



UNIVERSITÀ DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Scuola di dottorato in Scienze della Vita e della Salute

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali
XXIX Ciclo/2014

Individuazione di nuovi marker diagnostici e target terapeutici potenzialmente utilizzabili nella pratica clinica trapiantologica per minimizzare il processo di fibrosi polmonare indotta dalle alte dosi di Everolimus: risultati di uno studio in vitro di mirnomica e trascrittomica.

S.S.D. MED/14

Coordinatore: Prof. Giovanni Targher

Firma

Tutor: Prof. Gianluigi Zaza

Firma

Dottorando: Dott.ssa Paola Tomei

Firma

SOMMARIO

L'enzima mTOR appartiene alla famiglia delle serin treonin chinasi correlate a fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) che gioca un ruolo chiave in molti processi cellulari quali sintesi proteica, crescita cellulare e proliferazione. Esso si associa a diverse proteine formando due complessi funzionalmente distinti: mTOR complex 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2). mTORC1 integra segnali provenienti da fattori di crescita, amminoacidi, stato energetico della cellula, ossigeno promuovendo il metabolismo anabolico, stimolando la sintesi di proteine, lipidi e nucleotidi. Allo stesso tempo mTORC1 inibisce processi catabolici quali la biogenesi dei lisosomi e l'autofagia. mTORC2 controlla la sopravvivenza cellulare, l'organizzazione del citoscheletro, lipogenesi e gluconeogenesi.

La scoperta di mTOR è strettamente collegata allo sviluppo della rapamicina, un macrolide derivato dal batterio *Streptomyces hygroscopicus* con proprietà antifungine. Successivamente si è scoperto che possedeva anche proprietà antiproliferative ed è stata così introdotta nella terapia immunosoppressiva di pazienti portatori di trapianto di organi solidi e nelle terapie antitumorale.

Il Sirolimus (SRL, Rapamune, Wyeth Pharmaceuticals, New York city, USA) è stato il primo mTOR-I approvato per la terapia immunosoppressiva nel trapianto renale. Da allora sono stati sviluppati e ottimizzati nuovi analoghi semisintetici della rapamicina con proprietà farmacologiche più specifiche.

L'Everolimus (EVE, Cerican, Novartis) ha la stessa struttura molecolare del SRL con l'aggiunta di un radicale idrossietilico in posizione 40 che lo rende più idrofilico rispetto al SRL e ne aumenta la biodisponibilità di circa il 10–16%.

SRL ed EVE si legano alla immunofilina FK binding protein-12 (FKBP12) e questo complesso inibisce allostericamente l'attività chinasi di mTORC1 indebolendo l'interazione tra mTOR e le proteine del complesso.

Gli mTOR-I, sebbene dotati di ampie potenzialità cliniche/terapeutiche, possono indurre in alcuni pazienti importanti effetti collaterali che devono essere identificati e trattati precocemente. Tra questi, sono possibili una serie di alterazioni polmonari con evoluzione fibrotica quali la polmonite linfocitica

interstiziale, l'alveolite linfocitaria, la bronchiolite obliterante, la fibrosi polmonare o quadri sovrapposti/misti.

Il meccanismo biologico associato a questi effetti polmonari pro-fibrotici non è ancora del tutto chiaro ma è stato suggerito che la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) possa avere un ruolo fibro-patogenetico.

Durante la EMT le cellule perdono le caratteristiche epiteliali e acquisiscono la capacità di migrare, invadere, resistere all'apoptosi e aumentare la produzione di alcuni componenti della matrice extracellulare (ECM), tra cui vimentina e actina del muscolo liscio (α -SMA).

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che alte dosi di EVE inducono EMT in diverse linee cellulari epiteliali quali cellule epatiche, tubulari renali, pneumociti ed epiteliali bronchiali. Inoltre, in un gruppo di pazienti portatori di trapianto renale il livello di fibrosi polmonare era strettamente correlato ai trough level del farmaco (livelli ematici).

Pertanto, al fine di approfondire i meccanismi molecolari e biologici associati agli mTOR-I e di individuare potenziali marker diagnostici e terapeutici utilizzabili nella pratica clinica trapiantologica per minimizzare il processo di fibrosi polmonare indotto da Everolimus abbiamo effettuato una innovativa analisi high-throughput (trascrittomica e miRNomica) su cellule primarie epiteliali bronchiali (BE63/3) trattate con questo farmaco (5 e 100 nM) per 24 h. Dopo trattamento sono stati misurati i livelli di espressione genica di 3 marker noti di EMT (α -SMA, fibronectina e vimentina) mediante Real-Time PCR. La resistenza transepiteliale quale indice di integrità delle tight junctions è stata misurata con il Millicel-ERS resistance monitoring apparatus (Millipore). L'analisi dell'intero trascrittoma e miRNoma è stata effettuata, rispettivamente, con kit Illumina e Agilent.

I risultati del nostro studio confermavano le nostre precedenti osservazioni che sottolineavano che solo le alte dosi di EVE inducevano un incremento di espressione dei marker di EMT insieme ad una riduzione della resistenza transepiteliale. L'analisi bioinformatica mostrava, per la prima volta, che il trattamento con alte dosi di EVE determinava la deregolazione di un vasto numero di elementi biologici. Infatti, 125 geni risultavano deregolati dopo trattamento, la

maggior parte dei quali, in accordo con l'analisi di enrichment (attraverso cytoscape), era coinvolta nella sintesi/metabolismo del collagene e nella fibrosi d'organo. In particolare, il connective tissue growth factor (CTGF) è risultato essere uno dei geni maggiormente up-regolati dal trattamento con 100 nM EVE. Al contrario livelli più bassi di EVE (5 nM) non causavano alcun effetto. L'analisi dell'intero miRNoma, inoltre, identificava tre miRNA up-regolati dopo trattamento con 100 nM di EVE (alte dosi) e quattro dopo trattamento con EVE a basso dosaggio (5 nM). Incrociando i dati ottenuti dall'analisi trascrittomico e quella dell'intero profilo dei miRNA abbiamo identificato 31 geni che risultavano essere target specifici dei tre miRNA identificati.

MiR-8485 risultava significativamente up-regolato dopo EVE 100 nM e un importante regolatore dei trascritti genici di molti fattori pro-fibrotici (tra cui CTGF e MMP12).

La validazione con tecniche classiche di biologia molecolare (Real-Time PCR e western blot) confermava una up-regolazione di CTGF e MMP12 nelle cellule trattate con alte dosi di EVE.

In conclusione, il nostro studio suggerisce che alte dosi di EVE, attraverso l'attivazione di processi biologico-cellulari multifattoriali, sono in grado di attivare uno specifico network biologico pro-fibrotico nelle cellule polmonari. Inoltre l'analisi dei dati e il risultato della validazione funzionale identificavano potenziali marcatori patogenetici e diagnostici che, in futuro, potrebbero essere utilizzati nella pratica clinica quotidiana.

Infine, appare evidente la necessità, da parte dei clinici coinvolti nella gestione dei pazienti portatori di trapianto d'organo e oncologici di utilizzare dosi più basse possibili di mTOR-I e, se possibile, di minimizzarle sempre nei pazienti con iniziali segni di tossicità polmonare.

ABSTRACT

Mammalian target of Rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase member of the PI3K related kinase (PIKK) family that plays an integral role in the coordination of metabolism, protein synthesis, cell growth, and proliferation.

It interacts with several proteins to form two distinct complexes named mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2). mTORC1 integrates inputs from growth factors, aminoacids, energy status, oxygen promoting anabolic cellular metabolism, stimulating synthesis of proteins, lipids, and nucleotides. It inhibits catabolic processes, such as lysosome biogenesis and autophagy. mTORC2 controls cell survival, cytoskeleton organization, lipogenesis, and gluconeogenesis.

The discovery of mTOR is intimately linked to the development of rapamycin, a metabolite produced by the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* with antifungal properties and, in mammalian cellular assays, antitumour and immunosuppressive activity.

Due to their important antiproliferative and cellular effects, during the last 20 years, many Rapalogs have been developed and used in several clinical settings as immunosuppressive medications.

Sirolimus (SRL) (Rapamune; Wyeth Pharmaceuticals, New York, NY) was the first mTOR-I approved as an immunosuppressive agent for renal transplantation patients. Everolimus (Certican, Novartis) derived from SRL, contains a 2-hydroxy-ethyl chain in the 40th position that makes the drug more hydrophilic than SRL and increases oral bioavailability by approximately 10–16%.

Like other antineoplastic/immunosuppressive drugs, mTOR-I may induce several dose-related renal and systemic side effects. Some of them are manageable, whereas in other cases they require drug withdrawal. Among them, pneumonitis or interstitial lung disease with a range of pulmonary histopathologic changes (including alveolar hemorrhage, pulmonary alveolar proteinosis, focal fibrosis, bronchiolitis obliterans organizing pneumonia) have been largely reported in clinical records and they have been associated with worsened patients' clinical outcomes and drug discontinuation.

Although the underlying mechanism is not fully clarified, this condition could be in part caused by epithelial to mesenchymal transition (EMT) of airway cells.

Our group has recently demonstrated that high doses of EVE are able to induce a reprogramming of gene expression in several epithelial cell lines (airway, renal epithelial proximal tubular and hepatic cells) with a consequent loss of their phenotype (junctions and apical-basal polarity) and the acquisition of mesenchymal traits increasing the motility and enabling the development of an invasive and pro-fibrotic phenotype. The pro-fibrotic attitude of EVE has also been confirmed *in vivo* through the estimation of an arbitrary pulmonary fibrosis index score in renal transplant patients chronically treated with this drug. In this patients' subset, high blood trough level of EVE was associated with high rate of pulmonary signs of fibrosis.

Therefore, we employed, for the first time, a high throughput approach combining a transcriptomic with a miRNome analysis to study the capability of EVE to induce pro-fibrotic changes in primary bronchial epithelial cells.

Primary bronchial epithelial cells (BE63/3) were treated with EVE (5 and 100 nM) for 24 hours. EMT markers (α -SMA, vimentin, fibronectin) were measured by RT-PCR. Transepithelial resistance was measured by Millicell-ERS ohmmeter. mRNA and microRNA profiling were performed by Illumina and Agilent kit, respectively.

Only high dose EVE increased EMT markers and reduced the transepithelial resistance of BE63/3. Bioinformatics showed 125 de-regulated genes that, according to enrichment analysis, were implicated in collagen synthesis/metabolism. Connective tissue growth factor (CTGF) was one of the higher up-regulated mRNA. Five nM EVE was ineffective on the pro-fibrotic machinery. Additionally, 3 miRNAs resulted hyper-expressed after 100 nM EVE and able to regulate 31 of the genes selected by the transcriptomic analysis (including CTGF). RT-PCR and western blot for MMP12 and CTGF validated high-throughput results.

However, all together, our results suggested that high doses of EVE, through the activation of a multi-factorial biological/cellular machinery, may lead to pulmonary fibrosis and underlined potential pathogenetic, diagnostic biomarkers

and targets for future pharmacological interventions to introduce in the “day by day” clinical practice. Finally, at a clinical point of view, we confirm that, whenever possible, the dose of EVE should be the minimized in patients with early signs of lung toxicity.

INDICE

SOMMARIO	2
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	10
Network cellulare di mammalian target of rapamycin (mTOR).....	10
Inibitori di mTOR.....	13
Utilizzo degli mTOR-I (sirolimus ed everolimus) nella pratica clinica.....	14
Effetti collaterali degli inibitori di mTOR.....	16
Tossicità polmonare	19
Transizione epitelio mesenchimale.....	22
Possibili meccanismi eziopatogenetici alla base della fibrosi polmonare indotta da mTOR-I.....	24
Microarray.....	29
miRNA e miRNoma.....	32
SCOPI DELLO STUDIO	35
MATERIALI E METODI	36
Colture cellulari e trattamenti.....	36
Estrazione dell'RNA e profilo di espressione genica.....	37
Analisi delle Pathway.....	38
Profilo di espressione dei microRNA.....	38
Real-Time PCR.....	38
Western blot.....	38
Resistenza transepiteliale (TER).....	39
Analisi statistica.....	39
RISULTATI	41
Alte dosi di Everolimus inducono EMT nelle cellule BE63/3 (Cellule bronchiali epiteliali primarie).....	41
L'analisi trascrittomica ha rilevato che elevati dosaggi di EVE up-regolavano i geni coinvolti nella sintesi e metabolismo del collagene.....	43
L'analisi del miRNoma ha identificato specifici microRNA deregolati dall'EVE.....	53

L'analisi di espressione genica e proteica per la Metalloproteinasi di Matrice 12 (MMP12) e il fattore di crescita tissutale (CTGF) hanno validato i risultati di trascrittomica.....	56
Alte dosi di EVE inducevano un aumento dei livelli di CTGF e collagene 1 in fibroblasti e cellule stellate epatiche.....	58
DISCUSSIONE.....	60
CONCLUSIONI.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	65
Elenco pubblicazioni dott.ssa Paola Tomei nel triennio di dottorato.....	79

INTRODUZIONE

Network cellulare di mammalian target of rapamycin (mTOR)

L'enzima mTOR appartiene alla famiglia delle serin treonin chinasi correlate a fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)¹. Esso si associa a diverse proteine formando due complessi funzionalmente distinti: mTOR complex 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2). Il primo è costituito da mTOR, mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8), proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) e dalla proteina regolatoria regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR).

Inoltre, agisce attivando S6 chinasi (S6K) e inibendo eukaryotic translational initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) il cui effetto finale è quello di promuovere la traduzione e la crescita cellulare.

Il complesso mTORC2 è costituito da mTOR, mLST8, proline-rich protein 5 (PRR5), mitogen-activated protein kinase-associated protein 1 (SIN1) e rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR)¹.

Le funzioni di mTORC1 e mTORC2 risultano nettamente distinte: il primo attiva la sintesi proteica, la biogenesi dei ribosomi, il trasporto dei nutrienti, la sintesi lipidica e altri processi in risposta a nutrienti, fattori di crescita e disponibilità energetica della cellula; mTORC2 regola invece l'organizzazione del citoscheletro, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare (Figura 1)^{1,2}. Infatti fosforila diversi membri della famiglia della AGC chinasi quali AKT, serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) e protein kinase C (PKC), che regolano la sopravvivenza cellulare, la progressione del ciclo cellulare e l'anabolismo³⁻⁶.

La via di attivazione di mTORC1 comprende un etero dimero costituito da tuberous sclerosis 1 (TSC1, detto anche hamartin) e TSC2 (noto anche come tuberlin) che funziona come una GTPasi-activating protein (GAP) per la proteina GTPasi Ras homolog enriched in brain (Rheb). Quando Rheb è legata al GTP interagisce direttamente con mTORC1 e stimola fortemente la sua attività chinastica. Quando TSC1/2 agisce su Rheb sostituendo il GTP con il GDP, Rheb viene convertito nella sua forma inattiva, regolando negativamente mTORC1^{7,8}.

La via di segnalazione a monte di mTORC2 è invece meno conosciuta ma dato il suo ruolo nell'attivazione di AKT, SGK e PKC, si pensa che diversi fattori di crescita siano in grado di attivare, direttamente o indirettamente, questo complesso, tra i quali per esempio l'insulina (Figura 1)^{3,9}.

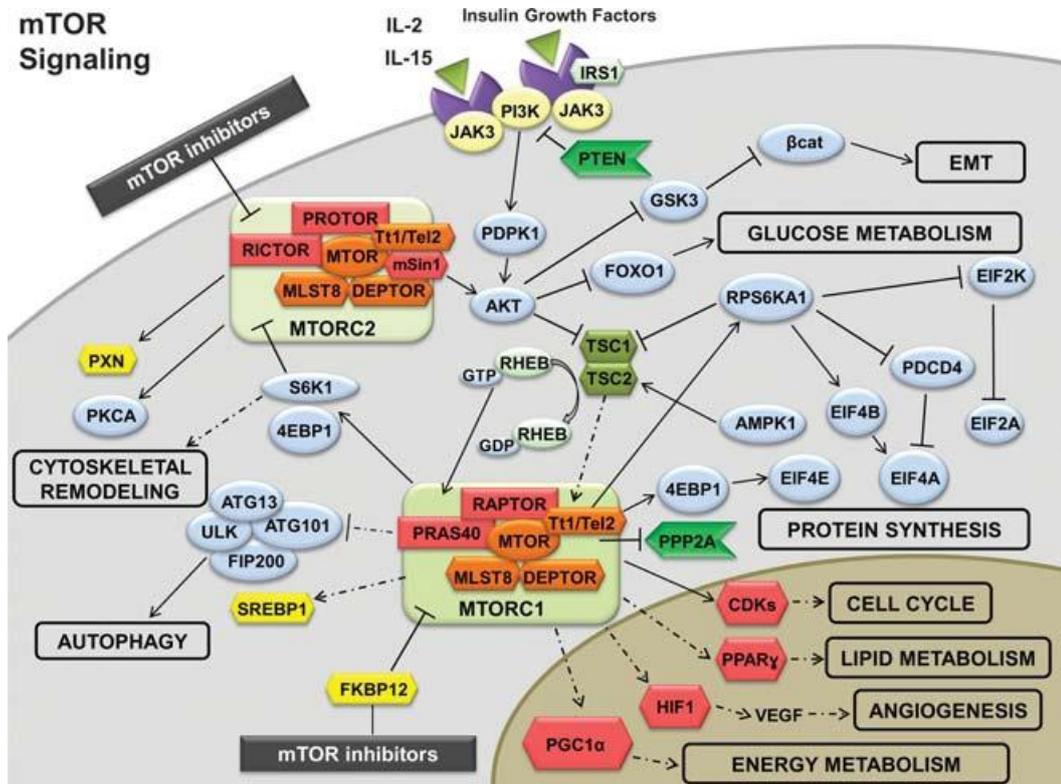


Figura 1. Pathway di mTOR: Network biologico regolata mTOR e principali effetti cellulari associati alla modulazione dei principali complessi mTORC-1 e mTORC-2¹⁰.

Inibitori di mTOR

La scoperta di mTOR è strettamente collegata alla scoperta della rapamicina, un macrolide derivato dal batterio *Streptomyces hygroscopicus* isolato dal terreno nell'isola di Rapa Nui nel 1975¹¹. Inizialmente utilizzata come farmaco antifungino, si è scoperto successivamente che aveva anche proprietà immunosoppressive. La rapamicina è stata così introdotta circa 20 anni fa nella terapia immunosoppressiva nel trapianto renale con il nome di Sirolimus (SRL, Rapamune, Wyeth Pharmaceuticals, New York city, USA)¹².

Da allora sono stati sviluppati e ottimizzati nuovi analoghi semisintetici della rapamicina con proprietà farmacologiche più specifiche.

Everolimus (EVE, registrato come Certican), è un derivato del SRL e contiene un radicale idrossietilico in posizione 40 che lo rende più idrofilico rispetto al SRL e ne aumenta la biodisponibilità di circa il 10–16%¹³. Esso è stato approvato dalla European Medicines Agency nel 2003 per la terapia immunosoppressiva nei trapianti di organo solido e dalla U S Food and Drug Administration nel 2010¹⁰.

SRL ed EVE si legano alla immunofilina FK binding protein-12 (FKBP12) e questo complesso inibisce allostericamente l'attività chinasi di mTORC1 indebolendo l'interazione tra mTORC1 e RAPTOR¹⁴.

Sebbene mTORC2 sia meno sensibile di mTORC1 all'inibizione da parte della rapamicina e dei suoi derivati, è stato dimostrato che trattamenti prolungati con questi farmaci hanno un'azione inibitoria anche su di esso interferendo con il legame dei componenti specifici di questo complesso: mSIN1 e RICTOR¹⁵.

L'introduzione di questi farmaci nella terapia immunosoppressiva ha avuto un impatto positivo sulla funzione renale, grazie soprattutto alla riduzione dell'utilizzo degli inibitori delle calcineurine (CNI)¹⁶⁻¹⁸.

Inoltre data l'iperattivazione del signaling di mTOR in vari tipi di tumore, gli mTOR-I sono ampiamente utilizzati anche in queste patologie. L'efficacia antineoplastica è anche correlata alla inibizione dell'angiogenesi attraverso la riduzione del rilascio di vascular endothelial growth factor (VEGF) e alla riduzione della sensibilità delle cellule endoteliali a questo fattore¹⁹.

Temsirolimus e Deforolimus sono infatti due rapaloghi introdotti nella terapia oncologica^{20,21}.

Più recentemente è stata sviluppata una nuova classe di mTOR-I chiamati TORKinibs (Torin-1, Torin-2, PP242, PP30, KU-0063794, e AZD8055) che, attraverso uno specifico meccanismo ATP-competitivo (competono con l'ATP per il legame alla chinasi), bloccano la funzione catalitica di entrambi i complessi e la fosforilazione di AKT in S473, con conseguente migliore proprietà antiproliferativa²²⁻²⁷. Tuttavia, ad oggi, questi composti sono stati testati solo su modelli tumorali animali e in un solo modello murino di trapianto cardiaco²⁸.

Utilizzo degli mTOR-I (sirolimus ed everolimus) nella pratica clinica.

Il Sirolimus (SRL) è stato il primo inibitore di mTOR approvato per l'utilizzo nel trattamento immunosoppressivo dei pazienti trapiantati di rene.

L'everolimus (EVE) è stato approvato successivamente e dal punto di vista molecolare è simile al SRL con l'eccezione dell'aggiunta di un gruppo idrossietilenico in posizione 40 (Figura 2)²⁹.

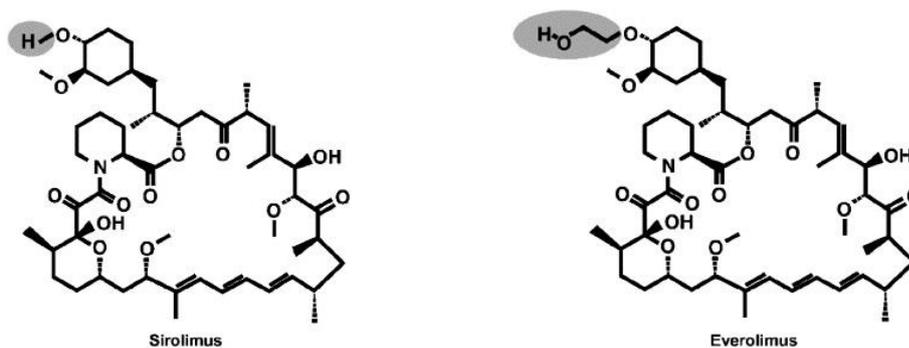


Figura 2. Struttura molecolare del Sirolimus e dell'Everolimus.

Il SRL e l'EVE differiscono per le loro proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche. L'EVE ha un'emivita considerevolmente più corta rispetto al

SRL (28 ore rispetto alle 62 di SRL) e un più veloce raggiungimento dello steady state (4 giorni rispetto ai 6 per SRL). Inoltre, l'EVE non sembra interferire con la Ciclosporina (CsA), che spesso è presente nei protocolli immunosoppressivi post-trapianto renale, e pertanto tali farmaci possono essere assunti simultaneamente, mentre il SRL deve essere somministrato a distanza di almeno 4 ore dalla CsA per evitare interferenze farmacologiche³⁰.

I complessi SRL/FKBP-12 ed EVE/FKBP-12 si legano direttamente a mTOR, bloccando la progressione del ciclo cellulare dei linfociti T dalla fase G1 alla fase S e portando all'inibizione della sintesi proteica e della proliferazione cellulare indotta dall'interleuchina-2³¹.

Queste proprietà rendono pertanto gli mTOR-I farmaci ampiamente efficaci nella terapia antirigetto del trapianto renale. In aggiunta, considerata la loro scarsa nefrotossicità, tali farmaci sono una valida alternativa agli inibitori della calcineurina (CNI) nella terapia di mantenimento immunosoppressivo dei pazienti trapiantati di rene con nefropatia cronica¹⁶⁻¹⁸.

Oltre all'effetto immunomodulatorio, come detto in precedenza, questi farmaci possiedono proprietà antineoplastiche. Nel 2009 l'EVE è stato approvato dalla food and drug administration (FDA) per il trattamento del carcinoma a cellule renali (RCC) e successivamente per il trattamento della Sclerosi Tuberosa e dei tumori neuroendocrini pancreatici^{32,33}. L'efficacia degli mTOR-I come farmaci antineoplastici sembra essere limitata al loro effetto come agenti citostatici piuttosto che citotossici e dal punto di vista clinico hanno dunque un effetto stabilizzante sulla malattia piuttosto che di induzione della regressione della stessa³⁴. Oltre agli effetti antiproliferativi le proprietà antitumorali di questa classe di farmaci sono da ricondurre anche all'induzione di un'aumentata espressione di alcune molecole di adesione e pertanto ad una transizione delle cellule tumorali verso un fenotipo meno invasivo³⁵.

Inoltre, essendo la via di segnalazione vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR integrata con la via di segnalazione PI3K/AKT/mTORC1, gli mTOR-I inibiscono l'angiogenesi inducendo una ridotta produzione di VEGF e una ridotta sensibilità di questo fattore di crescita a livello endoteliale¹⁹.

Infine le proprietà antineoplastiche sono potenziate dall'inibizione del crosstalk fra mTORC1, mTORC2 e PI3K³⁴.

Effetti collaterali degli inibitori di mTOR

Nonostante la chiara utilità clinica di questa classe di farmaci, analogamente ad altri farmaci immunosoppressivi, l'utilizzo degli inibitori di mTOR è associato allo sviluppo di numerosi effetti avversi (Tabella 1), la maggior parte dei quali dose-correlati³⁶⁻³⁸.

Ad oggi la maggior parte delle informazioni sulla tossicità secondaria all'assunzione degli mTOR-I è frutto dell'esperienza clinica maturata sul SRL, tuttavia è verosimile che il trattamento con EVE si associ a reazioni avverse simili.

Le più frequenti reazioni avverse indotte dagli mTOR-I sono:

Tossicità renale

E' stato osservato che il SRL è in grado di incrementare la nefrotossicità da CNI, aggravando il danno da ischemia-riperfusion e ritardando la risposta parenchimale al danno, a causa dell'inibizione della proliferazione delle cellule epiteliali tubulari³⁹. Come dimostrato, inoltre, sia il SRL che l'EVE inducono lo sviluppo di proteinuria de novo e/o peggiorano la sua entità⁴⁰. Schemi congiunti di SRL con gli CNI possono causare una microangiopatia trombotica indotta dall'attivazione locale della cascata coagulativa e dall'aggregazione piastrinica⁴¹.

Tossicità ematologica

Sono state descritte neutropenia e trombocitopenia da soppressione midollare (con una frequenza, rispettivamente, di circa 20% e 40% dei pazienti trattati). Tale

effetto mielosoppressivo è più evidente se tali farmaci sono associati a citostatici come Micofenolato Mofetile (MMF) e acido micofenolico.

Inoltre, è stata riportata anemia microcitica nel 30-40% dei pazienti trattati con EVE. Il meccanismo sembra essere legato all'effetto antiproliferativo sulle cellule progenitrici del midollo osseo e ad un diretto effetto sull'omeostasi del ferro. In aggiunta sembra esserci una forte correlazione tra lo stato di infiammazione cronica e l'anemia correlata agli mTOR-I⁴².

Tossicità muco-cutanea

In letteratura sono state riportate nel 46% dei pazienti eruzioni acneiformi e follicoliti. Tali effetti avversi sembrano maggiormente prevalenti nel sesso maschile. In una percentuale estremamente variabile (dal 3 al 68%) sono stati descritti esantemi transitori⁴³. Inoltre, in pazienti trattati cronicamente con questa categoria di farmaci è stata descritta una dermatite esfoliativa dose-indipendente che richiede l'interruzione rapida del trattamento⁴⁴.

Dal 30% al 60% dei pazienti trattati con alte dosi di mTOR-I, utilizzato da solo o in associazione con citostatici, è stata riportata l'insorgenza di stomatite aftosa della durata di qualche settimana. Tali effetti possono essere modulati attraverso la modifica dello schema terapeutico o con l'utilizzo di steroidoterapia topica. Raramente sono state descritte vasculiti leucocitoclastiche SRL-associate.

Disordini metabolici

Sono di comune riscontro in corso di terapia con mTOR-I un lieve innalzamento della glicemia ed un'alterazione nell'assetto lipidico ematico.

In particolare la dislipidemia, ampiamente associata all'utilizzo di mTOR-I, costituisce il maggior fattore di rischio per eventi cardiovascolari post-trapianto^{45,46}.

In una percentuale variabile tra il 40 e il 75% dei pazienti trattati con questa categoria di farmaci si registra un innalzamento delle lipoproteine ad alta densità (HDL), lipoproteine a bassa densità (LDL), colesterolo e trigliceridi.

Morrisett e coll. hanno registrato l'aumento dei livelli di colesterolo e trigliceridi dopo 2-4 settimane dall'inizio della terapia e un ritorno ai livelli di normalità entro 8 settimane dall'interruzione del trattamento⁴⁷.

Gli inibitori della 3-idrossi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) reduttasi (statine) da sole o in combinazione con un farmaco di seconda linea resta la principale opzione terapeutica per l'iperlipidemia indotta dal trattamento con mTOR-I.

Infertilità

L'utilizzo di mTOR-I è stato associato allo sviluppo di infertilità e sterilità primariamente dovuta al loro effetto antiproliferativo. Inoltre, nei pazienti trattati con SRL sono stati rilevati ridotti livelli di testosterone e un aumento degli ormoni gonadotropici (FSH e LH)⁴⁸⁻⁵¹.

Ritardata guarigione delle ferite

Nei pazienti trattati con mTOR-I è stata riscontrata una ridotta attività dei fibroblasti e un'alterazione nelle concentrazioni ed efficacia di alcune citochine⁵². Tali meccanismi potrebbero spiegare una ritardata guarigione delle lesioni in questi pazienti⁵³. Tali fenomeni sono dipendenti dall'interferenza che gli mTOR-I hanno su molteplici vie di trasduzione del segnale.

Tossicità polmonare

Oltre ai suddetti effetti avversi, negli ultimi anni molti report presenti in letteratura hanno segnalato che gli inibitori di mTOR sono responsabili di gravi alterazioni polmonari in pazienti nefrotrapiantati⁵⁴⁻⁶².

Diversi studi clinici hanno evidenziato una frequenza pari al 2-11% di eventi avversi polmonari legati agli mTOR-I, con comparsa della sintomatologia clinica dopo un periodo variabile da 1 a 51 mesi dall'avvio della terapia⁶³⁻⁶⁵.

L'espressione clinica è variabile ed i sintomi iniziali sono del tutto aspecifici e comprendono febbre, facile faticabilità, tosse e dispnea.

I quadri descritti in letteratura sono la polmonite linfocitica interstiziale, l'alveolite linfocitaria, la bronchiolite obliterante, la fibrosi polmonare oppure possono esservi quadri sovrapposti^{61,66,67}.

I meccanismi eziopatogenetici alla base di questi processi polmonari non sono ancora del tutto noti. Sono stati ipotizzati un coinvolgimento della risposta autoimmunitaria cellulo-mediata secondaria all'esposizione di antigeni polmonari occulti con conseguente comparsa di alveolite linfocitaria e polmonite interstiziale ed un possibile coinvolgimento dei linfociti T⁵⁸.

Il meccanismo di danno sembra essere dose-dipendente e questa ipotesi è supportata dal fatto che questi fenomeni si verificano per di più nei pazienti sottoposti a dosi elevate e generalmente si osserva una regressione del quadro con la sospensione o la riduzione del dosaggio del farmaco.

La diagnosi viene effettuata mediante indagini radiologiche del torace (Rx torace, TAC torace) associate a lavaggio broncoalveolare (BAL). Il quadro osservato alla tomografia del torace è caratterizzato generalmente da aspetti di opacità a vetro smerigliato con spesso associati infiltrati interstiziali. Il lavaggio broncoalveolare mette in evidenza un incremento numerico di CD4+ con mastcellule ed eosinofili. Il quadro funzionale è per lo più di tipo restrittivo (riduzione della diffusione del monossido di carbonio). Solo in rari casi è necessario ricorrere all'accertamento bioptico che mette in evidenza un quadro di infiammazione granulomatosa non necrotizzante intralveolare con infiammazione interstiziale linfocitaria e focali aspetti di polmonite organizzata⁶⁸.

Il meccanismo biologico associato a questi effetti polmonari pro-fibrotici non è ancora del tutto chiaro ma è stato suggerito che la transizione epitelio-mesenchimale possa avere un ruolo⁶⁹⁻⁷².

Tabella 1. I principali eventi avversi nei paziente nefrotrapiantati in trattamento con inibitori di mTOR. Adattata da pubblicazione³⁷.

Eventi avversi	Frequenza (%)
<u>Tossicità Polmonare</u>	2-11
<u>Effetti avversi ematopoietici</u>	
Anemia	13-58
Leucopenia	5-39
Trombocitopenia	4-45
<u>Disordini metabolici</u>	
Iperlipidemia	8-87
Diabete post-trapianto	3-33
<u>Ipofosfatemia</u>	15-20
<u>Linfedema</u>	<5
<u>Patologia Cardiovascolare</u>	1-6
<u>Ipertensione</u>	8-58
<u>Effetti avversi cutanei</u>	
Acne, follicoliti	9-25
Stomatiti ed alterazioni della mucosa	9-64
Edema	2-70
Patologie ungueali e alterazioni dei peli/capelli	74
<u>Complicanze gonadiche</u>	<5
<u>Alterazione della cicatrizzazione delle ferite</u>	2-20
<u>Infezioni</u>	2-60
<u>Complicanze gastrointestinali</u>	2-51

Transizione epitelio mesenchimale (EMT)

La EMT è un processo biologico attraverso cui una cellula epiteliale subisce diversi cambiamenti biochimici con conseguente acquisizione di un fenotipo mesenchimale (**Figura 3**)⁷³.

Le cellule epiteliali presentano caratteristiche peculiari come la presenza di giunzionali intercellulari che permettono di formare delle lamine continue; sono dotate di polarità cellulare con una superficie basale e apicale e laterale a seconda dell'organizzazione citoplasmatica ed hanno scarsa capacità di migrazione.

Diverse invece sono le caratteristiche delle cellule mesenchimali che possono migrare nell'interstizio circostante, diversamente dalle cellule epiteliali esse non si organizzano in strutture laminari e non presentano giunzioni intercellulari ma sono dotate di elevata mobilità⁷⁴.

Durante la EMT le cellule perdono le caratteristiche epiteliali e acquisiscono la capacità di migrare, invasività, divengono resistenti all'apoptosi e aumentano la produzione di alcuni componenti della ECM, tra cui vimentina e actina del muscolo liscio.

L' EMT è un processo che avviene anche in condizioni fisiologiche, ad esempio durante l'embriogenesi determina la formazioni e lo sviluppo dei diversi tessuti e organi, nell'adulto prende parte ai processi di rigenerazione tissutale e di carcinogenesi⁷⁵.

In questo processo intervengono diversi meccanismi molecolari tra cui l'attivazione di specifici fattori di trascrizione, l'aumento di espressione di proteine di superficie la riorganizzazione e l'espressione di proteine del citoscheletro, la produzione di enzimi che degradano ECM e cambiamenti di espressione di diversi microRNA⁷³.

Il risultato finale è una down regolazione dei marcatori epiteliali (E-caderina, ZO1) e un iperespressione dei marcatori mesenchimali (vimentina e alfa-SMA).

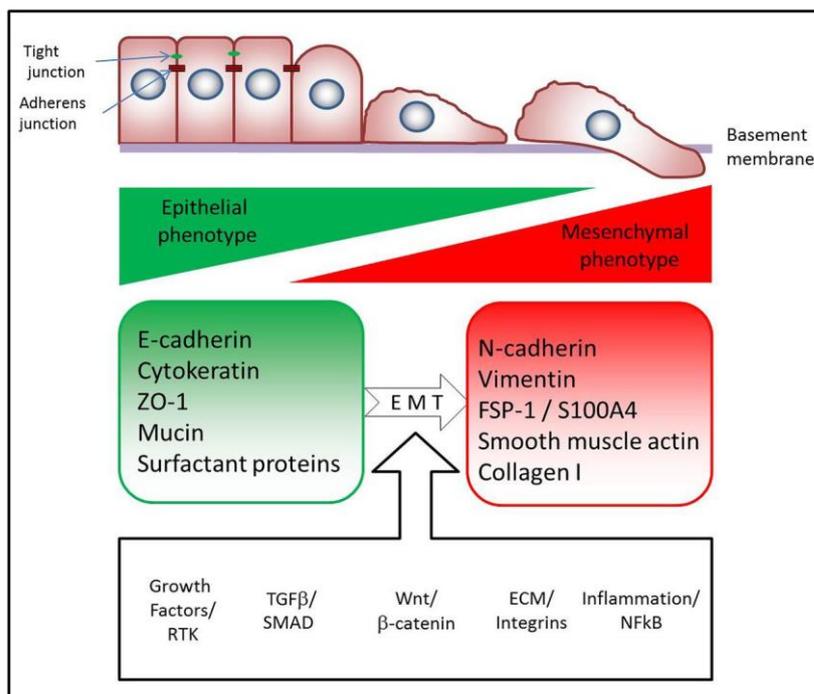


Figura 3. Processo di transizione epitelio mesenchimale. Diverse pathway possono innescare l'EMT: fattori di crescita (epidermal growth factor, fibroblast growth factor, connective tissue growth factor, platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor, etc), integrins, Wnt, nuclear factor (NF)- κ B e transforming growth factor β (TGF- β) pathways. Una caratteristica comune è che queste attivano fattori di trascrizione (Snail, Slug, Zeb-1, Twist, etc) che causano la down-regolazione dei marker epiteliali e l'aumento di espressione dei marker mesenchimali⁷⁶.

Possibili meccanismi eziopatogenetici alla base della fibrosi polmonare indotta da mTOR-I.

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che alte dosi di EVE inducono EMT in cellule epiteliali tubulari prossimali renali e cellule epatiche^{77,78} e per comprendere se questo farmaco potesse avere effetti analoghi anche sulle cellule polmonari e bronchiali, abbiamo stimolato con varie dosi di EVE (5, 10, 100 nM) diversi tipi di cellule: pneumociti di tipo II umani (A549), cellule epiteliali bronchiali wild-type (NuLi-1) e cellule epiteliali bronchiali omozigoti per la mutazione delta F508 della fibrosi cistica (Cufi-1). Le stesse cellule sono state stimolate anche con diverse dosi (5, 500 nM e 5 μ M) di Tacrolimus (TAC), un farmaco appartenente alla classe degli CNI.

L'analisi di espressione genica ha evidenziato che solo le alte dosi di EVE (100 nM) inducevano un aumento dell'espressione dei geni che codificano per tre marcatori di EMT noti: α -smooth muscle actin (α -SMA), vimentina (VIM) e fibronectina (FN), in tutte le linee cellulari. L'entità di questo effetto era simile a quello indotto da TGF- β , un noto induttore di EMT usato come controllo positivo. Al contrario, il trattamento con TAC non sortiva lo stesso effetto.

Analogamente le alte dosi di EVE inducevano una riduzione dell'espressione di E-caderina (ECAD) e Zonula occludens-1 (ZO-1), due marker epiteliali. Anche in questo caso non abbiamo osservato alcun cambiamento indotto dal TAC.

Tali risultati sono stati poi confermati a livello di espressione proteica dall'immunofluorescenza (IF). Le cellule trattate con basse dosi di EVE e con il TAC (a qualsiasi concentrazione) non mostravano alcun cambiamento di espressione proteica dei marker mesenchimali (Figure 4 e 5). Questi risultati suggerivano chiaramente che solo le alte dosi di EVE erano in grado di indurre EMT e che pertanto nei pazienti portatori di trapianto di organi solidi (inclusi quelli affetti da fibrosi cistica) dovrebbero essere evitati dosaggi elevati⁷⁹.

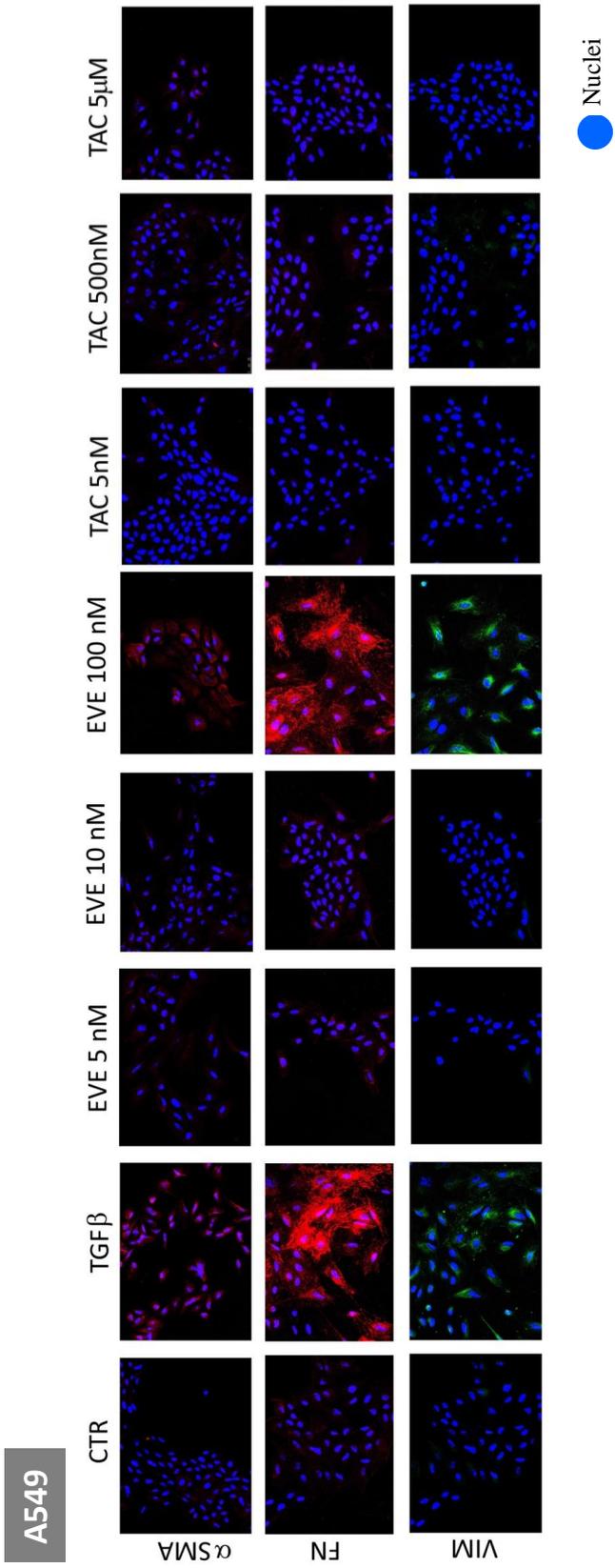


Figura 4. Alte dosi di EVE inducevano un aumento dei livelli proteici di α-SMA, vimentina (VIM) e fibronectina (FN) nelle cellule polmonari. Immagine rappresentativa di 3 esperimenti di immunofluorescenza per α-SMA, FN e VIM in cellule A549 trattate con e senza EVE o TAC. Il TGF-β (20 ng/ml) è stato usato come controllo positivo (ingrandimento, x400)

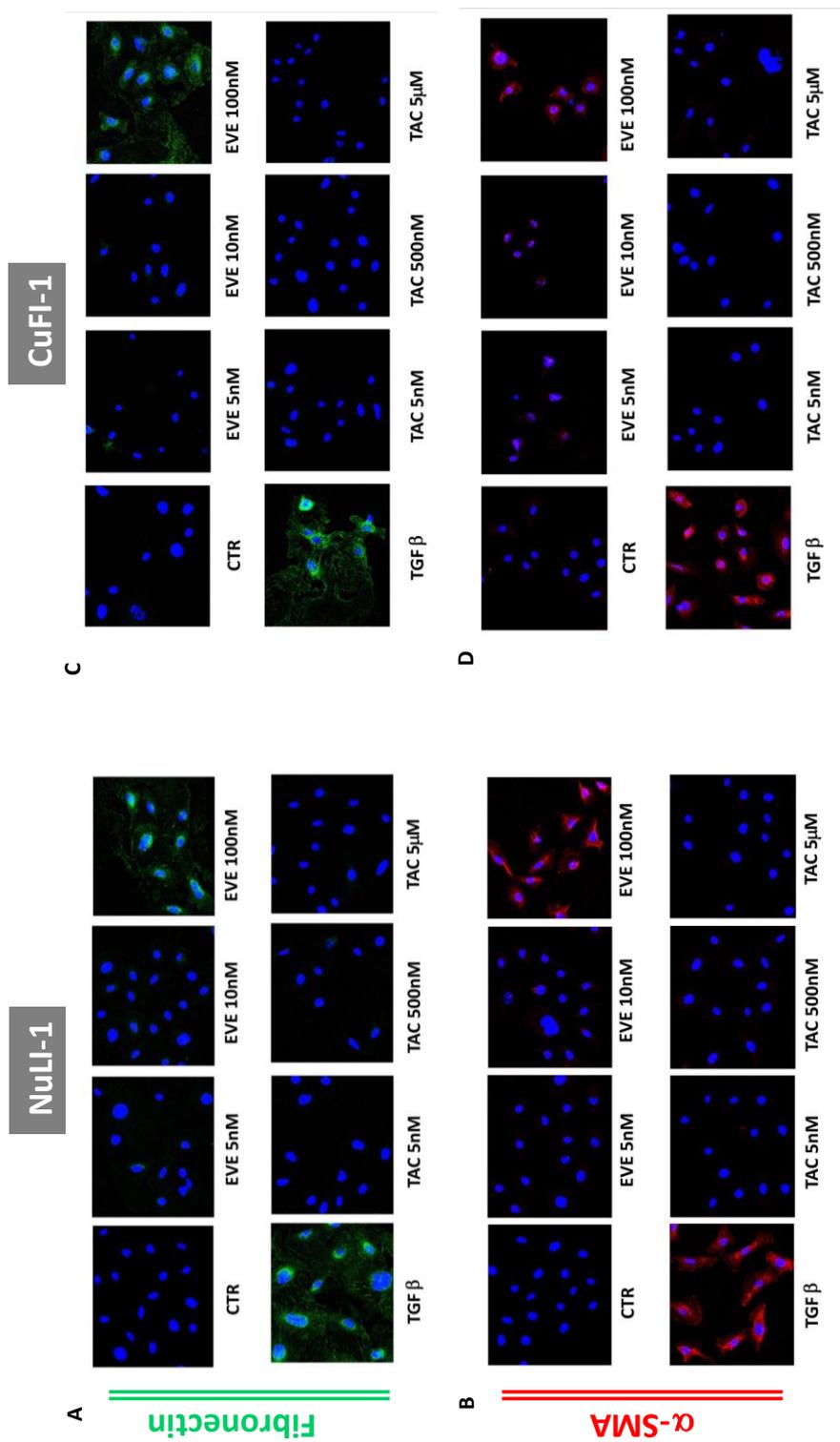


Figura 5. Alte dosi di EVE inducono un aumento di espressione proteica di α -SMA), e fibronectina (FN) in cellule epiteliali bronchiali. Immagine rappresentativa di uno dei tre esperimenti di immunofluorescenza per FN e α -SMA in NuLI-1 (a e b) e CuFI-1 (c e d) con e senza EVE o TAC. TGF- β (20 ng/ml) è stato usato come controllo positivo (ingrandimento, x400). I nuclei (in blu) sono stati colorati con Hoechst 33258.

Anche l'immunoistochimica dimostrava un incremento dose-dipendente di espressione del fattore di trascrizione ZEB1 (che agisce a valle di TGF- β) e implicato nella EMT. Infatti in condizioni basali ZEB1 era espresso dal 65% delle cellule A549 mentre a 10 e 200 nM EVE la percentuale di cellule positive saliva, rispettivamente, all'84 e al 92% (Figura 6).

Inoltre, la ciclina D1, un importante regolatore della progressione del ciclo cellulare, risultava ipo-espresso nelle A549 dopo trattamento con EVE. Come mostrato in figura 7, in condizioni basali circa il 78% delle cellule esprimevano ciclina D1. Dopo esposizione a EVE 10 e 200 nM la percentuale di cellule positive passava rispettivamente, a 36 e 27%. Questi risultati confermavano l'effetto antiproliferativo di questo farmaco.

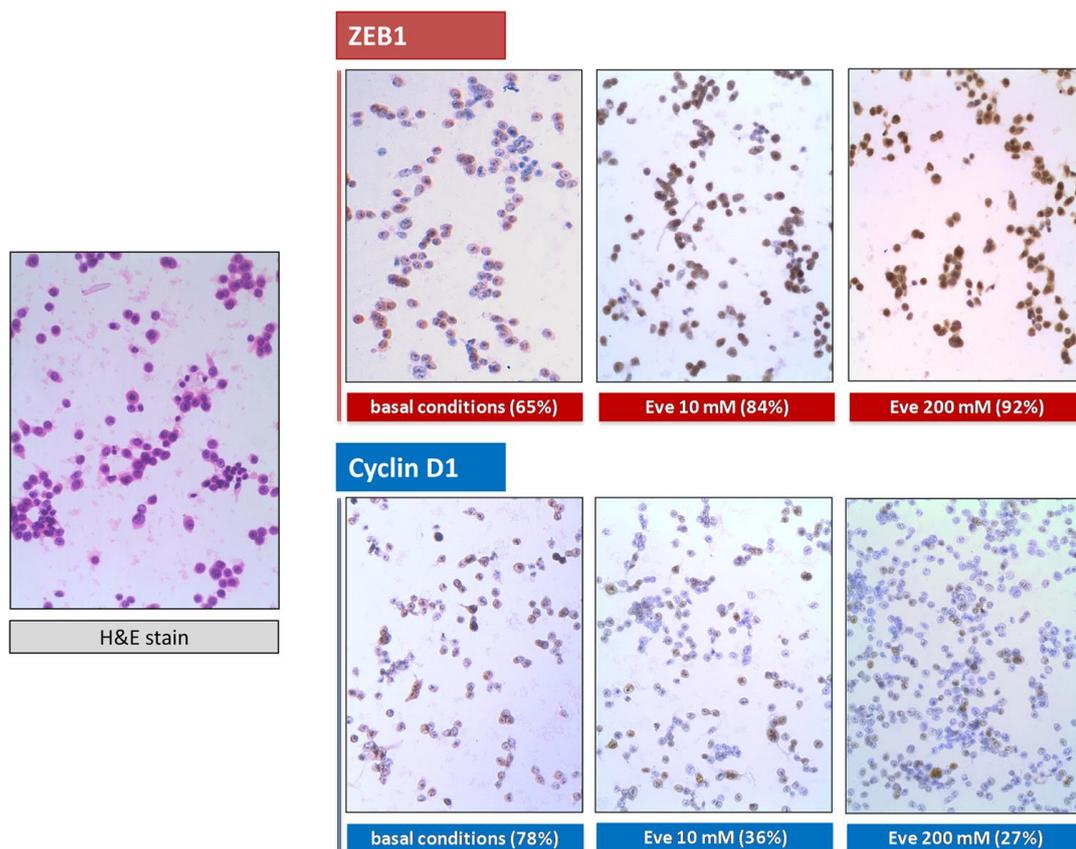


Figura 6. EVE modula il livello proteico di ZEB1 e ciclina D1 nelle cellule polmonari. L'immagine mostra la colorazione immunoistochimica (IHC) per ZEB1 e ciclina D1 in A549 trattate con EVE (10 and 200 nM) per 48 h. Il livello proteico di ZEB1 aumentava dal 65 al 92% mentre la ciclina D1 si riduceva dal 78 al 27%. La percentuale delle cellule positive è indicata sotto le immagini. H&E, colorazione ematossilina/eosina.

Dal momento che l'inibizione di mTORC1 può portare all'attivazione di AKT e dato che AKT ha un ruolo centrale nella EMT, abbiamo infine studiato l'effetto svolto da EVE a diverse concentrazioni sulla fosforilazione di questo enzima nelle linee cellulari A549, NuLI e CuFI.

Dai nostri risultati era emerso che alte dosi di EVE inducevano la fosforilazione di AKT nelle linee cellulari epiteliali polmonari e bronchiali.

Alla base di questo effetto profibrotico legato all'utilizzo di alte dosi di EVE potrebbe pertanto esservi una massiva inibizione di mTORC1, che determinerebbe una down-regolazione di S6K e conseguentemente un'iperattivazione di mTORC2. L'iperattivazione di mTORC2 a sua volta attraverso la fosforilazione di AKT in S473 attiverrebbe la pathway di PI3K-AKT e l'espressione dei geni coinvolti nell'EMT⁸⁰⁻⁸³.

Successivamente al fine di confermare *in vivo* i risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo confrontato il tasso di fibrosi polmonare in un gruppo di pazienti portatori di trapianto renale trattati cronicamente con EVE con un altro gruppo di pazienti trattati con Tacrolimus (TAC). La fibrosi polmonare è stata misurata attraverso uno score (pulmonary fibrosis index score, PFIS) definito secondo una scala arbitraria ottenuta dall'analisi di immagini TC ad alta risoluzione (HRCT). Sulla base dei dati attuali, la scansione HRCT è in grado di fornire una diagnosi altamente specifica di fibrosi polmonare nella maggior parte dei pazienti con malattie polmonari diffuse. La nostra scala, adattata a sua volta dalla scala Ashcroft, era stata applicata da due pneumologi, con più di 15 anni di esperienza. A tutti i pazienti inclusi nello studio era stato assegnato un punteggio PFIS, definito dalla somma dei tre singoli punteggi, valutati al momento dell'arruolamento : 1. punteggio polmonare, 2. punteggio funzionale, 3. punteggio alveolare.

Interessante, nel gruppo di pazienti trattati con EVE, i livelli di PFIS erano significativamente più alti rispetto al gruppo controllo e correlavano positivamente con il trough level del farmaco ($R^2 = 0.36$). Nessuna associazione era invece evidente nei pazienti trattati con TAC ($R^2 = 0.001$).

Comunque, sebbene si siano fatti importanti passi in avanti nella comprensione dei meccanismi biologici associati alla genesi del processo pro-fibrotico

polmonare, l'intricata rete biologica coinvolta non è stata ancora completamente chiarita. A tale proposito le tecniche highthroughput potrebbero rivelarsi delle importanti armi per tale fine.

Microarray

La tecnica dei microarray, o matrici ad alta densità, sfrutta le caratteristiche della doppia elica del DNA e la sua capacità di accoppiamento delle basi⁸⁴.

La sonda (o probe), che rappresenta la sequenza complementare a quella del gene da individuare, è ancorata su un supporto solido (ad esempio un gel o un filtro poroso) e grazie alla peculiarità degli acidi nucleici di legarsi alle sequenze complementari, essa può interagire con i frammenti nucleotidici dei geni da valutare.

Esistono due principali tecnologie microarray: la prima denominata a spotting e la seconda detta in situ.

Nella tecnologia spotting, le sonde sono sintetizzate in vitro e successivamente depositate sul supporto solido in genere costituito da un vetrino. Generalmente sono costituite da molecole di cDNA lunghe alcune migliaia di paia di basi le cui sequenze possono essere ricavate da banche dati genomiche. Tali sonde possono essere ricavate dalle cosiddette Express Sequence Tags (EST), ovvero dalle porzioni codificanti identificate dai singoli progetti genoma. Più recentemente le sonde sono rappresentate da sequenze sintetiche di oligonucleotidi lunghe 50-70 paia di basi.

La deposizione delle sonde viene effettuata da sistemi automatizzati (robot) che prelevano le sonde direttamente dalle piastre utilizzate per la PCR e le depositano sul vetrino formando spots di circa 100-150 μm di diametro, distanziati l'uno dall'altro 200-250 μm . Durante la deposizione, il sistema di controllo del robot riporta la precisa localizzazione e le caratteristiche identificative delle sonde. Il cDNA posto sul supporto viene reso a catena singola attraverso una denaturazione termica o chimica.

L'altra tecnica utilizzata per i microarray è quella detta in situ (sviluppata da Affimetrix) che utilizza tecniche di fotolitografia e la sintesi diretta in fase solida

di oligonucleotidi. La produzione delle sonde avviene direttamente sul supporto solido. In particolare, il supporto è ricoperto da sequenze di oligonucleotidi con gruppo reattivo protetto da gruppi fotosensibili. Una volta eliminata la protezione dei siti reattivi è sufficiente incubare la superficie con desossiribonucleotidi per allungare la catena in fase di sintesi. Ripetendo questo ciclo più volte è possibile aggiungere nucleotidi diversi in posizioni diverse e sintetizzare tutte le sonde necessarie per l'analisi di un dato genoma.

I targets da ibridizzare ai probe ancorati al supporto solido, sono normalmente ottenuti dalla marcatura con molecole fluoresceinate dell'mRNA proveniente da cellule o tessuti. Probes e targets sono poi messi a stretto contatto per favorire l'ibridazione e, in seguito, l'array può essere analizzato attraverso uno scanner per la valutazione e la stima dei segnali fluorescenti (Figura 7).

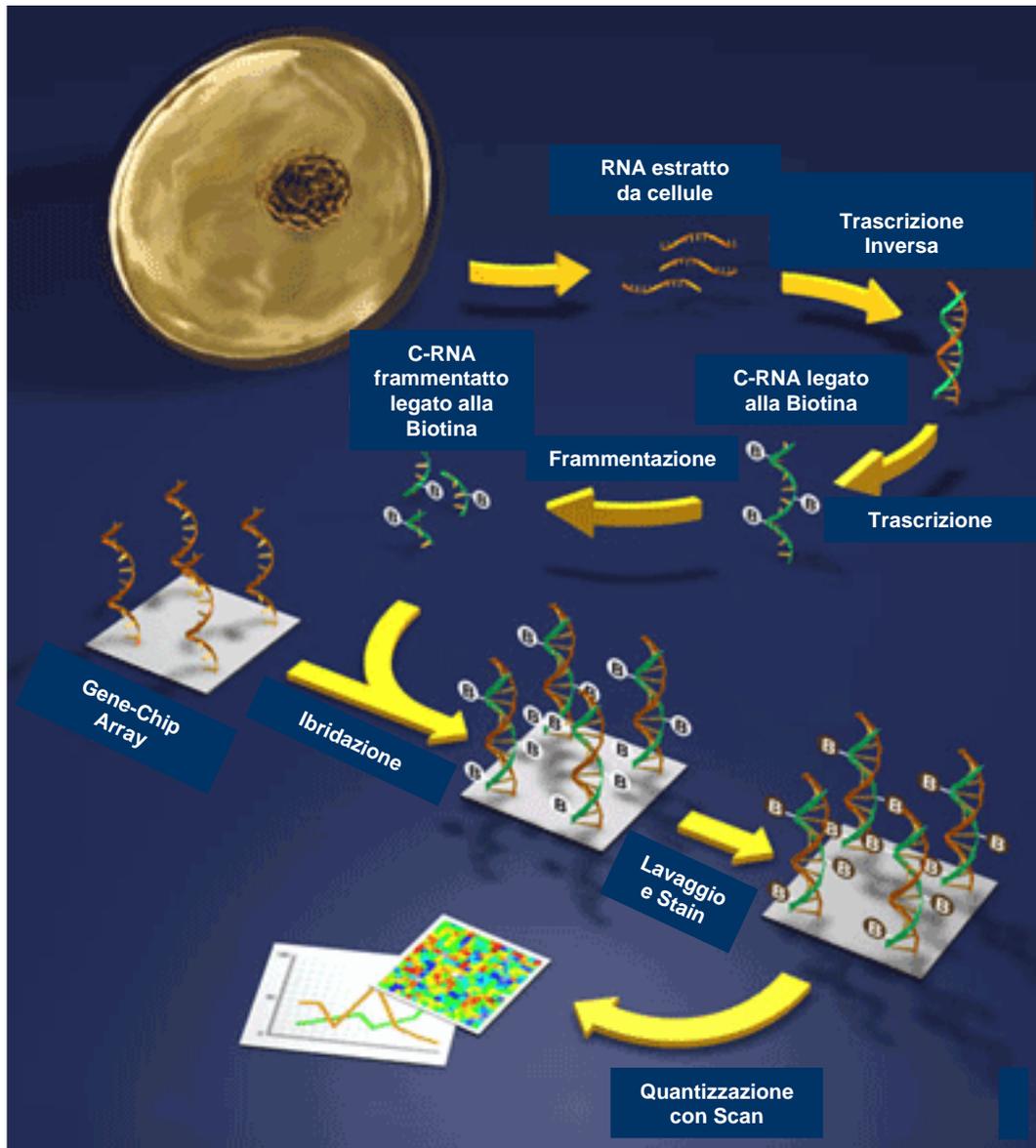


Figura 7. Rappresentazione schematica delle fasi di processing del campione per analisi microarray, ibridazione al gene-chip e quantizzazione/scannerizzazione. Immagine estratta e rielaborata da “SPOT YOUR GENES – AN OVERVIEW OF THE MICROARRAY” scritto da Bradley Coe and Christine Antler, the science creative quarterly (<http://www.scq.ubc.ca/author/bradleycoechristineantler/>).

L'intensità dei pixel dell'immagine ottenuta è direttamente proporzionale alla quantità di molecole di target che hanno ibridizzato. L'intensità colorimetrica (risultante dal livello d'ibridazione) è poi convertita in valore numerico attraverso l'utilizzo di software specifici e i dati di espressione di ogni probe set genico possono essere analizzati attraverso varie tecniche statistiche e bioinformatiche (Figura 7).

miRNA e miRNoma

I microRNA (miRNA) sono piccole sequenze oligonucleotidiche (circa 20 nucleotidi) non codificanti che regolano, per lo più negativamente, la sintesi di diverse proteine implicate in processi cellulari quali proliferazione, differenziamento e apoptosi⁸⁵. La funzione principale di questi filamenti di RNA è la regolazione dell'espressione genica a livello dell'RNA messaggero (mRNA). I miRNA infatti agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione (Figura 8).

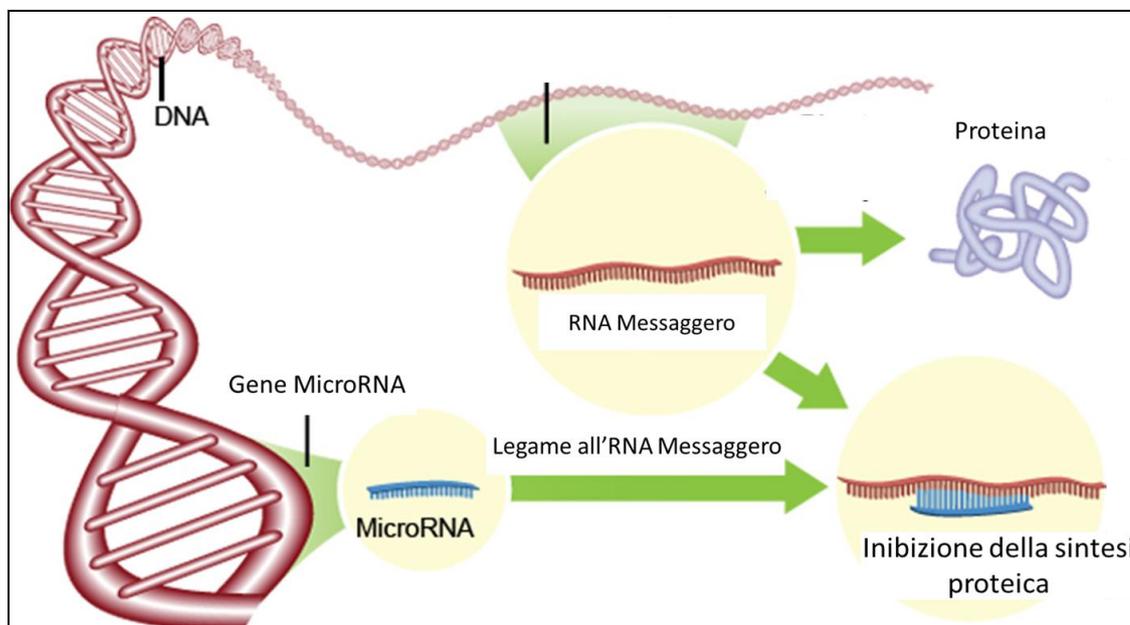


Figura 8. Regolazione dell'espressione genica da parte dei miRNA. Immagine tratta da discoverymagazine.com.

Il meccanismo di destabilizzazione dell'mRNA mediato dai miRNA consiste in una de-adenilazione seguita dalla rimozione del cap all'estremità 5' tramite il reclutamento di un complesso di enzimi cellulari. Nel caso di inattivazione di un miRNA si avrà la sovraespressione dell'mRNA bersaglio mentre l'attivazione di un miRNA porterà alla down-regolazione dell'mRNA target. Attraverso la loro funzione, che sembra andare oltre la semplicistica visione di repressori di un

singolo trascritto, essi possono regolare la differenziazione, la proliferazione e la morte cellulare agendo come modulatori di centinaia di proteine coinvolte in “signalling pathways”. Pertanto la disregolazione dell’espressione dei miRNA intracellulari è stata associata a molte condizioni patologiche. Poiché la complementarità tra miRNA e mRNA target non è perfetta molto probabilmente ciascun miRNA può regolare un ampio numero di geni.

I miRNA sono presenti anche nel circolo sistemico. Essi infatti possono essere trasportati al di fuori delle cellule (miRNA extracellulari) e circolare nei fluidi biologici (si trovano nel plasma, nel siero, nella saliva, nelle urine, nel liquido lacrimale e nel latte materno). I miRNA extracellulari sono protetti dalla degradazione (l’RNA nudo è prontamente bersagliato dalle esonucleasi che sono abbondantemente presenti in molti fluidi extracellulari) grazie a 5 diversi meccanismi: 1. Esosomi 2. micro-vescicole 3. corpi apoptotici 4. proteine che legano l’RNA 5. HDL.

I miRNA circolanti esplicano il loro ruolo nella comunicazione intercellulare (“cellular crosstalk”) attraverso il trasferimento di informazioni genetiche da una cellula donatrice ad una cellula accettrice che avviene mediante silenziamento genico nelle cellule riceventi. Pertanto un miRNA può influenzare un tipo cellulare o un tessuto in cui esso non viene prodotto spiegando come cellule adiacenti all’interno di un organo possano comunicare. Questa forma di comunicazione è coinvolta nella regolazione dell’immunità, nella migrazione cellulare e nello sviluppo dei tumori.

La scoperta dei microRNA circolanti nel sangue e, in particolare, della loro stabilità all’interno dei fluidi biologici li rende dei potenziali biomarker non invasivi (migliori rispetto all’mRNA ed alle proteine). L’ipotesi è che essi possano in futuro essere usati come indici diagnostici extracellulari per la diagnosi di alcune patologie. In effetti, negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato la possibilità di utilizzare i livelli sierici di miRNA come biomarcatori in diverse patologie e neoplasie (potendo essi avere funzione oncogenica od oncosoppressoria).

Il miRNoma è una tecnica che permette di misurare simultaneamente il livello di espressione dei miRNA. Il genoma umano codifica per circa 1000 miRNA che regolano almeno un terzo di tutti i trascritti⁸⁶.

Tutte le sequenze dei miRNA conosciuti sono catalogate in un database (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>) con un numero identificativo basato sulla similarità della sequenza. Le forme mature identiche sono annotate con lo stesso nome ma se sono prodotte da loci genomici diversi sono differenziate da un suffisso (es. “miR-16-1” e “miR-16-2”) e differenze di 2 basi sono identificate da un altro suffisso (es. “miR-181a” and “miR-181b”).

E' ormai accettato che i miRNA sono coinvolti nella regolazione di moltissimi processi cellulari: pathway metaboliche, stress cellulare, infiammazione e fibrosi⁸⁷⁻⁹⁰. Alterazione nel profilo di espressione di miRNA sono stati osservati in malattie croniche, cancro, diabete ed EMT⁹¹⁻⁹³.

In futuro i miRNA potrebbero inoltre diventare dei bersagli terapeutici oppure potrebbero essere essi stessi utilizzati come farmaci. Nel caso in cui la patologia sia causata da mutazioni del miRNA, si potrebbe inibire l'espressione del microRNA mutato attraverso la somministrazione di oligoribonucleotidi anti-senso modificati per essere complementari alla sequenza del microRNA (“antagomir”) inibendo l'espressione del microRNA stesso. Nel caso in cui il miRNA funzioni da oncosoppressore e sia poco espresso nella condizione patologica l'obiettivo di aumentarne l'espressione potrebbe essere ottenuto tramite sistemi di veicolazione che utilizzino vettori virali o liposomi per introdurre il miRNA nella cellula. Tali possibili applicazioni sono tutt'oggi oggetto di studio.

SCOPI DELLO STUDIO

Nonostante le grandi potenzialità terapeutiche degli inibitori di mTOR e il loro esteso utilizzo negli schemi immunosoppressivi di mantenimento utilizzati nella trapiantologia d'organo solido e nel trattamento di alcune neoplasie, come tutti i farmaci immunosoppressori/oncologici, questi agenti possono presentare vari effetti collaterali/tossici.

In particolare, negli ultimi anni la letteratura internazionale ha dato molto risalto allo sviluppo di gravi tossicità polmonari indotte dall'assunzione di mTOR-I che hanno reso indispensabile, in molti casi, minimizzare la terapia o sospenderla precocemente.

I meccanismi biologici molecolari alla base di questi fenomeni sono stati solo in parte chiariti e la transizione epitelio mesenchimale (EMT) delle cellule epiteliali e bronchiali sembra avere un ruolo centrale.

E' indubbio che altre vie metaboliche potrebbero essere coinvolte nella patogenesi di questo tipo di tossicità e determinare la spinta differenziativa delle cellule epiteliali polmonari verso un fenotipo pro-fibrotico e mesenchimale.

Pertanto, scopi del nostro studio sono stati:

1. Confermare le potenzialità profibrotiche di alte dosi di Everolimus già osservate su diverse linee cellulari immortalizzate, su cellule primarie epiteliali bronchiali;
2. Approfondire le nostre conoscenze sui meccanismi molecolari alla base della fibrosi polmonare indotta da questa categoria farmacologica attraverso analisi trascrittomiche e miRNomiche.
3. Individuare potenziali biomarker diagnostici precoci e target terapeutici associati a questo importante evento avverso.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari e trattamenti

Cellule primarie epiteliali bronchiali (BE63/3) sono state ottenute dal “Servizio Colture Primarie” della Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica e coltivate seguendo le loro istruzioni⁹⁴. Le cellule sono state fatte crescere su fiasche coattate con collagene di coda di ratto in medium LHC9/RPMI 1640 senza siero a 37°C e 5% CO₂. Dopo 4-5 passaggi le cellule sono state piastrate su inserti porosi (Transwell) e dopo 24 ore il medium è stato sostituito con DMEM/F12 supplementato con 2% Ultrosor G, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina.

Il medium è stato sostituito giornalmente su entrambi i lati del supporto poroso per 5 giorni. Successivamente il medium apicale è stato totalmente rimosso e le cellule ricavano i nutrienti solo dalla parte basolaterale (interfaccia aria-liquido). Questa condizione favorisce la differenziazione in epitelio. Dopo 11 giorni l'epitelio è stato trattato con EVE (5 e 100 nM) e TGF-β (20 ng/ml), un induttore di EMT, per 24 h. Sebbene un modello *in vitro* non rappresenta perfettamente il comportamento farmacocinetico *in vivo* possiamo postulare che 5 nM EVE corrisponde all'incirca a 5 ng/ml (che è il livello di farmaco frequentemente usato nella terapia di mantenimento nei trapianti di organo) mentre 100 nM corrisponde a dosi molto alte di farmaco (trough level maggiori di 50 ng/ml) generalmente utilizzate nelle terapie anticancro.

I fibroblasti murini NIH/3T3, acquistati dalla American Type Culture Collection (Manassas, VA) sono stati tenuti in coltura a 37°C in DMEM supplementato con 10% FCS, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, e 2 mM L-glutamina. Le cellule sono state poi trattate con 5 e 100 nM EVE per 24 h.

Le cellule stellate epatiche (HSC) sono state isolate da ratti Wistar wild-type con piena disponibilità di cibo ed acqua, in ambiente condizionato (23°C) e con cicli luce-buio di 12 ore. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo le Linee Guida per la Cura e l'Uso degli Animali dell'Istituto Nazionale di Sanità e approvato dal comitato etico dell'Università di Padova. Le cellule sono state isolate dal fegato

seguendo il protocollo di Zhang modificato⁹⁵: i fegati sono stati perfusi con una soluzione di lavaggio senza calcio per lavare via il sangue e subito dopo con una soluzione (CaCl₂ 0.294 g/L, MgSO₄ 0.097 g/L) e infine incubata in un buffer di digestione (collagenase 0.6 g/L in Gey's Balanced Salt Solution with Ca²⁺ e Mg²⁺, pH 7.5) per 1 h (37°C, CO₂ 5%) per degradare la matrice extracellulare. Gli organi sono stati poi tagliati in piccoli pezzi e omogenizzati per produrre una sospensione cellulare che è stata poi centrifugata a 1450 × g per 18 min in 12% (wt/vol) Nycodenz gradient al fine di ottenere una frazione pura di HSC. Il numero e la vitalità delle cellule è stata valutata con trypan blue.

Le cellule così isolate sono state lavate con Hank's balanced salt solution e messe in coltura in piastre coattate con collagene di tipo I (10 µg/ml) alla concentrazione di 1 × 10⁵ cells/ml, in DMEM (supplementato con 20% FBS e antibiotici).

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su cellule tra passaggio 3 e 4. Ventiquattro ore prima della stimolazione il medium è stato sostituito con DMEM senza FBS e poi stimolate con 5 o 100 nM EVE per 24 h.

Estrazione dell'RNA e profilo di espressione genica

L'RNA totale è stato estratto con Trizol (Invitrogen) e seguendo le istruzioni del produttore. Quantità e purezza dell'RNA sono state misurate con il Nanodrop.

I dati di espressione genica sono stati ottenuti con HumanHT-12 v3 Expression BeadChip (Release 38, Illumina, San Diego, CA, USA). In questo processo 500 ng di RNA totale delle cellule BE63/3 sono stati usati per sintetizzare il cRNA marcato con biotina con il kit Illumina®TotalPrep™ RNA amplification kit (Applied biosystems/Ambion, USA). La qualità del cRNA è stata valutata con il NanoDrop® ND-100 spectrophotometer and the Agilent 2100 Bioanalyzer. Successivamente 750 ng di cRNA sono stati usati per l'ibridazione su sonde gene-specifiche su microarray Illumina. Gli array sono stati successivamente scansionati con HiScanSQ.

Analisi delle Pathway

Per valutare le relazioni biologiche tra i geni individuati abbiamo usato il software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity System, Redwood City, CA, USA; <http://www.ingenuity.com>). IPA è un software in grado di costruire network basati sulle interazioni biologiche tra geni sulla base di dati ottenuti dall'analisi di pubblicazioni scientifiche sottoposte al processo di peer-review. Ad ognuno dei network generati dal software automaticamente è assegnato uno score relativo alla presenza di geni contenuti nel nostro dataset. Questo score è calcolato sulla base del logaritmo negativo dell'indicativo P value e dalla probabilità d'interazione genetica ottenuta non per pura coincidenza. Le pathway canoniche sono le più significative i data set caricati. Al fine di calcolare la significatività delle pathway è stato usato il test esatto di Fischer con false discovery rate (FDR).

Profilo di espressione dei microRNA

Cento ng di RNA totali delle cellule BE63/3 sono stati usati per generare miRNA marcati in fluorescenza con il kit miRNA Complete Labeling and Hybridization kit (Agilent Technologies). I miRNA marcati sono stati ibridizzati per 20 h a 55°C su slide Agilent 8x60K Human miRNA Microarray (Agilent Technologies), basato su miRBase database (Release 21.0). Dopo l'ibridazione le slide sono state lavate e scansionate seguendo i protocolli dell'Agilent con High-Resolution Microarray C Scanner (Agilent Technologies). L'analisi dei dati grezzi è stata effettuata con il software Agilent Feature Extraction (v10.7.3).

Real-Time PCR

Cinquecento ng di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA con il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguendo le istruzioni del produttore. Le reazioni di Real-Time PCR sono state effettuate in duplicato con chimica SYBR su CFX-connect (Bio-Rad) e utilizzando la SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). I primer per α -

SMA, VIM, FN, MMP12, CTGF and GAPDH sono i QuantiTect Primer Assay (Qiagen).

La quantificazione dell'espressione genica è stata calcolata con il metodo del Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) e la quantificazione relativa è stata misurata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La presenza di prodotti di amplificazione aspecifici è stata esclusa mediante le analisi delle curve di melting.

Western Blot

Le cellule sono state lisate in buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) con l'aggiunta di inibitori delle proteasi (Roche Applied Science). La concentrazione proteica è stata misurata con saggio BCA. Uguali quantità di proteine sono state denaturate in Laemmli buffer a 100°C per 10 min e poi sottoposte a SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10%. Le proteine sono state trasferite su membrana in nitrocellulosa e i siti aspecifici bloccati in latte al 5% in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Le membrane sono state incubate con anticorpi primari contro GAPDH (Santa Cruz sc-25778), CTGF (NovusBio) e collagen1 (ORIGENE TA309096) overnight a 4°C e successivamente con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi per 1 h a temperatura ambiente. Lo sviluppo del segnale è stato ottenuto con kit ECL SuperSignals West Pico Chemiluminescent substrate solution (Pierce) seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Resistenza transepiteliale (TER)

La resistenza transepiteliale (TER) è stata misurata quotidianamente mediante l'apparecchio Millicell-ERS con elettrodi (Millipore) che sono stati inseriti in entrambi i lati del filtro. La corrente alternata che è stata applicata tra gli elettrodi era compresa tra $\pm 20 \mu A$ ad una frequenza di 12.5 Hz. La resistenza del monostrato è stata moltiplicata per l'area di superficie effettiva per ottenere la resistenza elettrica del monostrato ($\Omega \text{ cm}^2$). La TER del filtro Transwell

(background) è stata sottratta dalla TER del monostrato cellulare. Una volta ottenute delle resistenze stabili, sono stati testati i diversi terreni di coltura (controllo, EVE 5 nM, EVE 100 nM, TGF- β 20 ng/ml). Le misure sono state effettuate 24 ore dopo l'aggiunta dei medium.

Analisi statistica

L'analisi statistica per i dati di trascrittomici è stata effettuata con il software Genespring GX 11.0 (Agilent Tech Inc., Santa Clara, CA, USA). L'identificazione dei geni differenzialmente espressi nelle cellule trattate con EVE rispetto ai controlli è stata ottenuta con il metodo del FDR di Benjamini-Hochberg e i gene probe set sono stati filtrati sulla base del FDR (p value adjusted con test multipli di 1000 permutazioni) e fold-change. Per il fold-change è stato scelto un filtro di 1.5. Per le successive analisi sono stati presi in considerazione solo i geni significativamente modulati (con adjusted-p value <0.05 e fold-change >1.5).

Per quanto riguarda l'analisi del miRNoma, la normalizzazione è stata effettuata secondo il metodo del Quantile. La selezione dei probes differenzialmente espressi è stata ottenuta applicando un t-test non appaiato, con cut-off di p value di 0.05 e un cut-off di fold change di 2.0, dopo correzione con test multipli di Benjamini-Hochberg.

Per i dati di Real-Time PCR e western blotting le differenze tra cellule controllo e trattate con EVE sono state misurate con t-test. Livelli di p-value inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Alte dosi di Everolimus inducono EMT nelle cellule BE63/3 (Cellule bronchiali epiteliali primarie)

Per confermare i nostri precedenti risultati ottenuti sulle cellule immortalizzate epiteliali bronchiali e sulle cellule polmonari⁷⁹, abbiamo misurato mediante RT-PCR il livello di espressione genica di alcuni marcatori di EMT noti quali α -SMA, vimentina (VIM) e fibronectina (FN) nelle cellule BE63/3 trattate per 24 h con due differenti concentrazioni di EVE (5 e 100 nM).

Solo elevate concentrazioni di EVE (100 nM), in modo simile al TGF- β (20 ng/ml), erano in grado di aumentare il livello di espressione dei marcatori mesenchimali sopra elencati (Figura 9).

Al contrario livelli più bassi di EVE (5 nM) non suscitavano alcun effetto (Figura 9).

Inoltre, alti livelli di EVE erano in grado di ridurre la resistenza transepiteliale (TER) valutata con Milicel_ERS ohmmeter ad indicare una disfunzione a livello delle giunzioni strette intercellulari (tight junctions) (Figura 9D).

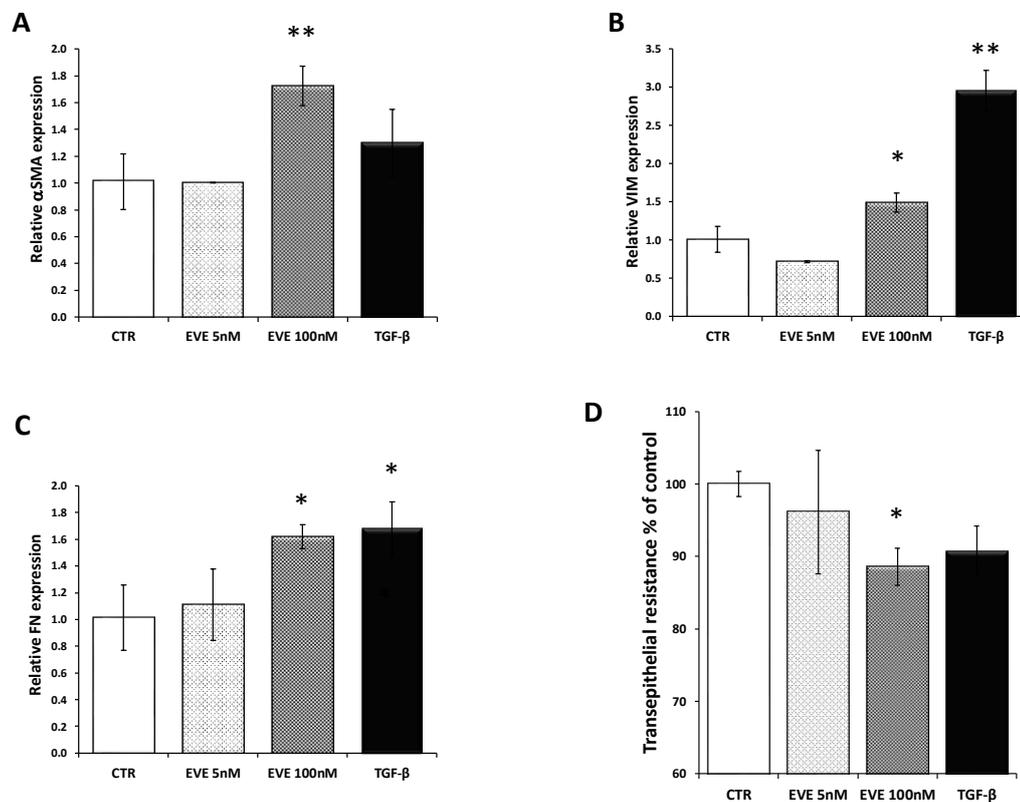


Figure 9. Espressione genica dei marcatori mesenchimale. Espressione genica di (A) α -SMA (B) FN e (C) VIM valutata mediante Real-Time PCR nelle cellule BE 63/3 trattate o non trattate con EVE (5 e 100 nM) o TGF- β (20 ng/ml). I livelli di espressione sono stati normalizzati con il GAPDH. Media \pm D.S. di tre differenti esperimenti eseguiti in triplicato. * p <0.05, ** p <0.01 vs CTR. (D) L'istogramma indica la resistenza transepiteliale come percentuale rispetto alle cellule controllo. * p <0.05 vs CTR.

L'analisi trascrittomiche ha rilevato che elevati dosaggi di EVE up-regolavano i geni coinvolti nella sintesi e metabolismo del collagene.

Il profilo di espressione genica valutato mediante analisi trascrittomiche ha rilevato che il trattamento delle cellule BE63/3 con 100 nM di EVE per 24 h induceva una deregolazione di 147 probe set (corrispondenti a 125 geni). Di questi, 60/147 probe set (47 geni) risultavano up-regolati mentre 87/147 probe set (corrispondenti a 78 geni) erano down-regolati (≥ 1.5 fold change) nelle cellule trattate con EVE rispetto ai controlli (Tabella 2).

Tabella 2. Lista dei probe set espressi in modo differente dopo trattamento con 100 nM di EVE.

Probe ID	Fold Change	Regulation	Symbol	Entrez Gene ID	Definition
4760626	2.275	up	MMP12	4321	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase), mRNA.
4780209	2.218	up	MMP12	4321	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) mRNA.
670041	1.925	up	AKAP12	9590	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12, transcript variant 2, mRNA.
6770746	1.903	up	LOC728715	728715	similar to hCG38149 (LOC728715), mRNA.
4640086	1.814	up	FOXQ1	94234	forkhead box Q1, mRNA.
2810246	1.808	up	LBH	81606	limb bud and heart development homolog (mouse) (LBH), mRNA.
6330270	1.804	up	GPC4	2239	glypican 4, mRNA.
6620201	1.789	up	KLHL24	54800	kelch-like 24 (Drosophila), mRNA.
5690687	1.783	up	CTGF	1490	connective tissue growth factor, mRNA.
5420577	1.775	up	CLCA4	22802	chloride channel, calcium activated, family member 4, mRNA.
2640292	1.769	up	CTGF	1490	connective tissue growth factor, mRNA.
1070477	1.753	up	ALDH1A1	216	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1, mRNA.
3130301	1.729	up	PIM1	5292	pim-1 oncogene, mRNA.
6620008	1.705	up	KAL1	3730	Kallmann syndrome 1 sequence, mRNA.
4040576	1.704	up	IL6	3569	interleukin 6 (interferon, beta 2), mRNA.
1820315	1.677	up	C4orf26	152816	chromosome 4 open reading frame 26 (C4orf26), mRNA.
1990142	1.671	up	C20orf114	92747	chromosome 20 open reading frame 114 (C20orf114), mRNA.
1940647	1.668	up	HBP1	26959	HMG-box transcription factor 1, mRNA.
2640324	1.665	up	SLC46A3	283537	solute carrier family 46, member 3, mRNA.
3800241	1.651	up	CDH6	1004	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney), mRNA.

6110736	1.646	up	IRS2	8660	insulin receptor substrate 2, mRNA.
4610056	1.641	up	FLRT2	23768	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2, mRNA.
6420687	1.638	up	PLUNC	51297	palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated, transcript variant 2, mRNA.
6420465	1.625	up	GABARAPL1	23710	GABA(A) receptor-associated protein like 1, mRNA.
4780128	1.625	up	ATF3	467	activating transcription factor 3, transcript variant 4, mRNA.
160242	1.622	up	C13orf15	28984	chromosome 13 open reading frame 15 (C13orf15), mRNA.
2650709	1.620	up	CDH11	1009	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast), mRNA.
2230767	1.615	up	LOC387825	387825	misc_RNA (LOC387825), miscRNA.
6860228	1.610	up	C5orf41	153222	chromosome 5 open reading frame 41 (C5orf41), mRNA.
6510754	1.609	up	ALDH1A1	216	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1, mRNA.
1980255	1.605	up	RNF39	80352	ring finger protein 39, transcript variant 2, mRNA.
6840491	1.604	up	C5orf41	153222	chromosome 5 open reading frame 41 (C5orf41), mRNA.
4280228	1.595	up	IVNS1ABP	10625	influenza virus NS1A binding protein, mRNA.
5080021	1.593	up	BIRC3	330	baculoviral IAP repeat-containing 3, transcript variant 1, mRNA.
6400131	1.589	up	CYP24A1	1591	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
7160239	1.580	up	FOSB	2354	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B, mRNA.
380689	1.578	up	TSC22D1	8848	TSC22 domain family, member 1, transcript variant 1, mRNA.
3060095	1.574	up	COL12A1	1303	collagen, type XII, alpha 1, transcript variant short, mRNA.
1410209	1.571	up	SGK1	6446	serum/glucocorticoid regulated kinase 1, transcript variant 1, mRNA.
2190553	1.556	up	FZD6	8323	frizzled homolog 6 (Drosophila), mRNA.
4570075	1.544	up	KIAA1641	57730	KIAA1641, transcript variant 7, mRNA.
5090626	1.540	up	FAP	2191	fibroblast activation protein, alpha, mRNA.
6620538	1.540	up	UBL3	5412	ubiquitin-like 3, mRNA.
5960398	1.537	up	NT5E	4907	5'-nucleotidase, ecto (CD73), mRNA.
5570731	1.533	up	C8orf4	56892	chromosome 8 open reading frame 4 (C8orf4), mRNA.
830639	1.531	up	LOC653778	653778	similar to solute carrier family 25, member 37 (LOC653778), mRNA.
3290187	1.529	up	PCMTD1	115294	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1 (PCMTD1), mRNA.
3440670	1.517	up	LOC402251	402251	similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (LOC402251), mRNA.
630315	1.514	up	DHRS9	10170	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9, transcript variant 1, mRNA.
1410161	1.513	up	KLHL5	51088	kelch-like 5 (Drosophila), transcript variant 3, mRNA.
4150575	1.513	up	LETMD1	25875	LETM1 domain containing 1, transcript variant 2, mRNA.

7210497	1.513	up	NUAK1	9891	NUAK family, SNF1-like kinase, 1, mRNA.
1240440	1.511	up	TXNIP	10628	thioredoxin interacting protein, mRNA.
4760747	1.509	up	TPST1	8460	tyrosylprotein sulfotransferase 1, mRNA.
2360220	1.508	up	MATR3	9782	matrin 3, transcript variant 1, mRNA.
3800431	1.508	up	RCOR3	55758	REST corepressor 3, mRNA.
4390450	1.504	up	SGK	6446	serum/glucocorticoid regulated kinase, mRNA.
2450465	1.503	up	CYBRD1	79901	cytochrome b reductase 1, mRNA.
6110053	1.501	up	ZNF32	7580	zinc finger protein 32, transcript variant 2, mRNA.
4570398	1.501	up	F2R	2149	coagulation factor II (thrombin) receptor, mRNA.
3800050	-1.503	down	ADCY3	109	adenylate cyclase 3, mRNA.
5900008	-1.504	down	KLK11	11012	kallikrein-related peptidase 11, transcript variant 2, mRNA.
5080605	-1.504	down	SNRPA1	6627	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A, mRNA.
4560541	-1.521	down	MLKL	197259	mixed lineage kinase domain-like, mRNA.
520682	-1.523	down	CPA4	51200	carboxypeptidase A4, mRNA.
4010296	-1.527	down	RNASE1	6035	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic), transcript variant 1, mRNA.
6350161	-1.530	down	LCPI	3936	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin), mRNA.
4730605	-1.532	down	AURKA	6790	aurora kinase A, transcript variant 5, mRNA.
6840075	-1.532	down	NP	4860	nucleoside phosphorylase, mRNA.
6770187	-1.533	down	SPRR2A	6700	small proline-rich protein 2A, mRNA.
870131	-1.533	down	HSPA5	3309	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa), mRNA.
1570193	-1.535	down	ARHGDI3	397	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta, mRNA.
2450167	-1.537	down	RPL29	6159	ribosomal protein L29, mRNA.
7510709	-1.540	down	CEP55	55165	centrosomal protein 55kDa, mRNA.
2350465	-1.544	down	RPL29	6159	ribosomal protein L29, mRNA.
160097	-1.546	down	MELK	9833	maternal embryonic leucine zipper kinase, mRNA.
3930703	-1.547	down	WDR4	10785	WD repeat domain 4, transcript variant 2, mRNA.
1170066	-1.554	down	SULT2B1	6820	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1, transcript variant 1, mRNA.
2070520	-1.556	down	CDCA7	83879	cell division cycle associated 7, transcript variant 1, mRNA.
6550048	-1.559	down	DHCR7	1717	7-dehydrocholesterol reductase, mRNA.
5310634	-1.566	down	FASN	2194	fatty acid synthase, mRNA.
6560494	-1.566	down	ARTN	9048	artemin, transcript variant 2, mRNA.
5860348	-1.568	down	SC4MOL	6307	sterol-C4-methyl oxidase-like, transcript variant 2, mRNA.
5270112	-1.570	down	HMGCS1	3157	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble), transcript variant 2, mRNA.
5690274	-1.571	down	MCM6	4175	minichromosome maintenance complex component 6, mRNA.

940487	-1.573	down	FUT3	2525	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group), transcript variant 4, mRNA.
5810154	-1.580	down	ALOX15B	247	arachidonate 15-lipoxygenase, type B, transcript variant b, mRNA.
870546	-1.581	down	MAD2L1	4085	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast), mRNA.
6020139	-1.588	down	KLK7	5650	kallikrein-related peptidase 7, transcript variant 1, mRNA.
4250156	-1.589	down	EBP	10682	emopamil binding protein (sterol isomerase), mRNA.
10341	-1.599	down	SHMT2	6472	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
5360678	-1.602	down	DHCR7	1717	7-dehydrocholesterol reductase, transcript variant 1, mRNA.
6580059	-1.610	down	UCP2	7351	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
5090278	-1.610	down	GPX2	2877	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal), mRNA.
3940673	-1.617	down	LOC728285	728285	similar to keratin associated protein 2-4 (LOC728285), mRNA.
2650564	-1.623	down	RARRES3	5920	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3, mRNA.
360367	-1.625	down	PCDH7	5099	protocadherin 7, transcript variant a, mRNA.
7560364	-1.635	down	LOC729779	729779	misc_RNA (LOC729779), miscRNA.
780528	-1.635	down	CKS2	1164	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2, mRNA.
5960224	-1.636	down	PTTG3P	26255	pituitary tumor-transforming 3 (pseudogene), non-coding RNA.
4730196	-1.653	down	TK1	7083	thymidine kinase 1, soluble, mRNA.
1510296	-1.656	down	ASNS	440	asparagine synthetase, transcript variant 1, mRNA.
1190142	-1.657	down	EMILIN2	84034	elastin microfibril interfacier 2, mRNA.
1170170	-1.662	down	STC2	8614	stanniocalcin 2, mRNA.
2140128	-1.670	down	SCD	6319	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase), mRNA.
5360070	-1.674	down	CCNB2	9133	cyclin B2, mRNA.
3990619	-1.675	down	TOP2A	7153	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa, mRNA.
3780047	-1.679	down	GBP6	163351	guanylate binding protein family, member 6, mRNA.
2000148	-1.683	down	IFIT1	3434	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, transcript variant 2, mRNA.
2070494	-1.700	down	PRC1	9055	protein regulator of cytokinesis 1, transcript variant 2, mRNA.
10414	-1.704	down	PTTG1	9232	pituitary tumor-transforming 1, mRNA.
2940110	-1.720	down	UHRF1	29128	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, transcript variant 1, mRNA.
1510291	-1.733	down	PTTG1	9232	pituitary tumor-transforming 1, mRNA.
1780446	-1.739	down	PCK2	5106	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.
1660521	-1.745	down	SPRR2D	6703	small proline-rich protein 2D, mRNA.
730689	-1.763	down	LOC652595	652595	similar to U2 small nuclear ribonucleoprotein A (U2 snRNP-A) (LOC652595), mRNA.

5090754	-1.766	down	KIAA0101	9768	KIAA0101, transcript variant 1, mRNA.
5080139	-1.789	down	PRSS3	5646	protease, serine, 3 (mesotrypsin), mRNA.
3800452	-1.805	down	EMP3	2014	epithelial membrane protein 3, mRNA.
1230047	-1.810	down	CBS	875	cystathionine-beta-synthase, mRNA.
6370615	-1.858	down	TGM1	7051	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase), mRNA.
5310471	-1.894	down	UBE2C	11065	ubiquitin-conjugating enzyme E2C, transcript variant 6, mRNA.
7380719	-1.897	down	IGFBP6	3489	insulin-like growth factor binding protein 6, mRNA.
940327	-1.907	down	KLK13	26085	kallikrein-related peptidase 13, mRNA.
520195	-1.914	down	TMEM79	84283	transmembrane protein 79, mRNA.
4040398	-1.954	down	MAL	4118	mal, T-cell differentiation protein, transcript variant d, mRNA.
1990630	-1.979	down	TRIB3	57761	tribbles homolog 3 (Drosophila), mRNA.
430446	-1.996	down	KRT81	3887	keratin 81, mRNA.
4260368	-2.022	down	UBE2C	11065	ubiquitin-conjugating enzyme E2C, transcript variant 3, mRNA.
290767	-2.038	down	KRTDAP	388533	keratinocyte differentiation-associated protein, mRNA.
6520139	-2.046	down	FGFR3	2261	fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism), transcript variant 2, mRNA.
620102	-2.046	down	MALL	7851	mal, T-cell differentiation protein-like, mRNA.
5870653	-2.050	down	LOC651397	651397	misc_RNA (LOC651397), miscRNA.
4050398	-2.071	down	KLK12	43849	kallikrein-related peptidase 12, transcript variant 1, mRNA.
7330753	-2.102	down	ACAT2	39	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2, mRNA.
4900458	-2.147	down	KRT14	3861	keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner), mRNA.
540546	-2.283	down	KRT4	3851	keratin 4, mRNA.
1500010	-2.322	down	CDC20	991	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae), mRNA.
6550356	-2.430	down	SPRR2C	6702	small proline-rich protein 2C (pseudogene), non-coding RNA.
4850674	-2.452	down	PSAT1	29968	phosphoserine aminotransferase 1, transcript variant 2, mRNA.
5890400	-2.577	down	SPRR2E	6704	small proline-rich protein 2E, mRNA.
240086	-2.608	down	PHGDH	26227	phosphoglycerate dehydrogenase, mRNA.
7650441	-2.696	down	FGFBP1	9982	fibroblast growth factor binding protein 1, mRNA.
5810546	-2.894	down	SPRR2E	6704	small proline-rich protein 2E, mRNA.
7330184	-2.933	down	SPRR1A	6698	small proline-rich protein 1A, mRNA.
2230035	-2.936	down	KRT13	3860	keratin 13, transcript variant 2, mRNA.
4610131	-3.284	down	SPRR3	6707	small proline-rich protein 3, transcript variant 1, mRNA.

In rosso i geni up-regolati e in verde i geni down-regolati nelle cellule BE63/3 trattate con 100 nM rispetto alle cellule controllo.

Attraverso l'analisi di enrichment abbiamo compreso che i geni selezionati appartenevano a 44 pathway (Tabella 3) e 5 di queste erano coinvolte nella sintesi/metabolismo del collagene e nella regolazione dell'assemblaggio delle stress fiber. E' interessante notare che il connective tissue growth factor (CTGF) risulta un gene coinvolto in tutte queste pathway profibrotiche.

Table 3. Lista delle pathways regolate in maniera differente dopo 100 nM di EVE

PATHWAYS	Adj Pvalue	Associated Genes
Epidermis development	1.24E-06	ALOX15B, CTGF, FOXQ1, FZD6, KLK7, KRT14, RNASE1, SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1, TMEM79, TXNIP
Keratinization	5.22E-06	SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1, TMEM79
Negative regulation of cell division	2.58E-05	CDC20, FGFR3, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, RGCC, TXNIP, UBE2C
Negative regulation of mitotic nuclear division	2.81E-05	CDC20, FGFR3, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, RGCC, UBE2C
Keratinocyte differentiation	3.05E-05	ALOX15B, SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1, TMEM79, TXNIP
L-serine metabolic process	3.54E-05	CBS, PHGDH, PSAT1, SHMT2
Epidermal cell differentiation	9.21E-05	ALOX15B, RNASE1, SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1, TMEM79, TXNIP
L-serine biosynthetic process	9.75E-05	PHGDH, PSAT1, SHMT2
Negative regulation of nuclear division	1.10E-04	CDC20, FGFR3, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, RGCC, UBE2C
Skin development	1.82E-04	ALOX15B, FOXQ1, FZD6, SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1, TMEM79, TXNIP
Peptide cross-linking	2.05E-04	SPRR1A, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TGM1
Serine family amino acid biosynthetic process	3.55E-04	CBS, PHGDH, PSAT1, SHMT2
Regulation of collagen metabolic process	5.84E-04	CTGF, F2R, FAP, IL6, RGCC
Regulation of multicellular organismal metabolic process	6.51E-04	CTGF, F2R, FAP, IL6, RGCC
Steroid biosynthesis	6.77E-04	CYP24A1, DHCR7, EBP, MSMO1
Chromosome separation	0.00192	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, TOP2A, UBE2C
Negative regulation of mitotic sister chromatid separation	0.00199	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Collagen metabolic process	0.00200	COL12A1, CTGF, F2R, FAP, IL6, MMP12, RGCC
Negative regulation of mitotic sister chromatid segregation	0.00231	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Multicellular organismal macromolecule metabolic process	0.00248	COL12A1, CTGF, F2R, FAP, IL6, MMP12, RGCC

Negative regulation of sister chromatid segregation	0.00267	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Negative regulation of chromosome segregation	0.00267	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Regulation of nuclear division	0.00302	AURKA, CDC20, FGFR3, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, RGCC, UBE2C
Multicellular organismal metabolic process	0.00456	COL12A1, CTGF, F2R, FAP, IL6, MMP12, RGCC
Regulation of collagen biosynthetic process	0.00457	CTGF, F2R, IL6, RGCC
Mitotic sister chromatid separation	0.00664	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Regulation of mitotic sister chromatid segregation	0.00834	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Sister chromatid segregation	0.00851	CDC20, CEP55, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, TOP2A, UBE2C
Glycine, serine and threonine metabolism	0.00873	CBS, PHGDH, PSAT1, SHMT2
Collagen biosynthetic process	0.00873	CTGF, F2R, IL6, RGCC
Oocyte meiosis	0.01153	ADCY3, AURKA, CCNB2, CDC20, MAD2L1, PTTG1
Regulation of sister chromatid segregation	0.01277	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Negative regulation of chromosome organization	0.01396	ARTN, CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
PERK-mediated unfolded protein response	0.01404	ASNS, ATF3, HSPA5
Regulation of stress fiber assembly	0.01630	CTGF, RGCC, RNASE1
FoxO signaling pathway	0.01634	CCNB2, GABARAPL1, IL6, IRS2, PCK2, SGK1
Anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	0.01664	AURKA, CDC20, MAD2L1, PTTG1, UBE2C
Alpha-amino acid biosynthetic process	0.01664	ASNS, CBS, PHGDH, PSAT1, SHMT2
Positive regulation of collagen biosynthetic process	0.02234	CTGF, F2R, RGCC
Regulation of systemic arterial blood pressure by circulatory renin-angiotensin	0.02412	CPA4, F2R, MMP12
Positive regulation of multicellular organismal metabolic process	0.02412	CTGF, F2R, RGCC
Secondary alcohol biosynthetic process	0.02578	DHCR7, EBP, HMGCS1, MSMO1
Regulation of chromosome segregation	0.02590	CDC20, MAD2L1, PTTG1, PTTG3P, UBE2C
Negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	0.03145	CDC20, MAD2L1, UBE2C

In rosso i geni up-regolati e in verde i geni down-regolati nelle cellule BE63/3 trattate con 100 nM rispetto alle cellule controllo.

Bassi dosaggi di EVE (5 nM) erano invece in grado di modificare l'espressione genica di soli 33 probe set (corrispondenti a 24 geni): 25/33 probe set (20 geni) risultavano iperespressi e 4 probe set (4 geni) down-regolati dopo il trattamento (Tabella 4). Nessuna di queste pathway selezionate era associata con i processi profibrotici intracellulari (Tabella 5).

Tabella 4. Lista dei probe set espressi in maniera differente dopo trattamento con 5 nM di EVE.

Probe ID	Fold Change	Regulation	Symbol	Entrez Gene ID	Definition
2230035	7.508	up	KRT13	3860	keratin 13, transcript variant 2, mRNA.
6510754	3.841	up	ALDH1A1	216	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1, mRNA.
1070477	3.395	up	ALDH1A1	216	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1, mRNA.
540546	2.749	up	KRT4	3851	keratin 4, mRNA.
1990142	2.644	up	C20orf114	92747	chromosome 20 open reading frame 114, mRNA.
5900368	2.385	up	MSMB	4477	microseminoprotein, beta-, transcript variant PSP94, mRNA.
4610131	2.358	up	SPRR3	6707	small proline-rich protein 3, transcript variant 1, mRNA.
3190110	2.194	up	MSMB	4477	microseminoprotein, beta-, transcript variant PSP94, mRNA.
630315	2.151	up	DHRS9	10170	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9, transcript variant 1, mRNA.
5420577	2.149	up	CLCA4	22802	chloride channel, calcium activated, family member 4, mRNA.
5560369	2.107	up	ALDH3A1	218	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1, mRNA.
4150598	1.990	up	MSMB	4477	microseminoprotein, beta-, transcript variant PSP57, mRNA.
1820414	1.897	up	ATP12A	479	ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, nongastric, alpha polypeptide, mRNA.
3520709	1.888	up	ADH7	131	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide, mRNA.
7160468	1.807	up	DHRS9	10170	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9, transcript variant 1, mRNA.
5310646	1.795	up	AKR1B10	57016	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase), mRNA.
4250092	1.749	up	C10orf99	387695	chromosome 10 open reading frame 99, mRNA.
110372	1.748	up	CSTA	1475	cystatin A (stefin A), mRNA.
3710671	1.712	up	KRT15	3866	keratin 15, mRNA.
1770603	1.705	up	TCN1	6947	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family), mRNA.
6100537	1.655	up	FAM3D	131177	family with sequence similarity 3, member D, mRNA.
4540400	1.623	up	CYP4B1	1580	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1, transcript variant 2, mRNA.
2900050	1.611	up	GSTA1	2938	glutathione S-transferase alpha 1, mRNA.
1510170	1.565	up	NLRP2	55655	NLR family, pyrin domain containing 2, mRNA.
5820400	1.526	up	CYP4B1	1580	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1, mRNA.
130561	1.525	up	GSTA4	2941	glutathione S-transferase A4, mRNA.
3850246	1.513	up	HOPX	84525	HOP homeobox, transcript variant 3, mRNA.
7200612	-1.522	down	LOC730417	730417	hypothetical protein LOC730417, mRNA.
1510296	-1.556	down	ASNS	440	asparagine synthetase, transcript variant 1, mRNA.

3290390	-1.563	down	LOC729841	729841	misc_RNA, miscRNA.
7380193	-1.574	down	ARPC3	10094	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa, mRNA.
130717	-1.610	down	ARPC1B	10095	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa, mRNA.
430446	-1.689	down	KRT81	3887	keratin 81, mRNA.

In rosso i geni up-regolati e in verde i geni down-regolati nelle cellule BE63/3 trattate con 100 nM rispetto alle cellule controllo.

Tabella 5. Lista delle pathway deregolate dopo trattamento con 5 nM di EVE.

PATHWAYS	Adj Pvalue	Associated Genes Found
Retinol metabolism	8.58E-05	ADH7, ALDH1A1, DHRS9
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.48E-05	ADH7, ALDH3A1, GSTA1, GSTA4
Drug metabolism	1.37E-05	ADH7, ALDH3A1, GSTA1, GSTA4
Retinoid metabolic process	1.41E-05	ADH7, AKR1B10, ALDH1A1, DHRS9
Chemical carcinogenesis	1.96E-05	ADH7, ALDH3A1, GSTA1, GSTA4
Cellular aldehyde metabolic process	2.60E-05	ADH7, AKR1B10, ALDH1A1, ALDH3A1
Primary alcohol metabolic process	3.30E-06	ADH7, AKR1B10, ALDH1A1, DHRS9
Retinol metabolic process	1.99E-05	ADH7, ALDH1A1, DHRS9

In rosso i geni up-regolati e in verde i geni down-regolati nelle cellule BE63/3 trattate con 100 nM rispetto alle cellule controllo.

La principal component analysis (PCA) ed il volcano plot mostravano il grado di separazione delle cellule trattate rispetto alle non trattate ad entrambi i dosaggi di EVE (Figura 10).

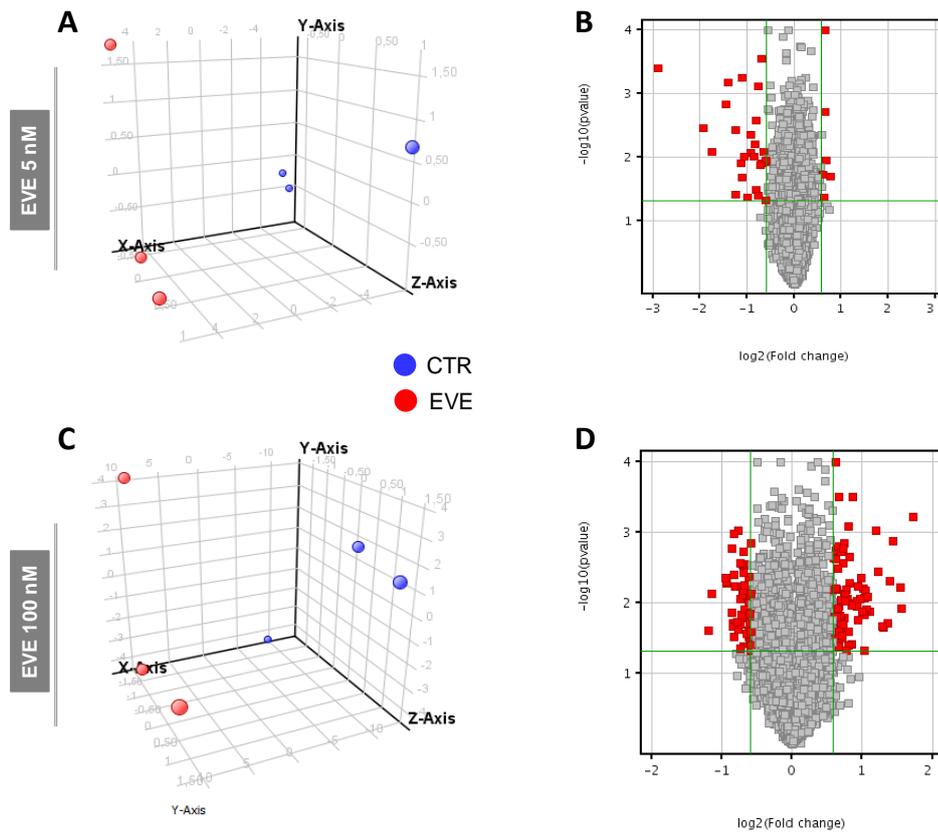


Figura 10. Principal Component Analysis (PCA) e Volcano Plot discriminano chiaramente le cellule BE63/3 trattate con EVE rispetto ai controlli. La PCA è stata eseguita usando il livello di espressione di tutti i geni differenzialmente espressi ottenuti dal profilo di espressione degli mRNA dopo trattamento con (A) 5 nM e (C) 100 nM EVE. Il volcano plot è basato sul fold change (Log_2) e p value ($-\text{Log}_{10}$) di tutti i geni identificati in BE63/3 dopo trattamento con (B) 5 nM e (D) 100 nM EVE

L'analisi del miRNoma ha identificato specifici microRNA deregolati dall'EVE.

Al fine di migliorare le nostre conoscenze riguardo i meccanismi alla base della EMT indotta dall'EVE e per identificare i possibili miRNA regolatori, abbiamo effettuato l'analisi del miRNoma mediante il kit miRNA Complete Labeling and Hybridization. L'analisi statistica ha identificato tre miRNAs up-regolati dopo elevati dosaggi di EVE (100 nM) (Tabella 6) e quattro dopo trattamento con EVE a basso dosaggio (5 nM) (Tabella 7). Fra questi miR-8485 era il miRNA maggiormente up-regolato (maggiore di 4 fold change per entrambi i trattamenti).

Tabella 6. Lista dei microRNAs deregolati dopo trattamento con 100 nM di EVE.

Systematic name	Regulation	Fold Change
hsa-miR-8485	up	5.372
hsa-miR-937-5p	up	1.787
hsa-miR-5194	up	1.694

Tabella 7. Lista dei microRNAs deregolati dopo trattamento con 5 nM di EVE.

Systematic Name	Regulation	Fold Change
hsa-miR-8485	up	9.183
hsa-miR-4730	up	2.900
hsa-miR-5194	up	2.732
hsa-miR-6716-3p	up	2.561

Incrociando l'analisi di espressione dei mRNA e del miRNA abbiamo identificato 31 geni che risultavano target specifici di tre miRNA identificati (Tabella 8).

Tabella 8. Sovrapposizione dei dati di trascrittoma e miRNoma

Cell Treatments	miRNA	Fold Change	mRNA target	Gene name
EVE 5 nM	miR-8485	9.183	CYP4B1	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1
	miR-5194	2.732	ARPC3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa
EVE 100 nM	miR-8485	5.372	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
			KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence
			UBL3	ubiquitin-like 3
			IRS2	insulin receptor substrate 2
			CTGF	connective tissue growth factor
			LBH	limb bud and heart development
			FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
			CDH6	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)
			CYBRD1	cytochrome b reductase 1
			LETMD1	LETM1 domain containing 1
			FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
			CPA4	carboxypeptidase A4
			AURKA	aurora kinase A
			CBS	cystathionine-beta-synthase
	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)		
	ADCY3	adenylate cyclase 3		
	TMEM79	transmembrane protein 79		
	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1		
	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1		
	PCDH7	protocadherin 7		
	miR-937-5p	1.787	CDH6	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)
			KIAA0101	KIAA0101
			EMILIN2	elastin microfibril interfacier 2
	miR-5194	1.694	KLHL24	kelch-like family member 24
			FAP	fibroblast activation protein, alpha
			LBH	limb bud and heart development
			PIM1	pim-1 oncogene
			FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
			LETMD1	LETM1 domain containing 1
			FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
			KIAA0101	KIAA0101
			RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
ARTN			artemin	
IGFBP6			insulin-like growth factor binding protein 6	
LCP1			lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	
MALL			small integral membrane protein 5	
SCD			LSM14B, SCD6 homolog B (S. cerevisiae)	
IFIT1			interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	

In rosso i geni up-regolati e in verde i geni down-regolati nelle cellule BE63/3 trattate con 100 nM rispetto alle cellule controllo.

L'analisi di espressione genica e proteica per la Metalloproteinasi di Matrice 12 (MMP12) e il fattore di crescita tissutale (CTGF) hanno validato i risultati di trascrittomica.

Allo scopo di validare i risultati ottenuti mediante microarray, abbiamo misurato con la real-time PCR il livello di espressione dei geni MMP12 e CTGF. Entrambi i geni risultavano up-regolati dopo trattamento con 100 nM di EVE. Al contrario il basso dosaggio di EVE non induceva alcun effetto (Figura 11A-B). Inoltre l'analisi dei livelli proteici di questa proteina mediante western blot ha confermato i risultati di espressione genica (Figura 11C e D).

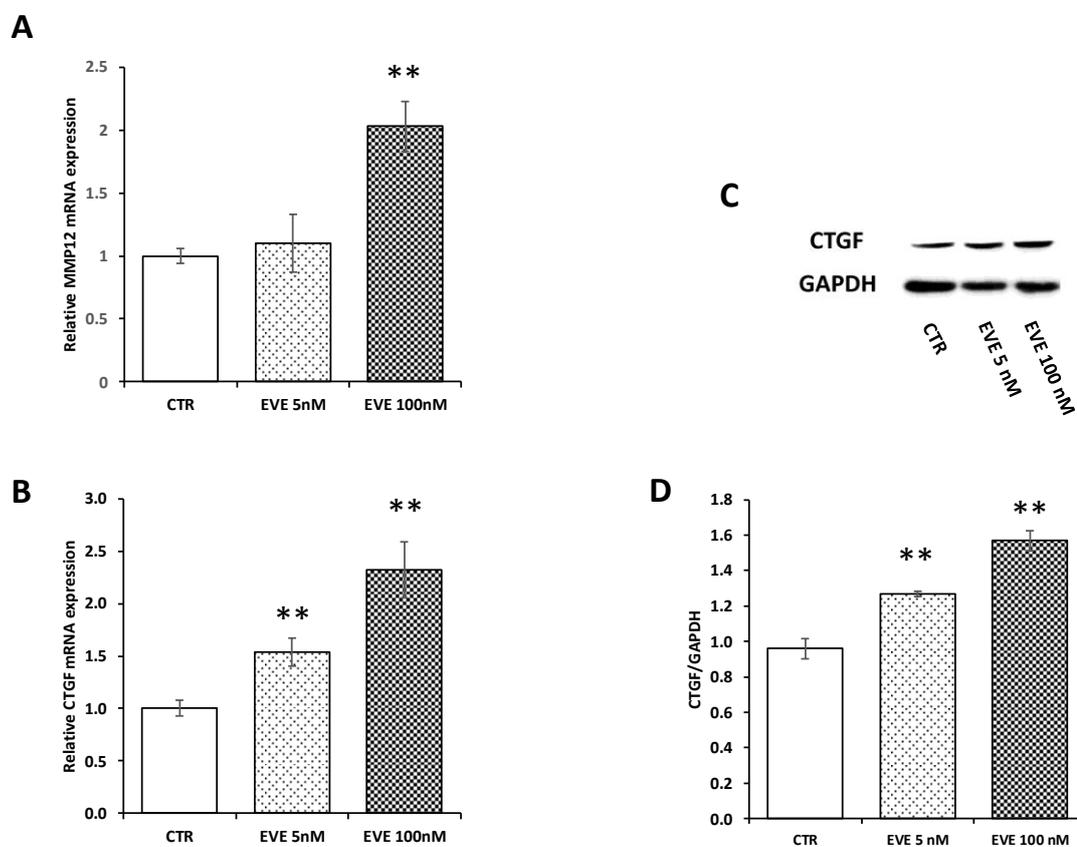


Figura 11. Espressione genica di MMP12 e CTGF. I livelli di mRNA di (A) MMP12 e (B) CTGF valutati mediante real-time PCR nelle cellule trattate con EVE (5 e 100 nM). I dati sono stati normalizzati con l'espressione di GAPDH. La media \pm D.S. di due esperimenti separati eseguiti in triplicato: ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs. CTR. (C) Western blotting per il CTGF. (D) L'istogramma rappresenta la media \pm D.S. dei livelli proteici di CTGF.

Alte dosi di EVE inducevano un aumento dei livelli di CTGF e collagene I in fibroblasti e cellule stellate epatiche.

Al fine di validare l'effetto pro-fibrotico di alte dosi di EVE abbiamo misurato il livello di espressione del collagene I e del CTGF in una linea di fibroblasti embrionali murini (NIH/3T3) e in un'altra linea di cellule primarie (stellate epatiche) trattate con l'mTOR-I.

Anche in queste linee cellulari le alte dosi del farmaco up-regolavano i livelli proteici di collagene e CTGF (Figure 12 e 13).

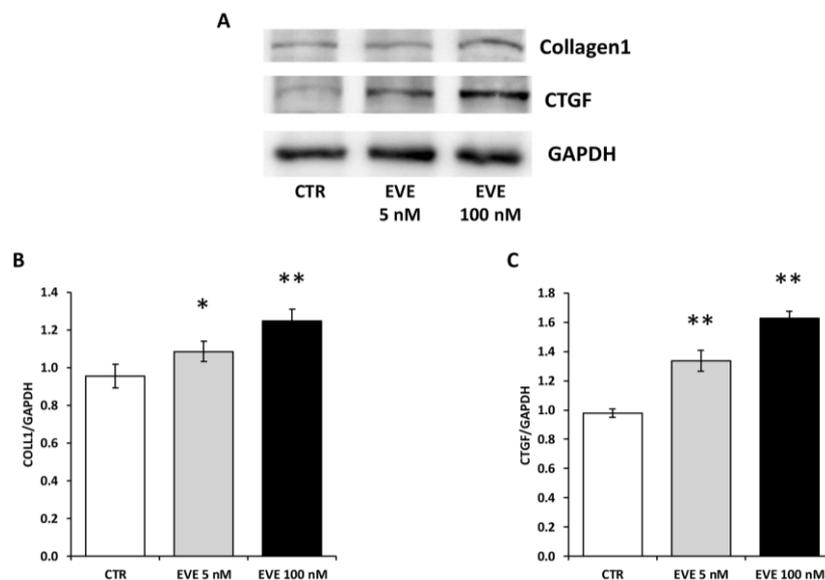


Figura 12. Livelli proteici di collagene 1 e CTGF in NIH/3T3. (A) Immagine rappresentativa di un western blot per collagene1 e CTGF. Gli istogrammi rappresentano la media±D.S. dei livelli proteici di (B) collagene1 e (C) CTGF normalizzati al GAPDH. **p<0.001, *p<0.05 vs. CTR.

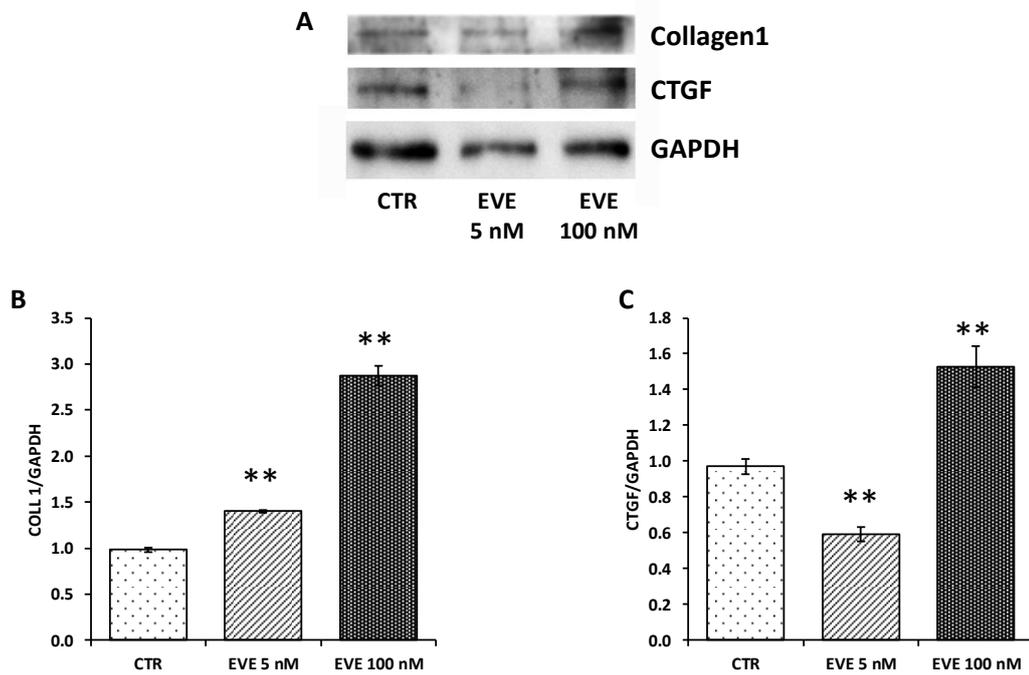


Figura 13. Livelli proteici di collagene 1 e CTGF in cellule stellate epatiche. (A) Immagine rappresentativa di un western blot per collagene1 e CTGF. Gli istogrammi rappresentano la media \pm D.S. dei livelli proteici di (B) collagene1 e (C) CTGF normalizzati al GAPDH. ** $p < 0.001$ vs. CTR.

DISCUSSIONE

La fibrosi polmonare è un grave evento avverso correlato all'uso di mTOR-I nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo o a chemioterapia.

La correlazione fra comparsa di fibrosi polmonare e somministrazione di mTOR-I deve essere fortemente sospettata in presenza di queste tre condizioni:

- 1) Esposizione a mTOR-I prima della comparsa di sintomatologia polmonare;
- 2) Esclusione di malattie polmonari infettive o di altra natura, compresa la tossicità dovuta ad altri farmaci;
- 3) Risoluzione della sintomatologia dopo la sospensione o riduzione della posologia del farmaco.

L'esistenza di un effetto dose dipendente è confermato dalla comparsa di questa complicanza soprattutto nei pazienti sottoposti ad alti dosaggi di mTOR-I.

Le manifestazioni polmonari nei pazienti con questa condizione avversa sono svariate: emorragia alveolare diffusa, proteinosi alveolare polmonare, fibrosi polmonare focale, polmonite interstiziale linfocitica, bronchiolite obliterante con polmonite organizzata^{60,61,66,67}.

La presenza di questi quadri clinici così eterogenei determina spesso la sospensione del farmaco, richiede valutazioni cliniche accurate con inizio di terapie specifiche e spesso dispendiose (antibiotici, corticosteroidi, farmaci immunosoppressivi)⁵⁷, e il coinvolgimento di team multidisciplinari (pneumologi, infettivologi, nefrologi).

Il meccanismo eziopatogenetico associato alla tossicità polmonare da mTOR-I non è ancora del tutto chiaro; a questo scopo sono stati condotti diversi studi *in vivo* e *in vitro*. Fra i vari possibili meccanismi coinvolti è stata ipotizzata una risposta autoimmune T-cellulare deregolata e scatenata dall'esposizione di antigeni criptogenici polmonari, che porterebbero alla comparsa di alveolite emorragica e polmonite interstiziale⁵⁸.

Inoltre una risposta di ipersensibilità di tipo ritardato⁶¹ o un processo infiammatorio polmonare conseguente ad una diretta stimolazione delle cellule dell'immunità innata a produrre citochine proinfiammatorie^{96,97} sembra avere un

ruolo chiave nella genesi e mantenimento del processo pro-fibrotico parenchimale.

Ussavarungsi e coll., hanno recentemente riportato un quadro di infiammazione interstiziale di tipo granulomatoso associata all'uso di Sirolimus e suggerivano l'esistenza in questa tipologia di paziente di un meccanismo di ipersensibilità mediata dalle cellule T in risposta ad antigeni circolanti o a complessi immuni nel polmone⁹⁸.

Inoltre altri autori hanno sottolineato il ruolo patogenetico chiave della transizione epitelio mesenchimale (EMT) indotta da alte dosi di EVE delle cellule bronchiali nello sviluppo di questi eventi avversi⁶⁹⁻⁷².

Allo scopo di migliorare ulteriormente la comprensione di questi meccanismi patogenetici abbiamo deciso di utilizzare per la prima volta tecnologie innovative che ci permettessero di identificare rapidamente nuovi elementi biologici/cellulari coinvolti nel meccanismo profibrotico indotto dalle alte dosi di everolimus.

In particolare i nostri dati evidenziavano che l'EVE a 100 nM (alte dosi) determina una significativa up regolazione dei ben noti marcatori mesenchimali (α -SMA, vimentina, fibronectina) e una riduzione della resistenza transepiteliale così come il TGF- β . Infine questo dosaggio era in grado di modificare significativamente l'espressione di 125 geni (47 iperespressi e 78 sotto-regolati). Tra questi vi erano importanti regolatori della pathway del collagene e induttori di fibrosi tissutale.

Inoltre, alcuni dei geni selezionati erano target specifici del miR-8485, il miRNA più significativamente up-regolato dall'Everolimus a 100 nM.

Altri due miRNAs risultavano deregolati: miR-937-5p e miR-5194.

Ad eccezione del miR-8485 nessuno di questi miRNA è mai stato associato allo sviluppo della fibrosi o comunque implicato nella regolazione di geni coinvolti in questo processo.

Nonostante l'importanza di questi risultati è indiscutibile che in futuro saranno sicuramente necessari altri studi per confermare il coinvolgimento di questi miRNAs nella transizione epitelio mesenchimale indotta dagli mTOR-I e comprenderne il ruolo funzionale.

Tutti i miRNA identificati risultavano up-regolati a dimostrare un possibile ruolo come induttori del processo fibrotico e questo sembrerebbe essere in linea con le recenti evidenze della letteratura. Dati recenti, infatti, sottolineano che la down regolazione mediata dai miRNA non è un fenomeno a senso unico e che alcuni miRNA potrebbero aumentare l'espressione genica in specifiche serie cellulari in determinate condizioni^{99,100}.

Di particolare interesse è stata l'identificazione, attraverso entrambe le tecnologie high-throughput (confrontate con i test di validazione) della iper-espressione del connective tissue growth factor (CTGF), una proteina secreta nell'ambiente extracellulare che interagisce con diversi recettori cellulari di superficie, fattori di crescita e matrice extracellulare^{101,102}.

E' noto che il CTGF regola l'attività del TGF- β e del vascular endothelial growth factor (VEGF) con conseguenti effetti profibrotici e angiogenici¹⁰³⁻¹⁰⁶. Topi transgenici over-esprimenti il CTGF nei fibroblasti presentavano un quadro polmonare simile a quello presente in pazienti affetti da fibrosi polmonare senza però coinvolgere la pathway canonica del TGF- β ¹⁰⁷. Diversi lavori hanno dimostrato un'induzione dose correlata da parte degli mTOR-I sul CTGF a livello di mRNA e a livello proteico sia *in vitro* che *in vivo*¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Inoltre Xu e coll., hanno dimostrato che la Rapamicina esercita un effetto profibrotico a livello delle cellule epiteliali polmonari così come a livello dei fibroblasti polmonari attraverso l'up-regolazione del CTGF mediante la pathway PI3K/AKT^{109,110}.

Mikaelian e coll., poi, utilizzando un approccio combinato farmacologico e con RNAi hanno dimostrato che l'inibizione di mTOR era in grado di indurre la EMT nelle cellule epiteliali di mammifero attraverso un meccanismo TGF- β indipendente¹¹².

Nel contesto dei trapianti è stato riportato un effetto sinergico pro-fibrotico del Sirolimus con la Ciclosporina a livello renale anch'esso mediato dall'up-regolazione del CTGF^{113,114}.

Un altro gene iper-espresso dall'EVE, identificato mediante microarray e confermato con la RT-PCR, era la Metalloproteinasi 12 (MMP12), un membro della famiglia delle endopeptidasi zinco dipendenti responsabili della proteolisi di

tutte le componenti della matrice extracellulare^{115,116}. Questa proteasi sembra svolgere la propria funzione degradando il collagene e altri filamenti extracellulari, alterando la struttura di citochine, fattori di crescita e loro recettori. Inoltre è stato ampiamente descritto che MMP12 ha un ruolo centrale nella fibrosi polmonare mediata dal TGF- β ^{117,118}.

Altri geni identificati con l'analisi trascrittomiche e, contemporaneamente, target del miR-8485 (Tabella 7) erano il Kallman syndrome -1 -gene (KAL1, fold change: 1.705), Limb-bud and heart (LBH, fold change: 1.808) e insulin receptor substrates 2 (IRS2, fold change: 1.656) che risultavano up-regolati dopo trattamento con 100 nM di EVE e Protocadherin 7 (PCDH7, fold change: -1.625) down-regolata con le stesse dosi di EVE. Tutti questi geni sono stati descritti in letteratura come direttamente o indirettamente coinvolti nell'EMT.

KAL1, anche detto anosmi-1, codifica per una proteina coinvolta nella matrice extracellulare con un ruolo importante nell'adesione cellulare indotta dal TGF- β ^{119,120}.

L'espressione di IRS2 sembra sopprimere l'espressione della E-caderina¹²¹, che è un marcatore epiteliale deregolato durante l'EMT.

LBH è un cofattore di trascrizione con funzione sia di attivatore che di corepressore.

LBH è un gene target del Wnt/ β -catenina ed è indotto dal TGF- β ^{122,123}. Il pathway di Wnt/ β -catenina viene attivato nelle cellule durante l'EMT¹²⁴ ed è stato osservato essere attivato anche nelle cellule trattate con mTOR-I.

PCDH7 codifica per una proteina integrale di membrana che riveste un ruolo importante per il riconoscimento cellula-cellula e per l'adesione. Una down-regolazione di questi geni si associa all'inibizione della E-caderina¹²⁵.

Tutti questi risultati sebbene interessanti dal punto di vista biologico, necessitano di essere validati *in vivo*. Infatti, il nostro studio può essere considerato "hypothesis generating" ed essere un punto di partenza per studi biomolecolari che coinvolgono un'ampia coorte di pazienti trapiantati o differenti modelli animali.

CONCLUSIONI

I nostri risultati, nel loro insieme, suggeriscono che alte dosi di EVE, attraverso l'attivazione di processi biologico-cellulari multifattoriali, sono in grado di indurre la fibrosi polmonare.

Solo alcuni degli elementi identificati è stato precedentemente riportato dalla letteratura. Invece, restano da validare molti dei potenziali nuovi marcatori patogenetici e diagnostici che potrebbero rivelarsi utili target farmacologici da introdurre nella pratica clinica quotidiana.

Infine, appare evidente la necessità, da parte dei clinici, di utilizzare dosi più basse possibili di mTOR-I e di minimizzarle sempre nei pazienti con iniziali segni di tossicità polmonare.

BIBLIOGRAFIA

1. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(11):868-80
2. Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012, 149, 274–293.
3. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
4. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 2008 Jul 23;27(14):1932-43
5. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 2008 Dec 15;416(3):375-85
6. Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 2008 Jul 23;27(14):1919-31
7. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003 Aug 1;17(15):1829-34
8. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.* 2003 Aug 5;13(15):1259-68.
9. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):21-35.

10. Zaza G, Granata S, Caletti C, Signorini L, Stallone G, Lupo A. mTOR Inhibition Role in Cellular Mechanisms. *Transplantation*. 2018 Feb;102(2S Suppl 1):S3-S16.
11. Vézina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28, 721–726 (1975).
12. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* 2003 May;35(3 Suppl):7S-14S.
13. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin. Pharmacokinet.* 2004, 43, 83–95.
14. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):163-75.
15. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006;22:159–168.
16. Morath, C.; Arns, W.; Schwenger, V.; Mehrabi, A.; Fonouni, H.; Schmidt, J.; Zeier, M. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007, 22 (Suppl. 8), viii61–viii65.
17. Paoletti, E.; Ratto, E.; Bellino, D.; Marsano, L.; Cassottana, P.; Cannella, G. Effect of early conversion from CNI to sirolimus on outcomes in kidney transplant recipients with allograft dysfunction. *J. Nephrol.* 2012, 25, 709–718.
18. Schena, F.P.; Pascoe, M.D.; Alberu, J.; del Carmen Rial, M.; Oberbauer, R.; Brennan, D.C.; Campistol, J.M.; Racusen, L.; Polinsky, M.S.; Goldberg-Alberts, R.; et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009, 87, 233–242.

19. Trinh XB, Tjalma WA, Vermeulen PB, Van den Eynden G, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Helleman J, Berns EM, Dirix LY, van Dam PA. The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2009 Mar 24;100(6):971-8.
20. Samad N, Younes A. Temsirolimus in the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Onco Targets Ther*. 2010;3:167–178.
21. Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, et al. FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist*. 2010;15:428–435.
22. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):8023-32
23. Liu Q, Wang J, Kang SA, et al. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *J Med Chem*. 2011;54:1473–1480.
24. Feldman ME, Apse B, Uotila A, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 2009;7:e38.
25. García-Martínez JM, Moran J, Clarke RG, et al. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*. 2009;421:29–42.
26. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*. 2010;70:288–298.
27. Zask A, Verheijen JC, Curran K, et al. ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin: design and synthesis of highly potent and selective pyrazolopyrimidines. *J Med Chem*. 2009;52:5013–5016

28. Rosborough BR, Raich-Regué D, Liu Q, Venkataramanan R, Turnquist HR, Thomson AW. Adenosine triphosphate-competitive mTOR inhibitors: a new class of immunosuppressive agents that inhibit allograft rejection. *Am J Transplant*. 2014 Sep;14(9):2173-80
29. Chapman JR, Valantine H, Albanell J, Arns WA, Campistol JM, Eisen H, Frigerio M, Lehmkuhl H, Marcen R, Morris R, Nashan B, Pascual J, Pohanka E, Segovia J, Zuckermann A. Proliferation signal inhibitors in transplantation: questions at the cutting edge of everolimus therapy. *Transplant Proceedings* 2007; 39:2937-2950.
30. Zimmerman JJ, Harper D, Getsy J, Jusko WJ. Pharmacokinetic interactions between sirolimus and microemulsion cyclosporine when orally administered jointly and 4 hours apart in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(10):1168-76.
31. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31:335-340.
32. Cen P, Amato RJ. Treatment of advanced pancreatic neuroendocrine tumors: potential role of everolimus. *Onco Targets Ther*. 2012; 5:217-224.
33. Kwiatkowski DJ. Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Ann Hum Genet*. 2003; 67(Pt 1):87-96
34. Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*. 2011; 121(4):1231-1241.
35. Gutiérrez-Dalmau A, Campistol JM. The role of proliferation signal inhibitors in post-transplant malignancies. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22 Suppl 1:i11-6.
36. Zaza G, Granata S, Tomei P, Masola V, Gambaro G, Lupo A. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *J Nephrol*. 2014 Oct;27(5):495-506.

37. Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:403280
38. Caletti C, Granata S, Tomei P, Lupo A, Zaza G. Extra-renal adverse effects of mTOR inhibitors: know them to optimize their use in renal transplantation. *Giornale italiano di nefrologia*;Vol.31,Issue4. 2014 Jul-Aug.
39. Fuller TF, Freise CE, Serkova N, Niemann CU, Olson JL, Feng S. Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003;76:1594-1599.
40. Diekmann F, Andres A, Oppenheimer F. mTOR inhibitor-associated proteinuria in kidney transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando)* 2012;26(1):27-9
41. Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR, Gökden N. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis.* 2003;42(1):202-6.
42. Sofroniadou S, Goldsmith D. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: potential uses and a review of haematological adverse effects. *Drug Saf.* 2011; 34(2):97-115.
43. Mahe E, Morelon E, Lechaton S, et al. Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation.* 2005; 79:476-482.
44. van Gelder T, ter Meulen CG, Hené R, et al. Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation.* 2003; 75(6):788-791.
45. Brattstrom C; Wilczek H; Tyden G et al. Hyperlipidemia in renal transplant recipients treated with Sirolimus (rapamycin). *Transplantation* 1998; 65:1272-1274.
46. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008; 8(7):1384-1392.

47. Fritsche L, Budde K, Dragun D, Einecke G, Diekmann F, Neumayer HH. Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients. *Am J Transplant*. 2004; 4(1):130-131.
48. Lee S, Coco M, Greenstein SM, Schechner RS, Tellis VA, Glicklich DG. The effect of sirolimus on sex hormone levels of male renal transplant recipients. *Clin Transplant*. 2005; 19(2):162-167.
49. Bererhi L, Flamant M, Martinez F, Karras A, Thervet E, Legendre C. Rapamycin-induced oligospermia. *Transplantation* 2003; 76: 885–886.
50. Zuber J, Anglicheau D, Elie C et al. Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008; 8(7):1471-1479.
51. Nair R, Huang X, Shorthouse R et al. Antiproliferative effect of rapamycin on growth factor-stimulated human adult lung fibroblasts in vitro may explain its superior efficacy for prevention and treatment of allograft obliterative airway disease in vivo. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2):614-615
52. Valente J, Hricik D, Weigel K et al. Comparison of sirolimus versus mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 1128.
53. Dean PG, Lund WJ, Larson TS et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004; 77: 1555.
54. West ML. Bronchiolitis obliterans and organizing pneumonia in renal transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:1531.
55. Feagans J, Victor D, Moehlen M, Florman SS, Regenstein F, Balart LA, Joshi S, Killackey MT, Slakey DP, Paramesh AS. Interstitial pneumonitis in the transplant patient: consider sirolimus-associated pulmonary toxicity. *J La State Med Soc* 2009;161:166–72

56. Molas-Ferrer G, Soy-Muner D, Anglada-Martínez H, Riu-Viladoms G, Estefanell-Tejero A, Ribas-Sala J. Interstitial pneumonitis as an adverse reaction to mTOR inhibitors. *Nefrologia*. 2013;33(3):297-300.
57. Lopez P, Kohler S, Dimri S. Interstitial Lung Disease Associated with mTOR Inhibitors in Solid Organ Transplant Recipients: Results from a Large Phase III Clinical Trial Program of Everolimus and Review of the Literature. *J Transplant*. 2014;2014:305931.
58. Morelon E, Stern M, Israël-Biet D, Correas JM, Danel C, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H. Characteristics of sirolimus-associated interstitial pneumonitis in renal transplant patients. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):787-90
59. Mahalati K. Bronchiolitis obliterans and organizing pneumonia in renal transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69: 1531.
60. Champion L, Stern M, Israël-Biet D, Mamzer-Bruneel M-F, Peraldi M-N, Kreis H, Porcher R, Morelon E. Sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Ann Intern Med* 2006;144:505–509.
61. Pham PT, Pham PC, Danovitch GM, Ross DJ, Gritsch HA, Kendrick EA, Singer J, Shah T, Wilkinson AH. Sirolimus-associated pulmonary toxicity. *Transplantation*. 2004 Apr 27;77(8):1215-20.
62. Weiner SM, Sellin L, Vonend O, Schenker P, Buchner NJ, Flecken M, Viebahn R, Rump LC. Pneumonitis associated with sirolimus: clinical characteristics, risk factors and outcome--a single-centre experience and review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Dec;22(12):3631-7
63. Rodríguez-Moreno A, Ridao N, García-Ledesma P, Calvo N, Pérez-Flores I, Marques M, Barrientos A, Sánchez-Fructuoso AI. Sirolimus and everolimus induced pneumonitis in adult renal allograft recipients: experience in a center. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug;41(6):2163-5.

64. Errasti P, Izquierdo D, Martín P, Errasti M, Slon F, Romero A, Lavilla FJ. Pneumonitis associated with mammalian target of rapamycin inhibitors in renal transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2010 Oct;42(8):3053-4.
65. Alexandru S, Ortiz A, Baldovi S, Milicua JM, Ruíz-Escribano E, Egido J, Plaza JJ. Severe everolimus-associated pneumonitis in a renal transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Oct;23(10):3353-5.
66. Vandewiele B, Vandecasteele SJ, Vanwalleghem L, De Vriese AS. Diffuse alveolar hemorrhage induced by everolimus. *Chest.* 2010 Feb;137(2):456-9.
67. Vlahakis NE, Rickman OB, Morgenthaler T. Sirolimus-associated diffuse alveolar hemorrhage. *Mayo Clin Proc.* 2004 Apr;79(4):541-5.
68. Kirby S, Satoskar A, Brodsky S, Pope-Harman A, Nunley D, Hitchcock C, Pelletier R, Ross P, Nadasdy T, Shilo K. Histological spectrum of pulmonary manifestations in kidney transplant recipients on sirolimus inclusive immunosuppressive regimens. *Diagn Pathol.* 2012 Mar 14;7:25
69. Kage H, Borok Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Curr Opin Pulm Med.* 2012;18(5):517-23.
70. Horowitz JC, Thannickal VJ. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006 Dec;27(6):600-12.
71. Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest.* 2009 Nov;136(5):1364-1370
72. Felton VM, Inge LJ, Willis BC, Bremner RM, Smith MA. Immunosuppression-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition: a potential contributor to obliterative bronchiolitis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Feb;141(2):523-30.
73. Kalluri R, Weinberg A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1; 119(6): 1420–1428.

74. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb; 7(2):131-42.
75. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest.* 2011 Feb; 121(2): 468-74.
76. Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O, Thickett DR. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax.* 2014 Aug;69(8):760-5.
77. Masola V, Zaza G, Granata S, Gambaro G, Onisto M, Lupo A. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition in immortalized human renal proximal tubular epithelial cells: key role of heparanase. *J Transl Med.* 2013 Nov 20;11:292
78. Masola V, Carraro A, Zaza G, Bellin G, Montin U, Violi P, Lupo A, Tedeschi U. Epithelial to mesenchymal transition in the liver field: the double face of Everolimus in vitro. *BMC Gastroenterol.* 2015 Sep 14;15:118
79. Tomei P, Masola V, Granata S, Bellin G, Carratù P, Ficial M, Ventura VA, Onisto M, Resta O, Gambaro G, Chilosi M, Lupo A, Zaza G. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation. *J Nephrol.* 2016 Dec;29(6):881-891
80. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, Doughty CA, Barys L, Maira SM, et al. Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(4):742-53.
81. Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene.* 2007;26(13):1932-40.
82. Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell.* 2007;12(4):487-502.

83. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(21):5856-64.
84. Gorreta F, Carbone W, Barzagli D. Genomic profiling: cDNA arrays and oligoarrays. *Methods Mol Biol.* 2012; 823:89-105.
85. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297.
86. Chang TC, Mendell JT. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:215–239.
87. Nelson KM, Weiss GJ. MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3655–3660
88. Xu P, Guo M, Hay BA. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet* 2004;20:617–624.
89. Karp X, Ambros V. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 2005;310:1288–1289.
90. Cano A, Nieto MA. Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol.* 2008;18(8):357–9.
91. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27:5848–5856.
92. Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, et al. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009;23:221–232.
93. Shukla P, Vogl C, Wallner B, Rigler D, Müller M, Macho-Maschler S. High-throughput mRNA and miRNA profiling of epithelial-mesenchymal transition in MDCK cells. *BMC Genomics.* 2015 Nov 16;16:944

94. Galiotta LJ, Lantero S, Gazzolo A, Sacco O, Romano L, Rossi GA, Zegarra-Moran O. An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Jun;34(6):478-81.
95. Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2004;10:610-3
96. Cravedi P, Ruggenti P, Remuzzi G. Sirolimus for calcineurin inhibitors in organ transplantation: contra. *Kidney Int* 2010;78:1068-74.
97. Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenächer K, Mages J, Haas T, Krug A, Janssen KP, Kirschning CJ, Wagner H. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol* 2008;38:2981-92.
98. Ussavarungsi K, Elsanjak A, Laski M, Raj R, Nugent K. Sirolimus induced granulomatous interstitial pneumonitis. *Respir Med Case Rep.* 2012 Nov 7;7:8-11
99. Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1105-18.
100. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics.* 2014;2014:970607
101. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999;13:1774-86.
102. Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors.* 2009 Mar-Apr;35(2):200-8.
103. Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J.* 2001 Jun;17(6):1220-7.

104. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Jun 6;5(Suppl 1):S24
105. Grotendorst, GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep;8(3):171-9.
106. Nishida T, Kondo S, Maeda A, Kubota S, Lyons KM, Takigawa M. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/ CTGF) regulates the expression of Vegf through Hif-1alpha expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition. *Bone*. 2009 Jan;44(1):24-31.
107. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, Leask A, Abraham D, Bou-Gharios G, de Crombrughe B. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010 May;62(5):1523-32
108. Balah A, Ezzate O. The mTOR inhibitor rapamycin induces CTGF and TIMP-1 expression in rat kidney: implication of TGF-b/SMAD signaling cascade. *Eur J Pharm Med Res*. 2017;4(11):49-56
108. Xu X, Dai H, Geng J, Wan X, Huang X, Li F, Jiang D, Wang C. Rapamycin increases CCN2 expression of lung fibroblasts via phosphoinositide 3-kinase. *Lab Invest*. 2015 Aug;95(8):846-59
110. Xu X, Wan X, Geng J, Li F, Yang T, Dai H. Rapamycin regulates connective tissue growth factor expression of lung epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Sep;238(9):1082-94.
111. Finckenberg P, Inkinen K, Ahonen J, Merasto S, Louhelainen M, Vapaatalo H, Müller D, Ganten D, Luft F, Mervaala E. Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am J Pathol*. 2003 Jul;163(1):355-66.

112. Mikaelian I, Malek M, Gadet R, Viallet J, Garcia A, Girard-Gagnepain A, Hesling C, Gillet G, Gonzalo P, Rimokh R, Billaud M. Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- β -independent mechanism. *Cancer Res.* 2013;73(22):6621-31
113. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Effect of cyclosporine and sirolimus on the expression of connective tissue growth factor in rat experimental chronic nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2006;26(4):400-7.
114. O'Connell S, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Sirolimus enhances cyclosporine a-induced cytotoxicity in human renal glomerular mesangial cells. *J Transplant.* 2012;2012:980910.
115. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Mar;292(3):F905-11.
116. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):617-29
117. Matute-Bello G, Wurfel MM, Lee JS, Park DR, Frevert CW, Madtes DK, Shapiro SD, Martin TR. Essential role of MMP-12 in Fas-induced lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(2):210–21.
118. Kang HR, Cho SJ, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7723–7732.
119. Tanaka Y, Kanda M, Sugimoto H, Shimizu D, Sueoka S, Takami H, Ezaka K, Hashimoto R, Okamura Y, Iwata N, Tanaka C, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Nomoto S, Fujiwara M, Kodera Y. Translational implication of Kallmann syndrome-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2015;46(6):2546-54.

120. Raju R, Jian B, Hooks JJ, Nagineni CN. Transforming growth factor- β regulates the expression of anosmin (KAL-1) in human retinal pigment epithelial cells. *Cytokine*. 2013 Mar;61(3):724-7
121. Carew RM, Browne MB, Hickey FB, Brazil DP. Insulin receptor substrate 2 and FoxO3a signalling are involved in E-cadherin expression and transforming growth factor- β 1-induced repression in kidney epithelial cells. *FEBS J*. 2011 Sep;278(18):3370-80
122. Rieger ME, Sims AH, Coats ER, Clarke RB, Briegel KJ. The embryonic transcription cofactor LBH is a direct target of the Wnt signaling pathway in epithelial development and in aggressive basal subtype breast cancers. *Mol Cell Biol*. 2010 Sep;30(17):4267-79
123. Liu Q, Guan X, Lv J, Li X, Wang Y, Li L. Limb-bud and Heart (LBH) functions as a tumor suppressor of nasopharyngeal carcinoma by inducing G1/S cell cycle arrest. *Sci Rep*. 2015 Jan 5;5:7626
124. Lam AP, Flozak AS, Russell S, Wei J, Jain M, Mutlu GM, Budinger GR, Feghali-Bostwick CA, Varga J, Gottardi CJ. Nuclear β -catenin is increased in systemic sclerosis pulmonary fibrosis and promotes lung fibroblast migration and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Nov;45(5):915-22
125. Chen HF, Ma RR, He JY, Zhang H, Liu XL, Guo XY, Gao P. Protocadherin 7 inhibits cell migration and invasion through E-cadherin in gastric cancer. *Tumour Biol*. 2017 Apr;39(4):1010428317697551.

Elenco pubblicazioni dott.ssa Paola Tomei nel triennio di dottorato

1. Granata S, Santoro G, Masola V, **Tomei P**, Sallustio F, Pontrelli P, Accetturo M, Antonucci N, Carratù P, Lupo A, Zaza G. In vitro identification of new transcriptomic and mirnomic profiles associated with pulmonary fibrosis induced by high doses everolimus: looking for new pathogenetic marker and therapeutic targets. *In sottomissione e revisione a rivista internazionale*.
2. **Tomei P**, Masola V, Granata S, Bellin G, Carratù P, Ficial M, Ventura VA, Onisto M, resta O, gambaro G, Chilosi M, Lupo A, Zaza G. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation. *J Nephrol*. 2016 Dec; 29 (6):881-891.
3. Granata S, Dalla Gassa A, **Tomei P**, Lupo A, Zaza G. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2015 Nov 25;12:49.
4. Caletti C, Granata S, **Tomei P**, Dalla Gassa A, Lupo A, Zaza G. Pharmacogenetics: a promising tool to personalize immunosuppressive therapy in renal transplantation. *G Ital Nefrol*. 2015 May-jun;32(3)
5. Zaza G, Granata S, **Tomei P**, Dalla Gassa A, Lupo A. Personalization of the immunosuppressive treatment in renal transplant recipients: the great challenge in "omics" medicine. *Int J Mol Sci*. 2015 Feb 17;16(2):4281-305.
6. **Tomei P**, Zaza G, Granata S, Gatti D, Fraccarollo C, Gesualdo L, Boschiero L, Lupo A. Sclerostin and Dickkopf-1 in Post-menopausal Renal Allograft Recipients. *Transplant Proc*.2014.Sep;46(7):2241-6
7. Zaza G, Granata S, **Tomei P**, Masola V, Gambaro G, Lupo A. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *J Nephrol*. 2014 Oct;27(5):495-506.
8. Caletti C, Granata S, **Tomei P**, Lupo A, Zaza G. Extra-renal adverse effects of mTOR inhibitors: know them to optimize their use in renal transplantation. *Giornale italiano di nefrologia*;Vol.31,Issue4. 2014 Jul-Aug.
9. Zaza G, **Tomei P**, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Monoclonal antibody therapy and renal transplantation: focus on adverse effects. *Toxins (Basel)*. 2014 Feb 28;6(3):869-91.