UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE CLINICHE SPECIALISTICHE ED ODONTOSTOMATOLOGICHE

Corso di Dottorato in

Biomedical Sciences

Ruolo dei lncRNAs ed effetto dell'estratto di germe di grano fermentato su proliferazione, migrazione, capacità invasiva e chemiosensibilità delle cellule di carcinoma orale squamocellulare

Role of lncRNAs and FWGE effect on proliferation, migration, invasive capability and chemosensitivity of oral squamous cell carcinoma cells

Dottoranda

Dott.ssa Graziana Spinelli

Relatore

Chiar.mo Prof. Davide Sartini

Correlatore

Dott.ssa Valentina Pozzi

Triennio Accademico 2019-2022

INDICE

Capitolo 1 INTRODUZIONE 4

1.1 Il carcinoma orale 4
1.1.1 Epidemiologia 5
1.1.2 Fattori di rischio 5
1.1.3 Sintomatologia e diagnosi 6
1.1.4 Sviluppo neoplasia 7
1.1.5 Staging 8
1.1.6 Strategie terapeutiche 11

1.2 Non-coding RNA 13
1.2.1 LncRNAs 13
1.2.2 Ruolo fisiologico lncRNA 16
1.2.3 LncRNA e cancro 17
1.2.4 LncRNA come biomarker 20

1.3 FWGE 23
1.3.1 Effetto antimetabolico 23
1.3.2 Effetto antiproliferativo 24
1.3.3 Effetto immunomodulatore 25
1.3.4 Effetto antimetastatico 26

1.4 Scopo della tesi 27

Capitolo 2 MATERIALI E METODI 28

2.1 Colture cellulari 28

2.2 Silenziamento genico 28
2.2.1 Silenziamento di TUG1 nella linea HSC-3 30
2.2.2 Isolamento, quantificazione, e retrotrascrizione dell'RNA totale 31
2.2.3 Real-time PCR 32
2.2.4 Valutazione della proliferazione cellulare tramite saggio MTT 33
2.2.5 Trattamento con chemioterapici 33

2.3 Trattamento con FWGE 33
2.3.1 Valutazione della proloferazione cellulare medinte saggio MTT 34
2.3.2 Saggio di invasività mediante valutazione 3D di sferoidi tumorali 34
2.3.3 Valutazione della migrazione cellulare mediante transwell assay 35
2.3.4 Trattamento con chemioterapici usati da soli e in combinazione con FWGE 35

2.4 Analisi statistica 35

Capitolo 3 RISULTATI……..36

3.1 Silenziamento di TUG1…….....36

3.1.1 Verifica dell'efficienza del silenziamento di TUG1 mediante Real-time PCR…….36

3.1.2 Effetti del silenziamento di TUG1 sulla proliferazione cellulare tramite saggio MTT….36

3.1.3 Effetti del cisplatino e 5-fluorouracile sulla vitalità cellulare ……..37

3.1.4 Impatto del silenziamento di TUG1 sulla chemiosensività delle cellule HSC-3…….41

3.2 Effetto di FWGE sulla tumogerigenicità delle linee OSCC……..43

3.2.1 FWGE riduce la vitalità cellulare delle line OSCC in maniera dose-dipendente…….....43

3.2.2 FWGE inibisce la capacità di formare sfere da parte delle linee cellulari di OSCC……44

3.2.3 Valutazione dell'effetto di FWGE su migrazione e capacità invasiva mediante transwell assay…….45

3.2.4 FWGE aumenta l'effetto inibente la proliferazione cellulare del trattamento chemioterapico…….46

Capitolo 4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI……48

Capitolo 5 ABBREVIAZIONI……51

Capitolo 6 BIBLIOGRAFIA…….....55

1. INTRODUZIONE

1.1 Il carcinoma orale

Il cavo orale è un distretto soggetto a un gran numero di neoplasie la cui prima distinzione macroscopica può essere operata in base alla natura del tessuto da cui le stesse si originano: si distinguono neoplasie di natura epiteliale (Tabella 1A) e neoplasie di natura connettivale (Tabella 1B). Tra tutte le forme maligne, il carcinoma orale squamocellulare (OSCC) è di gran lunga la più frequente, costituendo il 90% dei tumori del cavo orale. Insieme alle neoformazioni maligne esistono poi lesioni di natura benigna di cui i papillomi sono le più frequenti.

Tumori di origine epiteliale	
Benigni	**Maligni**
Papilloma (semplice-corneificante)	Carcinoma a cellule squamose
	Carcinoma a cellule basali
Tumori dell'epitelio ghiandolare	
Benigni	**Maligni**
Adenoma pleomorfo	Tumore mucoepidermoide
Adenolinfoma	Tumore a cellule acinose
Adenoma ossifilo	Carcinoma adenoideo cistico
Adenoma basocellulare	Tumore misto maligno
Adenoma tubulare	Adenocarcinoma
Adenoma a cellule chiare	
Tumori del sistema melanogenico	
Benigni	**Maligni**
Nevo pigmentato	Melanoma
Melanosi	

Tabella 1A. Classificazione delle neoplasie dei tessuti molli del cavo orale: tumori di origine epiteliale.

Tumori di origine mesenchimale	
Benigni	**Maligni**
Fibroma	Fibrosarcoma
Lipoma	Leiomiosarcoma
Leiomioma	Rabdomiosarcoma
Rabdomioma	Shwannoma maligno
Schwannoma	Neurosarcoma
Neurofibroma	Neurosarcoma
Emangioma capillare	Emangiopericitoma maligno
Emangioma cavernoso	Emangioendotelioma maligno
Emangiopericitoma	Emangiosarcoma
Emangioendotelioma	Linfagiosarcoma
Linfangioma semplice (capillare)	
Linfangioma cavernoso	
Tumori ad istogenesi incerta	
Benigni	**Maligni**
Mioblastoma	

Tabella 1B. Classificazione delle neoplasie dei tessuti molli del cavo orale: tumori di origine mesenchimale.

1.1.1 Epidemiologia

Con un aumento del 2% tra tutti i nuovi casi di neoplasia solo nell'arco del 2018, il carcinoma orale è in tutto il mondo una patologia la cui incidenza è in continua crescita. In molti paesi dell'Asia pacifica è una delle principali cause di morte. Nonostante la variabilità dei tassi di incidenza a seconda dei continenti, il carcinoma orale è responsabile ogni anno dell'1,9% dei decessi causati da tumori. Inizialmente, in gran parte diffuso nelle nazioni dell'Asia meridionale, oggi è diventato una neoplasia che desta preoccupazione anche nei paesi più sviluppati. Nel corso dei decenni passati si è registrato un aumento dei tassi di incidenza nei paesi sviluppati come USA, Australia, UK e qualche regione dell'Europa orientale e occidentale, contribuendo ad aggravare il fardello economico delle spese sanitarie in queste nazioni (1). Il carcinoma orale mostra una prevalenza legata al sesso, ma anche una distribuzione geograficamente correlata, con un'incidenza del 70% nei paesi con indice di sviluppo medio/basso. È infatti molto frequente in Asia centro-meridionale (es. Sri Lanka e Pakistan), così come in Melanesia (es. Papua Nuova Guinea dove si registra il più alto tasso di incidenza nel mondo per entrambi i sessi). In India è la principale causa di morte per cancro relativamente agli uomini (2). Il carcinoma orale è considerato una neoplasia aggressiva a causa del suo bassissimo tasso di sopravvivenza a 5 anni, dovuto in larga parte al ritardo della diagnosi, a sua volta imputabile alla natura asintomatica del tumore negli stadi precoci. Quando il carcinoma orale è confinato al suo sito di insorgenza, il tasso di sopravvivenza è dell'85.1%, ma questo scende rispettivamente al 66.8% e al 40.1% per tumori diffusi a linfonodi e a siti secondari. Altro fattore sotteso al ritardo della diagnosi è la mancanza, in molti paesi, di percorsi odontoiatrici di riferimento accessibili ed economicamente sostenibili, in cosiderazione del fatto che il trattamento di tale neoplasia è spesso associato a terapie invasive, complesse e costose (3). Il rischio di sviluppare la neoplasia aumenta con l'aumentare dell'età e la maggior parte dei casi si manifesta dopo i 40 anni, con picchi a 60 anni. Se la prognosi per OSCC sia diversa in pazienti giovani piuttosto che anziani non è ancora chiaro. Negli ultimi anni l'incidenza è comunque aumentata sia in soggetti giovani sia per quanto riguarda il sesso femminile. Ciò molto probabilmente a causa dell'aumento dei tassi di infezione da HPV nei paesi più sviluppati (4). Sostanzialmente, nonostante un generale aumento del tasso di mortalità a causa del ritardo della diagnosi in tutti i tipi di cancro, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dell'OSCC resta stabile intorno al 50%. Stando a quanto evidenziato da una recente analisi sui database di sorveglianza epidemiologica (SEER Analysis), la lingua è il sito anatomico di più comune riscontro in caso di OSCC e ad essa è associato il più alto tasso di mortalità rispetto alle forme di altri distretti (pavimento orale, gengive e trigone retromolare) (5).

1.1.2 Fattori di rischio

L'eziologia del carcinoma orale è strettamente correlata ad abitudini alimentari e stile di vita. Tra i principali fattori di rischio si annoverano fumo, consumo di alcol (che mostrano un notevole effetto sinergico), infezione da human papillomavirus (HPV), esposizione alle radiazioni ultraviolette (UV), masticazione di noci di betel, sesso maschile, stato economico, microbioma orale, abitudini alimentari e igiene orale (6). Il 25% di tutti i carcinomi orali è causato dal fumo di sigaretta. In soggetti fumatori si riscontra una probabilità tre volte maggiore rispetto a soggetti non fumatori di sviluppo di OSCC. In soggetti che hanno smesso da 4 anni il rischio si riduce del 35% rispetto a chi ancora consuma attivamente tabacco, mentre in soggetti che hanno smesso da più di 20 anni il rischio è paragonabile a chi non ha mai fumato. Anche il fumo passivo gioca infatti un ruolo importante: l'esposizione di soggetti non fumatori ad un ambiente ricco di fumo di sigaretta aumenta dell'87% il rischio di sviluppare la patologia. L'effetto imputabile al fumo è dovuto alla presenza di sostanze carcinogeniche come nitrosamine, benzopireni e amine aromatiche, in grado di

condizionare negativamente meccanismi di difesa enzimatici (7). Una relazione dose e tempo-dipendente lega il consumo di alcol all'insorgenza del carcinoma orale. Infatti, in soggetti avvezzi al consumo di 4-5 cocktail al dì, il rischio di sviluppare la neoplasia risulta almeno 3 volte maggiore rispetto a soggetti non consumatori di alcol. Ciò a causa dell'azione dell'alcol che oltre a dissolvere i componenti lipidici dell'epitelio causandone atrofia, si comporta come solvente di tutti i composti nocivi che anche il fumo produce e, grazie alla sua capacità di modificare la permeabilità di membrana rende le cellule particolarmente recettive a questi tipi di sostanze. Anche la produzione di saliva e la capacità epatica di inattivare componenti tossici e mutagenici o prodotti di scarto del metabolismo sono compromesse dall'abuso di alcol (6). L'agente infettivo primo fra tutti responsabile dell'insorgenza del carcinoma orale è l'HPV, ma più raramente anche l'Herpes simplex, lo Human Immunideficiency Virus e il Virus di Epstein Barr possono rivelarsi insidiosi per l'innesco della patologia. In particolar modo, i sierotipi di HPV 16 e 18 sono in grado di causare un'alterazione del ciclo cellulare che si può tradurre in uno stimolo protumorigenico (6,8). Stando ai dati della classificazione IARC (International Agency for Research on Cancer), fra i maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di OSCC si riscontra la masticazione di noci di betel, che è associata al rilascio di sostanze carcinogeniche, nitrosamine, e ROS in seguito all'autossidazione dei composti fenolici contenuti nelle stesse noci. Non a caso il Sud Est asiatico, la zona dei maggior consumatori di questi prodotti, rappresenta una delle popolazioni a più alta incidenza di carcinoma orale. Il carcinoma delle labbra, la zona maggiormente esposta alla luce solare, è in gran parte dei casi causato dall'esposizione ai raggi UV, agenti in grado di indurre mutazioni genetiche, danno al DNA, immunosoppressione, stress ossidativo e risposta infiammatoria, determinanti in grado di promuovere sia l'innesco della tumorigenesi che il suo sviluppo (8). Negli ultimi anni è stato riscontrato un aumento del rischio di OSCC in seguito all'infezione batterica nota come parodontite. Tra gli agenti responsabili, il Fusobacterium nuclatum è di certo quello più di frequente riscontrato nelle lesioni precancerose. Questo è responsabile dell'induzione dello stato infiammatorio grazie alla secrezione di sostanze come il lipopolisaccaride (LPS), che può indurre danno al DNA nelle cellule epiteliali. L'analisi della flora batterica orale di pazienti affetti da OSCC, soggetti con lesioni precancerose e soggetti sani, ha evidenziato la presenza di differenze nella composizione batterica del distretto orale (9). Nonostante non sia ancora stato chiarito il meccanismo d'azione dei micronutrienti nella lotta allo sviluppo della neoplasia, si ritiene che un'alimentazione ricca di frutta e verdura possa contrastarne l'insorgenza e la diffusione in quanto circa il 10-15% dei casi di OSCC può essere attribuito a soggetti con uno scarso apporto di vegetali. È inoltre stata dimostrata la correlazione tra scarsa igiene orale e carcinoma orale (8).

1.1.3 Sintomatologia e diagnosi

Per quanto riguarda l'OSCC, nelle fasi precoci è asintomatico e il sintomo più comune è il dolore. Sebbene esso sia una manifestazione costante della neoplasia, si avverte solo tardivamente, quando ormai le lesioni hanno raggiunto una misura notevole (10). Infatti, lo sviluppo dell'OSCC è caratterizzato da un processo multistadio, solitamente preceduto dalla comparsa di oral potentially malignant desorsders (OPMD), lesioni della mucosa orale, che nella maggior parte dei casi, predispongono il paziente allo sviluppo della patologia. Essendo per ragioni anatomiche meno esposto all'esaminazione clinica, il carcinoma orale è spesso diagnosticato in stadio avanzato, riducendo notevolmente le possibilità di sopravvivenza, nonostante l'esistenza di strategie terapeutiche valide. Per questo motivo, il clinico deve effettuare un'esame accurato della mucosa orale alla ricerca di alterazioni strutturali associate a perdita di integrità della superficie epiteliale e caratterizzate da colore e taglia anomali, tipiche del carcinoma orale e di lesioni premaligne (11). La palpazione dei linfonodi cervicali alla ricerca di masse metastatiche deve accompagnare l'ispezione orale; tuttavia, nonostante l'elevata sensibilità, tale ispezione clinica ha uno scarso grado di specificità a

causa della sua incapacità di discriminare lesioni benigne da lesioni maligne. A questo proposito le tecniche gold standard impiegate per una diagnosi corretta e affidabile di carcinoma orale sono le analisi bioptica e istopatologica, che purtroppo richiedono molto tempo e possono comportare sgradevoli effetti collaterali e complicazioni post-operatorie, poiché basate sulla resezione chirurgica. Per aggirare queste evenienze si è tentato di sviluppare nuove tecniche di imaging, non invasive, in grado di fornire informazioni in tempi più brevi e limitare l'esame bioptico solo alle lesioni altamente sospette. Tra di esse troviamo colorazione con blu di toluidina e imaging ad autofluorescenza (11). Eritroplachia e leucoplachia sono le tipologie di OPMD più comuni e maligne. La leucoplachia non mostra caratteristiche istopatologiche precise, mentre l'eritoplachia è caratterizzata da ipercheratosi, iperplasia epiteliale e/o ispessimento epiteliale. A differenza della prima, l'eritroplachia mostra un più alto tasso di trasformazione maligna e spesso mostra variazioni delle caratteristiche istopatologiche, tra cui displasia di alto grado, carcinoma in situ o SCC invasivo. Clinicamente, le lesioni appaiono ben demarcate e con macchie rosse, a volte ruvide e granulari in superficie. Alcuni studi hanno dimostrato che cambi nei livelli molecolari (specialmente relativi a ncRNAs) possono indentificare lesioni che sono destinate a progredire in cancro. Ad esempio la presenza di miR-150-5p/miR-222-3p e miR-150-5p/miR423-5p caratterizza rispettivamente pazienti sani da pazienti affetti da OSCC. Specifici meccanismi di trasporto nucleare sono stati identificati quali eventi chiave nella regolazione della progressione di OSCC (12).

I sintomi legati allo sviluppo del carcinoma orale variano in generale da lieve disagio a dolore severo a carico della lingua, dolore alle orecchie, sanguinamento, mobilità dentale, difficoltà respiratorie e alla parola, disfagia e parestesia (10). Negli ultimi anni molti studi si sono focalizzati sull'analisi della saliva alla ricerca di biomarker diagnostici e prognostici di OSCC. Tale campione bioptico è interessante poiché collocato vicino alle cellule tumorali, semplice da repertare, associato a tecniche di prelievo non invasive e poco costose. Fino ad ora l'analisi di questi campioni ha permesso di identificare alterazioni epigenetiche e genomiche di cellule maligne, permettendo la diagnosi precoce di un possibile stato patologico. I biomarkers più promettenti sono rappresentati da citochine, molecole di DNA e RNA, cellule libere e appartenenti a tessuti e vescicole extracellulari. Sebbene ancora ad uno stato primordiale, la biopsia del liquido salivare sembra avere un ottimo potenziale per la diagnosi e il trattamento di OSCC, migliorando, oltre alla prognosi, sia terapia che follow up (13).

1.1.4 Sviluppo della neoplasia

L'OSCC si origina dalle cellule epiteliali della mucosa che rivestono cavità orale, faringe, laringe e tratti sinonasali. Dal punto di vita istologico, sebbene molti pazienti non mostrino una storia di precedenti lesioni maligne, il processo che porta alla formazione del tumore segue una serie ordinata di trasformazioni: iperplasia delle cellule epiteliali, displasia (scarsa, moderata e severa), carcinoma in situ e carcinoma invasivo, con la successiva formazione di metastasi. Data la natura eterogenea dell'HNSCC, la cellula di origine dipende dal sito anatomico e dall'agente eziologico scatenante (cancerogeno o virus), ma generalmente le principali candidate sono cellule staminali adulte o progenitrici della mucosa orale, che incorrono in una trasformazione neoplastica generando cellule staminali tumorali (CSCs), dotate di proprietà di autorinnovamento e pluripotenza. Le CSCs di HNSCC con la capacità di generare tumori se trapiantate sono solo l'1-3% di tutte le cellule della massa tumorale primaria e, nonostante la loro resistenza ai farmaci convenzionali, rappresentano un bersaglio interessante per farmaci di nuova generazione (14). Il processo multifattoriale che porta alla genesi delle CSCs inizia quando una serie di variazioni genetiche ed epigenetiche influenzano l'espressione proteica alterando una serie di vie di

trasduzione del segnale. Le alterazioni genetiche che inaugurano il processo di carcinogenesi coinvolgono p53(TP53), notch homolog 1 translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1), il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), l'inibitore della chinasi 2-ciclina dipendente (CDKN2A), il trasduttore di segnale e l'attivatore della trascrizione STAT3, la ciclina D1 e retinoblastoma (Rb)(8). Il microambiente tumorale (TME) del carcinoma orale comprende i fibroblasti associati al cancro (CAF), le cellule del sistema immutario e altre cellule di supporto. Le variazioni foriere di cancro nei profili di espressione genica determinano eventi che portano l'accumulo di ROS (specie reattive dell'ossigeno), l'overproduzione di citochine e transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Questo stato di infiammazione cronica è caratterizzato dalla presenza di cellule immunosoppressive con attività pro-tumorale come linfociti T regolatori, macrofagi M2, neutrofili N2 e cellule soppressorie derivate dalle cellule mieloidi. I fibroblasti cancro-associati sono gli elementi centrali di questo ambiente poiché favoriscono la proliferazione, l'invasione e la formazione di metastasi. La repressione della risposta immunitaria si attua grazie all'overespressione di citochine ed interleuchine come il fattore di crescita e tarsformazione (TGF-β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin1 (IL-1), and interleukin-8 (IL-8). Altri fattori secreti dalle cellule tumorali che promuovono lo stato TME e la diffusione includono le metalloproteinasi di matrice 2, 9 e 13 (MMP2, MMP9 e MMP13), ROS, fattore di crescita endoteliale dei vasi (VEGF), il motivo CXC delle chemochine (CXC motif) col il ligando 1 (CXCL1) e 8 (CXCL8), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), E-caderina, vimentina e N-caderina. Questo microambiente promuove una proliferazione cellulare incontrollata e favorisce l'invasione e la migrazione (15).

1.1.5 Staging

L'OSCC è classificato in base alle linee guida del sistema internazionale del controllo del cancro (UICC) e dell'American Join Commitee on Cancer (AJCC), mediante il sistema TNM (tumor-node-metastasis). I parametri oggetto di valutazione di questo sistema vengono combinati per formare gruppi a differente stadio di sviluppo della neoplasia: misura/taglia del tumore primario (T) (Tabella 2), coinvolgimento dei linfonodi loco-regionali in termini di numero, taglia e sito (N) (Tabella 3) ed eventuale presenza di metastasi (M) (Tabella 4). La classificazione TNM (Tabella 5) è fondamentale per la definizione della terapia, la stima del rischio di recidive e la predizione del tasso di sopravvivenza. Con L'ultima versione, risalente al 2017, sono stati introdotti due nuovi elementi: DOI o profondità di incorporazione del tumore (incorporation of the tumor depth of invasion) ed ENE o estensione extranodale, aggiunte rispettivamente ai parametri T ed N. Attualmente si sta valutando il passaggio dall'approccio "basato sulla popolazione" ad un altro più contemporaneo, personalizzato, basato invece sulla considerazione di marker molecolari individuali del paziente (16-18).

TX	Impossibile individuare il tumore primitivo
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore di 2 cm o meno nella dimensione maggiore
T2	Tumore > 2 cm ma < 4 cm nella dimensione maggiore
T3	Tumore > 4 cm nella dimensione maggiore
T4a	Patologia locale moderatamente avanzata
	(Labbra) Il tumore invade l'osso compatto, il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale o la pelle del viso (del naso o del mento)
	(Cavità orale) Il tumore invade solo le strutture adiacenti (per esempio, invade l'osso compatto [mascella o mandibola], i muscoli della lingua estrinseci (genioglosso, ioglosso, palatoglosso, stiloglosso), il seno mascellare o la pelle del viso.
T4b	Patologia locale molto avanzata
	Il tumore invade lo spazio masticatorio, le piastre pterigoidee, la base del cranio e/o l'arteria carotide interna

Tabella 2. Classificazione TNM per il carcinoma orale. Tumore primario (T).

Nx	Impossibile individuare linfonodi regionali
N0	Non ci sono metastasi ai linfonodi regionali
N1	Metastasi in un solo linfonodo omolaterale con dimensione < o uguale a 3 nella dimensione maggiore
N2	Metastasi in un singolo linfonodo omolaterale, > 3 cm ma < o uguale a 6 cm nella dimensione maggiore
	Metastasi in linfonodi omolaterali multipli, tutte < 6 cm nella dimensione maggiore
	Metastasi in linfonodi bilaterali o controlaterali, tutte < 6 nella dimensione maggiore
N2a	Metastasi in un solo linfonodo omolaterale con dimensione > 3 cm e < o uguale 6 cm nella dimensione maggiore
N2b	Metastasi in linfonodi omolaterali multipli, tutte < 6 cm nella dimensione maggiore
N2c	Metastasi in linfonodi bilaterali o controlaterali ognuna con dimensioni < 6 cm
N3	Metastasi in un singolo linfonodo con dimensione > 6 cm nella dimensione maggiore

Tabella 3. Classificazione TNM. Linfonodi regionali (N)

Mx	Impossibile individuare la metastasi
M0	Nessuna metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

Tabella 4. Classificazione TNM. Metastasi a distanza (M).

Stadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV A	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IV B	Tutte le categorie T	N3	M0
	T4b	Tutte le categorie N	M0
IV C	Tutte le categorie T	Tutte le categorie N	M1

Tabella 5. Stadiazione del carcinoma orale. Stadio Anatomico e Gruppi Prognostici.

Quanto più un tessuto neoplastico si discosta dalle caratteristiche istologiche della componente normale tanto maggiore è la sua aggressività biologica e tanto peggiore è la prognosi. A tale proposito, anche per quanto concerne il carcinoma orale, esiste un sistema di classificazione relativa al grading istologico (Tabella 6) o grado di differenziamento cellulare del tumore che, definito anche come classificazione di Broder, che rappresenta la misura del grado di aggressività del tumore (19). Sebbene successivamente a questo siano stati proposti sistemi di classificazione più complessi del grado istologico, si continua a preferire l'edizione attuale, più semplice. La classificazione dei tumori della regione testa-collo messa a punto dalla World Health Organization (WHO), basato sui criteri di Broder, distingue le neoplasie in bene, moderatamente e scarsamente differenziate (GX-G3), ma il grado da solo non correla con la prognosi (16). Molti studi hanno dimostrato infatti che non c'è alcun valore prognostico nel sistema di grading della WHO. Nuovi sistemi di grading prevedono la valutazione di elementi legati al tumore (es. differenziazione) e al suo pattern di adesione, nonché alle reazioni dell'ospite (es. risposta infiammatoria). Inoltre, viene preso in considerazione il microambiente tumorale (es. lo stroma). Questi sistemi multifattoriali mostrano un valore prognostico migliore rispetto a quello della WHO, ma necessitano di ulteriori validazioni su larga scala (17).

Gx	Grado di differenziazione non determinabile
G1	Carcinoma ben differenziato, <25% di cellule non differenziato
G2	Carcinoma moderatamente differenziato, <50% di cellule non differenziate
G3	Carcinoma scarsamente differenziato, 50-75% di cellule non differenziate
G4	Carcinoma indifferenziato (anaplastico), >75% di cellule non differenziate

Tabella 6. Sistema di classificazione del grading del carcinoma orale.

1.1.6 Strategie terapeutiche

A seconda della collocazione e dello stadio del tumore e della condizione del paziente, resezione chirurgica, chemioterapia, radioterapia o una loro combinazione sono le principali terapie adottate per il trattamento dell'OSCC. Molti pazienti con patologia a stadio precoce vengono trattati con una modalità terapeutica singola scelta tra resezione chirurgica o radioterapia. La resezione chirurgica è il trattamento d'elezione in tumori resecabili e, per evitare la diffusione del tumore, può essere affiancata da dissezione dei linfonodi. Nel caso di tumori non resecabili, alto rischio operatorio dovuto alle precarie condizioni del paziente o cancro ricorrente, la radioterapia può essere usata alternativamente alla chirurgia come tecnica di elezione. Quando la neoplasia è diagnosticata ad uno stato avanzato, la chirurgia è seguita da radioterapia adiuvante o chemioradioterapia. In caso di massa non resecabile si ricorre in prima linea a chemio e radioterapia contemporanee. Per pazienti con neoplasia ricorrente e metastatizzante è previsto un trattamento a scopo palliativo. I chemioterapici usati più frequentemente sono cisplatino, carboplatino, 5- fluorouracile, paclitaxel and docetaxel. Il trattamento combinato di cisplatino e 5-fluorouracile è quello a maggior efficacia e minor livello di tossicità (6). Il cisplatino (cis-Diammineplatinum(II) dichloride or CDDP) è costituito da una molecola di platino legata a due diversi ligandi, un gruppo amminico e un atomo di cloro. Il cispaltino entra nelle cellule per diffusione o mediante proteine di trasporto transmembrana all'interno del quale gli atomi cloro vengono sostituiti con due molecole di acqua che formano le specie attive e cariche positivamente che possono legare in maniera covalente il DNA. Il legame cisplatino-DNA genera tre tipi di addotti: monoaddotti, crosslegami intrafilamento e crosslegami interfilamento. I monoaddotti si formano quando il cisplatino perde una molecola di acqua, ma la maggiorparte di essi (90%) reagisce per formare crosslegami. Una grande parte dei crosslegami è intrafilamento e coinvolge due guanine ma le forme più avanzate sono intercatena. L'attività antitumorale del cisplatino risiede nella sua capacità di danneggiare la struttura a doppia elica, disregolando il ciclo cellulare e provocando l'arresto della replicazione, nonché l'inibizione della trascrizione e dei processi di riparazione del DNA. Inoltre, esso è responsabile di cambiamenti della struttura del citoscheletro delle cellule tumorali, in virtù della sua capacità di legame ai gruppi sulfidrilici liberi della tubulina, causando una parziale depolimerizzazione dei microtubuli. Il cisplatino è in grado di legare altre molecole citoplasmatiche tra cui il glutatione ridotto e la metallotioneina, causando produzione di ROS che attivano la permeabilizzazione della membrana esterna dei mitocondri (MOMP) e danno al DNA. Resistenza e tossicità sono i maggiori problemi che limitano l'utilizzo del cisplatino in ambito clinico. Il maggior meccanismo di resistenza associato a questo farmaco è causato dall'overespressione del trasportatore copper 1 (CTR1) e della glicoproteina P, proteine transmembrana che mediano il trasporto dei farmaci a base di platino. La concentrazione di cisplatino nelle cellule epiteliali tubulari prossimali può essere fino a cinque volte maggiore di quella del composto nel siero. La nefrotossicità costituisce il determinante principale che limita l'impiego del cisplatino nel trattamento clinico (20,21). Il 5-fluorouracile (5-FU) è un analogo dell'uracile con un atomo di fluoro in posizione C5 al posto dell'idrogeno. Esso entra rapidamente nelle cellule usando lo stesso trasporto facilitato dell'uracile. Una volta internalizzato, viene convertito in svariati metaboliti attivi. Circa l'80% del 5-FU somministrato è compromesso dalle deidrogenasi diidropirimidiniche del fegato. Il 5-FU esplica il suo effetto inibendo la timidina sintasi (TS) e l'incorporazione dei suoi metaboliti in RNA e DNA. Formando complessi ternari stabili con la TS, il 5-FU blocca la sintesi de novo del timidilato necessario per la replicazione e la riparazione del DNA. L'inibizione della TS si traduce inoltre nell'accumulo di corpuscoli di dUTP e 5-FU che potrebbero portare alla rottura del filamento di DNA e alla morte cellulare. Il 5-FU è ampiamente incorporato anche nell'RNA ostacolando i suoi normali processi e funzioni. La riparazione del danno a DNA/RNA tramite il meccanismo di mismatch repair (MMR) e quello di escissione delle basi (BER) è uno degli strumenti utilizzati dal cancro per resistere al 5-FU. Un altro importante meccanismo di resistenza

attuato dalle cellule di OSCC è l'inibizione dell'apoptosi. Il trattamento con 5-FU può essere associato ad effetti collaterali a lungo termine a livello cognitivo, data la sua capacità di entrare nelle cellule del sistema nervoso centrale per diffusione passiva (21,22).

La terapia mirata e l'immunoterapia possono costituire altre opzioni terapeutiche, utilizzate da sole o in combinazione con chemio o radioterapia. Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico (murino/umano) che ha come bersaglio la proteina EGFR upregolata nella gran parte dei casi di OSCC. Esso previene l'attivazione del gene KRAS, che promuove la proliferazione e sopravvivenza delle cellule cancerose, e dei fattori pro-angiogenici. Il suo utilizzo è stato approvato sia in combinazione con radioterapia per forme localmente o regionalmente avanzate, sia come agente singolo per neoplasie ricorrenti o metastatizzanti, per cui la terapia a base di platino è fallita. Recentemente è stato dimostrato che la capacità dei carcinomi squamosi della regione testa-collo di eludere i sistemi di controllo del sistema immunitario può essere ridotta in seguito al trattamento con specifici inibitori. Sulla base di tali scoperte, sono stati messi a punto protocolli terapeutici che prevedono l'impego di anticorpi anti-PD1 (pembrolizumab and nivolumab) riservati a pazienti affetti da OSCC ricorrente o metastatizzante, con progressione della malattia durante o dopo chemioterapia a base di platino (23).

1.2 Non-coding RNA

Per decenni, il DNA non codificante proteine è stato definito come DNA spazzatura. Lo studio del genoma umano, mediante i progetti su larga scala FANTOME ed ENCODE, ha rivelato che in realtà solo il 2% del genoma è adibito a codificare proteine, mentre l'80% ospita elementi di regolazione. In seguito alla trascrizione di queste regioni del genoma, vengono generate molteplici specie di RNA di cui fanno parte i long non-coding RNA (lncRNA), i quali costituiscono una classe di RNA in grado di esercitare un importante ruolo regolativo all'interno della cellula eucariotica. Le regioni di DNA non codificante costituiscono il 68% del trascrittoma umano e una loro disregolazione è spesso associata ad eventi patologici come la carcinogenesi. Gli RNA non codificanti (ncRNA) possono essere classificati in due gruppi principali: small and long non-coding RNA (24). Da un punto di vista biologico, i miRNA agiscono come efficienti regolatori post-trascrizionali dell'espressione di specifici geni target, comportandosi da oncosoppressori o da oncogeni. Pertanto, la loro disregolazione rappresenta uno degli eventi chiave alla base dell'insorgenza dei tumori. Analogamente, i lncRNA modulano l'espressione di geni correlati alla proliferazione e al differenziamento cellulare, e pertanto, se disregolati possono esercitare un'attività oncogenica (24). Gli small non-coding RNA o piccoli RNA non codificanti (sncRNA) sono oligonucleotidi lunghi dalle 18 alle 23 basi e comprendono piccoli RNA interferenti (small interfering RNA o siRNA) e microRNA (miRNA), entrambi in grado di regolare negativamente l'espressione di geni a livello post-trascrizionale, legandosi in particolar modo alle regioni non tradotte (3' e 5' UTR) o alle sequenze codificanti dei trascritti, determinando la degradazione della sequenza nucleotidica o esercitando un'azione repressiva nei confronti della traduzione. Il processo di genesi dei miRNA prevede diverse fasi e origina dalla trascrizione da parte della RNA polimerasi II di trascritti primari (pri-miRNA) a partire da sequenze esoniche o introniche di geni non codificanti o da regioni introniche di geni codificanti. In seguito alle canoniche modifiche post-trascrizionali di capping, splicing e poliadenilazione, i miRNA vengono riconosciuti da specifici complessi multienzimatici appartenenti alla famiglia delle RNAsi III denominati DROSHA e DICER, andando incontro ad un processo di maturazione a livello nucleare (cropping) e citoplasmatico (dicing). Nel nucleo il complesso DROSHA converte i pri-miRNA in molecole precursore con struttura a forcina, denominate pre-miRNA. Questi ultimi, dopo la traslocazione nel citoplasma mediante il sistema esportina 5/Ran-GTP, divengono substrato del DICER che, rimuovendo il loop della forcina, genera un RNA duplex di 19-24 nucleotidi. Solo uno dei due filamenti sarà selezionato (filamento guida) e incorporato nel complesso multienzimatico RISC che lo dirotterà verso il messaggero bersaglio. Il complesso RISC-miRNA riconosce la sequenza bersaglio del messaggero, generalmente nella regione non tradotta 3', inducendone la degradazione o reprimendone la traduzione (25).

1.2.1 lncRNA

I lunghi RNA non codificanti (lncRNA) sono molecole dotate di una sequenza maggiore di 200 nucleotidi (compresa tra i 1000 e i 10000) e vengono trascritti dall'RNA polimerasi II. Essi sono soggetti ai processi di capping e poliadenilazione, e molto di frequente a splicing. I lncRNA non contengono open reading frame (ORF) e la loro funzione è quella di promuovere o reprimere l'espressione genica a diversi livelli (26,27). Nonostante il ridotto grado di conservazione della sequenza nucleotidica di tali trascritti tra le varie specie, molti lncRNA presentano funzioni e struttura secondaria ben conservate a livello evolutivo. La trascrizione dei lncRNA è spesso posta sotto il controllo di fattori di trascrizione e determinanti epigenetici ben caratterizzati, e la loro espressione è spesso specifica per tipo cellulare, tessuto, fase di sviluppo e/o patologia (28).

I lncRNA hanno la capacità di svolgere una gran mole di funzioni in molti processi cellulari tra cui imprinting genetico, il differenziamento e lo sviluppo, nonché la risposta antivirale (29,30,31). Molti lncRNA sono noti per interagire con i complessi di rimodellamento della cromatina, per essere coinvolti nella formazione dei domini nucleari o nell'attività di trascrizione in qualità di attivatori (mediante l'interazione con gli enhancers) (32,33). È stato inoltre dimostrato che alcuni lncRNA interferiscono con la macchina trscrizionale o sostengono la struttura dei corpi nucleari (34). Alcuni lncRNA agiscono a livello post-trascrizionale come regolatori dello splicing o esche di mRNA, partecipano alla traduzione e contribuiscono alla stabilità proteica o agiscono da spugne molecolari per microRNA (24).
Lo studio del ruolo svolto dai lncRNA è stato compiuto grazie alle tecniche di sequenziamento high-throughput. Tale approccio ha permesso di identificare differenti criteri con poter classificare le varie molecole di lncRNA.

1. Meccanismo di funzionamento - regolatori trascrizionali e post-trascrizionali.
2. Meccanismo di targeting.
3. DNA bersaglio - lncRNA agenti in cis e lncRNA agenti in trans, i primi controllano l'espressione dei geni posizionati nelle vicinanze del sito in cui viene trascritto il lncRNA, i secondi attivano o reprimono l'espressione di geni in loci lontani.
4. Collocazione sul genoma (24).

In base alla posizione che occupano all'interno del genoma, i lncRNA possono essere classificati in:
- lncRNA intergenici, situati tra due geni codificanti proteine,
- lncRNA bidirezionali, trascritti a partire dallo stesso promotore di un gene codificante, ma in direzione opposta,
- lncRNA antisenso, originati dal filamento di RNA antisenso di un gene codificante proteine,
- lncRNAs sovrapposti al filamento senso, ovvero la cui sequenza è sovrapposta ad uno o più introni/esoni di geni codificanti, a livello del filamento RNA senso (35).
Grazie alla loro struttura primaria, ovvero la sequenza nucleotidica di cui sono provvisti, i lncRNA sono in grado di operare direttamente o indirettamente la regolazione trascrizionale di un gene target, sulla base del principio di complementarità di basi (36). I lncRNA possono anche organizzarsi in strutture secondarie termodinamicamente stabili e regolari, quali doppie eliche, loop a forcina, rigonfiamenti e pseudonodi, grazie alla formazione di legami idrogeno interni alla struttura dell'RNA stesso. In questo caso la loro funzione biologica è strettamente associata alla loro struttura secondaria. Ad esempio, i motivi M2 ed M3 del lncRNA MEG3 (maternally expressed gene 3), organizzati in specifiche strutture secondarie, attivano p53, a differenza della sequenza primaria dello stesso lncRNA che non è in grado di interagire con il gene menzionato né di determinare alcun effetto su di esso. Mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso e RNA interferenza è stato dimostrato che i lncRNA sono presenti in diversi compartimenti cellulari, tra cui il nucleo (es. MALAT1 and NEAT1), il citoplasma (es. DANCR and OIP5-AS1), o addirittura possono essere attivi in entrambi (es. TUG1, CasC7 and HOTAIR) (36).

Il controllo dell'espressione genica può avvenire con meccanismi differenti, a seconda della localizzazione stessa del lncRNA, ovvero tra nucleo e citoplasma. In ciascuno dei due distretti, essi possono mettere in atto differenti modalità d'azione (Figura 1) sintetizzabili in tre categorie principali.

<u>ESCHE MOLECOLARI</u> - i lncRNA modulano l'espressione genica interagendo con proteine regolative e fattori di trascrizione, impedendo ad essi di interagire con il DNA. In particolare, essi legano e sequestrano RNA binding protein, fattori di trascrizione, microRNA, proteine ad attività catalitica e subunità di complessi di rimodellamento della cromatina, allontanandoli dal loro bersaglio nativo, e di conseguenza, influenzando la trascrizione e traduzione del gene bersaglio.

SCAFFOLD DINAMICI o ADATTATORI – si tratta di molecole che svolgono un ruolo strutturale fornendo una piattaforma centrale per l'assemblaggio transitorio di più complessi enzimatici. I lncRNA mediano la formazione di complessi ribonucleoproteici (RNP) che regolano l'espressione genica tramite il targeting di specifiche sequenze genomiche, oppure condensano o decondensano la cromatina, rendendola più o meno accessibile all'apparato di trascrizione basale, promuovendo o inibendo la trascrizione dei geni bersaglio. Tra i complessi RNP più rappresentativi si annovera il Polycomb Repressive Complex (PRC), che condensa la cromatina silenziando l'espressione dei geni target.

GUIDE – tali lncRNA sono necessari per la corretta localizzazione di fattori specifici in loci genomici target e sono essenziali per la regolazione dell'espressione genica. Sono in grado di legare proteine regolatorie o cataliticamente attive (come fattori di trascrizione ed enzimi di rimodellamento della cromatina) e di dirottarle in specifiche posizioni del genoma, in corrispondenza di siti cis (adiacenti) o trans (distanti) rispetto al loro locus di trascrizione. Il targeting specifico operato dai lncRNA guida è stimolato dalle interazioni RNA-DNA, RNA-RNA e RNA-proteina.

Dal punto di vista funzionale, dunque, la versatilità è caratteristica che contraddistingue le molecole di lncRNA: un singolo trascritto può comportarsi, a seconda dei contesti in cui si trova, da guida o da scaffold. (37,38) (Figura 1).
Nel citoplasma numerosi lncRNA esplicano la loro funzione interagendo con sequenze complementari trascritte sullo stesso locus cromosomico o su loci indipendenti agendo come spugne che, sequestrando specifici miRNA e interferendo quindi con la loro funzione. Tale fenomeno è possibile perché il lncRNA può contenere una regione complementare al miRNA analoga al MRE (miRNA response element) dell'mRNA bersaglio, entrando quindi in competizione col miRNA per l'interazione con l'RNA messaggero. Questi lncRNA prendono il nome di ceRNA (competitive endogenous RNA) e giocano un ruolo fondamentale nella regolazione del differenziamento e dello sviluppo, così come nei processi alla base della formazione dei tumori. Nelle cellule neuronali è stata recentemente identificata una nuova classe di RNA circolari (circRNA) che, analogamente ai ceRNA, può agire da spugne per miRNA ma, al contrario di essi, hanno una maggior stabilità (25).

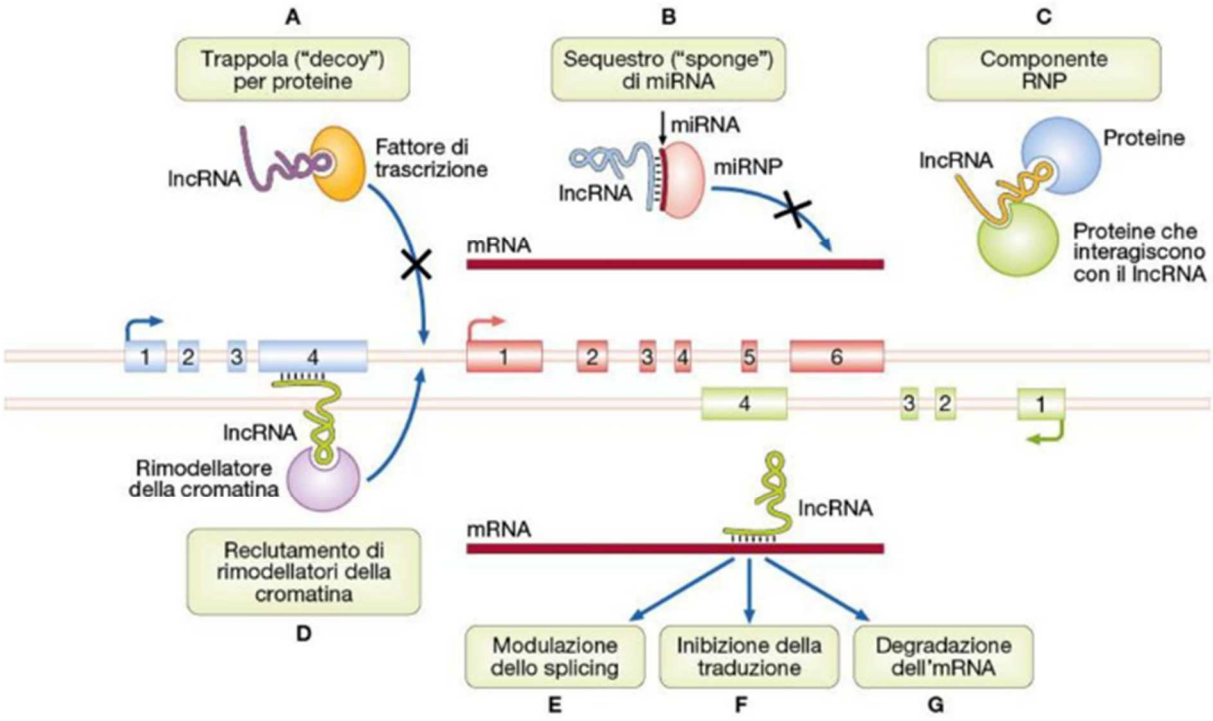


Figura 1. Funzioni biologiche dei lncRNA.

1.2.2 Ruolo fisiologico dei lncRNA

L'RNA polimerasi II trascrive preferenzialmente un solo filamento di DNA e il processo di trascrizione inizia in corrispondenza di specifici siti (TSS-transcription start sites). Raramente però la stessa polimerasi può interagire con siti posti ad una certa distanza dal promotore, anche orientati in direzione opposta, o con siti strutturalmente simili al promotore generando lncRNA. In altri casi, i lncRNA possono essere espressi a partire da pseudogeni o essere il risultato di mutazioni genomiche, duplicazioni, insersioni e inversioni (25).

Xist (X-inactive specific transcript) è un lncRNA che agisce in cis il cui meccanismo d'azione concorre all'inattivazione di uno dei due cromosomi X nella linea somatica femminile. Xist è espresso esclusivamente nelle cellule in cui sono presenti due cromosomi X, ed è trascritto nella zona Xic (X inactivation center) del cromosoma che deve essere inattivato. Xist si lega al DNA in corrispondenza del cromosoma da cui è stato trascritto, richiamando complessi di rimodellamento della cromatina che rendono il cromosoma stesso eterocromatico, ovvero trascrizionalmente inattivo (visibile al cariotipo come corpo di Barr). L'antagonista di Xist è Tsix (antisense to the Xist RNA), un lncRNA trascritto in direzione antisenso rispetto a Xist che, come Xist, agisce esclusivamente sul cromosoma che lo esprime, legandosi in maniera complementare a Xist ed neutralizzando la sua azione inibitoria (39).

TERC (Telomerase RNA component), un componente in principio usato come modello per la verifica della capacità dei lncRNA di formare complessi ribonucleoproteici stabili, è un ncRNA che funge da scaffold dinamico per l'assemblaggio dell'enzima telomerasi. A differenza di quanto dimostrato con TERC che offre uno stabile scaffold molecolare, i lncRNA possono instaurare con le proteine interazioni più dinamiche, caratterizzate da bassa affinità di legame. Le ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP) sono un

esempio di particelle che si formano in seguito alle interazioni funzionali tra lncRNA e fattori implicati nella biogenesi dell'mRNA. Anche altri lncRNA, come TUG1, MALAT1 e ANRIL funzionano come scaffold dinamici che collegano i complessi di rimodellamento della cromatina PRC2 e PRC1. Il Polycomb Repressive Complex è il complesso cromatinico che svolge un ruolo di primaria importanza nell'ambito dei meccanismi di regolazione epigenetica dell'espressione genica ed è in grado di condensare la cromatina silenziando l'espressione di specifici geni target. I lncRNA Kcnq1ot1, associati all'imprinting, fungono da scaffold per PRC2 ed Euchromatic Histone-Lysine N-metilthransferase (EHMT2), che inducono la trimetilazione dei residui lisinici 9 e 27 nell'istone H3 (H3K27me3 e H3K9me3), provocando il silenziamento dei geni target (40). Al contrario di PRC, il complesso Mixed-Lineage Leukemia 1 (MLL1) induce la trascrizione dei geni bersaglio (25).

La distinzione tra lncRNA agenti in cis e in trans non è chiara quando si considera l'organizzazione 3D dei compartimenti nucleari. L'associazione cooperativa dei lncRNA con altri RNA e proteine potrebbe infatti risultare significativa per la costituzione di compartimenti nucleari dinamici. Xist funge da scaffold per svariate proteine che a rotazione legano il lncRNA al DNA genomico. Il lncRNA Firre, che media il legame con hnRNP-U, agisce come una piattaforma per interazioni trans-cromosomiche. Di recente scoperta è trait-relevant (TR)-lincRNA che regola l'espressione del proximal TR-protein-coding gene, in grado di modulare l'architettura locale del cromosoma.

Altri lncRNA capaci di originare strutture nucleari specifiche sono NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1) e MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), coinvolti rispettivamente nella formazione delle macchie nucleari e nella costituzione dei corpi nucleari. NEAT1 è un lncRNA mono esonico che guida la formazione dei corpi nucleari, ovvero strutture subnucleari caratterizzate da un'elevata concentrazione locale di specifiche proteine ed RNA, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica. A tal proposito, è stato recentemente dimostrato che NEAT1 è un target trascrizionale di p53 e che la costituzione NEAT1-dipendente dei corpi nucleari contribuisce alla funzione oncosoppressiva di p53. In conclusione, poiché la formazione dei corpi nucleari richiede la presenza di NEAT1, l'espressione di tale lncRNA è rapidamente regolata in risposta allo stress e la compartimentalizzazione nucleare rappresenta una modalità funzionale e dinamica per il controllo dell'espressione e delle risposte cellulari (26).

1.2.3 lncRNA e cancro

Data la loro sofisticata natura, i lncRNA hanno la capacità di essere tessuto-, cellula- e compartimento-specifici. Non stupisce quindi un loro coinvolgimento in processi come lo sviluppo di patologie anche a carattere neoplastico. In modo particolare, essi sembrano avere un ruolo centrale nella regolazione dell'insorgenza e nella progressione tumorale. La disregolazione di lncRNA può avere un impatto su aspetti come proliferazione cellulare, crescita della massa tumorale e metastatizzazione. Sebbene la loro classificazione funzionale ad oggi sia delineata, nel contesto del cancro è necessaria una caratterizzazione più chiara in termini di risvolti fenotipici che essi possono dare, anche allo scopo di sviluppare nuove strategie terapeutiche e nuovi approcci diagnostici nell'ambito delle neoplasie (24).

Un aspetto interessante dei lncRNA è che essi possono creare un collegamento tra differenti meccanismi, generando reti complesse caratterizzanti il cancro. Le interazioni lncRNA-RNA e lncRNA-proteina costituiscono insieme una complessa rete regolatoria per il controllo dello sviluppo del cancro (39). È stato dimostrato che diversi lncRNA sono coinvolti nella patogenesi del cancro e potrebbero essere usati come biomarkers per la diagnosi trattamento e prognosi.

Ad esempio, il fattore di trascrizione p53 regola molti geni, tra cui anche lncRNA come lncRNA-p21, PANDA, H19 e loc285184, che fungono da effettori di p53 e regolando funzioni cellulari p53-associate come l'arresto del ciclo cellulare e dell'apoptosi. p53 è soggetto ad un meccanismo di autoregolazione che si avvale dell'azione svolta non solo dalla E3 ubiquitina ligasi MDM2, ma anche da parte dei lncRNA MALAT1, MEG3 e TP53NATWrap53 (35).

Nel contesto delle neoplasie esiste una categoria di molecole definite natural antisense transcript (NAT) a tutti gli effetti considerabili lncRNA. Essi possono originarsi tanto da geni codificanti quanto da geni non codificanti e possono codificare per piccoli peptidi o essere totalmente non codificanti. Essi possono esercitare varie azioni sul loro trascritto senso (repressione o attivazione) e possono agire attraverso meccanismi differenti quali lo scaffolding di proteine, la collisione trascrizionale (quando sovrapposti al loro trascritto senso causano lo stallo della RNAPII e la successiva rimozione dell'enzima mediante proteolisi ubiquitina-mediata) o la soppressione del filamento senso.

Un esempio di NAT nel cancro è l'RNA antisenso di p53 WD40 (Wrap53). In qualità di NAT dell'importante oncogene TP53, Wrap53 può indurre l'espressione di TP53 mediante il targeting della regione 5' UTR dell'mRNA di TP53. Il blocco dell' interazione tra il lncRNA Wrap53 e l'mRNA TP53 riduce i livelli basali di TP53 e previene l'induzione di TP53 in caso di danno al DNA. È stato osservato che Wrap53 è overespresso in linee cellulari di cancro. La sua più marcata espressione causa trasformazione di cellule sane in cellule tumorali, mentre la sua rimozione induce apoptosi delle stesse. In carcinomi della regione testa-collo, l'overespressione di Wrap53 è correlata a prognosi infausta. Questi elementi dimostrano che Wrap53 è un lncRNA oncogenico che regola l'espressione di TP53 (35).

Nell'ambito del carcinoma orale sono stati identificati numerosi lncRNA i cui livelli di espressione risultano alterati. L'analisi mediante RT-PCR dei lncRNA 4313 e 4612 ha riportato che i livelli espressione delle due popolazioni di lncRNA sono rispettivamente elevati e ridotti nella parodontite. Inoltre, l'upregolazione del lncRNA SNHG20 e la downregolazione di DLEU1 (deleted in lymphocytic leukemia 1) sono stabilmente correlate alla progressione dell'OSCC. In particolare, il silenziamento di DLEU1 inibisce la migrazione, l'invasività e la formazione di xenotrapianti (metastasi) in cellule di OSCC, elementi che mostrano il suo potenziale oncogeno. Anche UCA1 (urothelial cancer associated 1) è upregolato in OSCC e attiva la proliferazione e la metastatizzazione di cellule di OSCC, così come si comporta in altre neoplasie quali il carcinoma polmonare, gastrico e vescicale (36).

TUG1 (Taurine upregulated gene 1) promuove la proliferazione delle cellule tumorali, la loro migrazione e invasione, e al contempo reprime l'apoptosi. Esso esercita la propria funzione biologica sia legandosi a PRC2 e PRC1, reprimendone l'espressione genica in trans, sia sequestrando alcuni microRNA, influenzando così i diversi pathway tumorali. I meccanismi con cui TUG1 esercita il suo ruolo nella tumorigenesi sono molteplici.

- Mediante reclutamento di PRC2, reprime l'espressione dell'oncosoppressore KLF2.
-Reprimendo miR-145 e il suo effetto su Sirt3/GDH, influenza la progressione del tumore.
- Inibendo miR-145, TUG1 reprime la degradazione di MYC e SOX2.
- Inibendo miR-142-3p, influenza l'espressione di ZEB1 ed il processo EMT.
-Inibendo miR-142-3p, influenza l'espressione di ZEB2 ed il pathway di segnalazione di Wnt/β-catenina (40).

HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) è un lncRNA che funge da scaffold per indurre alterazioni epigenetiche. In modo particolare, la sua regione 5' si lega a PRC2, per indirizzarlo in determinati siti genomici, mentre, la sua regione 3' interagisce con la demetilasi lisina-specifica 1 (LSD1). In aggiunta,

HOTAIR coordina questi due maggiori complessi di modificazione degli istoni per interagire con la cromatina danneggiando la trascrizione dei geni anti-metastatici (40). Recentemente è stato dimostrato che mediante questo meccanismo HOTAIR assume un ruolo cruciale nel processo di fomazione delle metastasi in HNC (head and neck cancer). La conferma dell'esistenza di un'interazione tra l'espressione di HOTAIR e le metastasi linfonodali (LNM) nell'ambito dell'OSCC è scaturita dalla valutazione della sua attività in campioni tissutali e cellulari. Tali studi hanno determinato la funzione oncogenica di HOTAIR nella direzione dell'invasione e della migrazione in OSCC. I dati suggeriscono che HOTAIR contribuisce al processo di EMT diminuendo l'espressione di E-caderina e conseguentemente attivando la capacità metastatica. Un ulteriore studio, condotto sul carcinoma squamoso alla laringe (LSCC), ha riportato che il knockdown di HOTAIR causa una diminuzione significativa della capacità invasiva delle cellule cancerose, mediata da una modifica epigenetica, illustrando un meccanismo nuovo tramite cui HOTAIR regolerebbe l'invasione in LSCC. È stato inoltre identificato nella proteina HuR, uno tra i fattori chiave nella via di regolazione di HOTAIR. HuR è una RNA binding protein che, assieme ad HOTAIR, potrebbe contribuire ai processi che conducono alla formazione delle forme metastatiche di HNC. Nello specifico HuR potrebbe agire stabilizzando HOTAIR, promuovendone l'espressione e a sua volta HOTAIR aumenterebbe il livello di HuR comportandosi da spugna nei confronti di miR-7, attività nuovamente rafforzata da HuR. È stata poi evidenziata una correlazione postiva tra HOTAIR e le metastasi linfonodali a pannaggio di NPC (cellule progenitrici neoplastiche). Tale studio in vitro prova che HOTAIR facilita la migrazione e invasione nel modello NPC (41).

MALAT1 è un lncRNA evolutivamente conservato localizzato nei corpi nucleari, di frequente implicato nella modulazione epigenetica e nello splicing alternativo, in grado di guidare l'espressione dei geni metastasi-associati. In HNC l'inibizione di MALAT1 ad opera di siRNA ha evidenziato che invasività e capacità migratorie erano attenuate a causa della mancata attivazione dei pathway della β-catenina e del nuclear factor kβ (NF-kβ), importanti regolatori del processo di EMT. Il knockdown di MALAT1 causa soppressione dei marker di EMT N-caderina e vimentina. È stata poi individuata per MALAT1 anche l'influenza sullo splicing alternativo attraverso interazioni con i fattori di splicing ricchi in serina e arginina e con i pre-mRNA (30). MALAT1 è espresso in maniera dipendente dal ciclo cellulare ed è richiesto per il passaggio di fase G1/S e la progressione mitotica. Paradossalmente la deplezione di MALAT1 porta all'attivazione di TP53 (36).

Alcuni lncRNA hanno la capacità di interagire col DNA. Il locus presente 515 kb a monte del gene MYC trascrive un messaggero denominato CCAT1-L (Colon Associated Cancer Transcript), che può interagire con la regolazione trascrizionale di MYC accelerandola grazie alla formazione di loop long-range (arrangiando la cromatina in modo tale che la trascrizione sia accelerata). In maniera più dettagliata l'overespressione di CCAT1-L in cis attiva la tumorigenesi promuovendo l'espressione di MYC (36).

FOXCUT (FOXC1 upstrem transcript) è un long non coding RNA codificato da una regione nel promotore FOXC1 che lega l'mRNA dello stesso FOXC1 e attiva la migrazione NPC di OSCC. Infatti, in tessuti di carcinoma orale dove veniva riportato un elelvato livello di messaggero per FOXC1 si rilevavano analoghi livelli di lncRNA FOXCUT e la presenza di foxc1 mRNA era drasticamente ridotta quando era indotto il knockdown di FOXCUT, indicando quest'ultimo come responsabile della regolazione dei livelli di foxc1. Un altro effetto del knockdown del lncRNA in questione è linibizione della migrazione delle cellule OSCC, dimostrando una modulazione esercitata attraverso la riduzione dei livelli di MMP2, MMP7 e MMP9 (35).

HOTTIP (HOXA transcript at the distal tip) è un lncRNA molto espresso in HNC e risulta associato alla formazione di metastasi distali e responsabile di prognosi infausta (41). Altri lncRNA pro-metastatici in HNC sono H19, NEAT1, ROR, KCTD6-3 e LCE5A-1 (35).

MEG3 è coinvolto in molti pathway di segnalazione di cellule di OSCC compresa la metilazione del DNA. La riduzione di espressione di MEG3 aumenta significativamente la proliferazione cellulare di cellule Cal27 rispetto a quella di cellule di contollo, suggerendo un suo ruolo antipriliferatio. Tale molecola è inoltre in grado di inibire l'apoptosi di cellule OSCC e promuovere la metastatizzazione, mediante il coinvolgimento del pathway Wnt/b catenina (42).

AC132217.4 è un altro lncRNA upregolato in OSCC, insieme al fattore krüppel-like factor 8 (KLF8) e al fattore insulin-like growth factor 2 (IGF2). Si pensa che KLF8, proteina appartenente alla famiglia dei fattori di tarscrizione krüppel-like C_2H_2 a dita di zinco, prenda parte all'inizio e alla progressione del cancro. IGF2 una proteina anti-apoptotica endocrina è upregolata in molti carcinomi. Il meccanismo che regola l'interazione tra KLF8 and IGF2 è ancora sconosciuto, ma sembra che AC132217.4 possa upregolare i livelli di IGF2 interagendo con la regione 3'UTR del suo messaggero (43).

Nell'ambito dello sviluppo del tumore, la migrazione cellulare e il processo EMT sono stimolati. È stato dimostrato che il fattore di tarscrizione STAT3 regola positivamente i livelli di HNF1A-AS1 e che Notch1 e Hes1, interagendo con esso, possano upregulare HNF1A-AS1 causando l'accelerazione della progressione di OSCC. HAS2-AS1 potrebbe stabilizzare HAS2 col fine di promuovere il processo EMT indotto dall'ipossia in cellule di OSCC (44).

Linc-RoR è overespresso in campioni di tessuti tumorali di OSCC. La downregulazione di miR-145-5p e l'overespressione di c-Myc, Klf4, Oct4 e Sox2 indicano l'esistenza di una rete regolatoria linc-RoR-mediata. MiR-145–5p, downregulato in molti tumori, è noto per essere un sopressore tumorale importante ed è stato proposto come regulatore di Sox2. Ciò suggerisce che linc-RoR e CCAT1 potrebbero condividere una via di segnalazione parzialmente coincidente (45).

Il lncRNA ferritin heavy chain 1 pseudogene 3 (FTH1P3) potrebbe comportarsi da spugna molecolare di miR-224-5p per la modulazione dell'espressione di fizzled 5, un oncogene noto essere coinvolto in OSCC, facilitando la progressione della stessa neoplasia. LINC00152 è presente a livelli più alti in tessuti di pazienti OSCC e la trasfezione di cellule SCC9 col plasmide sh-LINC00152 al fine di diminuire i livelli di LINC00152 tramite knockdown inibisce la proliferazione delle stesse cellule. In vitro venivano inibite proliferazione cellulare, formazione di colonie, migrazione, invasione ed EMT, così come la crescita tumorale era inibita in vivo. E' anche emersa una correlazione negativa tra i livelli di LINC00152 e miR-139 ad indicare che LINC00152 agisce come spugna per miR-139-5p in OSCC. I lncRNA FTH1P3, PDIA3F e GTF2IRD2P1 influenzano progressione e metastasi di OSCC attivando MMP1, MMP3, MMP9, PLAU and IL8 (46).

1.2.4 lncRNA come biomarker

Numerosi lncRNA sono espressi in maniera aberrante in varie neoplasie, tra di essi alcuni sono stabilmente rilevabili nei fluidi biologici (plasma e urine) dei pazienti. Il loro livello di espressione è indicativo del livello di severità della neoplasia. Ciò rende possibile utilizzare i lncRNAs come biomarkers non invasivi e target terapeutici per il trattamento del cancro. I lncRNA si caratterizzano per essere altamente tessuto-specifici,

caratteristica che li rende dei candidati ottimali in qualità di nuovi biomarker diagnostici, prognostici e per lo sviluppo di terapie target (47).

È stato proposto che i ceRNA enfatizzino le interazioni fra RNA differenti, tra cui lncRNA, miRNA, pseudogeni trascritti e RNA circolari (48). Generalmente i lncRNA esercitano un effetto "sponge-like" su differenti miRNA al fine di inibire le funzioni miRNA-mediate. Un esempio è sicuramente rappresentato da Hsa-miR-1 che sopprime l'espressione del lncRNA UCA1 attraverso una via di segnalazione Ago-slicer-dipendente e il riconoscimento della struttura della regione non tradotta 3' di UCA1, esercitando un effetto di soppressione tumorale (36). Tale complesso di eventi potrebbe intaccare l'espressione di CREB, mediante il pathway PI3K-AKT, regolando così la progressione del ciclo cellulare (49,50).

L'analisi di 140 campioni tissutali di TSCC ha riportato che i livelli di UCA1 erano più elevati rispetto al tessuto sano ed ha dimostrato che la riduzione dell'espressione di uca1 causava inibizione della crescita tumorale. Il silenziamento di UCA1 inoltre inibiva proliferazione cellulare, migrazione e capacità invasive di linee cellulari di OSCC. Contemporaneamente si evidenizava che UCA1 era in grado di sopprimere la proliferazione di cellule OSCC in vitro. Ulteriori indagini dimostravano che l'upregolazione di UCA1 attivava la via di seganalazione Wnt/β-catenina. In seguito ad analisi qRT-PCR uno studio ha riportato che UCA1 era overespresso in tessuti, linee cellulari e linee cellulari cisplatino-resistenti di OSCC. In seguito al knockout di UCA1, la resistenza al cisplatino si indeboliva suggerendo che UCA1 facilitava la proliferatione, controllava l'apoptosi e conferiva resistenza al cisplatino alle cellule OSCC. UCA1 agisce inoltre da ceRNA, downregolando la sua espressione e upregolando quella del fattore sterodogenico-1 (SF-1), un regolatore essenziale di espresione di geni tessuto-speciifici in cellule steroidogeniche, mediante lo sponging di miR-184 in cellule OSCC (51,52).

L'analisi di tessuti tumorali e tessuti sani adiacenti ha riportato che l'espressione del lncRNA C5orf66-AS1 era significativamnte diminuita in tessuti di OSCC. Il lncRNA EGFR-AS1 era altamente upregolato nel carcinoma orale squamoso del collo. I livelli plasmatici di HOTAIR e dei due lncRNA lincRNA-p21 and GAS5 risultano associati alla risposta al trattamento di 41 pazienti affetti da carcinomi testa-collo sottoposti a chemioradioterapia, e che in pazienti con malattia in corso l'espressione di GAS5 era più elevata rispetto a quelli con buona risposta clinica (53,54).

Il processo di EMT coinvolge molte molecole e vie di segnalazione. Recentemente anche i lncRNA sono apparsi come regolatori cruciali di espressione e funzioni del processo EMT in OSCC. I livelli di espressione di circIGHG sono significativamente upregolati in tessuti OSCC rispetto ai tessuti non tumorali adiacenti ed emerge una associazione positiva al fenotipo EMT. L'induzione di tale via avviene mediante il targeting di miR-142- 5p, promuovendo in ultimo la progressione di OSCC. Anche lo sviluppo di farmaco-resistenza da parte del tumore è condizionato dal processo EMT, in particolar modo da EMT-TFs. EMT-TFs può legarsi ai promotori di certi geni trasportatori ABC attivando il programma EMT e innescando farmaco-resistenza. I meccanismi tramite cui i lncRNAs possono mediare il processo EMT promuovendo la farmaco-resistenza sono moltissimi. Il lncRNA TINCR, soggetto a splicing, è essenziale per la normale differenziazione dell'epidermide. Rispetto a cellule sensibili, i livelli di espressione di TINCR sono decisamnte superiori in cellule farmaco-resistenti. Il lncRNA TINCR, tramite lo sponging di miR-125b, stimola il rilascio di HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) inducendo farmaco-resistenza. In sostanza i processi di EMT e di farmaco-resisteza regolati dai lncRNA coinvolgono numerose molecole e vie di segnalazione di cui i lncRNA risultano i principali regolatori. I livelli di espressione dei lncRNA possono risultare determinanti del programma EMT e della progressione verso le forme neoplastiche farmaco-resistenti. In tal senso, gli stessi

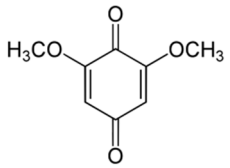
lncRNA possono essere utilizzati come potenziali target per lo sviluppo di stategie mirate per l'inibizione di tali processi (12,55).

RAD51, una importante proteina riparatrice HR, è in grado di riparare il danno al DNA causato da agenti chemioterapici, riducendo l'efficacia dei farmaci e attivando MDR (resistenza multifarmaco). Anche il lncRNA DDSR1 è coinvolto nella via di segnalazione HR per attivare il riparo del DNA. Il silenziamento di Lnc-RI interferisce con la via HR, aumenta il livello di DSBs, e diminuisce quello di RAD51. Il miR-193a-3p potrebbe legarsi a lnc-RI e al messaggero di RAD51 bloccando la loro espressione. lnc-RI, riconoscendo in maniera competitiva miR-193a-3p, determina un aumento dei livelli di espressine di RAD51 e stabilizza il pathway di segnalazione HR (56,57).

L'autofagia è un altro processo rilevato in molte forme di OSCC. I lncRNA partecipano anche al processo di farmaco-resistenza e progressione tumorale autofagia-mediato in cellule OSCC. Dal momento che essi funzionano come oncosoppressori o oncogeni in merito alla progressione di OSCC è stato indagato se fossero in grado di esercitare un effetto antagonistico o sinergistico nei confronti dell'autofagia. Nell'ambito del carcinoma orale sono stati osservati elevati livelli di espressione di LC3II (un gene correlato all'autofagia), mentre migrazione ed invasività di cellule di OSCC vengono silenziate da inibitori di geni d'autofagia (58). Lo stato di ipossia causa un aumento del livello di espressione di circCDR1as contestualmente al processo di autofagia in cellule di OSCC. Nel dettaglio circCDR1as facilita il processo di autofagia mediante il targeting di molti geni regolatori, ad esempio attraverso lo sponging di miR-671-5p, l'inibizione di mTOR, e upregolando le vie di segnalazione AKT e ERK. In sostanza i lncRNA si comportano come messaggeri a monte dell'intero pathway di segnalazione responsabile della regolazione di OSCC, attraverso l'induzione dell'autofagia, indicando che il targeting dei lncRNA potrebbe alleviare i processi autofagici OSCC-correlato (59). Resta però sconosciuto il meccanismo tramite cui l'autofagia è regolata da altri lncRNA in OSCC. Per resempio miR-519a innesca i processi di apoptosi ed autofagia TMZ-indotta. Mentre l'inibizione dello stesso miRNA causa diminuzione del processo autofagico e promuove il meccanusmo di resistenza a TMZ (temozolomide) in vivo, miR-519a sensibilizza le cellule al trattamento con TMZ e innesca l'apoptosi rafforzando il processo autofagico (60). Il flusso autofagico in OSCC è più attivo in cellule resistenti ai farmaci piuttosto che in cellule parentali e l'inibizione dell'autofagia causa una diminuzione di staminalità, suggerendo che l'autofagia stessa sia in grado di attivare la staminalità cisplatino-indotta e la chemioresistenza in cellule OSCC (61). I livelli di espressione di ATG3 e ATG7 (complessi Autofagy related 3 e 7) sono ridotti in seguito al blocco del lncRNA HOTAIR che inibisce l'autofagia. Parallelamente, il tasso di apoptosi aumenta la sensibilità di cellule di OSCC al cisplatino. L'espressione ectopica del lncRNA highly upregulated in liver cancer (HULC) induce il processo di autofagia in cellule neoplastiche mentre il suo silenziamneto sensibilizza le stesse cellule ai farmaci antitumorali, inibendo il processo di autofagia. Sempre il lncRNA HULC è notevolmente upregolato in linee cellule di OSCC rispetto a linee cellulari normali e la sua inibizione sopprime proliferazione e farmaco-resistenza. Pertanto, l'inibizione di HULC volta alla riduzione della farmaco-resistenza potrebbe mediare le vie di segnalazione dell'autofagia. Allo stesso tempo, il processo di autofagia modulato dai livelli di lncRNA può compromettere la resistenza di cellule di OSCC ai farmaci ad azione chemioterapica, promuovendo l'apoptosi e rallentando la progressione di OSCC. Gli inibitori di autofagia potrebbero rivelarsi importanti strumenti adiuvanti nella lotta alla farmaco-resistenzza in OSCC (12,62).

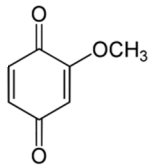
1.3 FWGE

Negli ultimi decenni grazie ai loro promettenti effetti e al loro basso tasso di tossicità, le sostanze nutraceutiche sono state oggetto di studio come agenti terapeutici per la prevenzione dei tumori e come supplemento alla terapia convenzionale (63-64). FWGE (Fermented Wheat Germ Extract) conosciuto commercialmente come Avemar, si ottiene dalla fermentazione del germe di grano ad opera di Saccaromyces Cerevisiae e dai successivi processi di separazione, essiccazione e granulazione dei liquidi prodotti dalla fermentazione. Come altri prodotti nutraceutici, FWGE è costituito di varie molecole ma studi recenti hanno dimostrato che le proprietà biologiche del germe di grano sono quasi del tutto imputabili ai due chinoni in esso contenuti: 2-metossi benzochinone (MBQ) e 2,6-dimetossi benzochinone (DMBQ) (Figura 2) (65). I chinoni sono composti ciclici caratterizzati da due gruppi carbonili (C=O) collegati alla struttura ciclica di un sistema coniugato. Analogamente a FWGE, altri composti antitumorali derivati da chinoni sono Mitomycin C, Mitotraxan, Doxorubicin, and Daunorubicin (66,67). AVEMAR è stato ampiamente studiato per le sue caratteristiche antitumorali e i risultati hanno mostrato i suoi effetti antimetabolici, antiproliferativi, antimetastatici e immunomodulatori (68-70).



2,6-dimetossi benzochinone

(DMBQ)



2-metossi benzochinone

(MBQ)

Figura 2. Chinoni contenuti nel germe di grano

1.3.1 Effetto antimetabolico

A differenza del tessuto sano, le cellule costituenti il tessuto canceroso mostrano uno stato ipermetabolico con un particolare aumento di utilizzo di glucosio e produzione di un gran quantitativo di lattato (71). Il glucosio è utilizzato come substrato per la via di produzione energetica non ossidativa (mentre le cellule sane prediligono la via ossidativa) che si basa sulla sintesi di ribosio, intermedio che promuove la sintesi di acidi nucleici per la rapida crescita e sviluppo delle cellule tumorali. FWGE inibisce l'uptake di glucosio nelle cellule cancerose e interferisce con gli enzimi della glicolisi anaerobica e la via dei pentosi fosfati (PPP), quali la transchetolasi, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, la lattato deidrogenasi e l'esochinasi, necessari per la sintesi dei precursori della sintesi di RNA e DNA. In aggiunta all'inibizione di glicolisi e via dei pentosi fosfati, FWGE influenza negativamente i meccanismi biosintetici dei precursori del DNA interferendo con la ribonucleotide reduttasi. Questa proteina è l'enzima chiave per la sintesi del DNA de novo e converte i ribonucleotidi a deossiribonucleotidi-trifosfato, precursori impiegati nel processo di sintesi del DNA (72). L'inibizione di questi pathway chiave del matabolismo degli acidi nucleici contribisce alla capacità di FWGE di inibire la proliferazione cellulare. I livelli di ribonucleotide reduttasi sono infatti molto spesso elevati nelle cellule cancerose rispetto a quanto accade nel tessuto sano, evidenza che rende l'enzima un interessante

target per la terapia antitumorale. Come molti altri farmaci antitumorali (es. gemcitabina, fludarabina, clorofarabina, ecc…), FWGE inibisce significativamente la ribonucleotide reduttasi in cellule di carcinoma del colon HT29 e nei promielociti di leucemia HL-60 (73). Oltre agli effetti interferenti sulla sintesi del DNA, FWGE inibisce l'attività delle cicloossigenasi 1 e 2, enzimi chiave nella sintesi delle prostaglandine a partire dall'acido arachidonico. Poiché le prostaglandine regolano i processi infiammatori, è reagionevole comprendere l'impiego di FWGE nel trattamento dell'artrite reumatoide (70).

1.3.2 Effetto antiproliferativo

Avemar può controllare la propagazione del tumore grazie ad una diminuzione dose-dipendente del consumo di glucosio e alla regolazione della redistribuzione delle catene carboniose zuccherine fra le molecole destinate a proliferazione e differenziamento cellulare. La privazione di glucosio di per sé è in grado di innescare il process apoptotico attraverso meccanismi differenti. Avemar induce il taglio proteolitico delle poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), evento scatenante l'attivazione delle poteasi caspasi-3 like, durante l'apoptosi. Infatti, l'incubazione di cellule di Jurkat per 48 h con Avemar a differenti concentrazioni causava una significativa inibizione delle PARP (70). L'effetto antiproliferativo è stato studiato sia in vivo che in vitro ed è emerso che FWGE possiede una spiccata attività antineoplastica in linee cellulari di neoplasia del colon, testicolare, tiroidea, ovarica, della cervice, mammaria, gastrica, polmonare, dei tumori della regione testa-collo, di glioblastoma, di melanoma e di neuroblastoma. È stato poi dimostrato che In altre linee cellulari o modelli di xenotrapianto FWGE riduce la crescita tumorale in maniera dose-dipendente (74,75,76). Avemar è inoltre in grado di amplificare l'attività antineoplastica esercitata da altri farmaci ad azione chemioterapica, quando è utilizzato in combinazione con essi. In cellule di carcinoma mammario positivo al recettore degli estrogeni, FWGE aumenta l'attività del tamoxifene. Studi in vitro su linee cellulari di cancro al colon hanno mostrato un effetto sinergico indotto da FWGE quanod era somministrato in combinazione con 5-FU, oxaliplatino e irinotecan. Studi in vivo in modelli murini di cancro al colon (human HCR-25 cell line) e melanoma (murine B16 cell line) hanno evidenziato l'interazione sinergica di FWGE e 5-FU o DTIC, con riduzione della taglia del tumore e metastasi (77).

L'effetto citotossico indotto da Avemar risulta intensificato dall'induzione di produzione di ROS ad opera del componente 2,6-dimetossibenochinone, in grado di di generare specie reattive dell'ossigeno, amplificando gli effetti antiproliferativo e antimetatstatico (78). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresentano un ampio gruppo di specie chimiche, molte delle quali a crattere radicalico, ovvero dotate di un elettrone spaiato nell'oritale più esterno. Alcuni esempi sono l'anione radicalico superossido (O_2^-), il radicale idrossile ($OH^{\cdot}$) e i ROS non radicalici come il perossido di idrogeno (H_2O_2). Un aumento dei ROS intracellulari può causare stress ossidativo e danni cellulari irreversibili. Le cellule di mammifero contengono diversi tipi di sistemi enzimatici e non enzimatici a carattere antiossidante, quali il glutatione, la catalasi e la DT-diaforasi. Quest'ultima gioca un ruolo importante nella protezione delle cellule dal danno ossidativo indotto da agenti esogeni ed endogeni, quali i chinoni. I flavoezimi intracellulari rivestono un ruolo importante nella bioattivazione dei chinoni. L'attivazione di DMBQ fuori dalla cellula, in associazione alla perossidazione lipidica ROS-indotta, è descritta come un possibile meccanismo di citotossicità indotta dai chinoni. In seguito a tali eventi, la continuità/integrità della membrana plasmatica viene compromessa, così pure l'effetto barriera da esa espletato. Tale condizione consente al DMBQ di diffondere attraverso di essa ed entrare nel citoplasma, inducendo la produzione di ROS a livello cellulare. Nella maggior parte delle

cellule, DMBQ necessita di acido ascorbico (viatmina C) per indurre la produzione di ROS. Tale composto, infatti, si comporta da donatore di elettroni e riduce DMBQ a radicale semichinone. L'acido ascorbico può essere trasportato all'interno della cellula attraverso la membrana plasmatica mediante un trasportatore Na-dipendente (trasporto attivo) o, nella sua forma ossidata, mediante il trasposratore del glucosio GLUT1 (trasporto passivo). A differenza di DMBQ, l'effetto antiproliferativo di FWGE non è influenzato dall'acido ascorbico (78).

1.3.3 Effetto immunomodulatore

Molti degli effetti clinici e preclinici generati dal FWGE non attribuiti alle sue azioni antiproliferative o antimetaboliche, bensi alla sua capacità di modulare la risposta immunitaria. Una strategia comune delle cellule tumorali per impedire la propria distruzione da parte del sistema immunitario - in particolar modo ad opera dell'attività delle cellule natural killer - è l'overspressione del complesso maggiore di istocompatibilità MHC-I. infatti è stato dimostrato che FWGE riduce significativamente l'espressione delle proteine di superficie cellulare di MHC-I attraverso la fosforilazione di specifiche tirosine di particolari proteine intracellulari e l'aumento del calcio intracellulare (79).

Le cellule neoplastiche hanno svariate strategie per sfuggire al controllo del sistema immunitario. Oltre all'overespressione delle proteine di classe I del MHC, un altro sistema è la downregolazione della proteina ICAM-1 sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi di tumori solidi che compromette l'accesso del sistema immunitario al tumore. Tale condizione compromette la migrazione dei leucociti attraverso la membrana dei vasi impedendo ai leucociti stessi di infiltrarsi nella massa tumorale. FWGE induce l'overespressione di ICAM-1 nelle cellule endoteliali tumorali ma ha anche la capacità di agire sul fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α) (76). Il fattore di necrosi tumorale alfa è in grado di indurre necrosi a livello delle cellule tumorali. TNF è maggiormente prodotto dai macrofagi attivati e dalle cellule epiteliali, mentre il suo recettore (TNF receptor-1 o TNF-R1) è ampiamente espresso in svariati tipi cellulari. L'interazione tra TNF e TNF-R1 attiva svariati pathway di tasduzione del segnale, tra cui l'apoptosi, ed è implicata nella patogenesi di diverse condizioni tra cui sepsi, diabete, malattia infiammatoria di Bowel, osteoporosi, sclerosi multipla, artrite reumatoide e cancro (79). A causa dell'importanza del TNF nella difesa naturale contro il cancro e del fatto che Avemar induce apoptosi in linee cellulari di tumori maligni delle cellule sanguigne e di tumori solidi e mostra attività immunomodulatoria, è stato studiato l'effetto del trattamento con Avemar sulla produzione di citochine infiammatorie e sull'attivazione cellulare Ras-mediata, in particolare osservando la citotossicità TNF mediata, la produzione di TNF da parte dei leucoiti attivati, la proliferazione cellulare, nonché la sensibilità e la sopravvivenza di cellule TNF-producenti e cellule target.

Numerose linee cellulari della tipologia mieloide producono un quantitativo irrisorio di TNF in assenza di attivazione. LPS e PMA (forbolo-miristil-acetato) inducono un incremento dell'espressione di TNF. Cellule mieloidi differenti rispondono in modo diverso, ma tutte in presenza di Avemar determinano un aumento della produzione di TNF LPS/PMA-indotta, con conseguente significativa riduzione della loro sopravvivenza. Tale effetto di Avemar è risultato specifico per le cellule mieloidi e al contraio le linee di natura linfoide non sono influenzate dalla presenza del composto (76).
L'effetto di Avemar sulle cellule mieloidi non si limita all'aumento della produzione di TNF. Il trattamento con Avemar determina infatti l'upregolazione di citochine quali IL-1α, IL-2, IL-5 e IL-6. Ulteriori analisi volte

all'approfondimento degli eventi molecolari scatenati dal trattamento con Avemar hanno chiarito che tale principio è un grado di attivare processi proinfiammatori citochina-mediati (72).
Ulteriori dati riguardo ad un effetto immuno-simulatorio di FWGE sono stati ottenuti in seguito ad esperimenti di innesti cutanei effettuati su modelli murini. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con FWGE riduce drasticamente il tempo di rigetto in topi che ricevono l'innesto (77).

1.3.4 Effetto antimetastatico

L'attività antimetastatica esercitata da FWGE risiede nell'abilità del composto di 1) attivare il sistema immunitario, 2) inibire l'adesione e la proloferazione cellulare, 3) indurre l'apoptosi e 4) innescare meccanismi di stress ossidativo. L'effetto antimetastatico di FWGE, utilizzato da solo o in combinazione con farmaci citostatici, è stato descritto valutando in modelli murini, nei quali è stata saggiata la capacità di generare metastasi epatiche, spleniche e polmonari in seguito ad inoculo con differenti linee cellulari (3LL-HH, B16 e HCR-25). La somministrazione orale di FWGE era in grado di ridurre la diffusione metastatica delle cellule tumorali inoculate, generando un effetto sinergico a quello indotto dai farmaci ad azione chemioterapica (78). In uno studio analogo, il trattamento con FWGE, utilizzato da solo o in combinazione con la vitamina C, riduceva il potere metastatico delle linee cellulari 3LL-HH, B16, RWT-M e HCR25 in modelli sperimentali murini (80,81).

1.4 Scopo della tesi

Il problema della farmacoresistenza si estende, in maniera sempre più diffusa, anche a patologie importanti come le neoplasie che si servono di farmaci potenti, ad azione mirata e soprattutto ricchi di effetti collaterali.
È fondamentale per questo, in modo particolare nell'ambito del carcinoma orale, spesso diagnosticato tardivamente ad un stadio già avanzato, sperimentare strategie terapeutiche alternative che non si limitino alla somministrazione di chemioterapici ma che rendano le cellule tumorali particolarmente sensibili ad essi, accentuando e garantendo la loro efficacia.
Consapevoli della centralità del ruolo svolto dai lncRNA nel carcinoma orale squamocellulare (35-37), il lavoro svolto si è a questo proposito focalizzato sull'approfondimento del ruolo del lncRNA TUG1, risultato avere un'espressione alterata nell'OSCC (105,107), e sugli effetti della somministrazione dell'integratore commercialmente noto come Avemar, a base di germe di grano fermentato capace di sensibilizzare le cellule neoplastiche e ampiamente studiato per le sue caratteristiche antitumorali, nello specifico per i suoi effetti antimetabolici, antiproliferativi, antimetastatici e immunomodulatori (68-70).
Lo studio è stato condotto a livello cellulare su linee di carcinoma orale della lingua.
In prima istanza le cellule della linea HSC-3 sono state assoggettate al silenziamento di TUG1. Dopo aver verificato l'efficienza della dowregolazione di TUG1 mediante Real-Time PCR, è stato valutato l'effetto indotto da tale trattamento sulla proliferazione cellulare, mediante il saggio MTT. Successive analisi sono state condotte al fine di valutare se il knockdown di TUG1 avesse delle ricadute sulla chemiosensibilità delle cellule HSC-3. Tale indagine è stata effettuata mediante valutazione della proliferazione cellulare (saggio MTT) in presenza di composti ad azione antineoplastica utilizzati nel trattamento delle forme localmente avanzate di OSCC. In particolare, le cellule in cui è stato indotto il silenziamento di TUG1 e i controlli sono state trattate con cisplatino e 5-fluorouracile, utilizzati singolarmente o in combinazione.
La seconda fase del lavoro ha previsto il trattamento delle cellule delle linee HSC-3, SCC-25 e SAS con Avemar. In particolare in seguito a trattamento con FWGE sono stati valutati gli effetti del composto in termini di riduzione di: proliferazione cellulare (saggio MTT), capacità invasive (valutazione 3D di sferoidi tumorali) e abilità migratorie (transwell assay).
Al fine di analizzare se l'azione combinata di Avemar e chemioterapici in termini di proliferazione cellulare avesse un effetto più impattante sulla chemiosensibilità è stato, in ultimo, svolto un ulteriore saggio MTT in seguito al trattamento combinato FWGE-chemioterapici, usati di nuovo singolarmente e in combinazione.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Le linee cellulari di OSCC HSC-3, SCC-25 e SAS sono state coltivate in terreno costituito da Dulbeccós Modified Eagle Medium (DMEM) e Ham´s Nutrient Mixture F-12 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), in rapporto 1:1, addizionato con 10% di siero fetale bovino, 100 U/ml di penicillina, 100µg/ml di streptomicina, 50µg/ml di acido ascorbico, 250ng/ml amfotericina B and 0.4 ng/ml di idrocortisone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO_2. Nello specifico, le linee cellulari di OSCC utilizzate sono relative a carcinoma della lingua primario (SAS) e metastatico (HSC-3 e SCC-25).

2.2 Silenziamento genico

La tecnologia dell'RNA interference (RNAi) è basata sul meccanismo di silenziamento genico sequenza-specifico che avviene a livello post-trascrizionale. Tale approccio ha permesso di effettuare il silenziamento di TUG1 nella linea cellulare di OSCC HSC-3. A partire da molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) della lunghezza di circa 20bp, in seguito a disappaiamento si generano inneschi a singolo filamento che, legandosi all'RNA messaggero target in maniera sequenza-specifica, ne inducono la degradazione. Per la generazione di molecole di RNA a singolo filamento (ssRNA), in grado di degradare specifici mRNA, possono essere impiegati 2 differenti tipi di molecole: gli short interfering RNAs (siRNAs) e gli short hairpin RNAs (shRNAs) (82) (Figura 3).

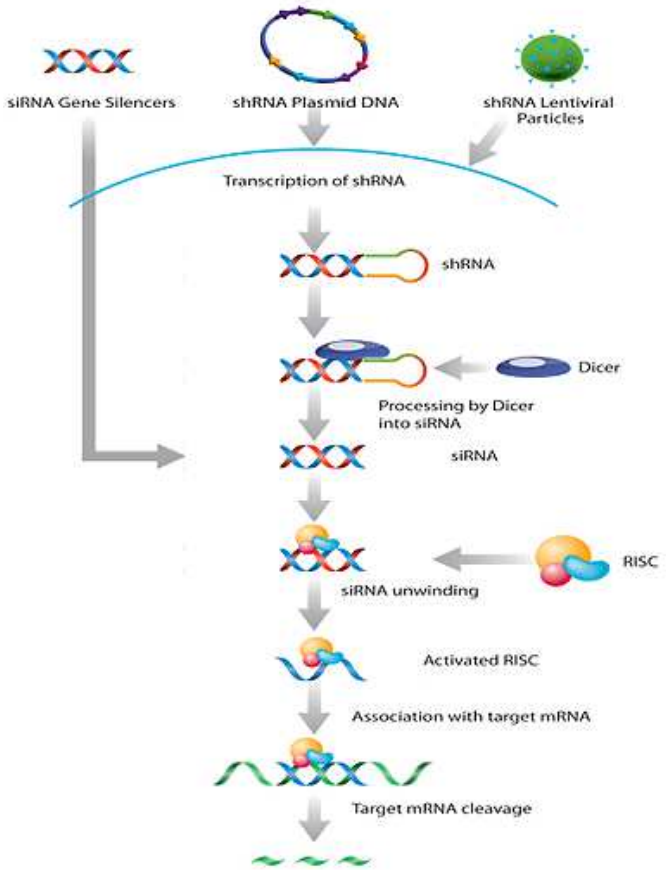


Figura 3. Silenziamento genico mediante RNAi

I siRNA sono brevi dsRNA di lunghezza compresa tra 21 e 26 nucleotidi, con estremità 3' protrudenti, in grado di indurre la degradazione sequenza-specifica dell'RNA messaggero relativo ad un gene target, riducendo il suo livello di espressione. Tali strutture si originano a seguito del processamento effettuato dell'enzima Dicer (una ribonucleasi appartenente alla famiglia delle RNAsi III) che converte lunghe molecole di dsRNA o shRNA in siRNA. I siRNA possono anche essere sintetizzati chimicamente ed essere introdotti all'interno della cellula mediante trasfezione (83). Dal momento che non può più essere rigenerato dai sistemi cellulari, la trasfezione di un siRNA esogeno consente un silenziamento genico solo transiente. Al contrario, ricorrendo a molecole di shRNA, generate all'interno della cellula bersaglio mediante specifici vettori plasmidici introdotti mediante trasfezione, è possibile rendere più duratura tale modulazione a carico dell'espressione del gene target. Gli shRNA presentano una tipica struttura a "forcina" (hairpin); essi consistono di due filamenti, uno senso e l'altro antisenso, appaiati ed uniti ad una estremità da un tratto di DNA spaziatore (ansa o loop). Il plasmide che ospita la sequenza relativa all'shRNA presenta a monte di essa un promotore eucariotico specifico per la RNA polimerasi III. Una volta all'interno della cellula ospite, tale sequenza di DNA viene trascritta e vengono prodotte le molecole di shRNA. In seguito alla degradazione del loop da parte della RNA DICER, le molecole di shRNA vengono convertite in siRNA. Ad opera del complesso RISC si ha la separazione del duplex e la degradazione del filamento senso. Il filamento antisenso potrà quindi legarsi alla sequenza complementare presente nell'RNA messaggero del gene target, inducendone la degradazione (84).

2.2.1 Silenziamento di TUG1 nella linea HSC-3

Le cellule HSC-3 sono state seminate in piastre 24-well ($3x10^4$ cellule per pozzetto), in modo da raggiungere dopo 24 ore una confluenza pari al 70-80%. Il giorno successivo alla semina, le cellule sono state trasfettate utilizzando FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA), quale agente di trasfezione. Per ogni campione, la miscela allestita (volume paria a 25µl) contenenva 0,5µg di DNA plasmidico, 1,5µl di FuGENE e terreno DMEM privo di siero e di gentamicina. Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, la miscela è stata aggiunta a ciascun pozzetto contenente 500µl di DMEM completo. Per il silenziamento di TUG1 sono stati utilizzati 2 diversi plasmidi: pLKO.1-589 e pLKO.1-738 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). Ogni plasmide conteneva la sequenza nucleotidica di uno specifico shRNA per il targeting di una regione dell'RNA messaggero di TUG1. La valutazione di un eventuale effetto sull'espressione di TUG1 indotto dal solo plasmide ospitante gli shRNA, è stata effettuata mediante l'impiego del plasmide pLKO.1-puro (SigmaAldrich, St. Luis, MO) privo dell'inserto codificante shRNA (Figura 3). Le cellule utilizzate come controllo (mock) sono state trattate con il solo reagente di trasfezione.

48 dopo l'inizio della trasfezione, è iniziato il processo di selezione che si protrae in genere per una durata di 10-15 giorni. Dai pozzetti contenenti le cellule in coltura è stato rimosso il terreno contenente la miscela di trasfezione e aggiunto terreno completo (500µl) contenente puromicina (0,5µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO), un agente inibente la sintesi proteica per cui il plasmide pLKO.1- puro conferisce resistenza. Le cellule che hanno internalizzato il plasmide avranno acquisito la capacità di sopravvivere in un mezzo contente l'agente selettivo. Pertanto, l'aggiunta nel terreno di coltura della puromicina ha permesso l'identificazione dei cloni cellulari nei quali il plasmide è stato internalizzato mediante trasfezione. Durante il processo di selezione si osserva infatti che le cellule trattate con il solo reagente di trasfezione vanno tutte incontro a morte. Nei pozzetti contenenti le cellule trasfettate con il plasmide vuoto (pLKO.1-puro)

(figura 4) o con i plasmidi codificanti gli shRNA per il silenziamento di TUG1 (pLKO.1-589 e pLKO.1-738), ha luogo la selezione dei cloni che hanno acquisito il plasmide. Al termine della selezione, i cloni cellulari sono stati espansi e assoggettati ad analisi molecolare per verificare l'avvenuto silenziamento di TUG1. L'espansione si è svolta mantenendo le cellule in coltura in terreno DMEM completo contenente puromicina 0,5 µg/ml. L'efficienza del silenziamento genico di TUG1 è stata valutata a livello di mRNA mediante Real-Time PCR.

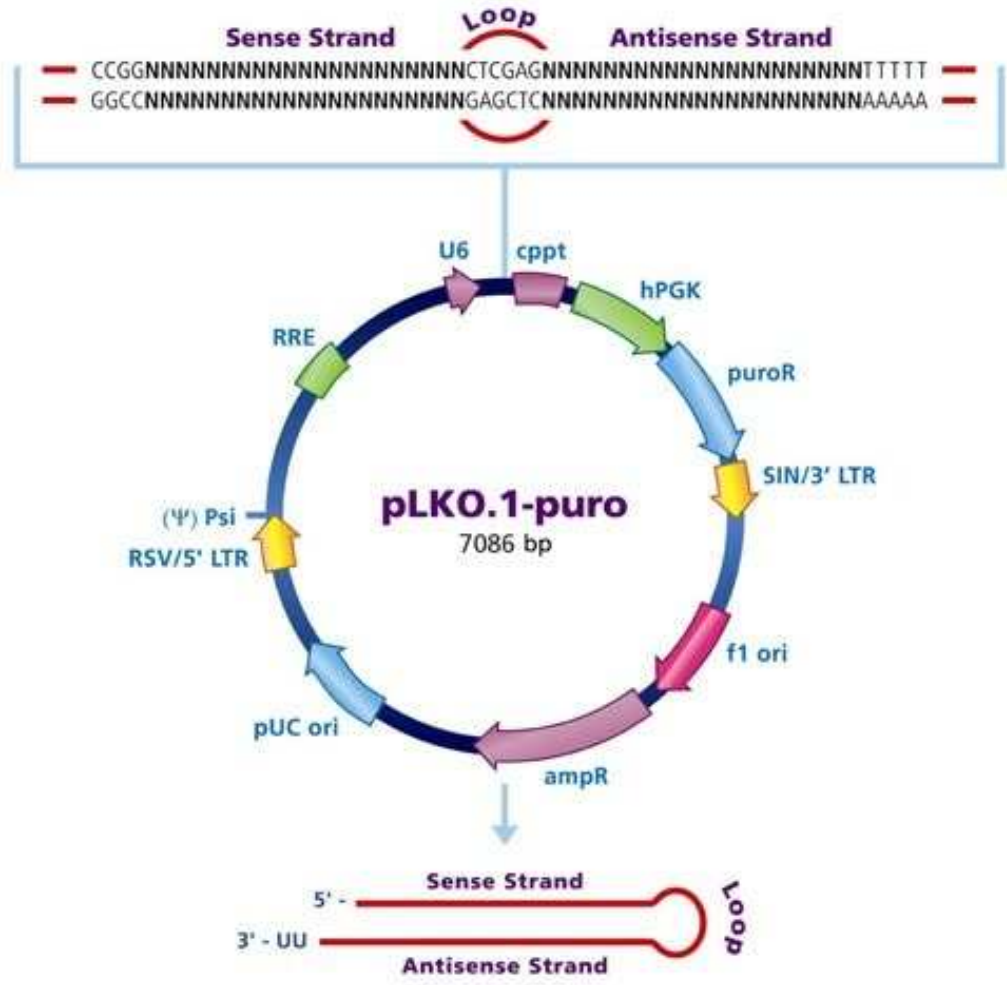


Figura 4. Struttura del plasmide pLKO.1-puro. A valle del promotore U6 è indicata la regione in cui è presente la sequenza nucleotidica di un generico shRNA, utilizzato per il silenziamento genico.

2.2.2 Isolamento, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA totale

Dopo essere state staccate con tripsina-EDTA, le cellule sono state contate e centrifugate (300xg per 5 minuti a 4°C). I pellet ottenuti ($1x10^6$ cellule) sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale mediante l'utilizzo del kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Concentrazione e purezza dell'RNA isolato sono state determinate mediante l'analisi spettrofotometrica utilizzando il NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Un'aliquota pari 1 µg dall'RNA totale estratto è stata assoggettata a retrotrascrizione mediante l'utilizzo del kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e random primers. Il cDNA ottenuto è stato quindi utilizzato come stampo per le successive analisi mediante Real-Time PCR. Al fine di minimizzare l'attività delle ribonucleasi liberate durante la lisi cellulare, il materiale di laboratorio è stato preventivamente trattato con una soluzione di dietilpirocarbonato (DEPC) allo 0,1% e successivamente sterilizzato in autoclave a 120°C per 30 minuti, mentre il piano di lavoro e gli strumenti non autoclavabili sono stati trattati con RNase Zap (Sigma).

2.2.3 Real-Time PCR

L'analisi mediante Real-Time PCR sul cDNA precedentemente ottenuto ha permesso di valutare il silenziamento di TUG1 nelle cellule di carcinoma orale squamocellulare. In Real-Time PCR, il DNA inserito qual input viene amplificato mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e la progressione della reazione di amplificazione viene seguita (in tempo reale) grazie alla presenza di marcatori (intercalanti) in grado di emettere un'intensa fluorescenza a seguito del legame con le molecole di dsDNA. La tecnica consente dunque contemporaneamente la caratterizzazione quantitativa del templato e di ottenere un profilo che descrive l'andamento della reazione in tempo reale (85). Il marcatore fluorescente usato nel suddetto esperimento è stato l'Eva Green. L'accumulo del prodotto di reazione segue la stessa cinetica della reazione di amplificazione: all'aumentare del prodotto di reazione aumenta anche il segnale fluorescente. In una reazione di amplificazione, la quantità di prodotto che si forma dopo un ciclo termico raddoppia al ciclo successivo. Seguendo l'aumento di fluorescenza dovuta alla formazione di prodotto all'avanzare dei cicli, è possibile osservare una curva (sigmoide) che descrive l'andamento dell'amplificazione del templato di interesse. Nella fase esponenziale crescente della curva di amplificazione, la proiezione sull'asse delle ascisse (in cui è riportato in numero di cicli di amplificazione) del punto di intersezione tra la curva stessa e la linea che identifica la fluorescenza di base (threshold) prende il nome di ciclo soglia (Ct) e rappresenta un valore di ciclo termico al di là del quale qualsiasi incremento di fluorescenza risulta significativo. I livelli di espressione del gene di interesse (TUG1) sono stati valutati mediante Real time PCR tramite determinazione quantitativa del relativo trascritto convertito in cDNA, in termini di Ct. L'analisi dell'espressione di TUG1 è stata condotta mediante il metodo di quantizzazione relativa, in cui l'espressione del gene di interesse viene confrontata con quella di un gene normalizzatore definito housekeeping (HKG), indice dell'attività trascrizionale generale della cellula. Il valore di espressione del gene di interesse (GOI) è stato normalizzato rispetto al valore di espressione di un gene di riferimento (β-actina), che funge da standard interno sia per il campione sia per il controllo. Successivamente al calcolo dei i valori Ct del GOI e dell'HKG per ciascun campione si determina il ΔCt = Ct (GOI) – Ct (HKG). L'espressione relativa del GOI nel campione (S) rispetto al controllo (C) è stata determinata mediante la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove ΔΔCt = SΔCt – CΔCt (86). Lo strumento utilizzato per l'esperimento di Real-Time PCR è il CFX96 RealTime PCR Detection System (BIO-RAD). Relativamente a ciascun campione, le miscele di reazione sono state allestite duplcato e in un volume totale di 20 µl. Esse erano composte da 1µl di cDNA, 10µl di EvaGreen Supermix 2X (BioRad) e i primers specifici ad una concentrazione finale pari a 500nM. Il protocollo ha previsto una fase iniziale di denaturazione (95°C per 5 minuti), seguita da 40 cicli di amplificazione, ciascuno a sua volta composto di una fase di denaturazione (95°C per 30 secondi) e di una fase di annealing-estensione del primer (58°C per 30 secondi). Le due coppie di primers utilizzate per l'amplificazione del gene di interesse (TUG1) e del gene housekeeping (β-actina), mostravano le seguenti sequenze nucleotidiche:

• TUG1 (forward) → 5'-CAGCACTGTTACTGGGAATTAGA-3',

• TUG1 (reverse) → 5'-TGGAATAGCACAGGGAAGGT-3',

• β-actina (forward) → 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3',

• β-actina (reverse) → 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'.

2.2.4 Valutazione della proliferazione cellulare mediante saggio MTT

L'impatto del silenziamento di TUG1 sulla proliferazione delle cellule HSC-3 è stato valutato mediante saggio colorimetrico MTT. Tale tecnica misura la vitalità cellulare in termini di attività enzimatica di deidrogenasi mitocondriali (attive solo nelle cellule vive), in grado di ridurre il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) in cristalli di formazano, insolubili in acqua. In seguito all'aggiunta di MTT al terreno di coltura, le deidrogenasi scindono l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo), generando un sale di formazano blu-violetto, che si accumula sotto forma di cristalli all'interno della cellula vitale (87). I sali insolubili ottenuti vengono dissolti grazie all'aggiunta di un solvente che permette di generare un composto colorato, ma, poiché l'MTT non causa lisi cellulare, è necessaria un'azione meccanica affinché essi vengano espulsi dalle cellule e si ottengano lisati cellulari di colore violaceo, di intensità proporzionale alla quantità di cristalli di formazano prodotti e, di conseguenza, al numero delle cellule vitali presenti nel pozzetto. L'intensità di tale colorazione può essere stabilita, impostando la lettura dell'assorbanza ad un valore di lunghezza d'onda di 540 nm, tramite l'impiego di uno spettrofotometro. I campioni cellulari relativi alle cellule downregulanti TUG1 e ai controlli (pLKO.1-puro e mock) sono stati seminati in 96-well ($2x10^3$ cellule/pozzetto). A 24 ore dalla semina, è stato eseguito il primo test MTT, corrispondente al punto zero della curva di crescita (0h). Una soluzione di MTT 5mg/ml in PBS è stata diluita (1:12) nel terreno di coltura (volume finale pari a 100 µl) presente in ciascun pozzetto e le cellule sono state incubate per 2 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2. Terminata la fase di incubazione, è stato rimosso il terreno da ogni pozzetto e sono stati aggiunti 200µl di isopropanolo. La lettura dei valori di assorbanza è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 540nm, utilizzando un lettore automatico per piastre. Questa procedura è stata ripetuta a 24h, 48h e 72h dal primo test (punto zero).

2.2.5 Trattamento con chemioterapici

Allo scopo di verificare se la riduzione dei livelli di espressione di TUG1 fosse in grado di modulare la resistenza delle cellule al trattamento farmacologico, la vitalità delle cellule HSC-3 (controlli e trattati) è stata valutata in presenza di cisplatino e 5-fluoro uracile, farmaci antitumorali principalmente usati per il trattamento del carcinoma squamocellulare orale, in fase avanzata. Tale analisi è stata condotta mediante l'impiego del saggio MTT e la scelta dei valori di concentrazione ottimali per entrambi i chemioterapici (utilizzati singolarmente o in combinazione) è stata ponderata sulla base di dati presenti in letteratura (88).

Per entrambi i chemioterapici utilizzati singolarmente, sono state testate le concentrazioni pari a 2, 1, 0,2 e 0,1µg/ml. È stato poi valutato l'effetto di 3 differenti combinazioni di entrambi i farmaci:

• 1°combinazione: cisplatino 0,5µg/ml + 5-fluorouracile 1,25µg/ml,

• 2° combinazione: cisplatino 1µg/ml + 5-fluorouracile 2,5µg/ml,

• 3° combinazione: cisplatino 0,1µg/ml + 5-fluoruracile 0,25µg/ml.

Cisplatino e 5-fluorouracile sono stati disciolti rispettivamente in terreno completo e DMSO, entrambi ad una concentrazione pari a 1mg/ml, al fine di ottenere uno stock da poter diluire nel mezzo di coltura fino al raggiungimento delle concentrazioni finali desiderate, mantenendo costante la concentrazione finale di DMSO (0,1%), per quanto riguarda i saggie effettuati con 5-fluorouracile. Per il cisplatino il controllo il controllo è rappresentato dalle cellule coltivate in terreno di coltura, per il 5-fluorouracile invece al mezzo di coltura è stato aggiunto DMSO allo 0,1%.

Analogamente a quanto precedentemente riportato, le cellule sono state seminate in 96-well ($2x10^3$ cellule/pozzetto). A 24 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato sostituito con quello previsto per ogni trattamento, ed è stata valutata la proliferazione cellulare tramite saggio MTT, effettuando la lettura prima dell'aggiunta dei chemioterapici e a 24h, 48h e 72h dall'inizio del trattamento.

2.3 Trattamento con FWGE

FWGE è stato acquistato dall'American BioScience Inc. come Fermented Wheat Germ Extract – Super concentrate (FWGE-SC®), in forma protetta dal marchio Metatrol®. La polvere relativa a tale composto, contenuta in capsule, è stata utilizzata per allestire una soluzione, tenendo presente che 41 mg di FWGE-SC® corrispondono a 5500 mg di FWGE, come da indicazioni fornite dal produttore. Per ogni esperimento è stata allestita una soluzione stock sciogliendo la sostanza in DMEM/F-12 privo di siero contenente 0.5% lattoalbumina (Sigma-Aldrich), successivamente centrifugata a 16000xg per 1min e filtrata (cut-off pari a 0,22 µm).

2.3.1 Valutazione della proliferazione cellulare mediante saggio MTT

Il saggio precedentemente descritto è stato svolto in seguito al trattamento delle cellule OSCC con FWGE. Le cellule relative alle linee HSC-3, SCC-25 e SAS ($2x10^3$ cellule/pozzetto) sono state seminate in 96-well e trattate con tre differenti concentrazioni di Metatrol (2, 5 e 10 mg/ml). Il gruppo di cellule di controllo è stato coltivato in mezzo contenente lattoalbumina. Le concentrazioni di FWGE sono state stabilite sulla base di studi preliminari (89,90,91,92).

2.3.2 Saggio di invasività mediante valutazione 3D di sferoidi tumorali

Le sfere relative alle 3 tre linee cellulari sono state generate seguendo il protocollo precedentemente messo a punto (93). Le cellule ($1x10^3$ cellule/pozzetto) sono state seminate in mezzo di coltura completo in piastre 96-well ultra-low attachment dal fondo tondo (Corning) e incubate a 37°C per 4 giorni. Dopo conferma visiva, il terreno di coltura è stato prelevato e le sfere sono state inglobate in 50 µl di una soluzione contenente 0,5 mg/ml di Myogel (94), 0,5 mg/ml di fibrinogeno (Merck), 0,3 U/ml di trombina (Sigma-Aldrich) e 33,3µg/ml di aprotinina (Sigma-Aldrich). La piastra è stata trasferita in incubatore a 37 °C per 30 minuti per permettere al gel di solidificare. 100 µl di mezzo di coltura completo contenente differenti concentrazioni di FWGE (2, 5 and 10 mg/ml) sono stati aggiunti al gel, mentre nei pozzetti

contenenti le cellule di controllo è stato aggiunto terreno addizionato di lattoalbumina. Le sfere sono state fotografate a 0h e dopo 2, 3, 4, 7, 9 e 11 giorni di incubazione con un microscopio a luce invertita Nikon Eclipse TS100, con obiettivo di ingrandimento 4x, connesso ad una fotocamera Canon PowerShot S50. L'area coperta dalle sfere è stata misurata con il software Fiji (95) ed è stata calcolata la variazione ad ogni time point rispetto a quella misurata a 0h. Relativamente a ciascun campione, sono state analizzati 3 differenti campioni e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

2.3.3 Valutazione della migrazione cellulare mediante transwell assay

La valutazione della migrazione cellulare mediante transwell assay è stata effettuata mediante l'utilizzo di piastre di coltura 24-well provviste di inserti del diametro di 6.5 mm dotati di membrana/filtro con porosità pari a 8 µm (Corning). Prima della semina, le membrane sono state ricoperte con 50 µl di MyoGel (2.4 mg/ml) (matrice extracellulare artificiale) solidificato con collagene tipo I 0.8 mg/ml (Corning) (94,96). Un quantitativo pari a 70000 cellule relative alle linee HSC-3 e SAS è stato quindi seminato nella camera superiore, in 100 µl di terreno privo di siero e contenente 0.5% di lattolbumina, a cui sono stati aggiunti ulteriori 100 µl di terreno serum-free contenente FWGE, alle concentrazioni sopra indicate, e lattoalbumina. Nella camera inferiore sono stati usati 500 µl di terreno supplementato con 10% FBS, quest'ultimo in qualità di agente chemiotattico. Le piastre transwell sono state incubate a 37°C per 48 h e 72 h. Successivamente le cellule sono state fissate in tampone fisiologico contenente formaldeide al 4% per 1 ora e lavate una volta in PBS. La colorazione è stata effettuata con Blu di Toluidinio all'1% in Borax 1% per 10 minuti a temperatura ambiente e lavate più volte con acqua deionizzata. Le cellule rimaste sulla superficie del filtro sono state rimosse con attenzione con un tampone di cotone bagnato. Il colorante è stato eluito con SDS all'1% ed è stata misurata l'assorbanza a 650 nm usando il lettore di piastre Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer Wallac) (94). Relativamente a ciascun campione, sono state analizzati 3 differenti campioni e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

2.3.4 Trattamento con chemioterapici utilizzati da soli ed in combinazione con FWGE

Le soluzioni stock dei chemioterapici preparate come precedentemente descritto sono state diluite nel mezzo di coltura fino a raggiungere una concentrazione di 0.5 µg/ml per entrambi i composti. Il trattamento combinato ha previsto questa volta l'utilizzo di cisplatino 0.1µg/ml e 5-fluorouracile 0,25µg/ml. FWGE è stato usato da solo ad una concentrazione pari 10 mg/ml, mentre in combinazione con cisplatino, 5-FU o con entrambi, è stato utilizzato alle concentrazioni di 5 e 10 mg/ml. Le cellule HSC-3 e SAS sono state seminate nelle condizioni precedentemente descritte in piastre 96-well. Il giorno successivo alla semina sono state incubate con i composti per 24, 48 e72 h, ed è stata successivamente valutata la vitalità cellulare tramite il saggio MTT. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte.

2.4 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata svolta col software GraphPad Prism versione 6.00 per Windows (GraphPad Prism software, San Diego, CA, USA). Sono stati applicati i test di Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn e Tukey. È stato considerato come statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$.

3. RISULTATI

3.1. Silenziamento di TUG1

Il silenziamento di TUG1 è stato condotto mediante trasfezione delle cellule di OSCC HSC-3 con plasmidi codificanti shRNA diretti contro la sequenza del lncRNA (pLKO.1-589 e pLKO.1-738), mentre i campioni di controllo sono stati trasfettati con il vettore vuoto (pLKO.1-puro) o trattati con il solo reagente di trasfezione (mock). Dopo 48 ore dalla trasfezione è iniziata la selezione con puromicina dei cloni che avevano internalizzato il plasmide e, al termine della selezione, le cellule sono state raccolte e sottoposte ad analisi mediante Real-Time PCR.

3.1.1 Verifica dell'efficienza del silenziamento di TUG1 mediante Real-Time PCR

La verifica dell'avvenuta downregolazione di TUG1 è stata effettuata mediante Real-Time PCR, utilizzando come templato il cDNA retrotrascritto a partire dal RNA totale isolato dai campioni cellulari. I risultati ottenuti mostrano che nelle cellule trasfettate con i vettori codificanti shRNA contro TUG1 si riscontra una significativa ($p<0,05$) riduzione del livello di espressione del lncRNA (0,31 ± 0,07 per pLKO.1-589 e 0,29 ± 0,05 per pLKO.1-738) rispetto ai campioni di controllo (1 ± 0,15 per mock; 0,92 ± 0,1 per pLKO.1-puro) (Figura 5).

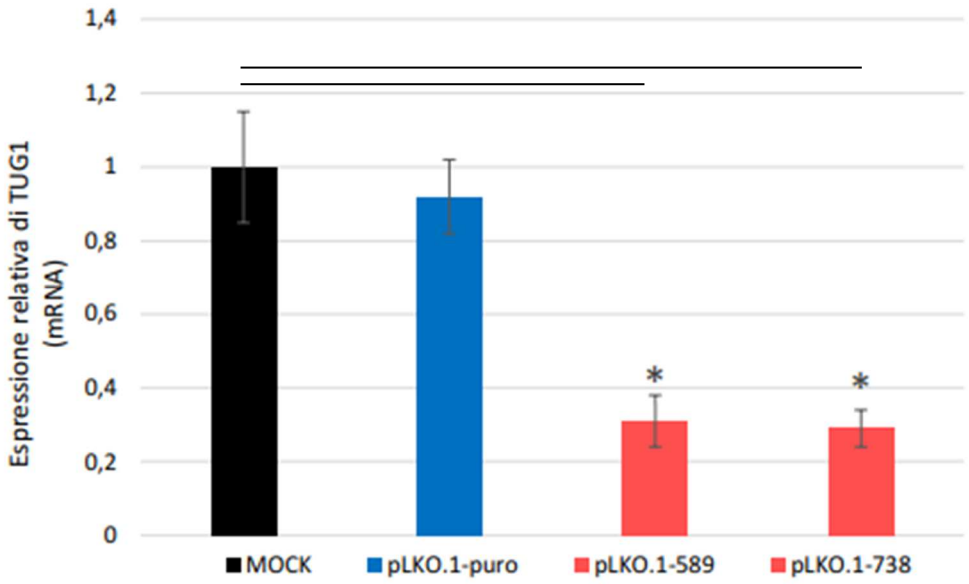


Figura 5. Analisi dei livelli d'espressione di TUG1 (mRNA) mediante Real-time PCR. I valori riportati nel diagramma a barre sono espressi come media ± deviazione standard (*$p<0,05$).

3.1.2 Effetto del silenziamento di TUG1 sulla proliferazione cellulare mediante saggio MTT

La valutazione dell'effetto indotto dal silenziamento di TUG1 sulla proliferazione delle cellule di OSCC è stata svolta mediante saggio MTT. Le cellule sono state seminate in 96-well e a 24 ore dalla semina è stata effettuata la prima lettura allo spettrofotometro, corrispondente al tempo zero. Le analisi sono state

ripetute a 24h, 48h e 72h dal primo test. Il grafico riportato in Figura 6 illustra la percentuale di vitalità cellulare dei vari campioni a diversi tempi (24h, 48h e 72h) rispetto al tempo zero (100%) e mostra l'assenza di differenze significative nella vitalità cellulare a 24 e 48h. A 72h tra i campioni di controllo (pLKO.1-puro e mock). Al contrario, le cellule trasfettate con il plasmide pLKO.1-589 mostrano una significativa ($p<0,05$) riduzione della proliferazione cellulare rispetto ai controlli, a 72h(Figura 5).

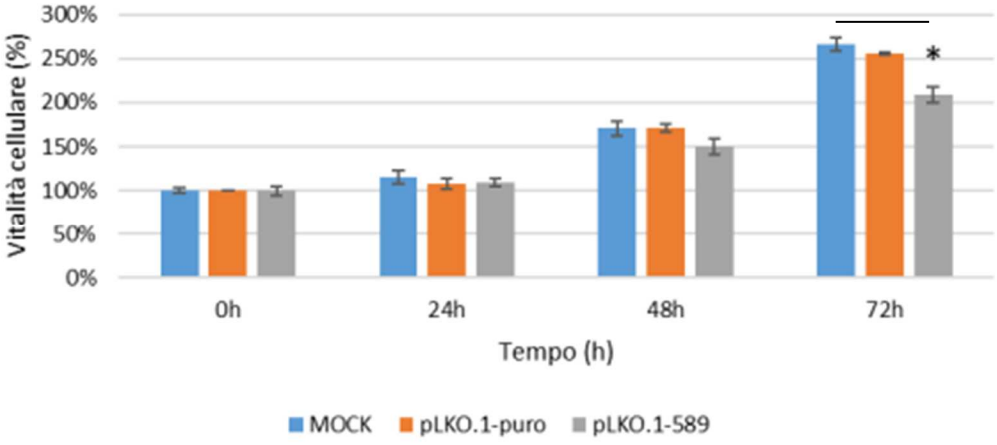


Figura 6. Saggio MTT effettuato sulle cellule trasfettate con il plasmide pLKO.1-589 e sui campioni di controllo (mock e pLKO.1-puro). I valori riportati nei grafici sono espressi come media ± deviazione standard ($p<0,05$).

3.1.3 Effetto del cisplatino e 5-fluorouracile sulla vitalità cellulare

Al fine di esplorare l'impatto sulla proliferazione cellulare dei 2 farmaci antineoplastici (cisplatino e 5-fluorouracile), comunemente utilizzati nel trattamento delle forme localmente avanzate di OSCC, sono stati allestiti ulteriori saggi MTT valutandone gli effetti indotti in seguito al trattamento delle cellule HSC-3 con differenti concentrazioni dei composti, utilizzati da soli o in combinazione.

La somministrazione di cisplatino causava una significativa ($p<0,05$) riduzione della vitalità cellulare a 48 e 72h dall'inizio del trattamento rispetto al controllo (Figura 7).

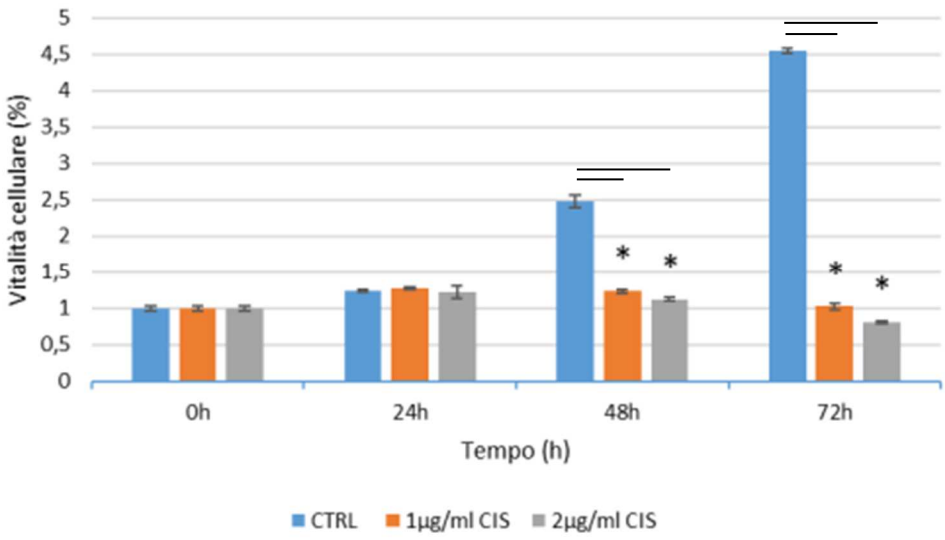


Figura 7. Effetto della somministrazione di cisplatino (1µg/ml e 2µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 ($p<0,05$).

Anche il 5-fluorouracile a 48 e 72h è efficace nel diminuire significativamente ($p<0,05$) la proliferazione cellulare delle HSC-3, rispetto al controllo. Rispetto al dato precedente, a 72h l'effetto indotto dal trattamento con il composto a concentrazione maggiore (2µg/ml) è più marcato di quello generato dallo stesso meno concentrato (1µg/ml) (Figura 8).

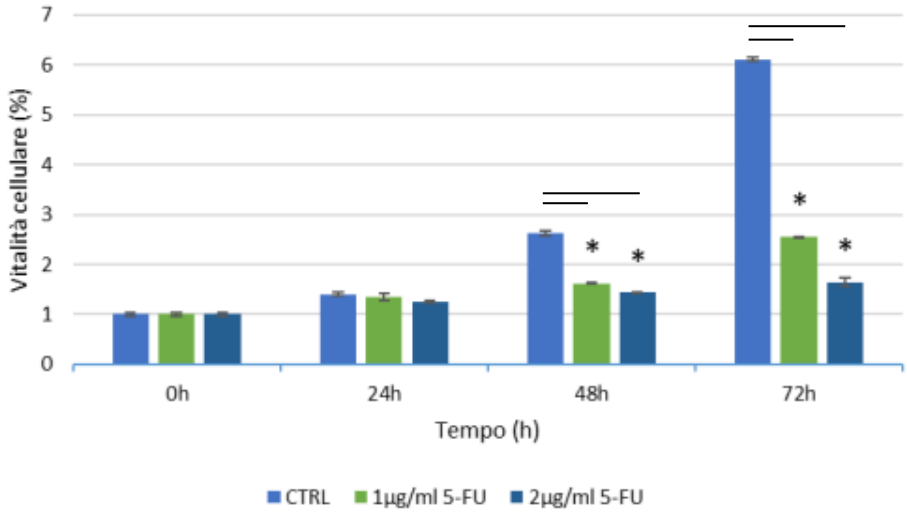


Figura 8. Effetto della somministrazione di 5-fluorouracile (1µg/ml e 2µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 ($p<0,05$).

La tendenza sopra descritta in merito alla somministrazione dei singoli farmaci, si riscontra anche nei trattamenti combinati (cisplatino + 5-fluorouracile). In particolare, la combinazione dei composti induceva una significativa ($p<0,05$) riduzione del tasso di vitalità cellulare a 48 e 72h rispetto al controllo (Figura 9), la cui entità era intensificata rispetto a quella rilevata in seguito al trattamento con cisplatino o 5-fluorouracile utilizzati da soli. Tale evidenza suggerendo la presenza di un effetto sinergico o additivo relativo al trattamento combinato (Figura 9).

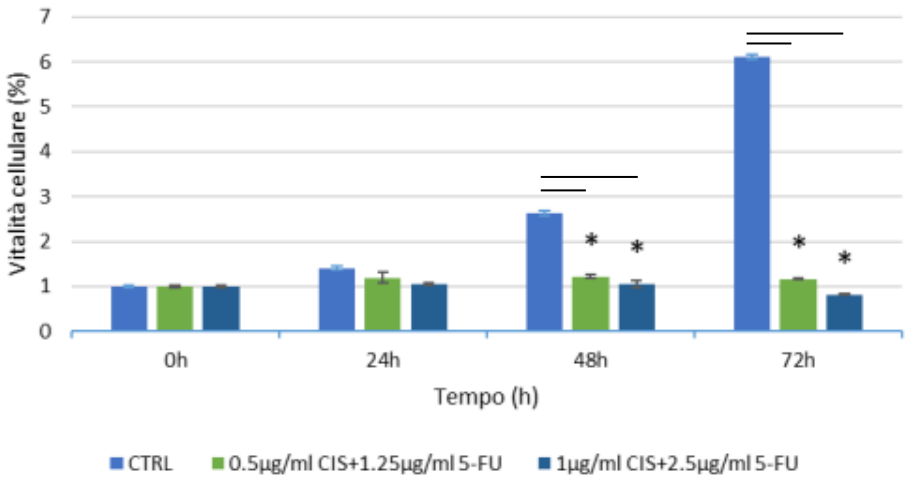


Figura 9. Effetto della somministrazione combinata di cisplatino e 5-fluorouracile sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 (cisplatino 0,5µg/ml + 5-fluorouracile 1,25µg/ml, combinazione 1; cisplatino 1µg/ml + 5-fluorouracile 2,5µg/ml, combinazione 2) ($p<0,05$).

Successivi esperimenti hanno previsto la valutazione del tasso di vitalità cellulare a seguito della somministrazione di concentrazioni più basse di entrambi i composti, sia usati singolarmente sia in combinazione. Per quanto concerne il cisplatino, a 72h di trattamento per entrambi i valori di concentrazione si osserva una significativa ($p<0,05$) riduzione della vitalità rispetto ai controlli, ma di minore entità rispetto a quella riscontrata in seguito al trattamento con cisplatino a valori di concentrazione maggiore. Analogamente a quanto riscontrato in precedenza, a 72h l'effetto maggiore si riscontra con il cisplatino somministrato a concentrazione maggiore (0,2µg/ml) (Figura 10).

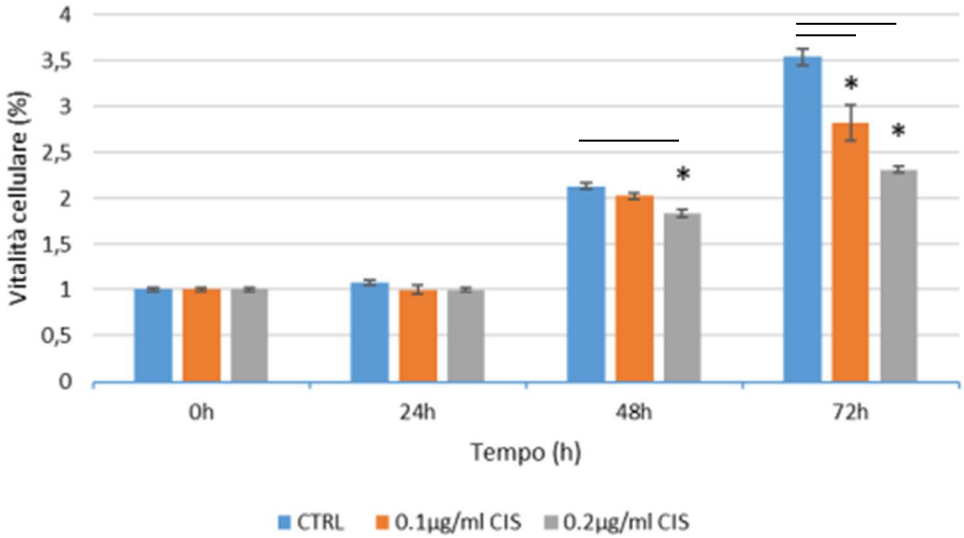


Figura 10. Effetto della somministrazione di cisplatino (0,1µg/ml e 0,2µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 ($p<0,05$).

In merito al trattamento con 5-fluorouracile, le cellule rispondono in maniera analoga a quanto si riscontra con il cisplatino, per quanto concerne i tempi 24h e 48h. Tuttavia, dopo 72h l'effetto del trattamento risulta quasi estinto. In generale si deduce che le suddette concentrazioni di 5-fluorouracile (0,1µg/ml e 0,2µg/ml)

sono troppo basse per poter apprezzare un sostanziale effetto antiproliferativo, confermando la maggiore efficacia del cisplatino (Figura 11).

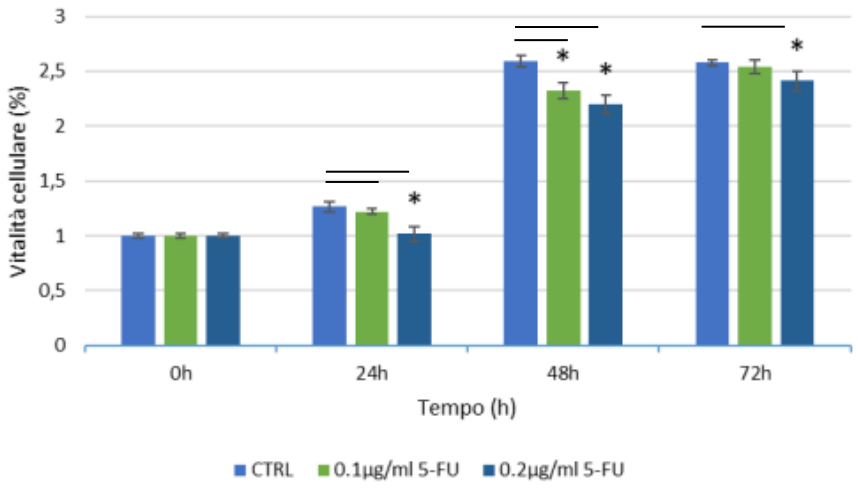


Figura 11. Effetto della somministrazione di 5-fluorouracile (0,1µg/ml e 0,2µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 ($p<0,05$).

Anche la somministrazione combinata dei due chemioterapici a concentrazioni più basse ha comportato una riduzione significativa della vitalità cellulare a 24, 48 e 72h. Rispetto a quanto osservato con i farmaci somministrati singolarmente e a basse concentrazioni, l'effetto antiproliferativo indotto è marcatamente superiore sia a 48 che a 72h (Figura 12).

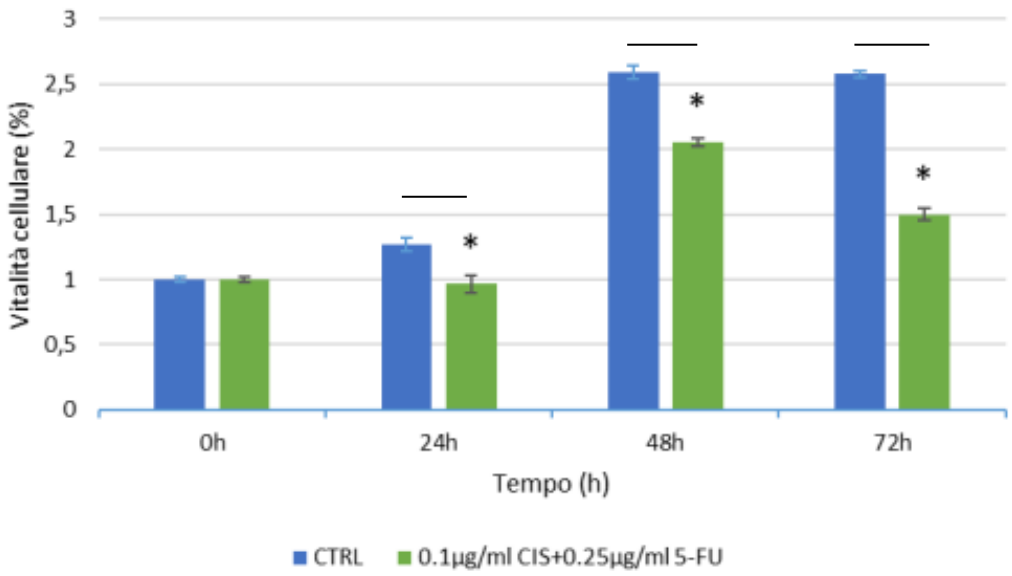


Figura 12. Effetto della somministrazione della combinazione di cisplatino e 5- fluorouracile sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 (cisplatino 0,1µg/ml + 5- fluorouracile 0,25µg/ml) ($p<0,05$).

3.1.4 Impatto del silenziamento di TUG1 sulla chemiosensibilità delle cellule HSC-3

La valutazione del ruolo di TUG1 sulla sensibilità al trattamento chemioterapico delle cellule HSC-3 ha previsto l'allestimento di saggi MTT. L'osservazione dell'attività proliferativa delle cellule in cui tale lncRNA era stato silenziato è stata effettuata in associazione al trattamento con cisplatino e 5-fluorouracile, utilizzati singolarmente o in combinazione (figura 13).

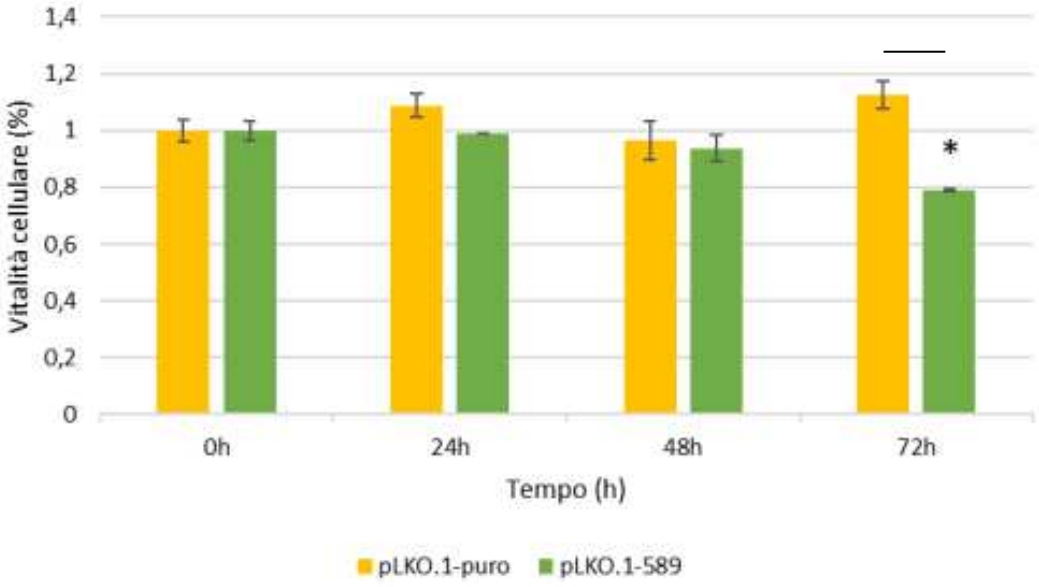


Figura 13. Effetto della somministrazione di cisplatino (1µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 sottoposta a trasfezione ($p<0,05$).

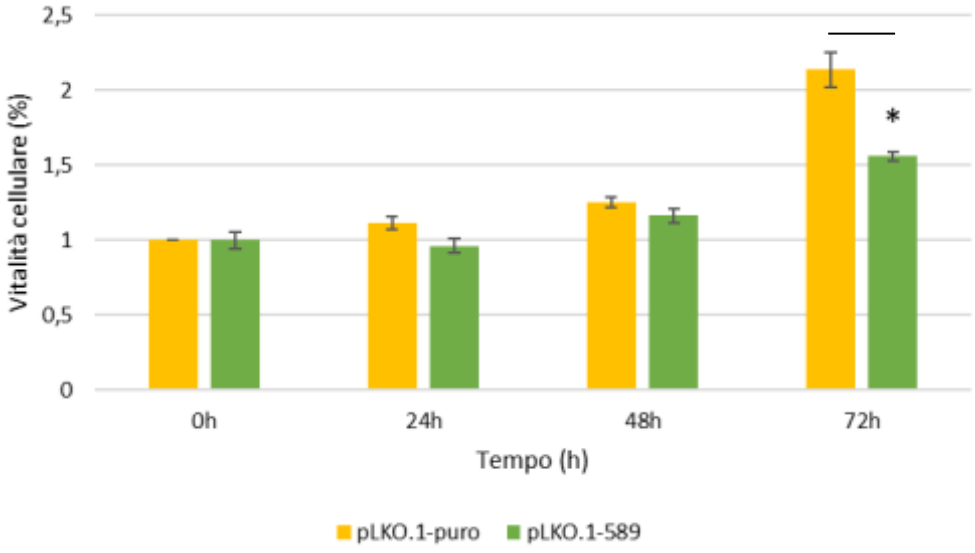


Figura 14. Effetto della somministrazione di 5-fluorouracile (1µg/ml) sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 sottoposta a trasfezione ($p<0,05$).

Per entrambi i farmaci utilizzati singolarmente ad una concentrazione pari a 1µg/ml, a 72h si nota una significativa (p<0,05) riduzione della proliferazione cellulare nelle cellule trasfettate con il plasmide pLKO.1-589 rispetto ai controlli (pLKO.1puro) (Figure 13 e 14).

Relativamente ai 2 composti usati in combinazione, si riscontra una riduzione significativa della vitalità cellulare sia a 24h che a 48 h. Tuttavia, a 72h per entrambe le combinazioni dei farmaci, la significatività viene persa (Figure 15 e 16).

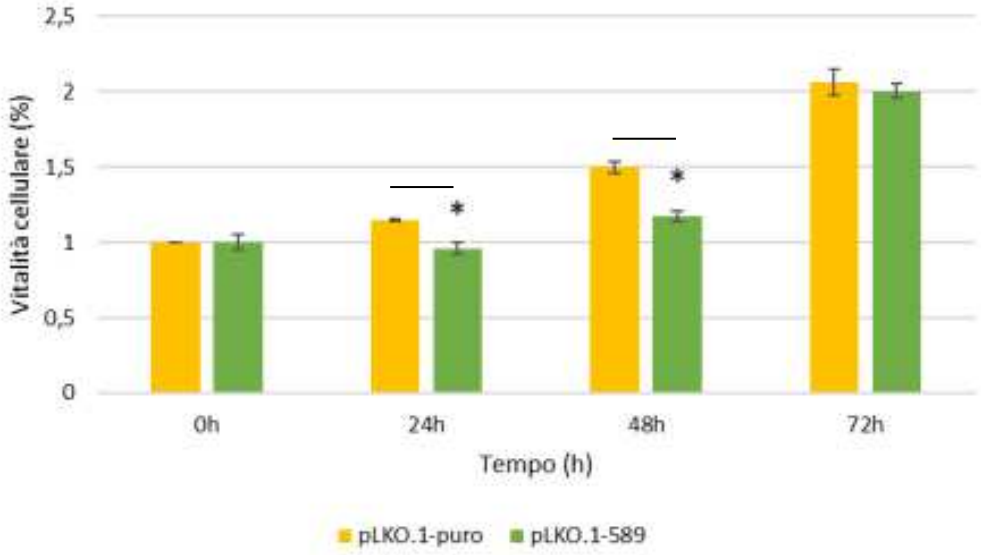


Figura 15. Effetto della somministrazione della combinazione di cisplatino e 5- fluorouracile sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 (cisplatino 0,2µg/ml + 5- fluorouracile 0,5µg/ml) (p<0,05).

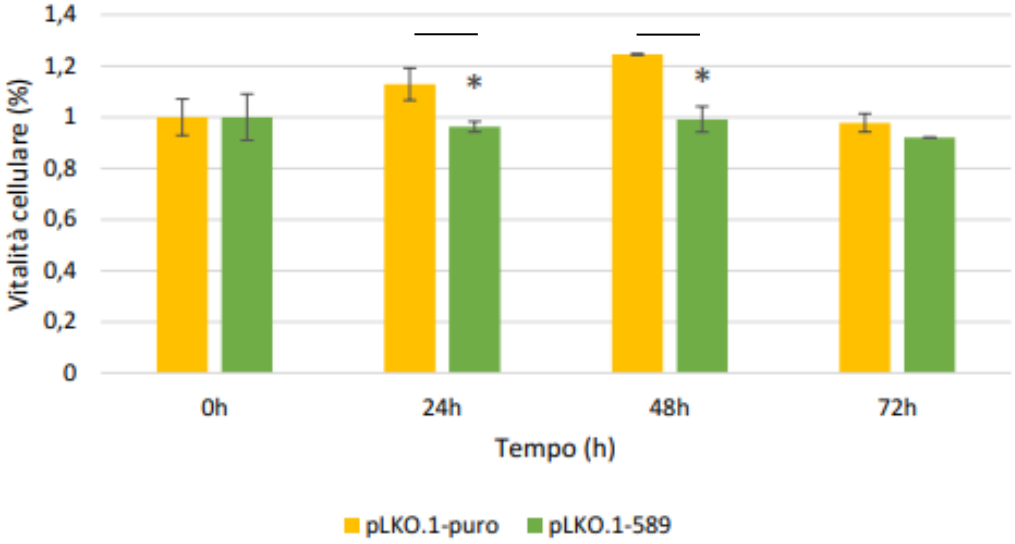


Figura 16. Effetto della somministrazione della combinazione di cisplatino e 5- fluorouracile sulla vitalità cellulare della linea cellulare HSC-3 (cisplatino 0,5µg/ml + 5-fluorouracile 0,5µg/ml) (p<0,05).

3.2 Effetto di FWGE sulla tumorigenicità delle linee di OSCC

FWGE è stato utilizzato per trattare le linee di OSCC HSC-3, SCC-25 e SAS. L'effetto di tale trattamento è stato valutato sul fenotipo della cellula neoplastica, in termini di proliferazione, migrazione invasività e chemioresistenza.

3.2.1 FWGE riduce la vitalità cellulare delle linee OSCC in maniera dose-dipendente

Per saggiare gli effetti di FWGE sulla vitalità cellulare in linee OSCC (HSC-3, SAS e SCC-25), le cellule sono state trattate con il composto a concentrazioni differenti (2, 5 e 10 mg/ml) ed analizzate mediante il saggio MTT ai time point 24, 48 e 72h.

La linea altamente invasiva HSC-3 e quella meno invasiva SCC-25, trattate con FWGE 5 e 10 mg/ml, mostravano una riduzione significativa ($p < 0.001$) della vitalità rispetto a quelle non trattate (Figure 17a e c). Per quanto concerne le SAS, è stata rilevata una significativa ($p < 0.01$) riduzione della citotossicità rispetto ai controlli solo nel caso di trattamento con la concentrazione più alta (10 mg/ml) (Figure 17b).

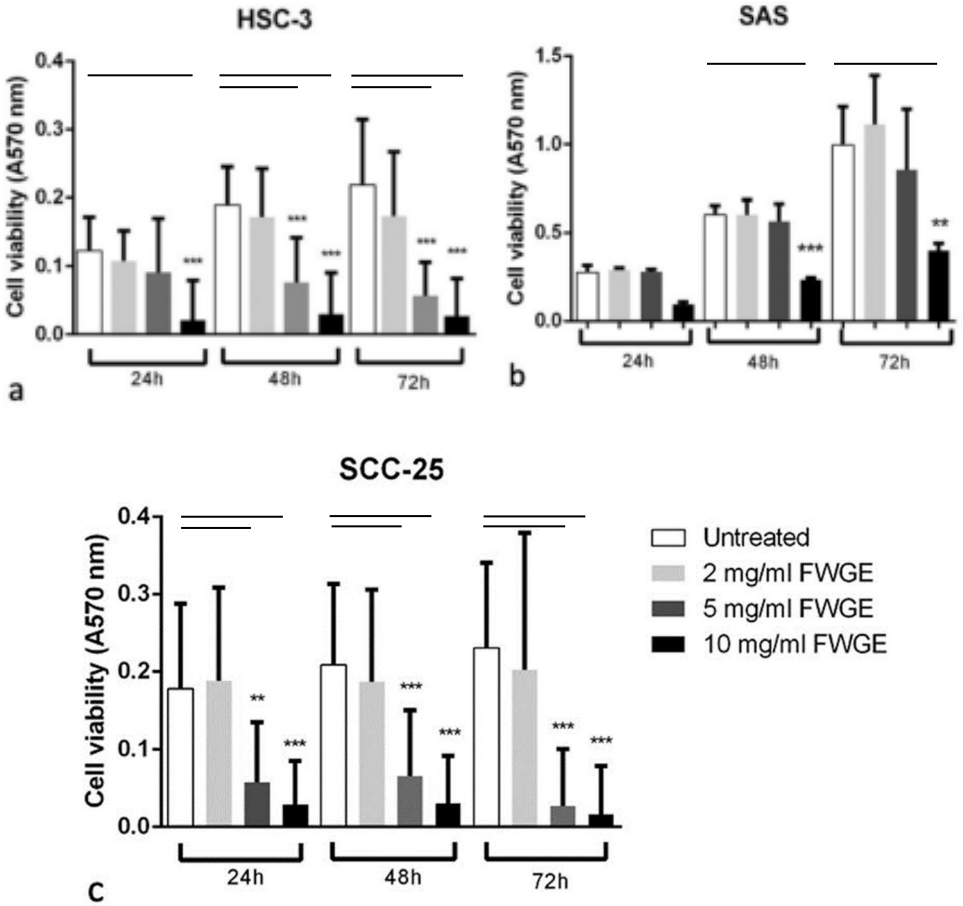


Figura 17. Valutazione dell'effetto del trattamento con FWGE (2, 5 e 10mg/ml) sulla vitalità delle linee cellulari di OSCC HSC-3 (a), SAS (b) e SCC-25 (c) mediante saggio MTT, a 24, 48 e 72h. La densità ottica (OD) è stata misurata a 540 nm. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

3.2.2 FWGE inibisce la capacità di formare sfere da parte delle linee cellulari di OSCC

La formazione delle sfere ad opera delle linee cellulari di OSCC è stata testata mediante crescita su piastre low-attachment, in presenza di su Myogel, quale substrato in grado di mimare la componente della matrice extracellulare (87). L'area di invasione delle sfere è stata confrontata tra cellule non trattate e cellule trattate con FWGE 2, 5 e 10 mg/ml, a time point differenti. Per quanto riguarda le HSC-3, nel secondo e nel quarto giorno di trattamento con FWGE 5 e 10 mg/ml, si assisteva ad una significativa riduzione delle dimensioni degli sferoidi rispetto alle cellule di controllo. Al contrario, al giorno 7, solamente la concentrazione 10mg/ml mostrava una efficacia significativa (Figure 18a e 19a). La capacità di formare sfere delle cellule SCC-25 trattate con FWGE 5 e 10 mg/ml era significativamente minore il giorno 7, 9 e 11 (Figure 18b e 19b), mentre per le SAS solo la concentrazione più alta di FWGE (10 mg/ml) causava una riduzione significativa del processo di formazione delle sfere, nei giorni 2, 3 e 4 (Figure 18c e 19c).

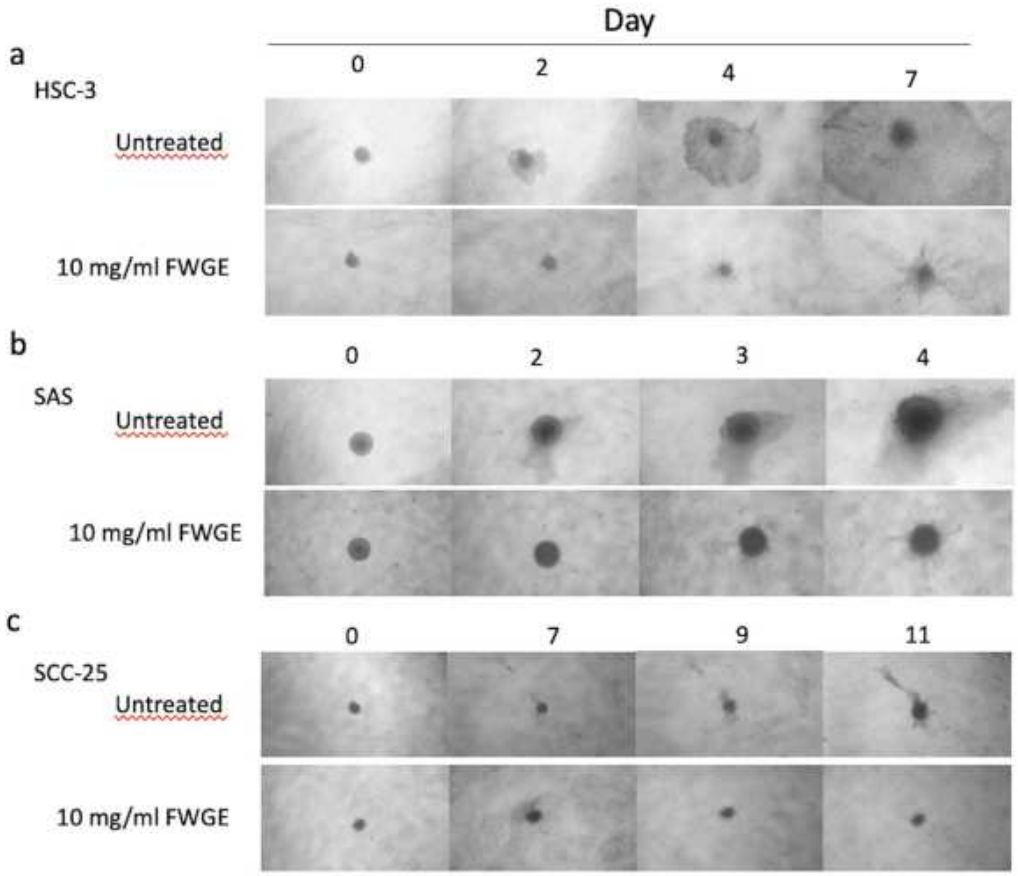


Figura 18. Immagini relative alle sfere originatesi dalle cellule di OSCC HSC-3(a), SAS(b) e SCC-25(c) non assoggettate ad alcun trattamento o trattate con FWGE 10mg/ml. La formazione delle sfere è stata monitorata mediante l'acquisizione di immagini a 0h e nei giorni successivi, usando il microscopio Nikon Eclipse TS100 a luce invertita con obiettivo 4x connessi alla camera Canon PowerShot S50.

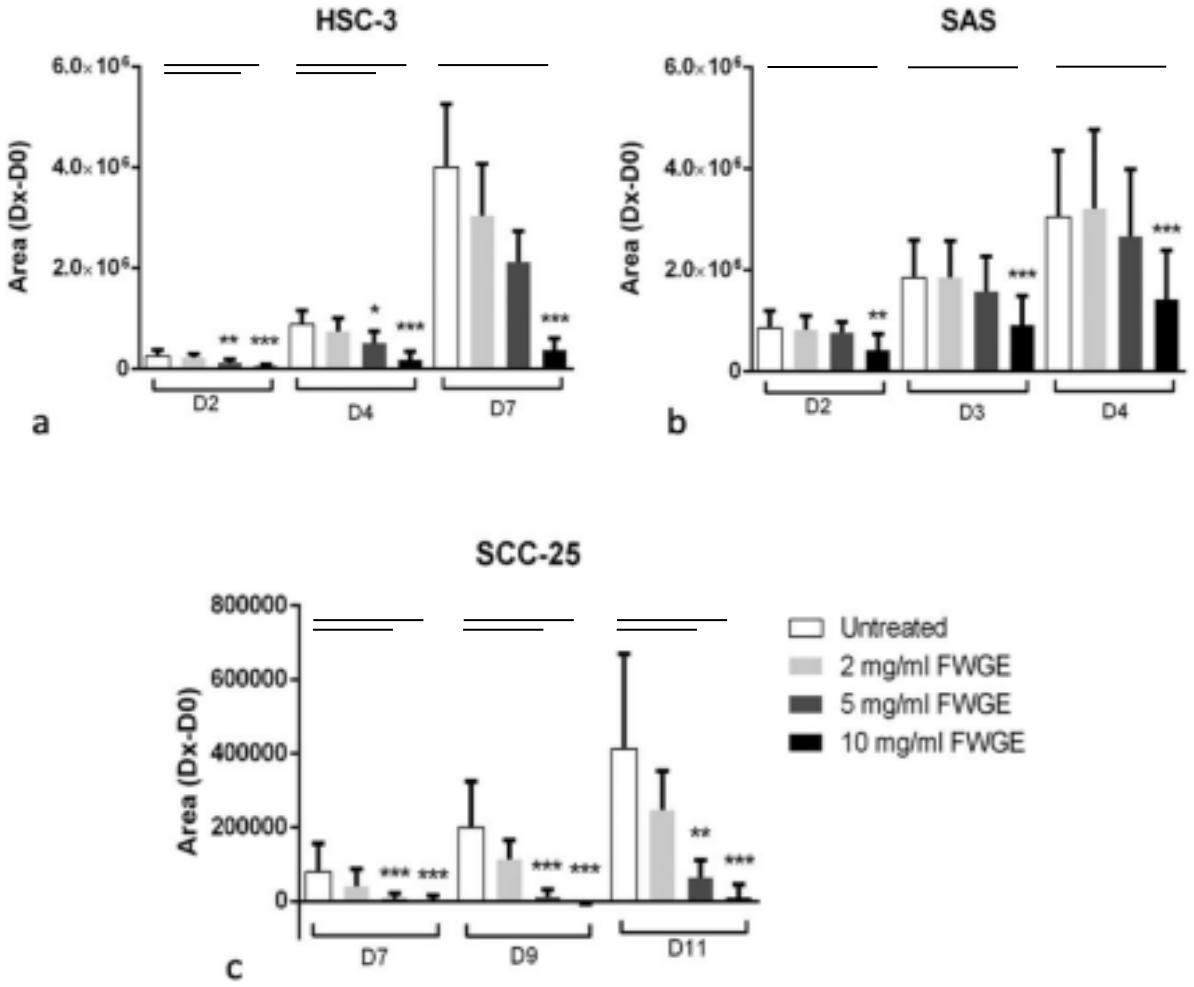


Figura 19. Diagrammi a barre che illustrano le dimensioni delle aree occupate dalle sfere formate dalle cellule di OSCC HSC-3 (a), SAS (b) e SCC-25 (c). Le misurazioni sono state effettuate a intervalli di tempo differenti (giorni 2,3,4,7,9 e 11) e al tempo zero (giorno 0). I dati sono espressi come media ± deviazione standard (*p<0,05, **p<0,01, **p<0,001).

3.2.3 Valutazione dell'effetto di FWGE sulla migrazione e la capacità invasiva mediante transwell assay

Il saggio in transwell è stato allestito allo scopo di valutare se il trattamento delle cellule di OSCC con FWGE era in grado di influenzare la migrazione verticale delle cellule attraverso una membrana semipermeabile ricoperta di Myogel. Tale analisi è stata condotta in maniera comparativa tra le linee cellulari HSC-3 e SAS, al fine di riscontrare se le differenze evidenziate in termini di vitalità e capacità di formare sfere fossero conservate anche in merito alla capacità di migrazione e invasione. Nelle cellule HSC-3, il trattamento con FWGE 5 e 10 mg/ml riduceva significativamente ($p < 0.01$) la capacità migratoria e invasiva (Figure 20a), mentre nelle SAS, solo la concentrazione maggiore di FWGE (10 mg/ml) era in grado di inibire significativamente ($p < 0.01$) la migrazione e l'invasività cellulare (Figure 20b).

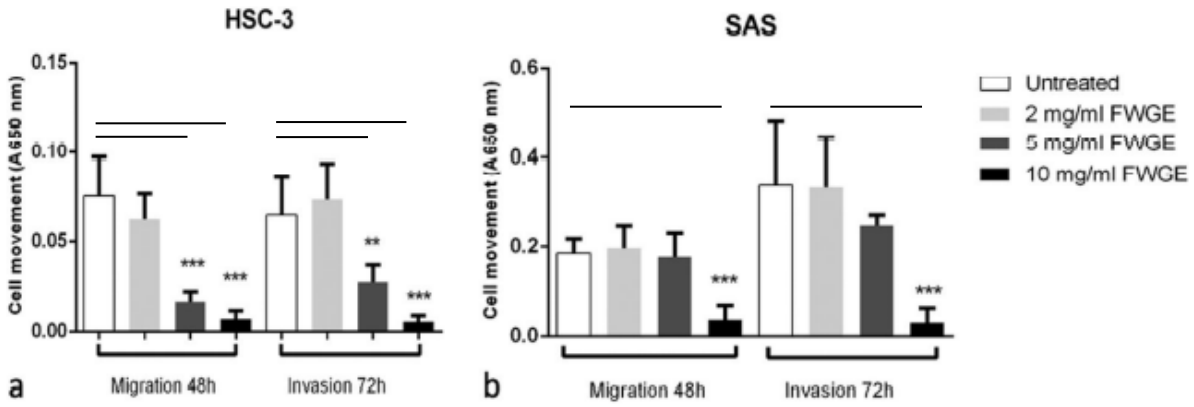


Figura 20. Valutazione della migrazione ed invasione cellulare mediante transwell assay, a carico delle linee di OSCC HSC-3 (a) e SAS (b), trattate con FWGE 2, 5 e 10mg/ml. I valori riportati nei diagrammi a barre sono relativi a media ± deviazione standard (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

3.2.4 FWGE aumenta l'effetto inibente la proliferazione cellulare del trattamento con chemioterapici

Mediante saggio MTT, è stato valutato l'effetto combinato di FWGE e farmaci ad azione chemioterapica sulla vitalità cellulare delle linee di OSCC HSC-3 e SAS. FWGE è stato usato da solo ad una concentrazione pari 10 mg/ml, mentre in combinazione con cisplatino, 5-FU o con entrambi, a valori di concentrazione di 5 e 10 mg/ml. Per quanto concerne i composti ad azione chemioterapica, questi sono stati utilizzati da soli ad una concentrazione di 0.5 µg/ml, mentre il trattamento combinato ha previsto l'utilizzo di cisplatino 0.1µg/ml e 5-fluorouracile 0,25µg/ml. Nelle HSC-3, il trattamento con cisplatino inibisce la vitalità cellulare più del 5-FU. Quando il cisplatino, il 5-FU o entrambi i composti erano utilizzati in combinazione con FWGE, la vitalità cellulare di entrambe le linee era ridotta rispetto a quella rilevata nelle cellule trattate solo con i farmaci chemioterapici o con l'FWGE (Figura 21).

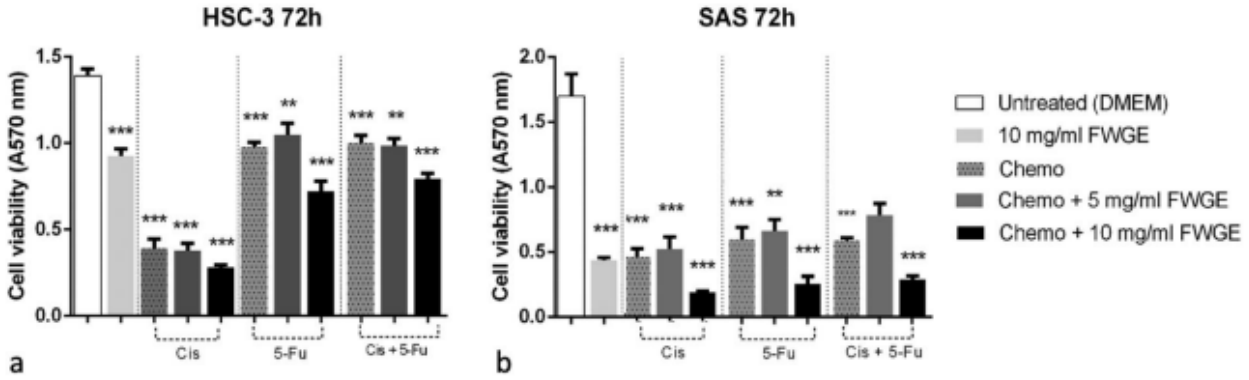


Figura 21. Effetto dei farmaci chemioterapici e FWGE, usati da soli o in combinazione, sulla vitalità cellulare delle linee HSC-3 (a) e SAS (b), valutato mediante saggio MTT a 72h dall'inizio del trattamento. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nell'ambito dei carcinomi della regione testa-collo, il carcinoma orale squamocellulare (OSCC) rappresenta decisamente la forma più frequente, con un'incidenza del 90% tra tutte le neoplasie della cavità orale (97). I distretti interessati dall'OSCC sono tutti quelli del cavo orale, comprese faringe e ghiandole salivari, anche se le aree più spesso coinvolte sono lingua e pavimento orale (98). Gli studi epidemiologici attestano che il carcinoma orale è la sesta forma di cancro più diffusa (6). I soggetti maggiormente esposti al rischio di sviluppare la neoplasia sono individui di sesso maschile in età avanzata, ma negli ultimi decenni si è registrato un drammatico incremento dei casi tra gli adulti più giovani e nella popolazione femminile (4), soprattutto a causa della diffusione dell'infezione da HPV, uno tra i maggiori fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma orale. Negli ultimi 30 anni, nonostante i progressi in ambito terapeutico, il carcinoma orale è rimasta una patologia con prognosi infausta e con tassi di sopravvivenza a 5 anni che si aggirano intorno al 50-55% (4). I principali fattori prognostici negativi sono lo stadio avanzato del tumore e la presenza di metastasi ai linfonodi cervicali (98,99). La prognosi, infatti, è tanto più infausta quanto più avanzato è lo stadio in cui il tumore viene diagnosticato (4). L'invasione dei tessuti circostanti, assieme alla presenza di metastasi linfonodali e a distanza e all'elevato rischio di recidive, sono spesso elementi associati ad una diagnosi della neoplasia in stadio avanzato (III o IV) (98). Tali condizioni riducono in maniera sostanziale il periodo di sopravvivenza, indipendentemente dalle strategie terapeutiche adottate (100): le forme localmente avanzate di OSCC mostrano un tasso di sopravvivenza a 5 anni al 5-20%, contro l'80-90% per gli stadi iniziali (I e II) della neoplasia (101), sottolineando l'importanza di una diagnosi precoce (99). La tendenza alla metastatizzazione nei linfonodi regionali è influenzata dalla posizione del tumore primario (102), dal grado di differenziamento delle cellule tumorali costituenti la massa neoplastica (103), dallo spessore del tumore e dalla profondità dell'infiltrazione, ed è il più importante fattore prognostico indipendente in OSCC (104). Le prospettive terapeutiche in caso di neoplasia in forma localmente avanzata sono limitate e generalmente prevedono trattamenti chirurgici invasivi e menomanti, seguiti da chemioterapia e radioterapia combinate (99). La chemioterapia adiuvante è il trattamento sistemico elettivo per controllare il volume tumorale e l'insorgenza di micrometastasi (98). Ritardo diagnostico e sottovalutazione dei sintomi da parte del paziente sono i fattori che determinano la prognosi sfavorevole dei pazienti affetti da carcinoma orale (6). L'individuazione tempestiva delle lesioni pre-maligne o con capacità di trasformazione maligna, insieme alla comprensione dei meccanismi molecolari che portano la cellula tumorale ad acquisire fenotipo invasivo, nonché un accurato follow-up dei pazienti, rappresentano importanti strategie in grado di formulare una diagnosi precoce e migliorare significativamente la prognosi della neoplasia (105).

Alla luce di queste evidenze, un obiettivo fondamentale della ricerca scientifica è l'identificazione di biomarker molecolari per la diagnosi precoce di OSCC, nonché l'individuazione di molecole chiave implicate nella tumorigenesi orale. Si inserisce in questo ambito il progetto in collaborazione tra il gruppo di ricerca del Prof. Lo Muzio dell'Università di Foggia (UNIFG) e quello coordinato dalla Prof. Emanuelli dell'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM), che previsto lo svolgimento di 2 fasi sperimentali distinte. Presso UNIFG è stata svolta un'analisi sistematica dei dati presenti in letteratura, al fine di individuare molecole di RNA con funzioni regolative (short and long non-coding RNA) che potessero fungere da potenziali marcatori prognostici dell'OSCC. Per esplorare il potenziale coinvolgimento dei lncRNA nei processi alla base della carcinogenesi orale, è seguita l'analisi dei profili di espressione di tali molecole in campioni bioptici di OSCC e di mucosa linguale sana, mediante tecnologia array. Dai dati ottenuti è emersa la deregolazione di numerose molecole di lncRNA, tra cui TUG1, FER1L4, C11ORF44 e HOTAIR, nel tessuto neoplastico rispetto a quello sano. In particolare, è stata riscontrata una significativa upregolazione di TUG1 nell'OSCC rispetto

al tessuto di controllo, suggerendo il possibile coinvolgimento di tale lncRNA nell'oncogensi orale. Tale dato è in linea con quanto riportato in letteratura relativamente ad altre neoplasie. L'overespressione di TUG1 è infatti stata dimostrata in tumori, quali il microcitoma polmonare, l'osteosarcoma, il melanoma, il carcinoma ovarico, della cervice uterina, esofageo, gastrico, vescicale, epatocellulare, colorettale e il glioma. Al contrario, tale lncRNA risulta essere downregolato in NSCLC (106).

Il presente lavoro di ricerca, parte integrante della seconda fase del progetto, è stato condotto da UNIVPM. L'attività sperimentale ha previsto il silenziamento di TUG1, al fine di esplorarne il potenziale effetto su vitalità cellulare e chemiosensibilità, a carico della linea di OSCC HSC-3. In base ai risultati ottenuti in seguito ai saggi MTT effettuati, è emerso che la downregolazione di TUG1 riduce significativamente vitalità cellulare. Altri studi presenti in letteratura hanno dimostrato che il silenziamento di TUG1 genera un marcato effetto antiproliferativo in cellule tumorali di neoplasie caratterizzate dall'overespressione dello stesso lncRNA, avvalorando tali risultati (107, 108). Successivamente sono stati osservati gli effetti causati dal knockdown di TUG1 sulla chemiosensibilità delle cellule HSC-3. Sono stati quindi allestiti saggi MTT per valutare la risposta al trattamento farmacologico con due chemioterapici comunemente utilizzati nel trattamento delle forme localmente avanzate di OSCC, quali cisplatino e 5-fluorouracile, in associazione al silenziamento di TUG1. Sono state dapprima testate diverse concentrazioni dei due composti ad azione chemioterapica (somministrati singolarmente o in combinazione) per osservare gli effetti antiproliferativi sulla linea cellulare HSC-3, mediante saggi MTT. I risultati ottenuti hanno illustrato come, a parità di concentrazione e tempo di trattamento, il cisplatino è spiccatamente più efficace nel ridurre la vitalità cellulare, rispetto al 5-fluorouracile. Una fase successiva dello studio effettuato ha previsto la valutazione dell'effetto della somministrazione degli stessi chemioterapici (usati singolarmente o in combinazione) sulla vitalità delle cellule in cui TUG1 era stato silenziato. I risultati descritti in merito a tali analisi rivelano come il silenziamento di TUG1 è associato ad una sensibile riduzione della vitalità cellulare rispetto a quella rilevata a carico delle cellule di controllo, incrementando/amplificando quindi l'effetto antiproliferativo indotto dal trattamento farmacologico. Riguardo alle future prospettive di studio, risulta interessante estendere tali analisi ad altre linee cellulari di OSCC, ampliando il numero e la tipologia di plasmidi codificanti shRNA diretti contro TUG1. Risulterà in seguito fondamentale lo svolgimento di saggi in vivo, mediante inoculo in topi atimici di cellule in cui è stato realizzato il silenziamento di TUG1 e di cellule di controllo, con lo scopo di monitorare lo sviluppo tumorale. L'inoculo negli esemplari murini consentirà inoltre di valutare la risposta al trattamento chemioterapico in vivo (109).

La seconda parte del presente lavoro di ricerca sì è focalizzata sull'esplorazione delle proprietà antineoplastiche di composti naturali al fine di un loro impiego per la prevenzione e il trattamento delle neoplasie, soprattutto nell'ottica della riduzione degli effetti collaterali associati alle terapie antitumorali convenzionali (110,111,112). L'estratto di germe di grano, prodotto da Saccharomyces Cerevisiae, è noto contenere un elevato quantitativo di benzochinone, in grado di esercitare un effetto antiproliferativo e un'attività citotossica nei confronti di diverse cellule tumorali (89,113). Questo studio si è concentrato sull'indagine degli effetti dell'estratto di germe di grano fermentato (FWGE) sulle linee cellulari di OSCC HSC-3, SAS e SCC-25, per indagare se tale composto influenzasse la loro vitalità, le loro capacità migratorie e invasive, nonché la loro sensibilità al trattamento chemioterapico (cisplatino e 5-fluorouracile). Il saggio di vitalità ha evidenziato che tutte e tre le linee erano sensibili, anche se in misura differente, al trattamento con FWGE mostrando risultati simili a quelli descritti da parte di altri ricercatori (90). Il saggio di formazione delle sfere ha anch'esso prodotto dei risultati che dimostrano la capacità da parte di FWGE di ridurre significativamente la tumorigenicità delle cellule di OSCC. Tale effetto, tuttavia era più marcato nella linea metastatica HSC-3 rispetto alle SAS. Per quanto riguarda il saggio di invasione in transwell (94,96), anche in

questo caso è stato evidenziato un effetto inibitorio esercitato dall'FWGE nei confronti di un aspetto fenotipico importante della cellula neoplastica come la capacità migratoria e invasiva. Analogamente al saggio di formazione di sferoidi, è stato utilizzato il Myogel come substrato di adesione cellulare. Tale substrato si è dimostrato migliore del Matrigel (matrice extracellulare derivante da tumori murini) poiché contenente molecole costituenti la matrice extracellulare di miomi umani, come ad esempio l'MMP-2, la tenascina-C e il collagene di tipo XII e XIV. Tale costituzione conferisce al Myogel caratteristiche simili a quelle che si riscontrano nelle nicchie metastatiche (114) e per questo risulta adatto anche per lo svolgimento dei test preclinici (115). I risultati ottenuti dimostrano che le linee cellulari HSC-3 e SAS si sono comportate in modo simile a quanto scaturito del test delle sfere e saggio di migrazione, ovvero esibendo una maggiore suscettibilità le prime e mostrandosi maggiormente resistenti le seconde. Questo dato è strettamente correlato al differente grado di aggressività che compete a ciascuna delle due linee cellulari, come già osservato in studi precedenti (116,117). In tal senso, le differenti linee di OSCC mostrano fenotipi vari e rispondere in maniera differente al trattamento farmacologico e/o con composti naturali come ad esempio FWGE. I nostri risultati sono in linea con dati riportati precedentemente in merito alle capacità di FWGE di inibire i processi di migrazione ed invasione cellulare (90). Cisplatino e 5-fluorouracile sono i chemioterapici usati per il trattamento del carcinoma orale a stadio avanzato (118,119). Nonostante il loro diffuso utilizzo, il problema che caratterizza l'impiego di chemioterapici è il gran numero di effetti collaterali e il sempre più frequente problema delle resistenze svilippate delle cellule tumorali (120,121). In tale contesto, sono iniziati gli studi volti all'identificazione di nuovi composti da utilizzare allo scopo di aumentare la chemiosensibilità di OSCC ai tradizionali cisplatino e 5-fluorouracile (122,123). I nostri risultati dimostrano che FWGE è in grado di aumentare l'effetto antineoplastico di questi agenti chemioterapici nell'ambito di OSCC. Infatti, il trattamento combinato chemioterapici-FWGE ad alte concentrazioni (10mg/ml) causava un effetto inibente la proliferazione cellulare significativamente più alto rispetto a quello osservato in seguito al trattamento con solo chemioterapici o solo germe di grano. L'effetto sinergico evidenziato da tali risultati è in linea con quanto riportato in altri studi (89).

Complessivamente, nonostante la variabilità delle risposte generate dalle differenti linee di OSCC, i dati riportati dimostrano nel complesso che FWGE utilizzato ad alta concentrazione esercita molteplici e significativi effetti antitumorali e la sua associazione con agenti chemioterapici migliora l'efficacia del trattamento farmacologico. Ulteriori studi in vivo consentiranno da un lato di valutare la tollerabilità delle formulazioni combinate e allo stesso tempo di identificare le combinazioni ottimali di chemioterapia e composti naturali, allo scopo finale di mettere a punto dei protocolli che siano efficaci e allo stesso tempo a ridotta tossicità.

5. ABBREVIAZIONI

AJCC	American Join Committe on Cancer
ATG3	Autophagy related 3
BER	(meccanismo di) riparo di escissione delle basi
CAF	fibroblasti associati al cancro
CCAT1-L	colon associated cancer transcript 1
CDDP	cis-diammineplatinum(II) dichloride
CDKN2A	inibitore della chinasi 2-ciclina dipendente
ceRNA	competitive endogenous RNA
ciRNA	circular RNA
Ct	threshold cycle
CTR1	trasportatore copper 1
DEPC	dietilpirocarbonalto
DMBQ	2,6-dimetossi benzochinone
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	dimetilsulfoxide
DOI	deep of invasion
dsRNA	double strand RNA
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	transizione epiteliale-mesenchimale
ENE	estensione extranodale
FTH1P3	ferritin heavy chair 1 pseudogene 3
FOXCUT	FOXC1 upstream transcript
FWGE	Fermented Wheat Germ Extract
HER2	human epidermal growth factor receptor2
HNC	Head and Neck cancer
hnRNP	heteogeneus ribonucleoprotein particle
HOTAIR	Hox transcript antisense RNA
HOTTIP	HoxA transcript at the distal tip
HPV	human papillomavirus
HULC	highly upregulated in liver cancer
HSC-3	linea cellulare di carcinoma orale della lingua

IARC	International Agency for Research on Cancer
IGF2	insulin like growth factor 2
IL-1	interleuchina 1
IL-8	interleuchina 8
KLF8	Kruppel-like factor 8
lncRNA	long non coding RNA
LNM	linfonodi metastatici
LPS	lipopolisaccaride
LSCC	carcinoma squamocellulare della laringe
LSD1	demetilasi lisina specifica
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
MBQ	2-metossi benzochinone
MDR	multifarm aco resistenza
MEG3	maternally expressed gene 3
miRNA	micro RNA
MLL1	Mixed-linkage leukemia 1
MMP-2	metalloproteinasi di matrice 2
MMR	meccanismo di mismatch repair
MOMP	major outer membrane protein
MRE	miRNA response element
MTT	bromuro di-3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAT	natural antisense transcript
ncRNA	RNA non codificanti
NEAT	nuclear enriched abudant transcript 1
NF-kβ	nuclear factor kβ
NOTCH1	notch homolog 1 translocation-associated
NPC	cellule progenitrici neoplastiche
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
OPMD	oral potentially malignant desorders
ORF	open reading frame
OSCC	carcinoma orale squamocellulare
PARP	poli (ADP-ribosio) polimerasi

PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PMA	forbolo miristil acetato
PRC	polyclomb repressive complex
Rb	retinoblastoma
RNAi	RNA interfence
RNP	ribonucleoproteine
ROS	recative species of oxygen
SAS	linea cellulare di carcinoma della lingua
SCC-25	linea cellulare di carcinoma della lingua
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
sncRNA	small non coding RNA
ssRNA	single strand RNA
STAT3	trasduttore del segnale e attivatore di trascrizione 3
TERC	telomerase RNA component
TME	tumor microenvironment
TMZ	termozolomide
TNF-α	fattore di necrosi tumorale α
TNF-R1	TNF receptor 1
TNM	tumor node metastasis
TGF-β	fattore di crescita e trasformazione β
TS	timidina sintasi
TSS	transcription start sites
TUG1	taurine upregulate gene 1
UCA1	urotelial cancer associated 1
UICC	Union International Cancer Control
UTR	untraslated region
UV	ultraviolette
VEGF	vascular endotelial growth factor
WHO	World Health Organization
XIC	X inactivation center

5-FU	5-fluorouracile

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nidhi Saraswata, Bronwyn Everetta, Rona Pillay, Neeta Prabhuc and Ajesh Georgea. Knowledge, attitudes and practices of general medical practitioners in developed countries regarding oral cancer: an integrative review. Fam Pract 2020 Oct 19;37(5):592-605 Review

2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021;71(3):209-249.

3. Patton LL, Ashe TE, Elter JR, Southerland JH, Strauss RP. Adequacy of training in oral cancer prevention and screening as self-assessed by physicians, nurse practitioners, and dental health professionals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 102: 758–64.

4. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. Head Neck 2017;39:297–304

5. Farhood Z, Simpson M, Ward GM, Walker RJ, Osazuwa-Peters N. Does anatomic subsite influence oral cavity cancer mortality? A SEER database analysis. Laryngoscope 2019;129:1400–6.

6. Rivera C. Essentials of oral cancer. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(9):11884-11894.

7. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Poropat A, Zoi V, Zacchigna S, Di Lenarda R, Biasotto M. Campaign to increase awareness of oral cancer risk factors among preadolescents. J Cancer Educ 2020;35(3):616- 620

8. Chi AC, Day TA Neville BW, oral cavity and oripharingeal squamous cell carcinoma – an udate. CA cancer J Clin 2015;136(5):401-21. Review.

9. Hou X, Liu S, Han Q, Cheng L. Role of oral bacteria in the development of oral squamous cell carcinoma. Cancers (Basel) 2020;12(10):2797

10.Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. Oral Oncol 2010;46(6):414-7.

11. Romano A, Di Stasio D, Petruzzi M, Fiori F, Lajolo C, Santarelli A, Lucchese A, Serpico R, Contaldo M. Noninvasive imaging methods to improve the diagnosis of oral carcinoma and its precursors: state of the art and proposal of a three-step diagnostic process. Cancers (Basel) 2021;13(12):2864

12. The role of non coding RNAs in drug resistance of oral squamous cell carcinoma andd therapeutic potential. Xiang meng, Qiu-Yue Lou2 Wen-Ying Yang, Yue-Rong Wang, Ran Chen, Lu Wang, Tao Xu, Lei Zhang. Cancer Commun (Lond). 2021 Oct; 41(10): 981–1006.

13. Abati, C. bramanti, S. Bondi, Alessandra Lissoni, and Matteo Trimarchi. Oral cancer and precancer: a narrative review on the relevance of early diagnosis. S Int J Environ Res Public Health. 2020 Dec; 17(24): 9160.

14. Daniel e. Johnson, Barbara Burtness, C. René Leemans, Vivian Wai Yan Lui, Julie E. Bauman, Jennifer R. Grandis. Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 2021; 6(1): 92.

15. Alves A, Diel L, Ramos G, Pinto A, Bernardi L, Yates 3rd J, Lamers M. Tumor microenvironment and oral squamous cell carcinoma: a crosstalk between the inflammatory state and tumor cell migration. Oral Oncol 2021;112:105038.

16. Almangusha A, Makitiee AA, Triantafylloug A, de Breeh R, Strojani P, Rinaldoj A, Hernandez-Prerak JC, Suarezl C, Kowalskin LP, Ferlitop A, Leivo I. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: an update. Oral Oncology 107 2020;104799.

17. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR et al. AJCC cancer staging manual. 8th edition. New York: Springer; 2017.

18. Brieleyt JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors, 8th edition. Willey Blackwell 2017, 272p.

19. Lo Muzio, Pelo. Il carcinoma orale-Manuale di riferimento. 2014; capitolo V p155.

20. Boztepe T, Castro GR, León IE. Lipid, polymeric, inorganic-based drug delivery applications for platinum-based anticancer drugs. Int J Pharm 2021;605:120788.

21. Kanno Y, Chen CY, Lee HL, Chiou JF, Chen YJ. Molecular mechanisms of chemotherapy resistance in head and neck cancers. Front Oncol 2021;11:640392.

22. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 2003;3(5):330-8. 101

23. Yeeng Chai AWY, Lim KP, Cheong SC. Translational genomics and recent advances in oral squamous cell carcinoma. Semin Cancer Biol 2020;61:71-83.

24. Anna Sanchez Calle, Yumi Kawamura, Yusuke Yamamoto, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer Cancer Sci. 2018 Jul; 109(7): 2093–2100.

25. Amaldi F, Benedetti P, Pesole G, Plevani P. Biologia Molecolare. Terza edizione. Casa Editrice Ambrosiana. 2018. Capitolo 18

26.Marchese FP, Raimondi I, Huarte M, The multidimensional mechanism of long non coding RNA function. Genome Biol. 2017 Oct 31; 18(1:206).

27. Jia W, Chen W, Kang J. The functions of microRNAs andlong non-coding RNAs in embrionic and induced pluripotent stem cells. Genomics Proteomics Bioinformatics 2013 Oct; 11 (5):275-83

28. Johnsson P, Lipovich L, Grandèr D, Morris KV. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. Biochim. Biophys. Acta 1840. 2014: 1063-1071.

29. Kanduri C. Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. Biochim Biophys Acta. 2016;1859:102–11.

30. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. Nat Rev Genet. 2014;15:7–21.

31. Fortes P, Morris KV. Long noncoding RNAs in viral infections. Virus Res. 2016; 212:1–11.

32. Engreitz JM, Ollikainen N, Guttman M. Long non–coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016;17:756–70.

33. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. Annu Rev Biochem. 2012;81:145–66.

34. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles**.** Mol Cell. 2009 Mar 27;33(6):717-26.

35. Yiwen Fang, Melissa J. Fullwood. Roles, function and mechanism of long non coding RNAs in Cancer 2016 Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016 Feb; 14(1): 42–54.

36. Lei Zhang, Xiang Meng, Xin-wei Zhu, Deng-cheng Yang, Ran Chen, Yong Jiang, Tao Xu. Long non coding RNAs in Oral squamous cell carcinoma: biologic function, mechanisms and clinical implications Mol Cancer. 2019; 18: 102.

37. Balas MM, Johnson AM. Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. Non-coding RNA Research 3. 2018: 108-117.

38. Zhang H, Zeitz MJ, Wang H, Niu B, Ge S, Li W, Cui J, Wang G, Qian G, Higgins MJ, et al. Long noncoding RNA-mediated intrachromosomal interactions promote imprinting at the Kcnq1 locus. J Cell Biol. 2014;204(1):61–75

39. Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored. Hum Genet. 2011; 130(2):223–236.

40. Xiaobo Luo, Yan Qiu, Yuchen Jiang, Fangman Chen, Lu Jiang, Yu Zhou, Hongxia Dan, Xin Zeng, Yu L. Lei, Qianming Chen. Long non coding RNA implicated in the invasion and metastasis of head and neck cancer: possible function and mecanism; Mol Cancer. 2018; 17: 14.

41. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature 2010;464:1071–6.

42. Liu Z, Wu C, Xie N, Wang P. Long non-coding RNA MEG3 inhibits the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma by regulating the WNT/beta-catenin signaling pathway. Oncol Lett. 2017;14(4):4053–8.

43. Brouwer-Visser J, Huang GS. IGF2 signaling and regulation in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(3):371–7

44. Liu Z, Li H, Fan S, Lin H, Lian W. STAT3-induced upregulation of long noncoding RNA HNF1A-AS1 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via activating notch signaling pathway. Cancer Biol Ther. 2018;1:10.

45. Arunkumar G, Deva Magendhra Rao AK, Manikandan M, Arun K, Vinothkumar V, Revathidevi S, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Expression profiling of long non-coding RNA identifies linc-RoR as a prognostic biomarker in oral cancer. Tumour Biol. 2017;39(4):1010428317698366.

46. Li M, Ning J, Li Z, Wang J, Zhao C, Wang L. LINC00152 promotes the growth and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating miR139-5p. Onco Targets Ther. 2018;11:6295–304

47. Hu X, Qiu Z, Zeng J, Xiao T, Ke Z, Lyu H. A novel long non-coding RNA, AC012456.4, as a valuable and independent prognostic biomarker of survival in oral squamous cell carcinoma. PeerJ. 2018;6:e5307

48. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. Nature. 2014;505:344

49. Wang T, Yuan J, Feng N, Li Y, Lin Z, Jiang Z, Gui Y. Hsa-miR-1 downregulates long non-coding RNA urothelial cancer associated 1 in bladder cancer. Tumour Biol. 2014;35(10):10075–84

50. Zang Z, Zhao J, Xie W, Sun Q, Wang H, Qiao B. LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by sunppressing miR-184 expression. Cancer Med. 2017;6(12):2897–908.

51. Harada K, Ferdous T, Harada T, Takenawa T, Ueyama Y. Gimeracil enhances the antitumor effect of cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. Oncol Lett. 2017;14(3):3349–56

52. Tan DSW, Chong FT, Leong HS, Toh SY, Lau DP, Kwang XL, Zhang X, Sundaram GM, Tan GS, Chang MM, et al. Long noncoding RNA EGFR-AS1 mediates epidermal growth factor receptor addiction and modulates treatment response in squamous cell carcinoma. Nat Med. 2017;23(10):1167–75. 170.

53. Fayda M, Isin M, Tambas M, Guveli M, Meral R, Altun M, Sahin D, Ozkan G, Sanli Y, Isin H, et al. Do circulating long non-coding RNAs (lncRNAs) (LincRNA-p21, GAS 5, HOTAIR) predict the treatment response in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy? Tumour Biol. 2016;37(3):3969–78

54. Liu J, Jiang X, Zou A, Mai Z, Huang Z, Sun L, et al. circIGHG-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression via miR-142- 5p/IGF2BP3 Signaling. Cancer Res. 2021;81(2):344-55.

55. Cheung TH, Quach NL, Chaville GW, Liu L., Park L., Edalati A. et al. Manteinance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. Nature, 2012;482:524-8

56.Bhat KP, Cortez D. RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. Nat Struct Mol Biol. 2018;25(6):446- 53.

57. Shen L, Wang Q, Liu R, Chen Z, Zhang X, Zhou P, et al. LncRNA lnc-RI regulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks by stabilizing RAD51 mRNA as a competitive endogenous RNA. Nucleic Acids Res. 2018;46(2):717-29.

58. Fan T, Chen Y, He Z, Wang Q, Yang X, Ren Z, et al. Inhibition of ROS/NUPR1-dependent autophagy antagonises repeated cadmium exposure -induced oral squamous cell carcinoma cell migration and invasion. Toxicol Lett. 2019;314:142-52.

59. Gao L, Dou ZC, Ren WH, Li SM, Liang X, Zhi KQ. CircCDR1as upregulates autophagy under hypoxia to promote tumor cell survival via AKT/ERK(½)/mTOR signaling pathways in oral squamous cell carcinomas. Cell Death Dis. 2019;10(10):745.

60. Li H, Chen L, Li JJ, Zhou Q, Huang A, Liu WW, et al. miR519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway. J Hematol Oncol. 2018;11(1):70

61. Naik PP, Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das CK, Mishra R, et al. Autophagy regulates cisplatin-induced stemness and chemoresistance via the upregulation of CD44, ABCB1 and ADAM17 in oral squamous cell carcinoma. Cell Prolif. 2018;51(1):e12411.

62. Su W, Tang J, Wang Y, Sun S, Shen Y, Yang H. Long non-coding RNA highly up-regulated in liver cancer promotes epithelialto-mesenchymal transition process in oral squamous cell carcinoma. J Cell Mol Med. 2019;23(4):2645-55

63. Ahmad A.; Ginnebaugh, K.R.; Li, Y.; Padhye, S.B.; Sarkar, F.H. Molecular targets of naturopathy in cancer research: Bridge to modern medicine. Nutrients 2015, 7, 321–334.

64. Ardito, F.; Pellegrino, M.R.; Perrone, D.; Troiano, G.; Cocco, A.; Lo Muzio, L. In vitro study on anti-cancer properties of genistein in tongue cancer. Onco Targets Ther. 2017, 10, 5405–5415.

65. Perrone, D.; Ardito, F.; Giannatempo, G.; Dioguardi, M.; Troiano, G.; Lo Russo, L.; DE Lillo, A.; Laino, L.; Lo Muzio, L. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. Exp. Ther. Med. 2015, 10, 1615–1623

66. Telekes, A.; Hegedus, M.; Chae, C.H.; Vekey, K. Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment. Nutr. Cancer 2009, 61, 891–899.

67. O'Brien, P.J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chem. Biol. Interact. 1991, 80, 1–41.

68. Piccart-Gebhart, M.J. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. N. Engl. J. Med. 2006, 354, 2177–2179

69. Johanning, G.L.; Wang-Johanning, F. Efficacy of a medical nutriment in the treatment of cancer. Altern. Ther. Health Med. 2007, 13, 56–63.

70. Boros, L.G.; Nichelatti, M.; Shoenfeld, Y. Fermented wheat germ extract (avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005, 1051, 529–542.

71. Iyer, A.; Brown, L. Fermented wheat germ extract (avemar) in the treatment of cardiac remodeling and metabolic symptoms in rats. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2011, 2011, 508957

72. Boros LG, Cascante M, Lee WN: Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery. Drug Discov Today 2002, 7(6):364-372

73. Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S, Cascante M: Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. J Biol Chem 2002, 277(48):46408-46414.

74. Boros LG, Lapis K, Szende B, Tomoskozi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M, Hidvegi M: Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells. Pancreas 2001, 23(2):141-147.

75. Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avemar. Exp Biol Med (Maywood) 2005, 230(2):144-149.

76. Andras Telekes, Endre Kiss-Toth, Tunde Nagy Y, Eva E. Qwarnstrom, Erzsebet Kusz, Timea Polgar, Ákos Resetar, Steven K. Dower, Ern Dudac. Synergistic Effect of Avemar on Proinflammatory Cytokine Production and Ras-Mediated Cell Activation Ann. N.Y. Acad. Sci. 1051: 515–528 (2005).

77. Chen, G. & D.V. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 296: 1634–1635.

78. Otto et al. Antiproliferative and antimetabolic effects behind the anticancer property of fermented wheat germ extract BMC Complementary and Alternative Medicine (2016) 16:160

79. Thomas Mueller and Wieland Voigt. Fermented wheat germ extract - nutritional supplement or anticancer drug? Mueller and Voigt Nutrition Journal 2011, 10:89

80. Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Szende B, Paku S, Pronai L, Bocsi J, Lapis K. MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect. Cancer Biother Radiopharm 1999, 14(4):277-289.

81. Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Paku S, Lapis K, Szende B. Effect of Avemar and Avemar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals. Anticancer Res 1998, 18(4A):2353-2358.

82. Wilson RC, Doudna JA. Molecular Mechanisms of RNA Interference. Annual Review of Biophysics. 2013; 42:1, 217-239.

83. Kawasaki H, Taira K, Morris KV. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. Cell Cycle. 2005; 4(3):442-8.

84. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science. 2001; 293(5532):1146-50.

85. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000; 25(2):169-93.

86. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402-8

87. Lü L, Zhang L, Wai MS, Yew DT, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. Toxicol In Vitro. 2012; 26(4):636-44.

88.Campagna R, Belloni A, Pozzi V, Salvucci A, Notarstefano V, Togni L, Mascitti M, Sartini D, Giorgini E, Salvolini E, Santarelli A, Lo Muzio L, Emanuelli M. Role played by Paraoxonase-2 enzyme in cell viability, proliferation and sensitivity to chemotherapy of Oral Squamus cell carcinoma cell lines. Int J Mol Sci. 2022; 24(1):338.

89. Mueller T, Jordan K, Voigt W. Promising cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Avemar®) in human cancer cell lines. J Exp Clin Cancer Res. 2011;30:42.

90. Yang M-D, Chang W-S, Tsai C-W, Wang M-F, Chan Y-C, Chan K-C, Lu M-C, Kao A-W, Hsu C-M, Bau D-T, et al. Inhibitory effects of AVEMAR on proliferation and metastasis of oral cancer cells. Nutr Cancer. 2016;68(3):473–80.

91. Zhang J-Y, Xiao X, Dong Y, Wu J, Yao F, Zhou X-H. Effect of fermented wheat germ extract with lactobacillus plantarum dy-1 on HT-29 cell proliferation and apoptosis. J Agric Food Chem. 2015;63(9):2449–57.

92. Tai C-J, Wang W-C, Wang C-K, Wu C-H, Yang M-D, Chang Y-J, Jian J-Y, Tai C-J. Fermented wheat germ extract induced cell death and enhanced cytotoxicity of Cisplatin and 5-Fluorouracil on human hepatocellular carcinoma cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:121725.

93. Naakka E, Tuomainen K, Wistrand H, Palkama M, Suleymanova I, Al-Samadi A, Salo T. Fully human tumor-based matrix in three-dimensional spheroid invasion assay. JoVE. 2019;2019:e59567 Naakka E, Tuomainen K, Wistrand H, Palkama M, Suleymanova I, Al-Samadi A, Salo T. Fully human tumor-based matrix in three-dimensional spheroid invasion assay. JoVE. 2019;2019:e59567

94. Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE, Akram SU, Ohlmeier S, Suomi F, Eklund L, et al. A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. BMC Cancer. 2015;15:981.

95. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676–82

96. Salo T, Dourado MR, Sundquist E, Apu EH, Alahuhta I, Tuomainen K, Vasara J, Al-Samadi A. Organotypic three-dimensional assays based on human leiomyoma–derived matrices. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018;373(1737):20160482.

97. Markopoulos AK. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. The Open Dentistry Journal, 2012; 6, 126-130

98. Noguti J, Gomes De Moura C, De Jesus G, Da Silva V, Ayaco Hossaka T, Oshima C, Ribeiro D. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. Cancer Genomics &Proteomics 2012; 9: 329-336.

99. Sim YC, Hwang JH, Ahn KM. Overall and disease-specific survival outcomes following primary surgery for oral squamous cell carcinoma: analysis of consecutive 67 patients. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2019 ;45(2):83- 90.

100. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). Oncol Lett 2014; 8: 7-11

101. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. Oral Oncol 2004; 40:433-439

102. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg 2005; 63:1599-605.

103. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka T, et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2005; 34:329

104. Kim BG, Kim JH, Kim MI, Han JJ, Jung S, Kook MS, et al. Retrospective study on factors affecting the prognosis in oral cancer patients who underwent surgical treatment only. Maxillofac Plast Reconstr Surg 2016; 38:3

105. P. J. Thomson, Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention— proliferation, position, progression and prediction. J Oral Pathol Med. 2018; 47:803–807

106. Zhou H, Sun L, Wan F. Molecular mechanisms of TUG1 in the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells. Oncol Lett. 2019; 18(5):4393–4402.

107. Li J, Zhang M, An G, Ma Q. LncRNA TUG1 acts as a tumor suppressor in human glioma by promoting cell apoptosis. Exp Biol Med (Maywood). 2016; 241(6):644–649.

108. Li ZQ, Zou R, Ouyang KX, Ai WJ. An in vitro study of the long non-coding RNA TUG1 in tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2017; 46(10):956-960

109. Liu H, Zhou G, Fu X, et al. Long noncoding RNA TUG1 is a diagnostic factor in lung adenocarcinoma and suppresses apoptosis via epigenetic silencing of BAX. Oncotarget. 2017; 8(60):101899–101910.

110. Niu Y, Ma F, Huang W, Fang S, Li M, Wei T, Guo L. Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2. Mol Cancer 2017; 16: 5

111. Vernieri C, Nichetti F, Raimondi A, Pusceddu S, Platania M, Berrino F, de Braud F. Diet and supple ments in cancer prevention and treatment: clinical evidences and future perspectives. Crit Rev Oncol Hematol. 2018;123:57–73. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.01.0

112. Aquino I. G d, Bastos DC, Cuadra-Zelaya FJM, Teixeira IF, Salo T, Coletta RD, Graner E. Anticancer properties of the fatty acid synthase inhibitor TVB-3166 on oral squamous cell carcinoma cell lines. Arch Oral Biol. 2020;113:104707. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104707

113. Zhurakivska K, Troiano G, Caponio VCA, Dioguardi M, Arena C, Lo Muzio L. The effects of adjuvant fermented wheat germ extract on cancer cell lines: a systematic review. Nutrients. 2018;10:1546.

114. Teppo S, Sundquist E, Vered M, Holappa H, Parkkisenniemi J, Rinaldi T, Lehenkari P, Grenman R, Dayan D, Risteli J, et al. The hypoxic tumor microenvironment regulates invasion of aggressive oral carcinoma cells. Exp Cell Res. 2013;319(4):376–89. doi:10.1016/j.yexcr.2012.12.010

115. Tuomainen K, Al-Samadi A, Potdar S, Turunen L, Turunen M, Karhemo P-R, Bergman P, Risteli M, Astrom P, Tiikkaja R, et al. Human tumor-derived matrix improves the predictability of head and neck cancer drug testing. Cancers (Basel). 2019;12:92.

116. Väyrynen O, Piippo M, Jämsä H, Väisänen T, de Almeida CEB, Salo T, Missailidis S, Risteli M. Effects of ionizing radiation and HPSE1 inhibition on the invasion of oral tongue carcinoma cells on human extracellular matrices in vitro. Exp Cell Res. 2018;371(1):151–61.

117. Vierthaler M, Rodrigues PC, Sundquist E, Siponen M, Salo T, Risteli M. Fluctuating role of antimicrobial peptide hCAP18/LL-37 in oral tongue dysplasia and carcinoma. Oncol Rep. 2020;44(1):325–38.

118. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014;740:364–78.

119. Andreadis C, Vahtsevanos K, Sidiras T, Thomaidis I, Antoniadis K, Mouratidou D. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. Oral Oncol. 2003;39(4):380–5.

120. Su L, Wang Y, Xiao M, Lin Y, Yu L. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;110:484–91.

121. Shim HJ, Kim HJ, Hwang JE, Bae WK, Chung IJ, Lee DH, Mi YT, Lee JK, Lim SC, Chung JW, et al. Long term complications and prognostic factors in locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with

docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy: a retrospective cohort study. Medicine (Baltimore). 2020;99(49):e23173

122. Pons-Fuster López E, Gómez García F, López Jornet P. Combination of 5-florouracil and polyphenol EGCG exerts suppressive effects on oral cancer cells exposed to radiation. Arch Oral Biol. 2019;101:8–12.

123. Kim EH, Jang H, Shin D, Baek SH, Roh JL. Targeting Nrf2 with wogonin overcomes cisplatin resistance in head and neck cancer. Apoptosis. 2016;21(11):1265–78.