



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**
XXXI Cycle — Academic Year 2018/2019

PhD Thesis in

**The Winnie-APCmin as an Innovative Tool to
Investigate the Axis Between
Inflammation and Colorectal Cancer**

Candidate/Matricola

Marcello Chieppa/8800700015

Supervisor

Prof. *Aldo Pinto*

PhD Program Coordinator: Prof. Dr. *Gianluca Sbardella*

ENGLISH SUMMARY

Nel corso dei tre anni di dottorato abbiamo incrociato le linee murine Winnie ed APC^{min} per ottenere la linea murina WinnieAPC^{min}. Dall'incrocio utilizzato per il breeding abbiamo ottenuto le 4 linee murine necessarie per la sperimentazione ed i controlli: WT (Winnie^{+/+} Apc^{min+/+}), Winnie (Winnie^{-/-} Apc^{min+/+}), APC^{min} (Winnie^{+/+} Apc^{min+/-}) e WinnieAPC^{min} (Winnie^{-/-} Apc^{min+/-}). La mutazione contemporanea del gene Winnie ed APC si dimostra compatibile con la vita.

Al momento dello svezzamento tutti i topi sono stati pesati dimostrando come la presenza del gene Winnie determini una diminuzione del peso già al momento dello svezzamento e che questo andamento si presenta anche nei topi caratterizzati dalla mutazione contemporanea del gene Winnie ed APC. Anche la misurazione della lunghezza del Colon, la cui riduzione è un simbolo di infiammazione in corso, indica come la mutazione Winnie influenzi lo stato infiammatorio della linea WinnieAPC^{min}.

Abbiamo quindi iniziato la caratterizzazione delle linee murine ottenute scegliendo di sacrificare i topi immediatamente dopo l'ottenimento del genotipo (5 settimane di età).

Questa strategia ci ha permesso di dimostrare che la predisposizione all'infiammazione cronica tipica del modello Winnie possa sinergizzare con la predisposizione al CRC e mostrare segni di neoplasia in età "pediatrica".

Dopo ogni sacrificio abbiamo isolato un tratto di circa 0.5cm dal tratto mediale del colon. Dal tessuto abbiamo estratto l'mRNA ed utilizzando le piastre di PCR quantitativa specifiche per neoplasie del colon retto dimostrando l'espressione di 91 geni legati alle neoplasie intestinali nei campioni provenienti dalla linea WinnieAPC^{min}.

Le feci dei topi sono state raccolte il giorno dello svezzamento e conservate a -80°C. Il sequenziamento del gene ribosomiale 16S rRNA (effettuato in service) ha evidenziato come il microbiota del modello WinnieAPC^{min} abbia caratteristiche comuni sia al Winnie che all'APC^{min}. La differenza più grande è stata riscontrata nell'incremento del rapporto tra Bacteroidetes/Prevotella nella linea Winnie APC^{min}.

Nel corso degli ultimi anni abbiamo utilizzato la quercetina come paradigma delle sostanze di origine vegetale ad effetto anti-infiammatorio. Abbiamo in un primo momento individuato l'espressione della proteina "Secretory leukoprotease inhibitor" (SLPI) come fondamentale checkpoint per l'effetto anti-infiammatorio indotto dalla quercetina. Per dimostrare la fondamentale correlazione tra espressione di SLPI ed inibizione del profilo infiammatorio, abbiamo somministrato quercetina a cellule dendritiche SLPI-KO dimostrando che in queste la secrezione di citochine infiammatorie ed in particolare del TNF α non viene inibita.

Sucessivamente abbiamo studiato il meccanismo di azione grazie al quale la quercetina sopprime la secrezione di citochine infiammatorie da parte delle cellule dendritiche.

Abbiamo analizzato il pathway molecolare indotto dall'esposizione a quercetina riscontrando significative variazioni dei geni collegati al metabolismo del ferro. Visto il ruolo fondamentale della quercetina nei processi anti-infiammatori, abbiamo cercato delle matrici naturali in grado di attivare un pathway molecolare anti-infiammatorio ed al tempo stesso correggere la disbiosi intestinale.