma *in situ*
 - T1, T2, T3, T4 – Dimensione locale del tumore primitivo.

- T1 – tumore < 2 cm
 - T1mic: microinvasione della dimensione massima di 0,1 cm
 - T1a: tumore dalla dimensione compresa tra 0,1 cm e 0,5 cm
 - T1b: tumore dalla dimensione compresa tra 0,6 cm e 1 cm
 - T1c: tumore dalla dimensione compresa tra 1,1 cm e 2,0 cm
- T2 – tumore > 2 cm e < 5 cm
- T3 – tumore > 5 cm
- T4 – tumore di qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute.
- N - assenza o presenza ed estensione di metastasi ai linfonodi regionali. Il primo a essere valutato è il linfonodo sentinella, cioè il primo linfonodo a ricevere il drenaggio linfatico del tumore primitivo. La classificazione prevede:
 - NX linfonodi regionali non valutabili (ad esempio, se precedentemente asportati)
 - N0 linfonodi regionali liberi da metastasi
 - N1, N2, N3 Aumento dell'interessamento dei linfonodi regionali
- M - assenza o presenza di metastasi a distanza:
 - M0– Metastasi a distanza assenti
 - M1– Metastasi a distanza presenti

Utilizzando i parametri T, N e M viene successivamente stabilito lo stadio della lesione maligna (Tabella 3), che varia da un valore 0 (tumore *in situ*) ad un valore 4 (metastasi a distanza).

L'ulteriore stratificazione adottata è tale da assicurare che ogni stadio sia il più omogeneo possibile rispetto alla sopravvivenza attesa. In molti casi vengono fornite ulteriori informazioni, quali dimensioni del tumore e numero dei linfonodi prelevati e metastatici. La dimensione della lesione è un dato determinante per la definizione del parametro T; il numero di linfonodi coinvolti, invece, è un parametro aggiuntivo che migliora notevolmente la sensibilità dello stadio N. In caso di tumori

classificati N0, il numero dei linfonodi totali repertati assume un importante ruolo di controllo della qualità della stadiazione

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio I A	T1	N0	M0
Stadio I B	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
Stadio II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Stadio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadio III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stadio III B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stadio III C	Ogni T	N3	M0
Stadio IV	Ogni T	Ogni N	M1

Tabella 3. Stadiazione tumorale mediante i parametri T, N ed M.

1.1.6 Terapia

A differenza di altri BC, il TNBC rappresenta una sfida importante dal punto di vista clinico, in quanto l'assenza di recettori per gli estrogeni e di HER2 preclude l'utilizzo di terapie endocrine o di anticorpi monoclonali diretti contro HER2, complicando notevolmente il trattamento di questa neoplasia. Nonostante la prognosi infausta e l'alta aggressività di questa neoplasia, un significativo numero di pazienti mostra una particolare sensibilità alla chemioterapia se comparata a quella riscontrata in pazienti affette da BC ER positivo. Infatti, circa il 30-40% delle pazienti con TNBC ottiene una risposta patologica completa (pCR) in seguito al trattamento con chemioterapia neoadiuvante. Le pazienti che hanno raggiunto una pCR mostrano una buona prognosi con un rischio di recidiva ridotto del 70%³⁰. Tuttavia, una percentuale importante di pazienti risulta naturalmente resistente al trattamento chemioterapico o sviluppa una forma di resistenza importante a seguito del trattamento, limitando i benefici della chemioterapia nel lungo periodo aumentando drasticamente il tasso di mortalità³¹.

Le opzioni terapeutiche utilizzabili per il trattamento del TNBC comprendono:

- Escissione chirurgica – le modalità di escissione chirurgica variano da una chirurgia conservativa fino a una mastectomia totale. Le pazienti affette da TNBC sono maggiormente propense ad una mastectomia (rimozione totale della mammella), piuttosto che ad una lumpectomia (rimozione del tumore e dei suoi bordi). Nonostante lo “status” molecolare triplo negativo, la scelta della chirurgia poggia comunque su diverse variabili, sia clinico-patologiche sia legate alle preferenze della paziente. Dopo l'opzione chirurgica, il tasso di recidiva locale è più basso rispetto ad altri sottotipi di BC, e pertanto la chirurgia è considerata il trattamento di elezione.
- Radioterapia – la radioterapia trova indicazione terapeutica in seguito a mastectomia; viene usata anche in caso di chirurgia conservativa, ma in questo caso è meno efficace. Le donne con mutazioni a carico del gene BRCA hanno una deficienza nella riparazione della doppia

elica di DNA e pertanto sono potenzialmente radiosensibili. In questi casi, la radioterapia contribuisce all'eradicazione di tumori con deficienza di BRCA1 anche occulti, e inoltre riduce il rischio di recidiva regionale.

- Chemioterapia – nonostante il TNBC risponda meglio alla chemioterapia rispetto ad altri BC, tale caratteristica non è da sola sufficiente a garantire una prognosi ottimale. Tale evidenza è correlata alla difficoltà nell'individuare rapidamente una terapia adatta e dalla capacità del TNBC di generare metastasi molto precocemente. Per il trattamento del TNBC si utilizzano taxani, derivati del platino quali il cisplatino (CDDP), antimetaboliti come il 5-fluorouracile (5-FU) ed antracicline come la doxorubicina⁵. Nonostante vengano ancora raccomandati nella terapia della malattia metastatica, diverse prove suggeriscono una mancanza di benefici specifici nel trattamento del TNBC. Il gene BRCA sembrerebbe avere un ruolo chiave nella sensibilità ai taxani. Dati preclinici, dimostrano che BRCA1 contribuisce alla sensibilità agli agenti anti-mitotici (anti-microtubuli). Inoltre, nonostante siano identificati carriers di BRCA1 che fanno parte del meccanismo, solo il 40% di pazienti che hanno ricevuto docetaxel e doxorubicina hanno ottenuto una risposta completa o parziale.

Il principale meccanismo di azione del cisplatino è correlato all'alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA, con formazione di addotti che ostacolano il processo e che si traducono nell'arresto del ciclo cellulare e nell'apoptosi. Inoltre, il cisplatino è in grado di dissociare p63 e p73, fattori di trascrizione espressi esclusivamente nei TNBC, che si associano al fine di impedire l'attività pro-apoptotica³².

Il 5-Fluoruracile è un composto organico con struttura molecolare simile alle pirimidine di DNA ed RNA. Grazie a questa struttura, funge da antimetabolita, interferendo col metabolismo nucleotidico e sostituendo i classici residui nella sintesi di acidi nucleici, portando a citotossicità e morte cellulare. Tuttavia, anche per tale molecola, esistono dei fattori di resistenza che in alcuni casi ne impediscono l'utilizzo³³.

La doxorubicina è un'antraciclina utilizzata per il trattamento di diverse neoplasie, incluso il BC, ed esercita la sua attività citotossica attraverso diversi meccanismi d'azione. Tra questi, ritroviamo la capacità di fungere da agente intercalante nelle eliche del DNA, la distruzione del meccanismo di riparazione del DNA ad opera della Topoisomerasi II, e la generazione di radicali liberi che danneggiano le membrane e le proteine cellulari. La maggiore limitazione nell'uso di questa molecola è la cardiotoxicità, di cui la dose cumulativa rappresenta il principale criterio di tossicità³⁴³⁵.

1.1.7 Prognosi e prevenzione

Le informazioni su età, dimensioni del tumore, stato dei linfonodi, stadio clinico e grado istologico giocano un ruolo importante nella prognosi del TNBC. Comparandoli con i tumori non triplo negativo, i TNBC sono caratterizzati da età inferiore, alto grado istologico, precoce coinvolgimento dei linfonodi, dimensioni tumorali maggiori, stadio più alto alla diagnosi ed un rischio di recidiva a 5 anni più elevato, con polmoni, fegato e cervello che sono i siti più comuni di metastatizzazione. Inoltre, il TNBC genera spesso recidive locali, ragione che favorisce la scelta di una mastectomia totale piuttosto che una chirurgia conservativa³⁶. Grado istologico e stadiazione sono molto importanti ai fini della prognosi, riducendo la sopravvivenza a lungo termine nelle pazienti con stadio tumorale più avanzato. Confrontando le condizioni con pazienti affette da BC non triplo negativo, le pazienti affette da TNBC hanno una prognosi peggiore in ogni stadio della malattia, anche a causa della impossibilità di utilizzare terapie ormonali che sono invece attuabili su altri sottotipi di BC³⁷.

Nelle donne ad alto rischio, che risulta da una storia familiare o da caratteristiche come densità del seno, sembrerebbe che l'uso di modulatori selettivi degli estrogeni riduca significativamente il rischio di cancro. Tale ipotesi è corroborata dai risultati di studi che hanno evidenziato come in seguito a gravidanze avute in giovane età si riscontrino delle modifiche nell'espressione di alcuni geni specifici atti a promuovere determinate popolazioni cellulari. Inoltre, si stima che quasi la metà dei BC possa essere prevenuta con uno stile di vita corretto, che includa uno stato di forma ottimale, moderato uso di alcolici, astensione dal fumo di sigaretta. Inoltre, è molto importante seguire una alimentazione sana con apporto di frutta e verdura variegata, in quanto è stato dimostrato che una corretta alimentazione riduce il rischio di sviluppare tumori ER negativi³⁸.

1.2 L'ENZIMA PARAOXONASI-2

1.2.1 Caratteristiche strutturali, espressione tissutale e localizzazione cellulare

La Paraoxonasi-2 (PON2) è un enzima che fa parte delle Paraoxonasi (PON), famiglia proteica altamente conservata anche tra specie diverse, e che nell'uomo presenta tre geni diversi: PON1, PON2 e PON3. Analisi filogenetiche mostrano come la PON2 sia il membro più antico della famiglia, con PON1 e PON3 che si sono evoluti da esso³⁹ (Figura 4).

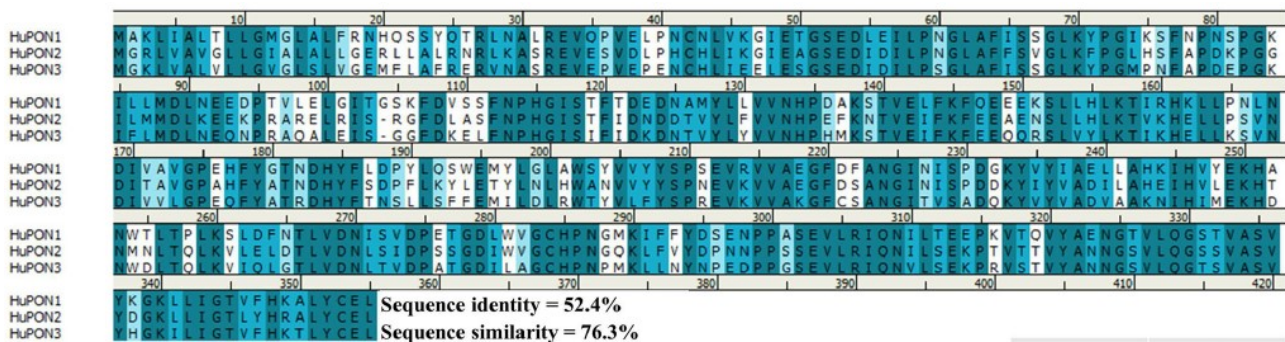


Figura 4. Allineamento dei membri della famiglia enzimatica delle Paraoxonasi.

I geni che codificano per questi enzimi sono situati sul cromosoma 7, in loci vicini tra loro. Mentre PON1 e PON3 sono principalmente espressi nel fegato (in associazione alle lipoproteine ad alta densità, le HDL), PON2 è espressa in maniera ubiquitaria, ma non è presente nel plasma. I più alti livelli di PON2 si riscontrano nei polmoni e nell'intestino tenue, seguiti da cuore e fegato; anche se in misura minore, la PON2 è riscontrabile anche in testicoli, reni e cervello^{39,40}.

Il trascritto maturo del gene PON2 include una sequenza codificante di 1062 nucleotidi, che vengono tradotti in una proteina composta da 355 amminoacidi. E' possibile riscontrare due diverse isoforme della proteina PON2 caratterizzate da un diverso grado di glicosilazione e caratterizzate da un peso molecolare di 40 kDa per la versione non glicosilata e 43 kDa per la versione glicosilata. La struttura terziaria di PON1 è stata determinata attraverso esperimenti di diffrazione a raggi X partendo da

modelli ricombinanti. L'elevata omologia delle tre Paraoxonasi ha consentito di eseguire studi comparativi per la determinazione della struttura degli altri membri della famiglia, consentendo di modellare la struttura terziaria di PON2 (Figura 5). In questa Paraoxonasi, sono stati identificati residui amminoacidici deputati ad instaurare interazioni idrofobiche necessarie all'attività lattonasica e arilesterasica (Glu53, His115, Asn167, Asn224, Asp269, e Asn270). Inoltre, è stata riportata la presenza di due ioni Ca^{2+} nella regione centrale della molecola, che interagiscono rispettivamente con cinque (Asn269, Asn167, Asn223, Glu53, Asp268) e tre (Asp168, Asp51, e Ile116) residui amminoacidici⁴¹.



Figura 5. Struttura tridimensionale della PON2.

La proteina PON2 è classificata come una proteina transmembrana di tipo II caratterizzata da un dominio transmembrana situato nella regione N-terminale e da un dominio catalitico extracellulare nella regione C-terminale. Le Paraoxonasi sono ubiquitarie e sono note per contrastare il danno ossidativo e la perossidazione lipidica. La loro attività è data dalla capacità di idrolizzare, con varia

specificità, lattoni rappresentati dagli esteri dell'acido fosforico in forma salificata. La denominazione di Paraoxonasi deriva dagli studi condotti da Aldridge sulla capacità di queste proteine di detossificare il paraoxone (il metabolita attivo di un pesticida denominato parathion), evidenziando la presenza di attività esterasica nei confronti degli organofosfati. Nonostante il nome Paraoxonasi rappresenti tutte e tre le molecole, gli enzimi PON2 e PON3 non hanno o presentano una debolissima attività paraoxonasi; allo stesso modo, ognuno di questi enzimi mostra attività antiossidante ed antinfiammatoria. Comunque, la loro funzione fisiologica ed il loro substrato naturale restano ambigui⁴².

La localizzazione cellulare di PON2 è soprattutto a livello della regione perinucleare, nel reticolo endoplasmatico (ER) e nei mitocondri. La presenza di PON2 nei mitocondri, inoltre, suggerisce il suo ruolo antiossidante, oltre ad una funzione citoprotettiva. Difatti, carenze di questo enzima a livello mitocondriale causano disfunzioni cellulari (Figura 6)⁴³.

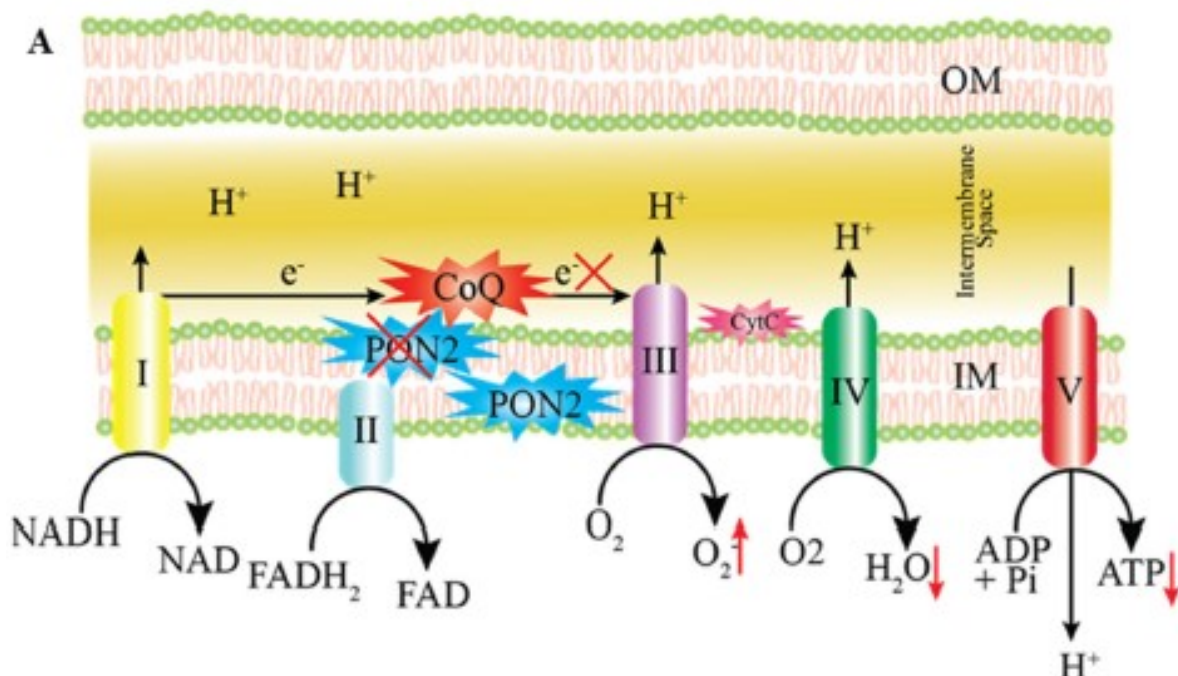


Figura 6. Presenza e funzione antiossidante di PON2 nella membrana mitocondriale interna.

1.2.2 Regolazione dell'espressione genica della PON2

Dato il ruolo patologico e fisiologico della PON2, molecole in grado di modulare i suoi livelli possono essere di interesse clinico. Sono note diverse molecole in grado di modulare l'espressione della PON2 (Tabella 4):

- Fattori di trascrizione – la trascrizione del gene della PON2 è regolata a livello genetico, ed è influenzata dallo stress ossidativo così come dai livelli di colesterolo. L'attivazione di diversi fattori di trascrizione, come la Binding protein 2 dell'elemento regolatorio degli steroli (SERBP-2), e la proteina attivatrice 1 (AP-1), è in grado di potenziare l'espressione della PON2. Inoltre, è stato dimostrato che i complessi dei recettori dei glucocorticoidi sono coinvolti nell'attivazione di AP-1, andando quindi ad attivare il gene della PON2⁴⁴.
- Ormoni – è ormai noto che gli ormoni abbiano un effetto regolatorio. Tale evidenza può essere utile per capire in modo più approfondito alcune patologie quali le malattie neurodegenerative, dato che si riscontrano livelli più alti di PON2 nel cervello femminile rispetto al cervello maschile. I livelli più bassi dell'enzima potrebbero essere una predisposizione a disordini conseguenti a stress ossidativo, tra cui Alzheimer e Parkinson, suggerendo come i livelli più elevati di PON2 nei neuroni dopaminergici femminili esercitino un ruolo protettivo⁴⁵.
- Modifiche post-traduzionali – tali modifiche sono in grado di modulare l'attività di PON2 dato che apportano cambiamenti sulle estremità. Un esempio è la sostituzione amminoacidica nella posizione 311 di una serina con una cisteina, fenomeno che provoca una glicosilazione alterata nella PON2 ricombinante che ne diminuisce l'attività lattonasica, nonostante i livelli di espressione e la localizzazione della proteina rimangano inalterati⁴⁶.
- Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei (FANS) – l'uso dei comuni FANS, come il Diclofenac sodico, è risultato esercitare un'azione modulatoria nei confronti dell'attività arilesterasica e lattonasica della PON2⁴⁷.

- Nutraceutica –flavonoidi e polifenoli sono da tempo noti per le loro proprietà antiossidanti, e per essere in grado di modulare la concentrazione enzimatica intracellulare di PON2. I flavonoidi estratti dal melograno influiscono sull’attività di legame al DNA del fattore di trascrizione AP-1, presente nella regione del promotore del gene di PON2. Più recentemente è stato dimostrato come alti livelli di glucosio siano in grado di ridurre i livelli fisiologici della PON2. La formazione di terminazioni glicate è indotta da elevati livelli di glucosio. In modelli cellulari endoteliali di vena ombelicale, l’overespressione della PON2 riduce i prodotti di derivazione delle glicazioni premature o tardive che siano ROS, infiammazioni e stress cellulari⁴⁸.

Modulatori	Regolazione
Farmaci	
Atorvastatina	Upregolazione dell’mRNA di PON2
Pioglitazone	Upregolazione dell’espressione proteica di PON nel cervello
Tenoxicam (FANS)	Downregolazione lattonasica ed arilesterasica
Diclofenac (FANS)	Downregolazione lattonasica
Nutraceutica	
Quercitina	Upregolazione attività lattonasica
Estratto Erba Mate	Upregolazione PON2 in macrofagi e monociti
Ormoni	
Estrogeni	Upregolazione PON2 mRNA e proteine
Gonadotropina corionica	Upregolazione PON2 mRNA e proteine
Composti alimentari	
Melograno	Upregolazione PON2 mRNA e proteine
Olio di Pesce	Upregolazione PON2 mRNA

Tabella 4. Molecole con effetto modulatorio sulla PON2.

1.2.3 Catalisi e substrati della PON2

Le Paraoxonasi presentano diverse specificità di substrato generalmente categorizzate sulla base della loro struttura molecolare in: organofosfati, esteri arilici e lattoni (Figura 7):

- Organofosfati – sono tri-esteri fosfati con un meccanismo d’azione associato all’inibizione dell’acetilcolinesterasi nel sistema nervoso centrale, catalizzando l’idrolisi di acetilcolina e causando una severa crisi colinergica.
- Esteri arilici – strutturalmente, consistono in esteri con un anello aromatico. Sebbene tutte le isoforme delle PON esprimano attività arilesterasica, l’attività di PON2 è molto limitata.
- Lattoni – sono esteri carbossilici ciclici con l’effetto di danneggiare la crescita cellulare, la biosegnalazione e il differenziamento. È molto probabile che l’azione delle PON avvenga metabolizzando ed andando ad alterare l’attività biologica dei lattoni, esogeni ed endogeni, giocando un ruolo importante in condizioni fisiologiche e patologiche. L’idrolisi di queste molecole avviene molto più velocemente rispetto ai loro analoghi non ciclici⁴⁹.

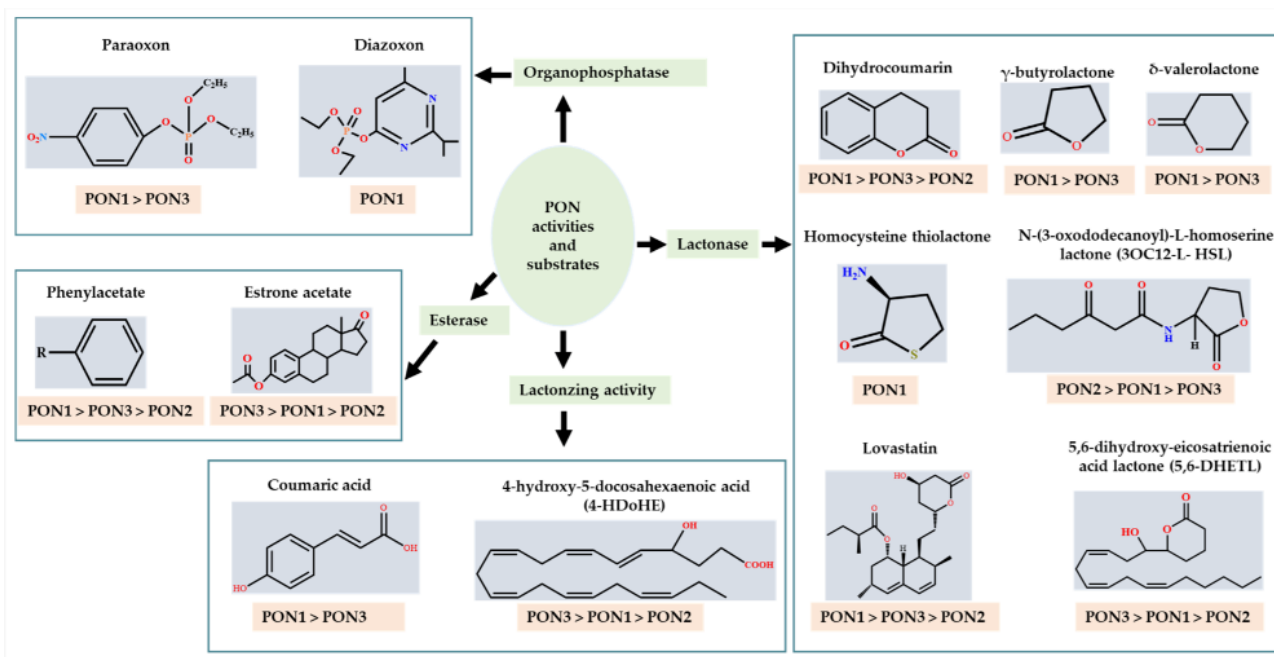


Figura 7. Attività delle PON e diversi substrati utilizzati.

La PON2 è up-regolata in risposta allo stress ossidativo in diverse tipologie cellulari e nei pazienti ipercolesterolemici. In uno studio su macrofagi trattati con agenti che inducono stress ossidativo, è stato rilevato un incremento dell'espressione della PON2 ed un aumento dell'attività lattonasica. Inoltre, bassi livelli di PON2 si riscontrano in assenza di stress ossidativo.

È bene specificare che solo la PON1 è in grado di catalizzare le tre attività (paraoxonasica, esterasica e lattonasica); difatti, PON2 e PON3 esercitano prevalentemente attività lattonasica, che viene espletata principalmente in presenza di substrati come diidrocoumarina (DHC) e l'acido (5S,6E,8Z,11Z,14Z)-5-idrossicoso-6,8,11,14-tetraenoico (5-HETE). Tali evidenze sono state confermate da altri studi che hanno verificato l'incapacità di PON2 di utilizzare come substrato gli organofosfati, e la sua ridotta capacità arilesterasica (Tabella 5)⁵⁰.

Substrato	PON1	PON2	PON3
Organofosfati			
Paraoxone(1mM)	1,94	ND	0,205
Clorpirifos oxone (0.32 mM)	40,9	ND	ND
Diazoxone (1mM)	113	ND	ND
Esteri			
Fenil acetato (1mM)	1120	0,086	4,1
p-NO ₂ -acetato (1mM)	15	0,7	39
p-NO ₂ -propionato (1mM)	13,6	0,96	20,7
p-NO ₂ -butirato (1mM)	1,3	1,4	11,4
Tiofenilacetato (1mM)	259	ND	0,48
Beta- naptilacetato (o.5mM)	139	ND	4,6
Estrone acetato (25µM)	0,137	0,004	0,515
Estrone propionato (25µM)	0,057	ND	0,220
17β-Estradiolo acetato (25µM)	0,125	0,005	1,06
17β-Estradiolo diacetato (10 µM)	1,00	0,509	55,4
Estrone Enolo Diacetato (10 µM)	0,987	0,955	31,8
17β-Estradiolo 3-Ac 17-ciclopentil-propionato (10µ M)	0,024	0,114	1,6
Lattoni aromatici			
Diidrocumarina (1mM)	129,9	3,1	126,1
2-Cumaronone (1mM)	135,7	10,9	40,7
Acido lattonico (1mM)	329,5	ND	ND
γ-Lattoni			
γ-Butirolattone (1mM)	32,1	ND	0,81
γ-Valerolattone (1mM)	45,0	ND	6,2
γ-Esalattone (1mM)	51,7	ND	23,9
γ-Eptalattone (1mM)	57,2	ND	27,7
γ-Ottalattone (1mM)	69,2	ND	25,6
γ-Nonalattone (1mM)	144,7	ND	30,9
γ-Decanolattone (1mM)	173,8	ND	45,6
γ-Undecanolattone (1mM)	127,6	ND	71,4
α-Angelica lattone (1mM)	183,0	ND	20,7
γ-Fenil-g-butirolattoe (1mM)	63,0	0,68	11,4

Tabella 5. Specifiche attività delle PON sui vari substrati.

1.2.4 Stress ossidativo e cancro: ruolo della PON2

La diversa collocazione delle proteine della famiglia delle Paraonasi conferisce loro la capacità di esercitare un ruolo protettivo nei confronti del danno ossidativo e della perossidazione lipidica. Nello specifico, la PON2 esercita la sua funzione sostanzialmente a livello intracellulare, mentre PON1 e PON3 risultano attive a livello plasmatico, in associazione alle lipoproteine HDL^{51,52}.

Grazie alla sua presenza ubiquitaria, è stato dimostrato che PON2 è in grado di contrastare in maniera estensiva il danno ossidativo (Figura 8), conferendole un ruolo cruciale nel contrastare l'insorgenza di numerose patologie riconducibili al danno da specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali trasformazioni maligne, malattie cardiovascolari e neurodegenerative⁵³.

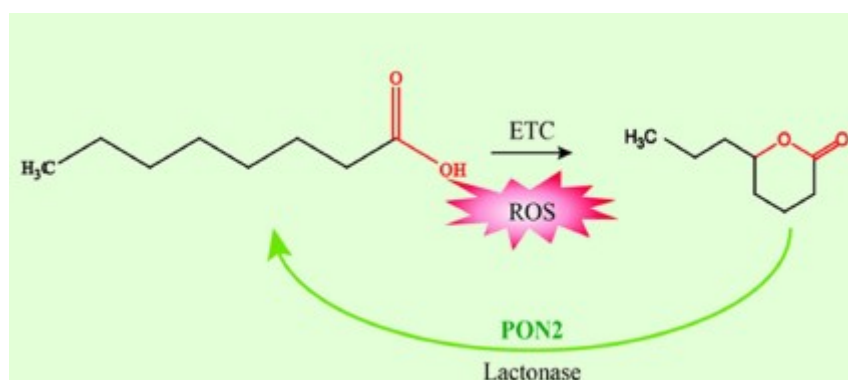


Figura 8. Formazione di lattoni da parte dei ROS e ruolo della PON2 nel ricostituire le catene di acidi grassi.

A livello intracellulare, la PON2 si localizza principalmente a livello della membrana mitocondriale e del reticolo endoplasmatico. Questa particolare distribuzione negli organelli rende ragionevole ipotizzare che PON2 eserciti un ruolo chiave nella prevenzione del danno ossidativo a livello dei mitocondri, modulando la presenza delle specie reattive dell'ossigeno e regolando quindi l'equilibrio apoptotico⁵⁴.

La maggior parte delle specie reattive dell'ossigeno viene tipicamente prodotta nel mitocondrio, dal momento che in esso hanno luogo le reazioni che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni.

Sebbene in questo processo la grandissima parte dell'ossigeno molecolare venga ridotto ad acqua, si stima che circa l'1% venga convertito in anione superossido⁵⁵. Quest'ultimo costituisce il principale precursore di una varietà di specie molto reattive come il perossido d'idrogeno e il radicale ossidrile, entrambi appartenenti ai ROS. Allo scopo di contrastare la formazione di ROS, il mitocondrio è corredato di un sistema enzimatico antiossidante, che include la glutazione perossidasi e la superossido dismutasi. L'attività dannosa dei ROS (Figura 9) è stata approfonditamente documentata, rilevando meccanismi di danno a carico di molteplici molecole che includono gli acidi nucleici, gli acidi grassi, e proteine⁵⁶. Quando il danno ossidativo coinvolge molecole con ruolo strutturale o enzimatico, il risultato può essere un funzionamento alterato o la morte della cellula. Tuttavia, la loro capacità di raggiungere i vari distretti cellulari diffondendo attraverso le membrane, pone l'attività di queste molecole in primo piano per quanto riguarda i danni a carico del DNA che possono produrre alterazioni oncogene⁵⁷.

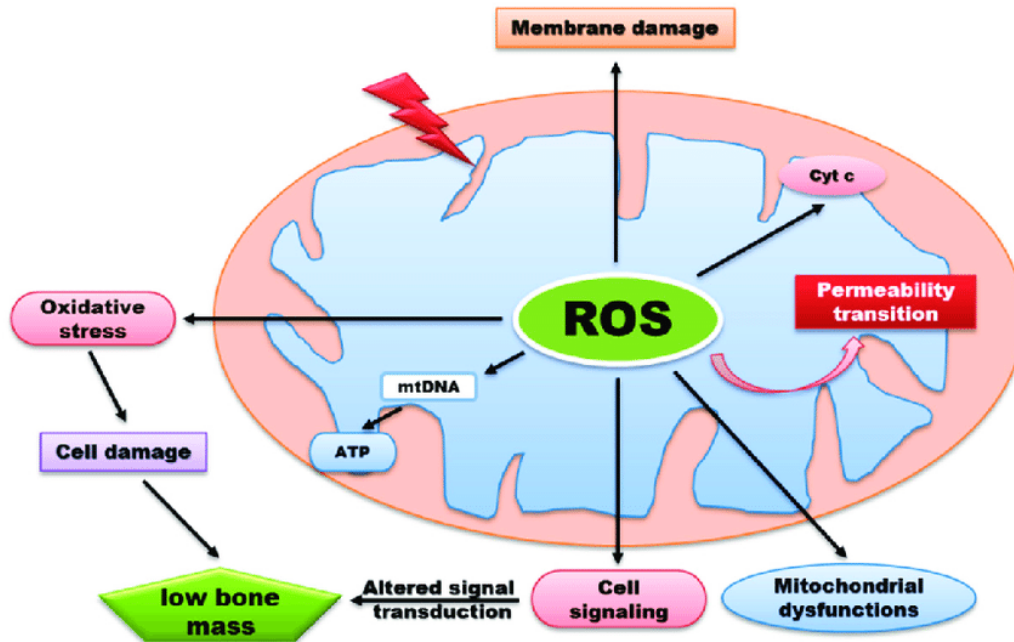


Figura 9. Danni provocati dai ROS a livello mitocondriale e cellulare.

L'aumento di stimoli pro-ossidanti associato all'inflammatione cronica rappresenta un significativo fattore di rischio oncogeno, che si declina nelle varie alterazioni che promuovono lo sviluppo e la progressione del tumore, tra cui:

- instabilità genomica;
- alterazioni epigenetiche, che si riflettono in una alterata espressione genica;
- proliferazione e invasività cellulare;
- disseminazione;
- chemioresistenza;
- radioresistenza.

Le cellule tumorali sono dotate di sistemi di difesa antiossidanti particolarmente efficienti in grado di proteggerle dai ROS; questa loro efficienza gli permette di sopravvivere e proliferare a discapito delle cellule sane, nelle quali elevati livelli di ROS determinano citotossicità (Figura 10)⁵⁸.

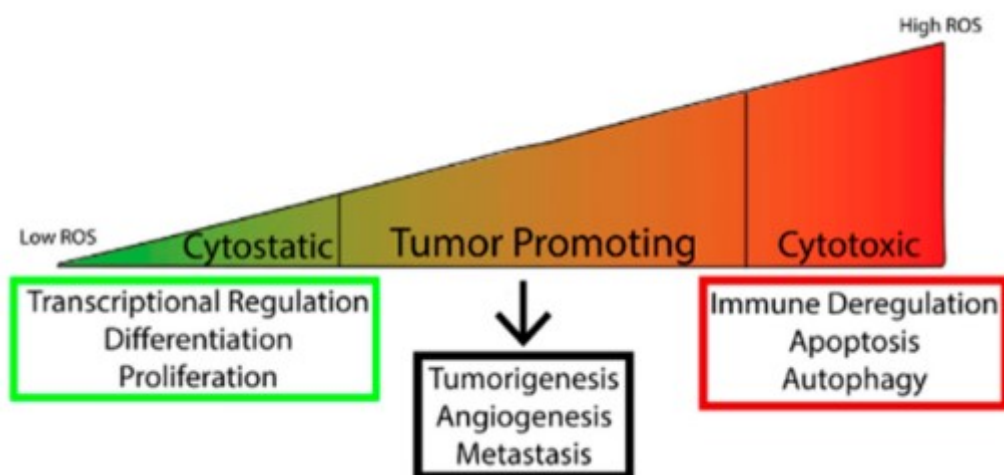


Figura 10. Danni causati alle cellule con l'aumentare della concentrazione di ROS.

L'infiammazione cronica è spesso associata all'insorgenza e alla progressione del cancro. Durante l'infiammazione, le cellule del sistema immunitario rilasciano citochine infiammatorie che promuovono la produzione di ROS e l'attivazione di processi ossidativi nel microambiente tumorale. L'aumento dello stress ossidativo può danneggiare le varie molecole presenti nelle cellule. In questo contesto, la PON2 potrebbe svolgere un ruolo importante nella modulazione dell'infiammazione e dello stress ossidativo nell'ambiente tumorale associata alla produzione dei ROS nel mitocondrio, grazie alla sua attività antiossidante e antinfiammatoria. Studi condotti su un'ampia coorte di pazienti hanno dimostrato un'aumentata espressione della PON2 in diverse tipologie tumorali, associata ad un'aumentata chemioresistenza. Tra queste tipologie tumorali, rientrano tumori del pancreas, fegato, rene, polmone, timo, prostata, e altri⁵⁹.

L'aumentata espressione della PON2 in cellule di leucemia mieloide cronica K562 è risultata correlata a una riduzione dell'apoptosi indotta da Bcr-Abl in seguito al trattamento con imatinib. Inoltre, gli effetti dell'aumentata espressione della PON2 sono stati studiati su cellule EA.hy926, nelle quali è stata riscontrata una riduzione degli effetti citotossici del chemioterapico doxorubicina e dell'attivazione della Caspasi-3. Questi effetti suggeriscono un ruolo pro-oncogeno della PON2 conferito dal suo potere anti-apoptotico⁶⁰.

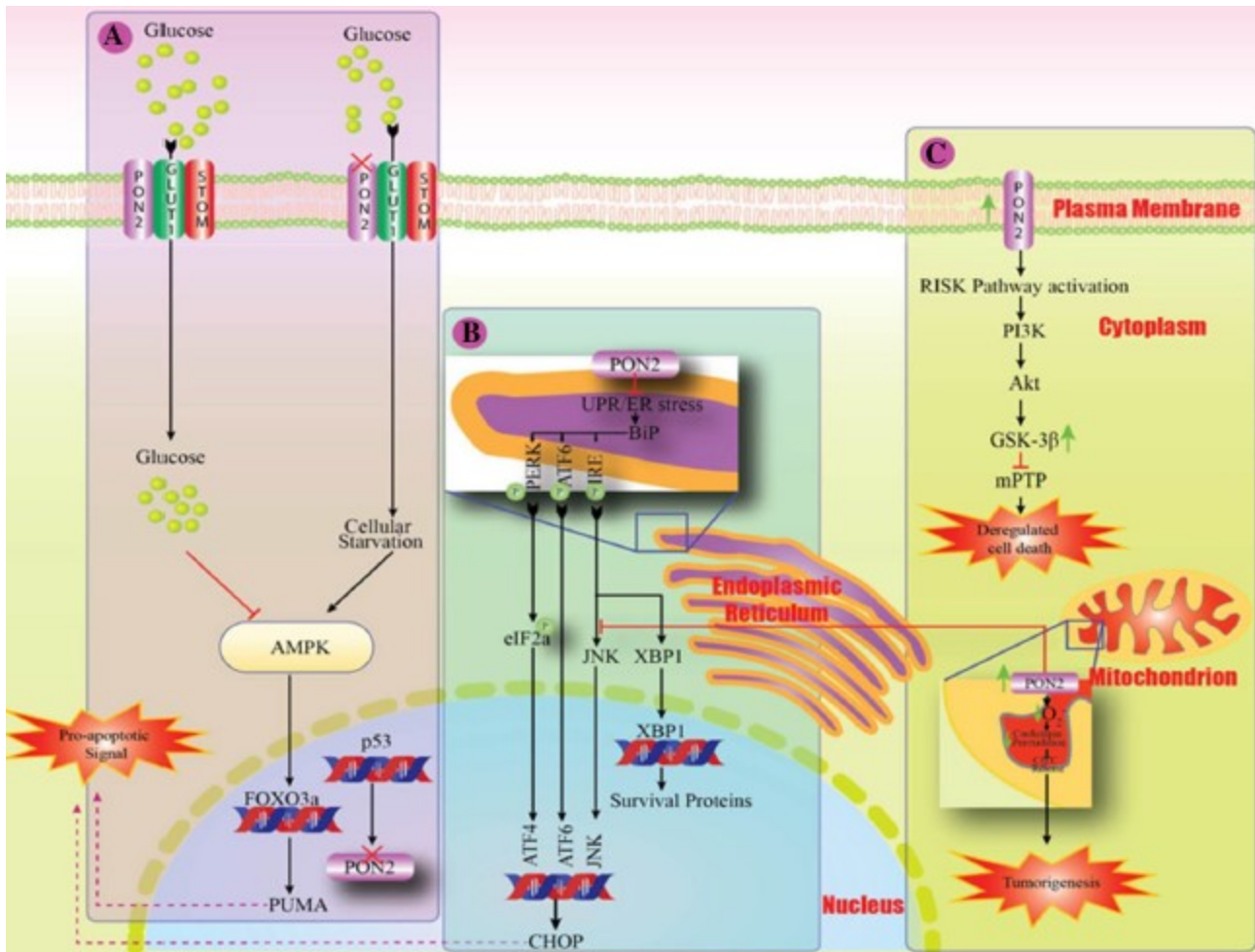


Figura 11. Effetti della PON2 nelle cellule tumorali nei vari distretti.

Similmente, PON2 contrasta lo stimolo apoptotico indotto dal danno a carico del reticolo endoplasmatico nelle cellule endoteliali (Figura 11). In questo caso, l'aumentata espressione della PON2 inibisce la sintesi della proteinchinasi JNK, impedendo l'attivazione di c-Jun e la conseguente trascrizione del fattore pro-apoptotico CHOP. A favore del ruolo antiapoptotico della PON2 depone anche l'osservazione che p53 reprime trascrizionalmente la Paraossinasi, e mutazioni di p53 possono determinare una overespressione della PON2. Infatti, questo enzima è risultato essere overespresso nei tessuti tumorali pancreatici (come nell'adenocarcinoma duttale pancreatico), dove una mutazione di p53 agevola la progressione metastatica (Figura 12)⁶¹.

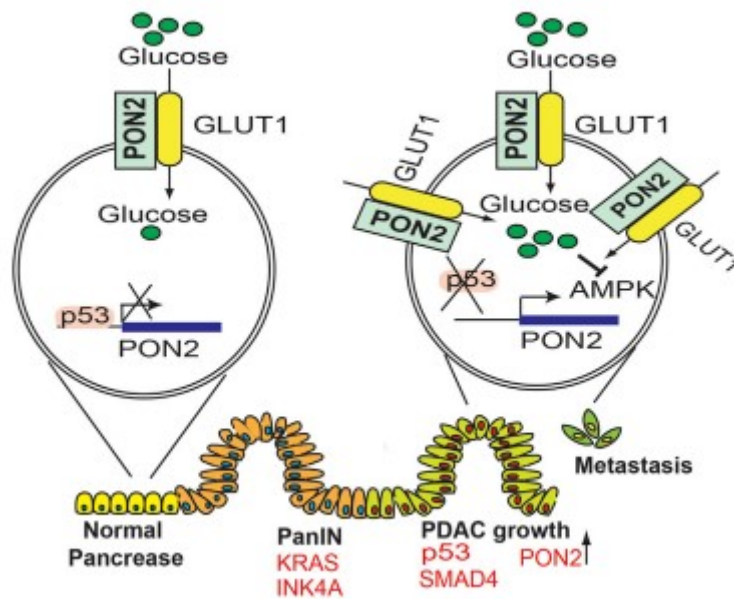


Figura 12. Effetti della mutazione di p53 sulla progressione metastatica.

È stato dimostrato che la PON2 modula positivamente l'espressione del trasportatore del glucosio GLUT1, oltre a disattivare il pathway della proteinchinasi attivata dall'AMP (AMPK). Questa chinasi si attiva in risposta al fabbisogno cellulare nelle cellule sane, fungendo da possibile soppressore del metabolismo tumorale. Dato che la PON2 causa un incremento nell'espressione di GLUT1, si ha sempre un elevato apporto di glucosio, evento che va a reprimere l'azione di AMPK; pertanto, azzerando un controllo sul metabolismo tumorale, la PON2 è in grado di promuovere la crescita tumorale^{62,63}.

L'efficacia dei chemioterapici attivatori della via apoptotica intrinseca come staurosporina e actinomicina D viene ridotta da un'aumentata espressione della PON2, agendo a livello delle Caspasi 3, 8, e 9. Nel caso della staurosporina, la cascata delle Caspasi viene attivata in seguito al rilascio del citocromo C dal mitocondrio in conseguenza della perossidazione della cardiolipina, un lipide della membrana mitocondriale interna. Dal momento che questo processo è favorito dalla presenza di ROS nel mitocondrio, la riduzione dei livelli di anione superossido determinata dall'attività di PON2 causa, in sequenza⁶⁰:

- la perossidazione della cardiolipina;
- il rilascio del citocromo C;
- l'attivazione delle caspasi;
- la morte cellulare.

Studi condotti sul carcinoma orale squamocellulare hanno dimostrato un'aumentata radioresistenza delle cellule neoplastiche che esprimono elevati livelli della PON2, che potrebbero essere associati all'attivazione della via Wnt/GSK3- β / β -catenin.

1.2.5 Altre funzioni della PON2

Diversi studi hanno dimostrato un coinvolgimento della PON2 in diverse condizioni patologiche (Figura 13)⁵⁰:

Malattie cardiovascolari – la PON2 sembra essere presente nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce e nei macrofagi, associata alla membrana plasmatica, alla membrana del reticolo endoplasmatico e alla membrana nucleare. L'effetto cardioprotettivo è stato dimostrato sia in modo sperimentale, che negli infarti reali. Tale effetto protettivo è attribuibile all'incremento dell'attività della PON2, che è in grado di migliorare le funzioni mitocondriali e ridurre la generazione di ROS. Sembra inoltre che nelle cellule endoteliali, PON2 vada a regolare la coagulazione e l'infiammazione, modulando l'attività tissutale con meccanismi ossido-riduttivi⁶⁴.

Infezioni batteriche – data la sua attività idrolitica, la PON2 esercita un ruolo cruciale nelle malattie infettive e nelle anomalie correlate come stress ossidativo, infiammazioni e modifiche nelle proteine sieriche. Alcuni studi mostrano come topi knockout per la PON2 siano maggiormente suscettibili allo sviluppo di infezioni batteriche rispetto ai topi *wild type*. Il ruolo della PON2 nella difesa cutanea da infezioni batteriche è dimostrato dal fatto che agisce sul quorum sensing (QS). La maggior parte dei

gram-negativi usano i lattoni per favorire questa attività, quindi l'attività lattonasica della PON2 è responsabile della soppressione del fenomeno del QS, offrendo un'importante difesa⁶⁵.

Malattie neurodegenerative – coerentemente con le funzioni precedentemente esposte, la PON2 contrasta anche lo stress ossidativo a carico del sistema nervoso centrale poiché, essendo una proteina localizzata nella membrana mitocondriale interna, si associa al Coenzima Q10, uno dei siti principali per la generazione dei ROS. Il legame PON2-Q10 va a sequestrare gli elettroni che genererebbero radicali dell'ossigeno piuttosto che essere trasferiti al citocromo C. L'assenza della PON2 causa un grave sbilanciamento nell'equilibrio redox che avviene nei mitocondri. Sembra inoltre, che i livelli della PON2 siano molto più elevati nelle fasi di sviluppo individuale piuttosto che a formazione cerebrale completa. Tale variazione potrebbe essere ricondotta al fatto che durante la crescita sia di fondamentale importanza preservare le funzioni cognitive. È bene chiarire che il ruolo citoprotettivo della PON2 dipende dalla tipologia cellulare, dato che in caso di formazioni neoplastiche, l'attività della PON2 proteggerebbe il tumore dall'apoptosi^{45,66}.

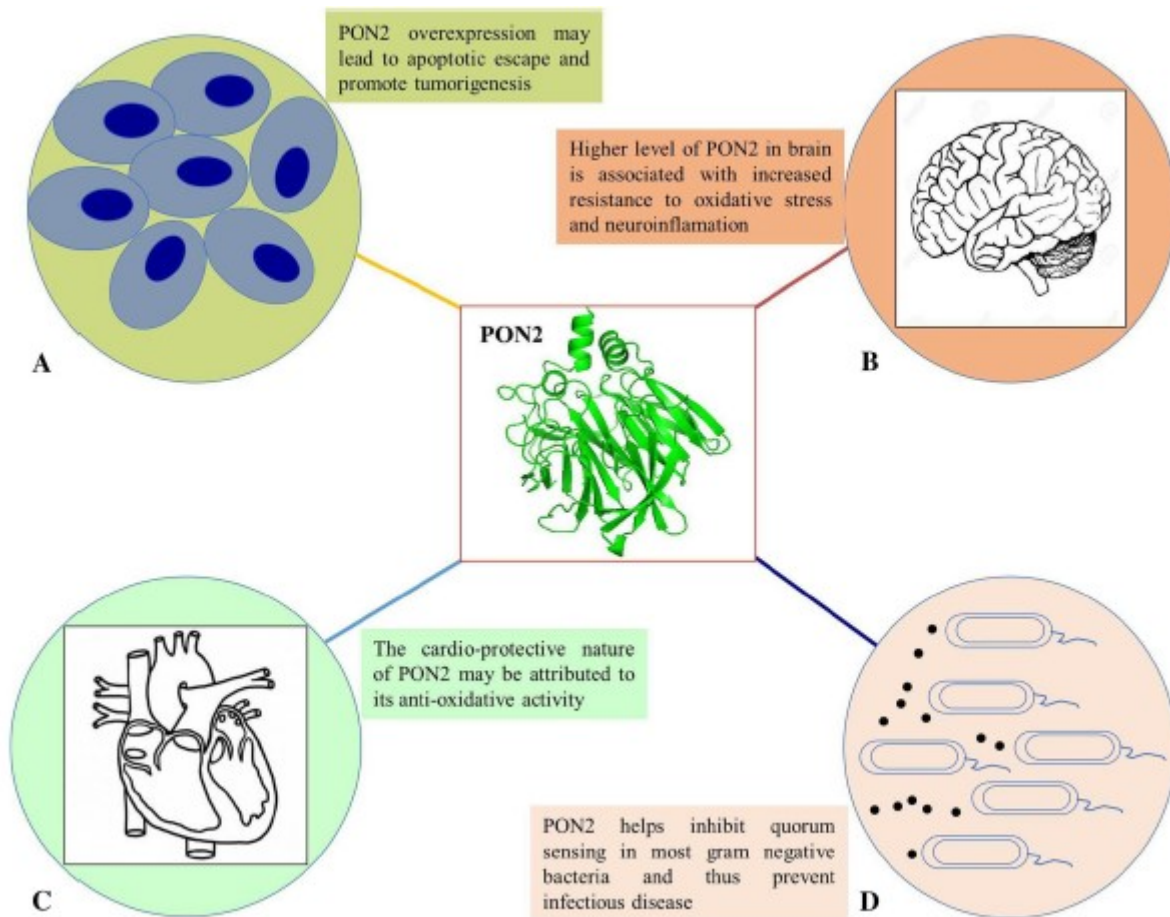


Figura 13. Differenti funzioni della PON2 .

2 MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI TISSUTALI

2.1.1 Selezione dei pazienti

Sono stati analizzati 56 campioni relativi a casi di BC, fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE), ottenuti dal Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica dell'Università Politecnica delle Marche, seguendo i criteri di esclusione riportati nella Figura 14.

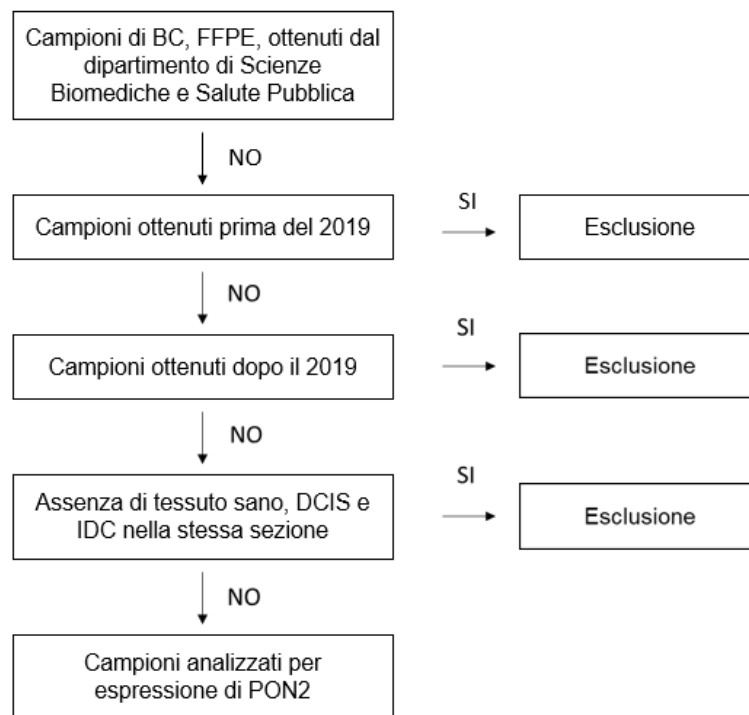


Figura 14. criteri di esclusione per i campioni selezionati.

Nello specifico, i casi di BC comprendevano: 11 Luminal A, 12 Luminal B, 11 Luminal B HER2+, 10 HER2+ e 12 TNBC. Il tessuto peritumorale sano è stato utilizzato come controllo. Di ogni singolo campione, è stata analizzata sia la porzione di carcinoma duttale *in situ* (DCIS) che la porzione di carcinoma duttale infiltrante (IDC). I casi di BC hanno compreso 56 donne, con età media di 65 anni

(età minima=38 anni; età massima=94 anni). Le condizioni demografiche e clinico-patologiche dei casi analizzati sono riportate nella Tabella 6.

Casi	56
Età media	65 (min 38-max 94)
Totale dei casi di Luminal A	11
Età media	57 (min 47-max 82)
Grado istologico	
G1	6
G2	4
G3	1
Totale dei casi di Luminal B	12
Età media	61 (min 44-max 82)
Grado istologico	
G1	2
G2	3
G3	7
Totale dei casi di Luminal B HER2+	11
Età media	66 (min 38-max 94)
Grado istologico	
G1	0
G2	2
G3	9
Totale dei casi di HER2+	10
Età media	64 (min 42-max 82)
Grado istologico	
G1	0
G2	0
G3	10
Totale dei casi di TNBC	12
Età media	68 (min 50-max 90)
Grado istologico	
G1	0
G2	3
G3	9

Tabella 6. Caratteristiche demografiche e parametri clinico-patologici delle pazienti affette da BC.

2.1.2 Analisi immunoistochimica

Analisi immunoistochimiche sono state eseguite per valutare l'espressione della PON2 nei campioni di tessuto tumorale e nel tessuto di controllo. Attraverso l'utilizzo del microtomo, dai blocchetti di tessuto FFPE sono state ottenute delle sezioni di 5 µm di spessore, successivamente montate su vetrini rivestiti da poly-L-lisina. Dopo l'essiccamento a caldo, le sezioni sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante immersione in una serie di alcoli a concentrazione decrescente. Successivamente i vetrini sono stati incubati con la soluzione EnVision FLEX Target Retrieval a pH alto (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA, USA). In seguito, l'attività perossidasi endogena è stata inibita mediante trattamenti con perossido di idrogeno al 3% per 7 minuti e bloccata con una soluzione con siero di capra al 5% (Dako). Dopo i lavaggi, le sezioni sono state incubate con un anticorpo policlonale di coniglio anti-PON2 umana diluito 1:1000 (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente per un'ora ed in atmosfera umidificata. In seguito ad ulteriori lavaggi, le sezioni sono state sottoposte ad incubazione con EnVision FLEX/HRP (Dako) per 20 minuti. I vetrini sono stati quindi sottoposti a trattamento con la soluzione di lavaggio e ad un'incubazione per 10 minuti con la diaminobenzidina contenuta nella soluzione EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako). Dopo essere state colorate con ematossilina di Mayer (Bio-Optica, Milano, Italia), le sezioni sono state montate su vetrini in modo permanente ed esaminate al microscopio ottico. I campioni sono stati valutati da due patologi indipendenti e non informati sul tessuto che stavano osservando, ottenendo le stesse conclusioni in più del 95% dei casi. Il punteggio dell'intensità di PON2 è stato classificato come negativo (0), moderato (1), buono (2) e intenso (3), ed espresso come mediana e scarto interquartile.

2.2 CELLULE IN COLTURA

Al fine di studiare il ruolo dell'enzima PON2 nei processi metabolici della cellula tumorale sono stati condotti esperimenti *in vitro* impiegando come modello di studio tre linee cellulari di BC: MCF-7 (ER+), SKBR-3 (HER2+) e MDA-MB-231 (TNBC).

2.2.1 Colture cellulari

Le linee cellulari di BC (MCF-7, SKBR-3 ed MDA-MB-231) sono state ottenute dall'Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani (IRCCS INRCA, Ancona, Italia). Le cellule sono state coltivate in DMEM contenente 4,5 g/l di glucosio addizionato con il 10% di siero fetale bovino e 50 µg/ml di gentamicina, in ambiente umidificato e in condizioni di coltura standard quali temperatura a 37°C e 5% di CO₂.

2.2.2 Silenziamento della PON2

Al fine di ottenere il silenziamento genico della Paraoxonasi-2 nelle cellule di BC è stato utilizzato la metodologia dell'RNA interference che agisce a livello post-trascrizionale utilizzando molecole di RNA a doppia elica (dsRNA) che si legano all'RNA messaggero target in maniera sequenza-specifica, causandone la degradazione. Il silenziamento può avvenire mediante l'utilizzo di short interfering RNAs (siRNAs) o short hairpin RNAs (shRNAs).

I siRNAs prevedono l'utilizzo di un oligonucleotide a doppio filamento che, mediante trasfezione, viene internalizzato nella cellula bersaglio, determinando la degradazione dell'RNA messaggero specifico per il gene target. Gli shRNAs sono molecole di RNA che, generalmente, vengono codificate da plasmidi che sono utilizzati per la trasfezione di cellule in coltura. Il plasmide, una volta internalizzato, viene riconosciuto dall'RNA polimerasi III che trascrive le sequenze relative agli shRNAs, con un filamento senso, una sequenza spacer (ad ansa o a loop), ed un filamento antisenso.

Grazie a queste strutture, i filamenti si assemblano nella tipica formazione a “forcina” (hairpin), che viene così riconosciuta da complessi multi-enzimatici, che andranno a determinare il taglio dello spacer e del filamento senso. Il filamento restante (l’antisense) si andrà a legare alla sequenza complementare del messaggero d’interesse, determinandone la degradazione (Figura 15). Tale strategia è stata utilizzata per il silenziamento delle varie linee cellulari di BC.

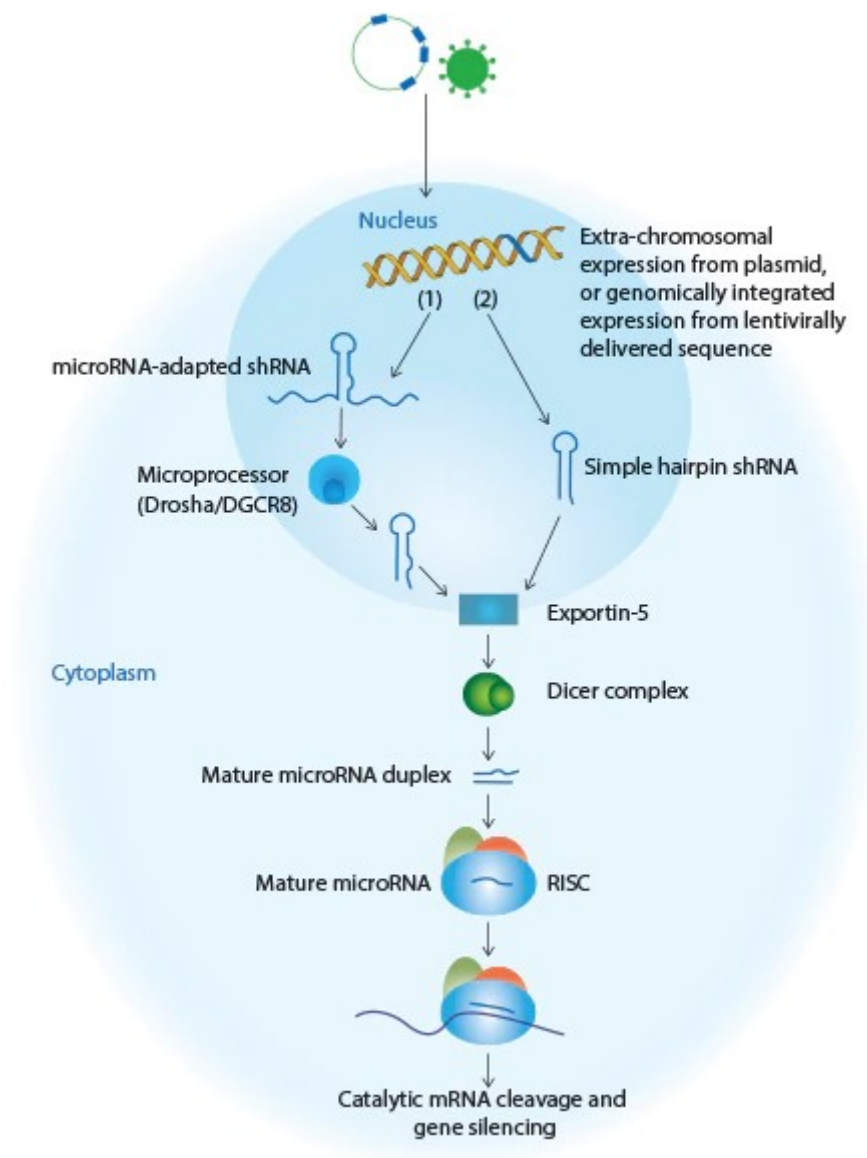


Figura 15. Silenziamento genico mediato da shRNAs.

Le linee cellulari MCF-7, SKBR-3 ed MDA-MB-231 sono state seminate in piastre 24-well (5×10^4 cellule per pozzetto) in 500 μ l di terreno di coltura. Al raggiungimento di una confluenza pari a circa il 70-80%, le cellule sono state trasfettate separatamente con 2 plasmidi della serie pLKO.1-puro codificanti shRNAs specifici per il silenziamento della PON2: pLKO.1-643 e pLKO.1-647 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). Ognuno dei plasmidi utilizzati contiene al suo interno una sequenza codificante il gene che conferisce resistenza alla puromicina e per uno shRNA con sequenza antisense complementare alla regione del messaggero della PON2. Le cellule utilizzate come controllo sono state trasfettate con il plasmide pLKO.1-puro (Figura 16) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO), privo dell'inserto codificante per l'shRNAs o trattate unicamente con i reagenti di trasfezione (mock). La trasfezione è stata eseguita utilizzando l'agente di trasfezione liposomiale FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA), secondo la procedura prevista dal protocollo. Per la trasfezione del singolo campione, è stata allestita una miscela dal volume finale di 25 μ l, contenente 0,5 μ g di DNA plasmidico, 1,5 μ l di FuGENE e terreno DMEM privo di siero. La miscela di trasfezione è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente è stata aliquotata nel pozzetto della piastra 24-well contenente le cellule, dopo aver effettuato un cambio di terreno.

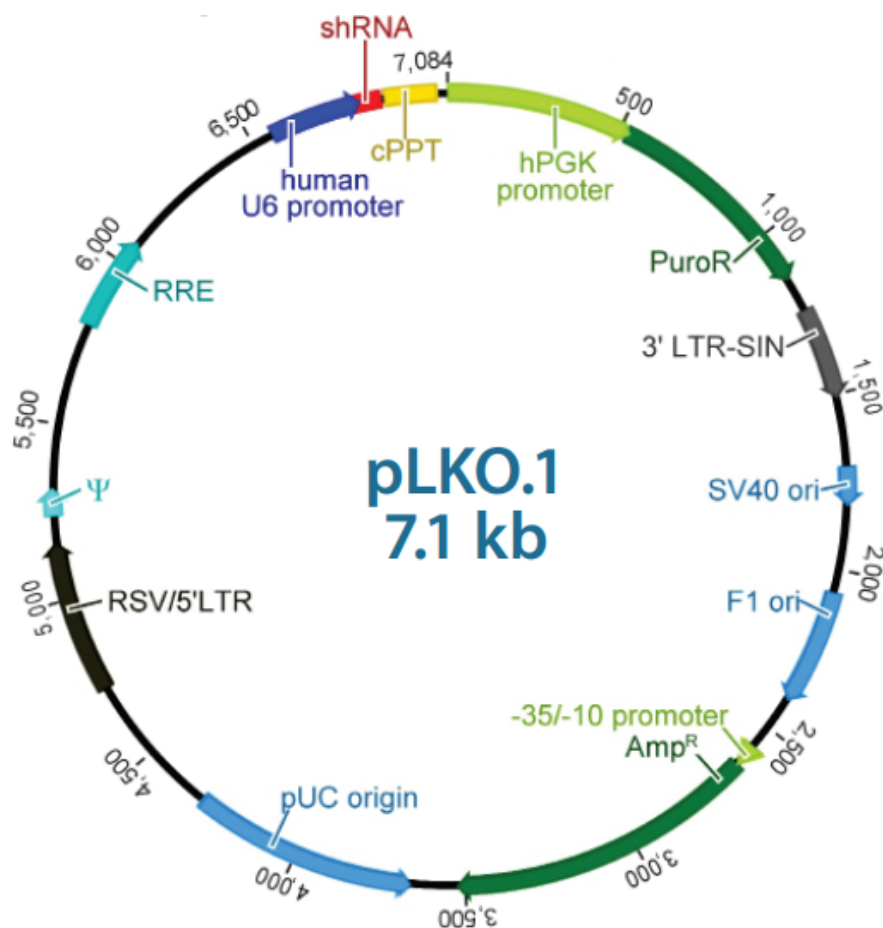


Figura 16. Plasmide pLKO.1-puro. Si nota, a valle del promotore U6, la regione in cui è inserita la sequenza per lo shRNA; da notare anche la regione che conferisce la resistenza alla puromicina.

Trascorse 48 ore dalla procedura di trasfezione, il terreno di coltura contenente la miscela di trasfezione è stato sostituito con terreno addizionato con puromicina (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) al fine di iniziare la procedura di selezione delle cellule che hanno correttamente incorporato il plasmide, poiché il costrutto pLKO.1-puro codifica l'elemento genico in grado di conferire la resistenza a tale antibiotico. La selezione dei cloni che hanno correttamente incorporato il plasmide è proseguita per 2 settimane, sostituendo il terreno di coltura con terreno addizionato con puromicina (1 µg/ml). La selezione è risultata completata quando le cellule di controllo, trattate esclusivamente con il reagente di trasfezione (mock), sono morte.

Al termine del processo di selezione, i cloni cellulari sono stati espansi ed analizzati per la verifica dell'effettivo silenziamento dell'enzima; l'efficienza del silenziamento genico della PON2 è stata valutata a livello di mRNA mediante Real-Time PCR e a livello proteico mediante analisi di Western blot.

2.2.3 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale

Le cellule sono state distaccate dalla superficie di coltura utilizzando tripsina-EDTA e centrifugate 300 x g per 5 minuti a 4°C. A seguito della centrifugazione, il pellet è stato risospeso in 1 ml di terreno di coltura completo e le cellule sono state contate con l'ausilio della camera di Burker utilizzando il Trypan Blue come colorante di esclusione. Alla conta è seguita un'ulteriore centrifugazione a 300 x g per 5 minuti a 4°C delle aliquote di sospensione cellulare contenenti il numero di cellule desiderate. I pellet cellulari (1×10^6) ottenuti sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale mediante l'utilizzo del kit SV Total RNA Isolation System (Promega). L'estrazione dell'RNA è stata eseguita mediante lisi cellulare, denaturazione dei complessi nucleoproteici, inattivazione dell'attività ribonucleasica endogena e rimozione del DNA genomico e delle proteine contaminanti.

Per determinare la concentrazione e la purezza del campione, l'RNA isolato è stato sottoposto ad analisi spettrofotometrica tramite l'utilizzo dello strumento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), valutando i valori di assorbanza a 3 diverse lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm e 280 nm. In aggiunta sono stati verificati i rapporti tra i valori di assorbanza misurati alle differenti lunghezze d'onda (260/280 nm; 260/230 nm) per poter valutare eventuali contaminazioni dei campioni da parte rispettivamente di proteine o di guanidina tiocianato.

Un'aliquota di RNA totale pari a 2 µg è stata sottoposta a retrotrascrizione attraverso il kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) utilizzando random primers a 6 nucleotidi. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template per le analisi eseguite tramite Real-Time PCR.

2.2.4 Real-Time PCR

L'efficienza del silenziamento della PON2 è stato valutato a livello di mRNA tramite Real-Time PCR. Questa metodica consente simultaneamente di amplificare e quantizzare molecole di DNA del campione che viene usato come stampo. L'amplificazione del DNA stampo avviene con reazioni cicliche, e l'avanzamento del processo viene monitorato grazie all'emissione di fluorescenza dovuta a sonde specifiche il cui segnale aumenta con le stesse modalità e la stessa cinetica della reazione di amplificazione, permettendo di monitorare il prodotto di reazione in tempo reale. All'aumentare del prodotto di reazione aumenta anche il segnale fluorescente che viene acquisito da un lettore ottico combinato al termociclatore. Per la Real-Time PCR della PON2 la molecola fluorescente utilizzata è stata l'EvaGreen, sonda fluorescente in grado di intercalarsi nella doppia elica del DNA e permettere la rilevazione dei prodotti di reazione.

Il metodo di quantizzazione scelto per questo studio ha previsto la quantizzazione relativa che consente di apprezzare e confrontare le differenze di espressione di un gene (gene di interesse o GOI) tra il campione (S) e il rispettivo controllo (C) grazie al confronto dei valori di Ct. Per raggiungere tale risultato, è necessario avvalersi di un secondo gene (gene housekeeping o HKG) che funga da normalizzatore; in questo caso è stato utilizzato il gene codificante per la β -Actina, proteina coinvolta nella struttura e nell'integrità cellulare. Una volta determinati i valori Ct per i due geni, si calcola la differenza tra GOI e HKG sia nel campione (S) che nel controllo (C). In seguito a tale determinazione, che consente di risalire al valore di $\Delta Ct = (GOI Ct - HKG Ct)$, è possibile calcolare il valore di espressione genica differenziale relativamente al GOI, in S rispetto a C, utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(S\Delta Ct - C\Delta Ct)}$.

L'analisi dell'espressione del gene d'interesse nei campioni è stata effettuata utilizzando il CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Relativamente a ciascun campione sono state allestite miscele di reazione di 20 μ l (in duplicato) contenenti 1 μ l di cDNA, 10 μ l di EvaGreen Supermix (Bio-Rad) e i primers specifici. Il protocollo ha previsto lo svolgimento di 40 cicli di amplificazione,

ciascuno dei quali costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi e da una fase di annealing-elongazione a 58°C per 30 secondi. Le sequenze nucleotidiche relative alle coppie di primers impiegati per l'amplificazione del gene di interesse e per il gene housekeeping (β -actina), sono state le seguenti:

- PON2 (forward) \rightarrow 5'- TCGTGTATGACCCGAACAATCC -3'
- PON2 (reverse) \rightarrow 5'- AACTGTAGTCACTGTAGGCTTC -3'
- β -actina (forward) \rightarrow 5'- TCCTTCCTGGGCATGGAGT -3'
- β -actina (reverse) \rightarrow 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'

2.2.5 Western Blot

L'efficienza del silenziamento della PON2 è stata verificata anche a livello proteico mediante analisi di Western blot. Le cellule sono state distaccate dalla superficie di coltura utilizzando tripsina-EDTA e centrifugate 300 x g per 5 minuti a 4°C. A seguito della centrifugazione, il pellet è stato risospeso in 1 ml di terreno di coltura completo e le cellule sono state contate con l'ausilio della camera di Burker utilizzando il Trypan Blue come colorante di esclusione. Alla conta è seguita un'ulteriore centrifugazione a 300 x g per 5 minuti a 4°C delle aliquote di sospensione cellulare contenenti il numero di cellule desiderate. I pellet cellulari (2×10^6) sono stati successivamente risospesi in 100 μ l di un tampone di lisi così costituito: PBS 1X a pH 7.4, 1% nonidet-P40 10mg/ml, desossicolato di sodio 5mg/ml, sodio dodecil solfato (SDS) 1 mg/ml, ortovanadato di sodio 1 mM, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM e aprotinina 2 μ g/ml. I lisati cellulari poi sottoposti ad omogeneizzazione utilizzando una siringa da insulina provvista di ago a 25G. L'intero processo è avvenuto in ghiaccio al fine di bloccare la degradazione proteica; l'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 16000 x g a 4°C per 10 minuti e in seguito a tale procedura è stato prelevato il surnatante (estratto proteico).

La concentrazione delle proteine è stata misurata con il metodo di Bradford, utilizzando come standard la sieralbumina bovina (BSA). Un quantitativo di proteine totali pari a 20 μ g ottenuto da ciascun campione è stato assoggettato ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) secondo il metodo di Laemmli, utilizzando un running gel ad una concentrazione di poliacrilammide pari al 12,5%. Una volta terminata la corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF). Il gel è stato immerso per 10 minuti nel tampone di trasferimento (CAPS 10 mM pH 11, metanolo al 10%). La membrana di PVDF, poiché è altamente idrofobica, è stata prima immersa in metanolo per 1 minuto, poi in acqua Milli-Q per 2 minuti ed infine mantenuta nel tampone di trasferimento per 10 minuti.

Successivamente è stato assemblato il sistema di trasferimento costituito da un supporto formato da due lastre di plastica su cui sono stati posti in successione uno sopra l'altro una spugnetta e due fogli

di carta da filtro delle dimensioni pari a 9x5 cm; la formazione del sandwich è stata completata ponendo, al di sopra dei fogli di carta da filtro, il gel, la membrana in PVDF (delle stesse dimensioni del gel), due fogli di carta da filtro ed infine un'altra spugnetta, il tutto condizionato in tampone di trasferimento. Il trasferimento è stato effettuato a 250 mA a 4°C per 40 minuti.

Al fine di evitare legami aspecifici degli anticorpi, la membrana su cui è avvenuto il trasferimento è stata incubata con una soluzione di bloccaggio costituita da TBS, 2% BSA e 0,1% Tween-20. Successivamente la membrana è stata assoggettata a tre lavaggi con TBST da 5 minuti ciascuno per poi essere incubata overnight a 4°C con l'anticorpo policlonale rabbit anti-PON2 umana (Sigma-Aldrich) diluito 1:500. A seguito di 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBST, la membrana è stata incubata 1h con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit coniugato con perossidasi di rafano ad unadiluizione 1:150000. A seguito di ulteriori 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBST, si è quindi proceduto alla rivelazione del segnale chemiluminescente relativo alla PON2 mediante un'incubazione di 5 minuti con SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate (ThermoFisher). L'acquisizione del segnale chemiluminescente relativo alla proteina PON2 è avvenuta mediante l'impiego del rilevatore di immagini ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories). Successivamente le immagini digitali sono stati oggetto di analisi densitometrica mediante il software Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

2.2.6 Saggio MTT e Trattamento con i chemioterapici

Per valutare l'effetto del silenziamento della PON2 sulla proliferazione cellulare e sulla sensibilità delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico, le cellule di BC silenziate e di controllo sono state saggiate mediante il test dell'MTT prima e dopo trattamento chemioterapico utilizzando il cisplatino (CDDP), doxorubicina e 5-fluorouracile (5-FU), che rappresentano alcuni dei farmaci chemioterapici principalmente utilizzati per il trattamento del BC. 1×10^4 cellule/pozzetto sono state seminate in piastre 96-wells e la vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio colorimetrico dell'MTT, in assenza ed in presenza di chemioterapici dopo 0, 24, 48 e 72 ore. Ad ogni timepoint, il terreno di coltura di ogni pozzetto è stato sostituito con 100 μ l di terreno fresco completo contenente 8,4 μ l di reagente MTT (5mg/ml) in buffer fosfato. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C, la soluzione è stata rimossa e le cellule sono state lisate con 200 μ l di 2-propanolo disciogliendo i cristalli di formazano. Infine, è stata misurata l'assorbanza a 540 nm usando un lettore spettrofotometrico per piastre ELISA. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo (valore medio \pm la deviazione standard) di tre esperimenti indipendenti, effettuati in triplicato.

2.2.7 Analisi statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software GraphPad Prism, versione 8.00 per Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). La one-way analysis of variance (ANOVA) e i test di Wilcoxon, Mann-Whitney e Spermann sono stati utilizzati per valutare le differenze tra gruppi esaminati e le possibili correlazioni con i parametri clinico-patologici. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3 RISULTATI

3.1 CAMPIONI TISSUTALI

3.1.1 Espressione della PON2 nei sottotipi molecolari di carcinoma della mammella

L'espressione della PON2 è stata valutata nel tessuto sano e nel tessuto patologico derivante da 56 sottotipi di BC (in situ ed infiltranti) mediante analisi di immunohistochimica. Non sono state riscontrate relazioni statisticamente significative tra livello di espressione proteica della PON2 e parametri quali l'età ($p = 0.37$) o il grado ($p = 0.50$). Le analisi immunohistochimiche hanno però rivelato come l'espressione enzimatica risulti significativamente più elevata nei tessuti tumorali se comparata ai livelli rilevati nei margini dei tessuti sani (Figura 17).

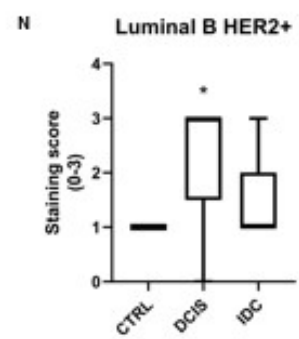
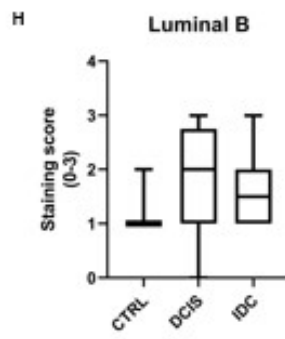
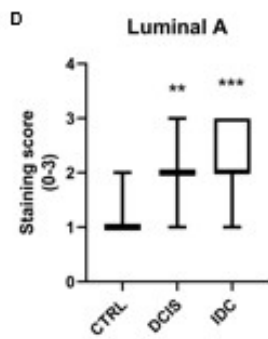
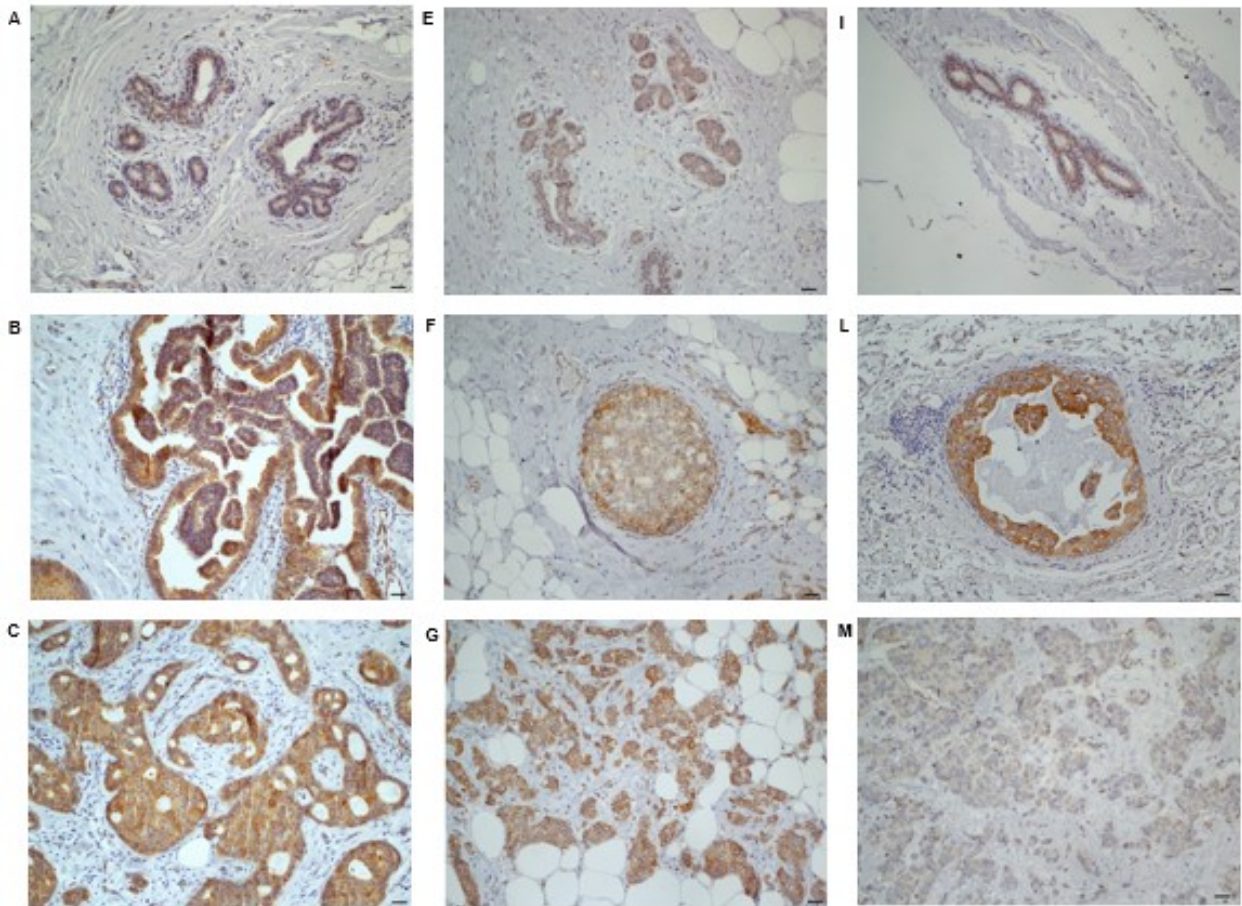
In particolare, nel sottotipo Luminal A, la mediana dello staining score per il carcinoma invasivo è risultata essere di 2, con un valore pari a 2 per il carcinoma *in situ*, e di 1 per il tessuto sano (Figura 17 A-D).

Nel sottotipo Luminal B, la tipologia infiltrante ha mostrato uno staining score di 1,5, mentre il DCIS ed il tessuto sano hanno mostrato uno staining score di 2 (Figura 17 E-H).

Per quanto riguarda il Luminal B HER2+, l'IDC ha mostrato uno staining score di 1, mentre per il DCIS ed il tessuto sano è stato rilevato uno staining score rispettivamente di 3 e di 1 (Figura 17 I-N).

Nel sottotipo HER2+, l'immunohistochimica ha mostrato uno staining score di 2,5 per l'IDC, di 1 per il DCIS e di 2 per il tessuto sano (Figura 17 O-R).

Infine, nei tessuti di TNBC, per l'IDC è stato rilevato uno staining score pari 2, per il DCIS uno staining score pari a 2, e per i tessuti sani uno staining score pari a 1 (Figura 17 S-V).



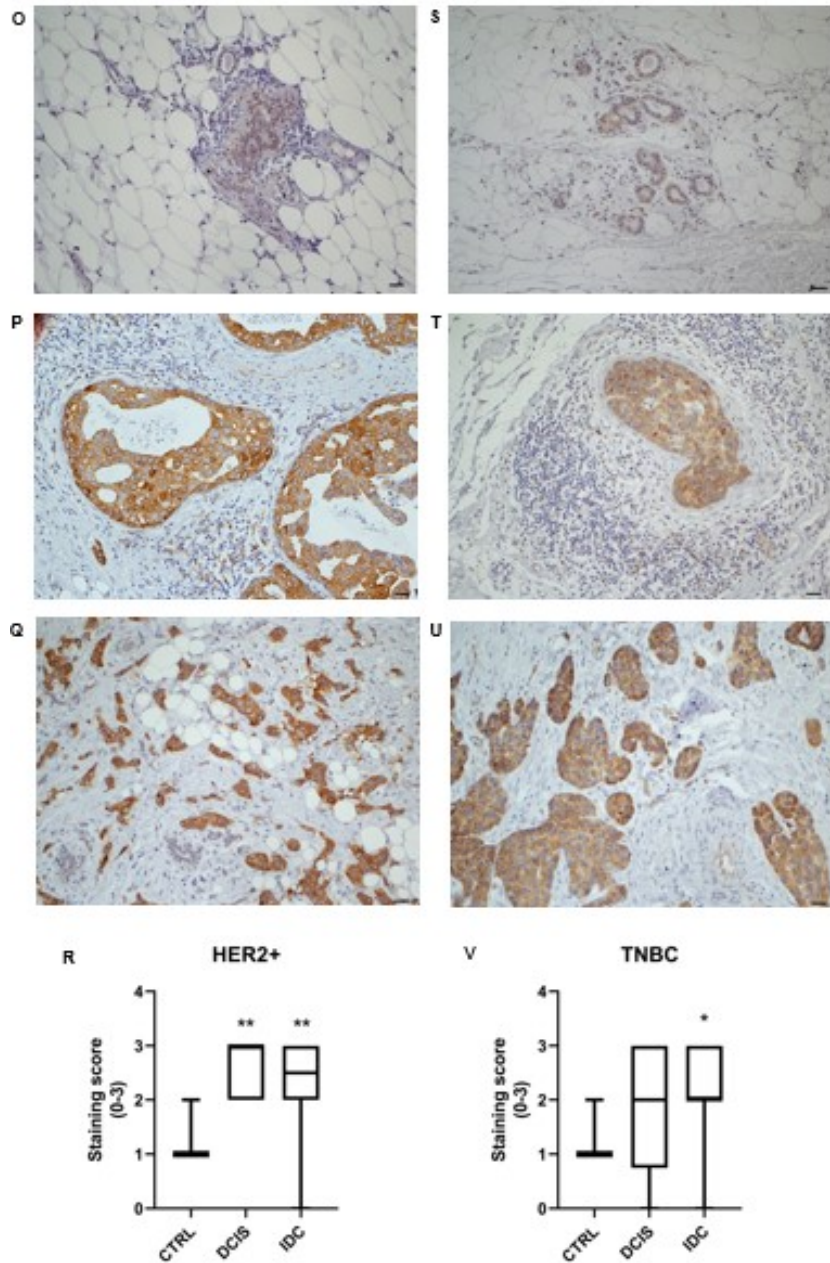


Figura 17. Espressione immunoistochimica della PON2 in diversi sottotipi di BC. Sono stati analizzati tessuti sani, di carcinoma duttale infiltrante (IDC) e di carcinoma duttale in situ (DCIS). Le immagini mostrano: Luminal A (A, B e C), Luminal B (E, F e G), Luminal B HER2+ (I, L ed M), HER2+ (O, P e Q) e TNBC (S, T e U). I diagrammi a barre indicano l'espressione differenziale della PON2 nei vari sottotipi (ingrandimento x200, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2 ANALISI CELLULARI

3.2.1 Efficienza del silenziamento di PON2 mediato dagli shRNA in modelli cellulari di BC

Le linee cellulari MDA-MB-231, MCF-7 ed SKBR-3 sono state trasfettate come descritto precedentemente. Per valutare l'efficienza del silenziamento della PON2, i livelli di RNA messaggero e di proteina sono stati valutati rispettivamente con Real-Time PCR e Western blot.

L'analisi dell'espressione dell'mRNA della PON2 nelle linee di MDA-MB-231 ha rivelato che le cellule trasfettate con i vettori codificanti shRNA contro la PON2 hanno mostrato una significativa ($p < 0,05$) riduzione del livello di espressione dell'mRNA della PON2 ($0,41 \pm 0,05$ per pLKO.1-647; $0,69 \pm 0,06$ per pLKO.1-643) rispetto ai campioni di controllo ($1,00 \pm 0,06$ per mock; $0,75 \pm 0,12$ per pLKO.1-puro) (Figura 18A).

Analogamente, l'analisi dell'espressione dell'mRNA della PON2 nelle linee di MCF-7 ha indicato che le cellule trasfettate con i vettori codificanti shRNA contro la PON2 hanno mostrato una significativa ($p < 0,05$) riduzione del livello di espressione dell'mRNA della PON2 ($0,29 \pm 0,04$ per pLKO.1-647; $0,70 \pm 0,07$ per pLKO.1-643) rispetto ai campioni di controllo ($1,00 \pm 0,07$ per mock; $1,04 \pm 0,14$ per pLKO.1-puro) (Figura 18B).

Infine, anche nelle linee cellulari SKBR-3, l'analisi dell'espressione dell'mRNA della PON2 ha indicato che le cellule trasfettate con il vettore codificante shRNA contro la PON2 hanno mostrato un significativo ($p < 0,05$) decremento del livello di espressione dell'mRNA della PON2 ($0,05 \pm 0,05$ per pLKO.1-647) rispetto ai campioni di controllo ($1,00 \pm 0,07$ per mock; $1,16 \pm 0,18$ per pLKO.1-puro) (Figura 18C).

Il dato relativo alla downregolazione della PON2 ottenuto a livello di RNA messaggero è stato ulteriormente confermato a livello proteico tramite Western Blot. Come mostrato nella Figura 18D, le linee cellulari MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3, trasfettate con il plasmide pLKO.1-647, hanno mostrato una significativa riduzione nell'espressione proteica della PON2, confermando l'avvenuto silenziamento genico.

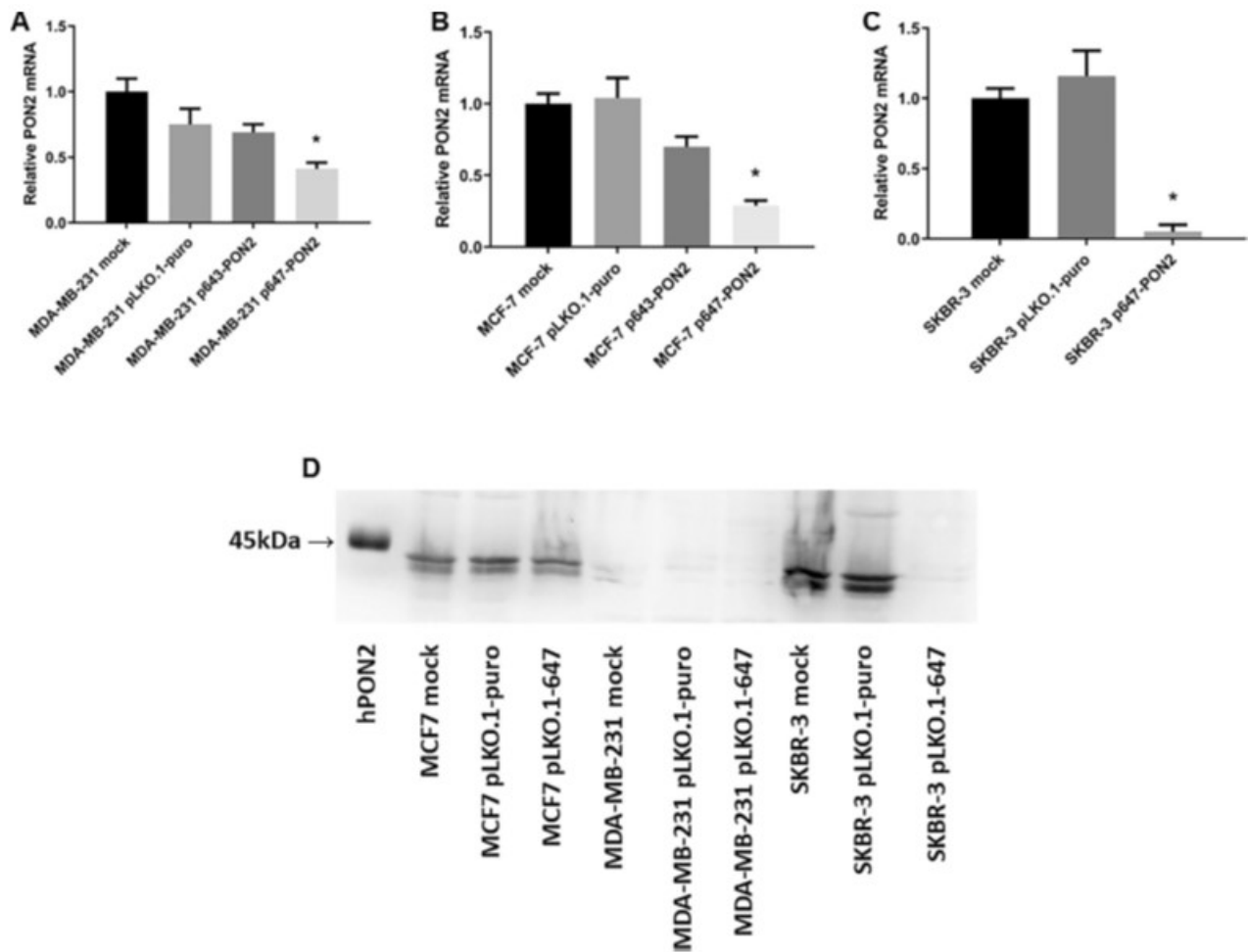


Figura 18. Analisi dell'efficienza del silenziamento della PON2. Le colture di MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) ed SKBR-3 (C) sono state trasfettate con plasmidi contenenti shRNA per PON2 (pLKO.1-647 e pLKO.1-643), con plasmide vuoto (pLKO.1-puro) o solo con i reagenti di trasfezione (mock). L'espressione è stata valutata mediante Real-Time PCR (A-C) e analisi di Western blot (D). Come standard, è stata usata la PON2 umana ricombinante con aggiunta di His-Tag (hPON2) (45kDa). I valori sono stati espressi come media \pm la deviazione standard (* $p < 0,05$).

3.2.2 Effetto del silenziamento della PON2 sulla proliferazione delle cellule di BC

Al fine di esplorare il ruolo della PON2 nel metabolismo delle cellule tumorali di BC ed esaminare gli effetti biologici conseguenti al suo silenziamento, è stata analizzata la proliferazione delle cellule, wild-type e dopo silenziamento dell'enzima, utilizzando il saggio colorimetrico dell'MTT. Le cellule sono state seminate in 96-well e a 24 ore dalla semina è stata eseguita la prima lettura allo spettrofotometro, corrispondente al tempo zero. Le analisi sono state ripetute a 24h, 48h e 72h dalla prima lettura.

I grafici riportati in Figura 19 esprimono la percentuale di vitalità cellulare dei vari campioni a diversi tempi (24h, 48h e 72h) rispetto al tempo zero (100%). I valori riportati nelle barre dei diagrammi rappresentano la media \pm la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

Nella linea cellulare MDA-MB-231, il silenziamento dell'enzima ha indotto un significativo ($p < 0,05$) calo della proliferazione cellulare rispetto alle cellule di controllo (mock e pLKO.1-puro) a partire dal timepoint a 48h, e proseguendo con il timepoint a 72h dove la riduzione della proliferazione cellulare è risultata ancor più evidente (Figura 19A).

Nelle linee cellulari MCF-7 e SKBR-3, il knockdown della PON2 ha determinato una riduzione significativa ($p < 0,05$) della proliferazione solo a livello del timepoint 72h, mentre non sono stati evidenziati cambiamenti significativi per i timepoint 24 e 48h (Figura 19B e C).

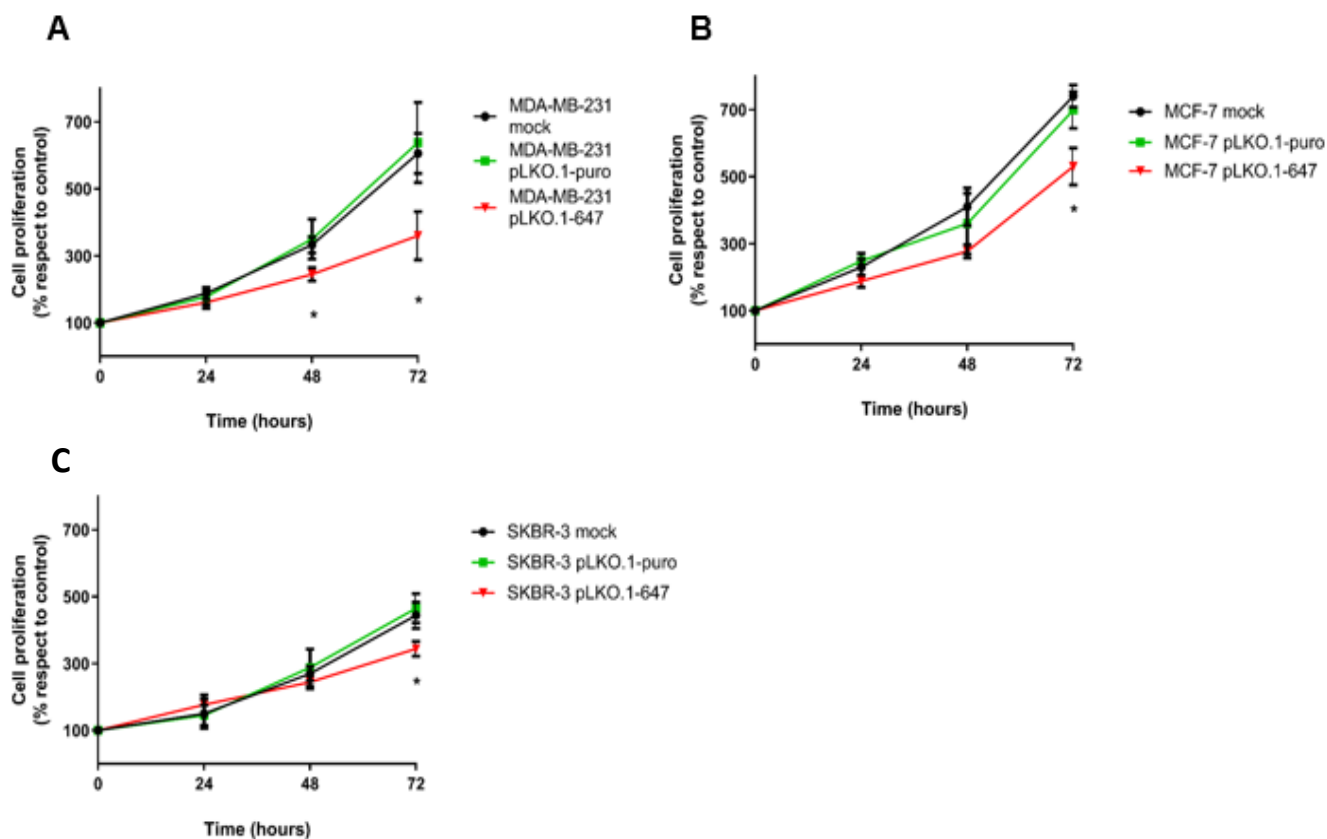


Figura 19. Effetto del silenziamento della PON2 sulla proliferazione cellulare. L'impatto del silenziamento dell'enzima sulla proliferazione delle cellule MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) e SKBR-3 (C) è stato analizzato con il saggio dell'MTT.

3.2.3 Impatto del silenziamento della PON2 sulla chemiosensibilità delle cellule di TNBC

Al fine di valutare un potenziale coinvolgimento della PON2 nella chemioresistenza delle cellule MDA-MB-231, sono stati allestiti saggi MTT per valutare la vitalità cellulare conseguente a trattamento delle cellule con cisplatino, doxorubicina e 5-fluorouracile, utilizzati singolarmente o in combinazione, a 24, 48 e 72h dal trattamento.

I risultati ottenuti hanno mostrato una significativa ($p < 0,05$) riduzione della vitalità cellulare a seguito del trattamento con doxorubicina 0,1 μM nella linea cellulare con PON2 silenziata (pLKO.1-647) rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) per tutti i timepoint analizzati (Figura 20A). Concentrazioni più elevate di doxorubicina pari a 1 μM hanno mostrato un significativo decremento della vitalità per i timepoint 24 e 48h nella linea cellulare pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) (Figura 20B), mentre una concentrazione dieci volte superiore di doxorubicina (10 μM) ha determinato una significativa riduzione nella vitalità cellulare nella linea cellulare pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) solo nel timepoint 24h (Figura 20C).

I risultati ottenuti hanno mostrato una significativa ($p < 0,05$) riduzione della vitalità cellulare anche a seguito del trattamento con 5-fluoruracile. Nel dettaglio, a seguito del trattamento con 5-fluoruracile 0,5 mg/ml, nella linea cellulare pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) il decremento di vitalità cellulare è risultato significativo per tutti i timepoint analizzati (Figura 20D). Concentrazioni di 5-fluoruracile 1 $\mu\text{g/ml}$ hanno determinato differenze nella vitalità cellulare nella linea cellulare pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) solo per il timepoint a 72h, mentre concentrazioni di 5-fluoruracile 5 $\mu\text{g/ml}$ hanno indotto decrementi significativi nella vitalità cellulare nei timepoint 24 e 48h (Figura 20E e F).

Inoltre, il trattamento con l'agente chemioterapico cisplatino 1 μM è stato in grado di causare un significativo decremento della vitalità cellulare della linea cellulare trafettata con pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) nei timepoint 24 e 48h (Figura 20G). Sono state analizzate anche concentrazioni di Cisplatino più elevate, ma senza ottenere differenze significative nella vitalità di tutti i campioni, evento probabilmente legato alla concentrazione eccessiva del chemioterapico (dati non mostrati). Conseguentemente, è stata valutata la combinazione dei tre farmaci, a concentrazioni ridotte, per verificare eventuali effetti additivi di citotossicità cellulare. Questo trattamento ha previsto l'incubazione delle cellule con una combinazione di doxorubicina 10nM, cisplatino 100nM e 5-fluoruracile 50 ng/ml. Tale combinazione ha mostrato una significativa

($p < 0,05$) riduzione della vitalità cellulare nella linea cellulare pLKO.1-647 rispetto ai controlli (mock e pLKO.1-puro) per i timepoint 48 e 72h.

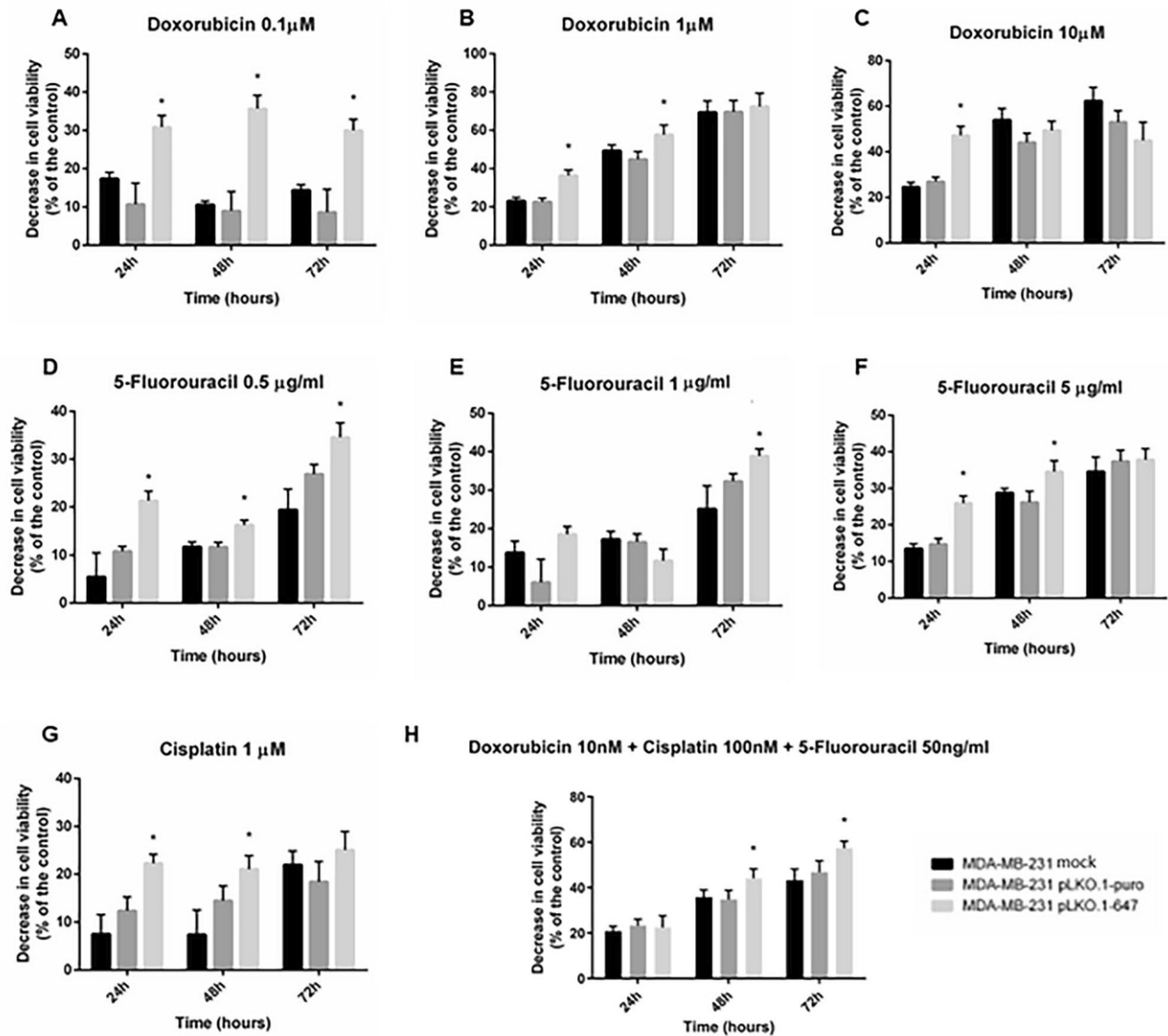


Figura 20. Effetto dei trattamenti chemioterapici sulle linee di TNBC MDA-MB-231. Saggi MTT sono stati allestiti per valutare gli effetti di doxorubicina (A-C), 5-fluoruracile (D-F), cisplatino (G), o una combinazione dei tre chemioterapici (H), sulla proliferazione cellulare delle cellule di controllo (mock), cellule trasfettate con vettore vuoto (pLKO.1-puro) e cellule silenziate per la PON2 (pLKO.1-647). Tutti i valori sono espressi come media \pm la deviazione standard (* $p < 0,05$).

4 DISCUSSIONE

Il carcinoma della mammella è il tipo di cancro femminile più comune al mondo, con oltre 2,1 milioni di nuovi casi ed oltre 620000 decessi all'anno. Tra le numerose varianti, il TNBC è il più aggressivo e quello caratterizzato da prognosi peggiore³. Inoltre, nonostante la sua scarsa incidenza, è responsabile di circa il 5% di tutte le morti correlate alle neoplasie che si registrano nel corso di un anno⁶⁷.

A causa delle sue particolari caratteristiche molecolari, il TNBC non può essere bersaglio di opzioni terapeutiche che sono altresì disponibili per altre tipologie di BC, tra cui la terapia ormonale o la terapia mirata con anticorpi monoclonali (trastuzumab), quindi la chemioterapia rappresenta ancora il miglior approccio terapeutico insieme alla chirurgia. Sebbene la resezione chirurgica del tumore primario possa essere curativa in alcuni casi, i trattamenti adiuvanti non sono così efficaci determinando recidive precoci e rapida progressione tumorale. Nei casi di TNBC spesso si ricorre ad una mastectomia totale, trattamento che è altamente invasivo e implica importanti conseguenze per la salute quali linfedema ed altre complicazioni post-operatorie, oltre al grandissimo impatto psicologico e fisico⁶⁸.

Per tali motivi, è di fondamentale importanza identificare nuovi biomarcatori molecolari che possano migliorare la diagnosi, la prognosi o possano essere utilizzati come target terapeutici per terapie mirate. Tali progressi permetterebbero l'elaborazione di una più accurata prognosi della malattia e lo sviluppo di farmaci specifici più efficaci nel trattamento del TNBC e che possano permettere il ricorso ad una chirurgia meno invasiva, particolare molto importante poiché tale neoplasia colpisce maggiormente le donne di giovane età.

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare i livelli di espressione dell'enzima PON2 nei vari sottotipi molecolari di BC, e comprendere il ruolo di tale enzima nel metabolismo della cellula tumorale, valutando in particolar modo il TNBC.

Un crescente numero di studi ha infatti dimostrato come la PON2 eserciti un ruolo in diverse tipologie di tumori solidi, andando a contrastare gli alti livelli di stress ossidativo che caratterizzano le cellule tumorali, i quali sono correlati ad un aumento del tasso di crescita e potenzialmente alla capacità di indurre chemioresistenza.

Le analisi immunohistochimiche del nostro studio hanno rivelato come i livelli d'espressione della PON2 siano significativamente più alti nei sottotipi tumorali IDC di Luminal A, HER2+ e TNBC se comparati al tessuto sano, mentre i livelli d'espressione dei carcinomi *in situ* degli stessi sottotipi sono risultati non sempre significativamente aumentati, sebbene ci sia una chiara tendenza all'aumento dell'espressione della PON2 passando dal tessuto sano, al DCIS e infine all'IDC.

In diverse neoplasie, la PON2 è risultata essere overespressa e correlata positivamente con l'aggressività della variante neoplastica. Nel carcinoma basocellulare (BCC) l'espressione di PON2 è risultata essere aumentata solo nelle forme infiltranti, mentre nelle varianti meno aggressive, come i BCC nodulari, l'espressione resta simile a quella delle cellule di controllo⁶⁹. Anche nei tumori gastrici, alti livelli di PON2 sono risultati correlati a forme diffuse e invasive della neoplasia.

In altri studi condotti su campioni di urine provenienti da pazienti con tumore alla vescica, l'espressione della PON2 è risultata essere inversamente correlata allo stadio tumorale, suggerendo un suo possibile valore diagnostico. I risultati ottenuti dal nostro studio sono coerenti con quanto presente in letteratura, suggerendo quindi che l'enzima PON2 possa essere coinvolto nei primi stadi di progressione tumorale, rappresentando quindi un promettente biomarcatore con valore prognostico nei sottotipi di BC Luminal A, HER2+ e TNBC.

Successivamente, dopo aver indotto il silenziamento della PON2 in linee cellulari di BC, è stato valutato l'impatto della downregolazione di tale enzima sulla proliferazione cellulare mediante il saggio MTT. I dati riportano chiaramente come il silenziamento genico effettuato con shRNA sia correlato ad una diminuzione del tasso di proliferazione cellulare su tutti i tipi di BC testati, con un

miglior effetto sulla linea cellulare di TNBC MDA-MB-231, sottolineando un suo potenziale ruolo nella promozione della tumorigenesi dei BC.

Diversi lavori sperimentali hanno dimostrato come il silenziamento della PON2 determini una riduzione della proliferazione cellulare in modelli tumorali, quali tumore del pancreas, tumore della vescica, e glioblastoma multiforme^{50,70-72}. I dati ottenuti dal nostro studio sono coerenti con quanto riportato in letteratura, sebbene l'esatto meccanismo con cui la PON2 influenzi la proliferazione cellulare non sia stato ancora chiarito. Alcuni studi ipotizzano che la riduzione della proliferazione cellulare legata al silenziamento della PON2 possa essere la conseguenza di un incremento del tasso di apoptosi cellulare spontanea. La capacità del silenziamento della PON2 di ridurre la proliferazione delle cellule di TNBC è particolarmente importante, a causa del fatto che il TNBC è definito come un tumore "a crescita rapida", caratteristica che contribuisce in maniera notevole al suo comportamento altamente aggressivo⁷³.

È stato riportato come anche la resistenza ai chemioterapici o alle terapie mirate possa essere modulata dall'espressione della PON2 nelle cellule tumorali⁵⁰. Dato che il trattamento del TNBC non prevede terapie mirate o endocrinologiche, la chemioterapia rappresenta ancora la prima opzione terapeutica per adiuvarne la chirurgia nella gestione di questa neoplasia. Molti studi hanno documentato come i derivati del platino sono molto efficaci nella chemioterapia adiuvante per il trattamento del TNBC, oltre ad essere sicuri e ben tollerati.

Sebbene molte pazienti affette da TNBC mostrino inizialmente una buona risposta alla chemioterapia, una percentuale importante di casi mostra tuttavia chemioresistenza già all'esordio oppure la sviluppa nel tempo, evento che determina un elevato tasso di mortalità. Per tali motivi, in questo studio è stato valutato l'impatto del silenziamento della PON2 nella risposta ai chemioterapici delle cellule TNBC. A tal fine, sono stati utilizzati tre diversi chemioterapici (cisplatino, 5-fluoruracile e doxorubicina), utilizzati di routine nella terapia al TNBC e che esercitano la loro azione citotossica inducendo una massiva produzione di ROS oltre alla loro capacità di creare rotture a singolo e doppio filamento degli

acidi nucleici⁷⁴. L'impatto dei chemioterapici sulla vitalità delle cellule TNBC è risultato significativamente maggiore nelle cellule con PON2 silenziata piuttosto che nel controllo, in particolar modo in seguito ai trattamenti con doxorubicina e cisplatino, suggerendo come l'attività di PON2 possa esercitare un ruolo protettivo nelle cellule tumorali verso la citotossicità indotta dai farmaci chemioterapici. Inoltre, la combinazione dei tre chemioterapici è risultata esercitare un importante effetto additivo nella riduzione della vitalità delle cellule silenziate per PON2, permettendo l'utilizzo dei tre chemioterapici in combinazione a basse concentrazioni, il che limiterebbe gli effetti collaterali inevitabilmente connessi all'utilizzo di chemioterapici in concentrazioni elevate.

I risultati ottenuti concordano con quanto riportato in letteratura; infatti, diversi studi hanno dimostrato come il silenziamento della PON2 sia capace di incrementare la sensibilità delle cellule tumorali agli agenti chemioterapici. Un recente studio ha mostrato come il silenziamento della PON2 abbia reso le cellule T24, un modello di tumore della vescica, maggiormente sensibili al cisplatino, mentre un'overespressione della PON2 è stata rilevata a seguito del trattamento con cisplatino e che sarebbe responsabile della significativa riduzione della produzione intracellulare di ROS conseguente al trattamento chemioterapico⁷². Analogamente, un altro studio ha evidenziato come il silenziamento della PON2 sia capace di incrementare la sensibilità al cisplatino delle cellule di melanoma A375, scoperta particolarmente importante dato che il melanoma è notoriamente refrattario ai chemioterapici stessi⁵⁹. Inoltre, uno studio *in vitro* di overespressione della PON2, effettuato utilizzando come modello cellule endoteliali immortalizzate EA.hy926 trattate con doxorubicina, ha rivelato come l'overespressione dell'enzima sia correlata ad una riduzione della concentrazione di ATP intracellulare ed all'inibizione dell'attivazione della caspasi-3. Infine, l'apoptosi indotta dal trattamento con staurosporina o actinomicina D è risultata essere significativamente ridotta nelle cellule EA.hy296 overesprimenti la PON2⁶⁰.

È interessante notare come la PON2 sia coinvolta anche nella resistenza di alcune neoplasie verso farmaci non chemioterapici. Per esempio, nei pazienti con leucemia linfoblastica acuta, i livelli d'espressione della PON2 sono risultati essere positivamente correlati con la resistenza al desametasone, e il silenziamento dell'enzima è stato in grado di ridurre significativamente la resistenza a quest'ultimo in topi immunosoppressi sottoposti a xenotrapianto con cellule di tale tipologia di leucemia⁷⁵.

Il meccanismo con cui la PON2 contribuirebbe alla resistenza delle cellule tumorali nei confronti dei chemioterapici non è stato del tutto chiarito. È stato ipotizzato la chemioresistenza associata ad alti livelli di espressione della PON2 possa essere il risultato di un potenziamento della sua attività anti-apoptotica e della sua attività di detossificazione dei ROS.

Il ruolo anti-apoptotico della PON2 è legato alla modulazione della produzione di anione superossido mitocondriale e dell'apoptosi correlata al danno del reticolo endoplasmatico. Alcuni studi riportano come il silenziamento della PON2 sia correlato ad un aumento dei livelli di ROS, che a loro volta causano danni a DNA, proteine e lipidi^{59,72}. In particolare, tutti i chemioterapeutici usati nello studio sono in grado di indurre una massiva produzione di ROS nelle cellule. L'accoppiamento di una ridotta capacità antiossidante (nel nostro caso dovuta al silenziamento di PON2) con l'uso di potenti induttori di ROS è considerato uno dei possibili approcci per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche⁷⁶.

L'ipotesi che il silenziamento della PON2 possa indurre chemiosensibilità dovuta all'elevata produzione di ROS è supportata anche dalle evidenze che nel carcinoma orale a cellule squamose, un'elevata espressione della PON2 sia correlata a una maggiore radioresistenza^{77,78}. Infatti, la radioterapia innesca una morte cellulare massiva inducendo l'attivazione di segnali apoptotici nelle cellule tumorali derivanti, in larga misura, dai ROS⁷⁹. Alla luce di queste osservazioni, dato che la radioterapia adiuvante è utilizzata di routine nel trattamento del TNBC, potrebbe essere interessante esplorare l'effetto del silenziamento della PON2 sulla risposta delle cellule di TNBC alle radiazioni.

Altri meccanismi potenzialmente coinvolti nel ruolo anti-apoptotico della PON2 comprendono la risposta a proteine malpiegate (UPR), un percorso di segnali attivato durante lo stress cellulare. Infatti, è stato riportato che le cellule di carcinoma orale a cellule squamose che overesprimono la PON2 sono protette da meccanismi apoptotici mediati dalle UPR⁷⁷.

5 CONCLUSIONI

Il presente studio è stato il primo a valutare l'espressione della PON2 nei vari sottotipi molecolari di BC, riportando come nel TNBC infiltrante vi sia un'elevata espressione dell'enzima. L'immunoistochimica è stata utilizzata come approccio iniziale per stimare i livelli d'espressione della PON2 in vari sottotipi di BC, e successivamente è stato analizzato l'impatto del silenziamento della PON2 nel fenotipo della cellula neoplastica in modelli cellulari di BC *in vitro*.

A tal proposito, al fine di validare il possibile ruolo prognostico della PON2 nel TNBC, saranno necessarie ulteriori analisi su una coorte più vasta di campioni FFPE, così come un follow-up a lungo termine delle pazienti affette da TNBC per valutare un'eventuale correlazione tra espressione della PON2 e sopravvivenza.

Ciò nonostante, i nostri esperimenti *in vitro* hanno chiaramente dimostrato come la PON2 possa rappresentare un potenziale target terapeutico utile a migliorare l'efficacia della chemioterapia nelle pazienti affette da TNBC che, ad oggi, mancano ancora di terapie specifiche, circostanza che è in parte responsabile della scarsa sopravvivenza che caratterizza il TNBC.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
2. Łukasiewicz, S. *et al.* Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13174287> (2021).
3. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* **24**, 2206–2223 (2013).
4. Howard, F. M. & Olopade, O. I. *Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer A Review*. www.journalppo.com (2021).
5. Shao, Z., Chaudhri, S., Guo, M., Zhang, L. & Rea, D. Neoadjuvant Chemotherapy in Triple Negative Breast Cancer: An Observational Study. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* **23**, 291–302 (2016).
6. Dent, R. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* **13**, 4429–4434 (2007).
7. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. & Yu, S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research* **22**, 61 (2020).
8. Moran, M. S. Should Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Subtype Affect Local-Regional Therapy Decision Making? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* e32–e36 (2014) [doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.e32](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2014.34.e32).
9. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 2750–2767 (2011).

10. Prat, A. *et al.* Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist* **18**, 123–133 (2013).
11. Derakhshan, F. & Reis-Filho, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2022** **17**, 181–204 (2022).
12. Burstein, M. D. *et al.* Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **21**, 1688–1698 (2015).
13. Plasilova, M. L. *et al.* Features of triple-negative breast cancer. *Medicine* **95**, e4614 (2016).
14. Gulbahce, H. E. *et al.* Differences in molecular features of triple-negative breast cancers based on the age at diagnosis. *Cancer* **124**, 4676–4684 (2018).
15. Mavaddat, N. *et al.* Pathology of Breast and Ovarian Cancers among *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1* / 2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **21**, 134–147 (2012).
16. Shimelis, H. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **110**, 855–862 (2018).
17. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* **13**, 1141–1151 (2012).
18. Gallagher, E. J. & LeRoith, D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev* **95**, 727–748 (2015).
19. Munsell, M. F., Sprague, B. L., Berry, D. A., Chisholm, G. & Trentham-Dietz, A. Body Mass Index and Breast Cancer Risk According to Postmenopausal Estrogen-Progestin Use and Hormone Receptor Status. *Epidemiol Rev* **36**, 114–136 (2014).
20. Koo, M. M. *et al.* Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol* **48**, 140–146 (2017).

21. Cavanaugh, B. C. & McNally, S. Mammography. in *Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection* 117–132 (Springer US, 2010). doi:10.1007/978-0-387-87583-5_6.
22. Madjar, H. Role of Breast Ultrasound for the Detection and Differentiation of Breast Lesions. *Breast Care* **5**, 109–114 (2010).
23. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy* vol. 10 955–960 Preprint at <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879> (2010).
24. Lester, S. C. *et al.* Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 1515–1538 (2009).
25. Limaiem, F. & Mlika, M. *Medullary Breast Carcinoma*. (2023).
26. Thapa, B. *et al.* Metaplastic Breast Cancer: Characteristics and Survival Outcomes. *Cureus* (2022) doi:10.7759/cureus.28551.
27. Gordillo, C. & Chukus, A. *Adenoid cystic carcinoma: A case of rare breast cancer*. vol. 17 690–692 (2022).
28. Aktepe, F., Sarsenov, D. & Ozmen, V. *Secretory Carcinoma of the Breast*. vol. 12 174–176 (2016).
29. Johnson, K. S., Conant, E. F. & Soo, M. S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *Journal of Breast Imaging* vol. 3 12–24 Preprint at <https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa110> (2021).
30. Xiao, Y. & Gao, W. Therapeutic pattern and progress of neoadjuvant treatment for triple-negative breast cancer (Review). *Oncol Lett* **24**, 219 (2022).
31. Assidicky, R. *et al.* Targeting HIF1-alpha/miR-326/ITGA5 axis potentiates chemotherapy response in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **193**, 331–348 (2022).
32. Koh, M. Z. *et al.* Regulation of cellular and cancer stem cell-related putative gene expression of parental and cd44+ cd24- sorted mda-mb-231 cells by cisplatin. *Pharmaceuticals* **14**, (2021).

33. Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J. & Chen, W.-S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* **13**, 1551–1569 (2008).
34. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways. *Pharmacogenet Genomics* **21**, 440–446 (2011).
35. Hanan Ahmed Wahba & Hend Ahmed El-Hadaad. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* (2015).
36. Qiu, J. *et al.* Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *J Cancer* **7**, 167–173 (2016).
37. Li, X. *et al.* Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **161**, 279–287 (2017).
38. Colditz, G. A. & Bohlke, K. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA Cancer J Clin* **64**, 186–194 (2014).
39. Draganov, D. I. & La Du, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 78–88 (2004).
40. Marsillach, J. *et al.* Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* **45**, 146–157 (2008).
41. Porntadavity, S., Permpongpaiboon, T. & Sukketsiri, W. *Mini review: HUMAN PARAOXONASE 2. EXCLI Journal* vol. 9 (2010).
42. Draganov, D. I. *et al.* Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* **46**, 1239–1247 (2005).
43. Devarajan, A. *et al.* Paraoxonase 2 Deficiency Alters Mitochondrial Function and Exacerbates the Development of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **14**, 341–351 (2011).
44. Shiner, M., Fuhrman, B. & Aviram, M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K) pathway. *bchm* **388**, 1353–1358 (2007).

45. Giordano, G., Cole, T. B., Furlong, C. E. & Costa, L. G. Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: A neuroprotective role? *Toxicol Appl Pharmacol* **256**, 369–378 (2011).
46. Carusone, T. M. *et al.* WTAP and BIRC3 are involved in the posttranscriptional mechanisms that impact on the expression and activity of the human lactonase PON2. *Cell Death Dis* **11**, 324 (2020).
47. Solmaz Avcikurt, A. & Korkut, O. Effect of certain non-steroidal anti-inflammatory drugs on the paraoxonase 2 (PON2) in human monocytic cell line U937. *Arch Physiol Biochem* **124**, 378–382 (2018).
48. Morresi, C. *et al.* Effect of High Glucose-Induced Oxidative Stress on Paraoxonase 2 Expression and Activity in Caco-2 Cells. *Cells* **8**, 1616 (2019).
49. Mohammed, C. J. *et al.* A PON for All Seasons: Comparing Paraoxonase Enzyme Substrates, Activity and Action including the Role of PON3 in Health and Disease. *Antioxidants* **11**, 590 (2022).
50. Parween, F. & Gupta, R. D. Insights into the role of paraoxonase 2 in human pathophysiology. *Journal of Biosciences* vol. 47 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00234-7> (2022).
51. Mackness, B. *et al.* Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* n/a-n/a (2010) doi:10.1002/iub.347.
52. Shih, D. M. & Lusis, A. J. The roles of PON1 and PON2 in cardiovascular disease and innate immunity. *Curr Opin Lipidol* **20**, 288–292 (2009).
53. Furlong, C. E., Marsillach, J., Jarvik, G. P. & Costa, L. G. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact* **259**, 51–62 (2016).
54. Horke, S. *et al.* Paraoxonase-2 Reduces Oxidative Stress in Vascular Cells and Decreases Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Caspase Activation. *Circulation* **115**, 2055–2064 (2007).
55. Ježek, P. & Hlavatá, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2478–2503 (2005).
56. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44–84 (2007).

57. Manco, G., Porzio, E. & Carusone, T. M. Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation. *Antioxidants* **10**, 256 (2021).
58. Weinberg, F., Ramnath, N. & Nagrath, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers (Basel)* **11**, 1191 (2019).
59. Campagna, R. *et al.* Paraoxonase-2 Silencing Enhances Sensitivity of A375 Melanoma Cells to Treatment with Cisplatin. *Antioxidants* **9**, 1238 (2020).
60. Witte, I. *et al.* Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis* **2**, e112–e112 (2011).
61. Nagarajan, A. *et al.* Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport. *Mol Cell* **67**, 685–701.e6 (2017).
62. Faubert, B. *et al.* AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. *Cell Metab* **17**, 113–124 (2013).
63. Hu, M. *et al.* AMPK Inhibition Suppresses the Malignant Phenotype of Pancreatic Cancer Cells in Part by Attenuating Aerobic Glycolysis. *J Cancer* **10**, 1870–1878 (2019).
64. Xu, J. *et al.* Expression of Concern: Molecular mechanism whereby paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor in rat haemorrhagic shock model. *Int Wound J* **17**, 735–741 (2020).
65. Camps, J., Iftimie, S., García-Heredía, A., Castro, A. & Joven, J. Paraoxonases and infectious diseases. *Clin Biochem* **50**, 804–811 (2017).
66. Costa, L. G. *et al.* Modulation of Paraoxonase 2 (PON2) in Mouse Brain by the Polyphenol Quercetin: A Mechanism of Neuroprotection? *Neurochem Res* **38**, 1809–1818 (2013).
67. Current treatment landscape and emerging therapies for metastatic triple-negative breast cancer. *Am J Manag Care* **27**, S87–S96 (2021).
68. Baranova, A. *et al.* Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis. *J Med Life* **15**, 153–161 (2022).

69. Bacchetti, T. *et al.* Paraoxonase-2: A potential biomarker for skin cancer aggressiveness. *Eur J Clin Invest* **51**, (2021).
70. Tseng, J.-H. *et al.* Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression. *Oncotarget* **8**, 14666–14679 (2017).
71. Nagarajan, A. *et al.* Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport. *Mol Cell* **67**, 685-701.e6 (2017).
72. Fumarola, S. *et al.* Bladder Cancer Chemosensitivity Is Affected by Paraoxonase-2 Expression. *Antioxidants* **9**, 175 (2020).
73. Dahan, M., Hequet, D., Bonneau, C., Paoletti, X. & Rouzier, R. Has tumor doubling time in breast cancer changed over the past 80 years? A systematic review. *Cancer Med* **10**, 5203–5217 (2021).
74. Conklin, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr Cancer Ther* **3**, 294–300 (2004).
75. Hui, P.-Y., Chen, Y.-H., Qin, J. & Jiang, X.-H. PON2 blockade overcomes dexamethasone resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* **27**, 32–42 (2022).
76. Emanuelli, M. *et al.* The Double-Edged Sword of Oxidative Stress in Skin Damage and Melanoma: From Physiopathology to Therapeutical Approaches. *Antioxidants* **11**, 612 (2022).
77. Krüger, M., Pabst, A. M., Al-Nawas, B., Horke, S. & Moergel, M. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol* **141**, 1757–1766 (2015).
78. Krüger, M. *et al.* The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/ β -catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget* **7**, 51082–51095 (2016).
79. Kim *et al.* Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* **8**, 1105 (2019).

7 ABBREVIAZIONI

5-FU	5-Fluoruracile
5-HETEL	Acido 5-idrossieicosatetraenoico
AMPK	Protein chinasi attivata dall'AMP
AP-1	Proteina attivatrice 1
BC	Carcinoma della mammella
BL	Basal Like
BLIA	Basal Like Immuno Attivati
BLIS	Basal Like Immuno Soppressi
BRCA	Gene di suscettibilità al BC
BSA	Sieroalbumina bovina
CDDP	Cisplatino
CDH1	Caderina epiteliale
Ct	Ciclo di threshold
DCIS	Carcinoma duttali in situ
DHC	Diidrocumarina
ER	Recettore per gli estrogeni
ER	Reticolo endoplasmatico
FANS	Farmaci antinfiammatori non steroidei
FFPE	Fissati in formalina ed inclusi in paraffina
HER2	Recettore per il fattore di crescita epidermico umano 2

HRD	Deficit Ricombinazione omologa
IDC	Carcinoma duttale infiltrante
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IM	Immunomodulatorio
LAR	Luminal con recettore per gli androgeni
LCIS	Carcinoma lobulare in situ
M	Mesenchimale
MSL	Staminale mesenchimale
pCR	Risposta patologica completa
PI3K	Fosfatidilinositolo-3-chinasi
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PON	Paraoxonasi
PON1	Paraoxonasi 1
PON2	Paraoxonasi 2
PON3	Paraoxonasi 3
PR	Recettore per il progesterone
PTEN	Omologo di fosfatasi e tensina
PVDF	Polivinildenfluoruro
QS	Quorum Sensing
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SDS	Sodio dodecil solfato

SERBP-2	Proteina legante l'elemento regolatorio degli steroli
STK11	Serina-Treonina chinasi
TILs	Linfociti infiltranti il tumore
TNBC	Carcinoma della mammella triplo negativo