



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE PER L'AMBIENTE E LA SALUTE**

CICLO XXXVIII

COORDINATRICE Prof.ssa LUISA PASTI

**VALUTAZIONE BIOLOGICA DELLA POTENZIALE
ATTIVITA' ANTITUMORALE DI NUOVI IBRIDI
MOLECOLARI**

Settore Scientifico Disciplinare BIOS-12/A

Dottoranda

Dott.ssa Pozza Elena

(firma)

Tutor

Prof.ssa Melloni Elisabetta

(firma)

Co-Tutor

Prof.ssa Voltan Rebecca

(firma)

Anni 2022/2025

INDICE

ABBREVIAZIONI

1. INTRODUZIONE

1.1 Tumore del colon-retto (CRC)

1.1.1 Epidemiologia

1.1.2 Eziologia e fattori di rischio

1.1.3 Patogenesi e sviluppo del tumore

1.1.4 Diagnosi e stadiazione

1.2 Carcinoma epatocellulare (HCC)

1.2.1 Epidemiologia

1.2.2 Eziologia e fattori di rischio

1.2.3 Patogenesi e sviluppo del tumore

1.2.4 Diagnosi e stadiazione

1.3 Approcci terapeutici tradizionali e limitazioni

1.3.1 Strategie terapeutiche per il trattamento del CRC

1.3.2 Strategie terapeutiche per il trattamento dell'HCC

1.3.3 Limiti e resistenza ai trattamenti attuali

1.4 Ibridi molecolari

1.4.1 Definizione di ibridazione molecolare

1.4.2 Il concetto di farmaci ibridi nello sviluppo di agenti antitumorali

1.5 Ibridi Nucleosidi - Ossido Nitrico

1.5.1 Nucleosidi: ruolo biologico e applicazioni terapeutiche

1.5.2 Ossido Nitrico

1.5.3 Attività biologica e fisiologica di NO

1.5.4 NO e carcinogenesi

1.5.5 NO donors

1.5.6 Studi clinici recenti sull'utilizzo di NO come agente terapeutico

1.5.7 Ibridi nucleosidi - NO

1.6 Ibridi DHA - Acidi Biliari

1.6.1 Diidroartemisinina

1.6.2 Effetti antitumorali della DHA

1.6.3 Terapia combinata - miglioramento dell'effetto antitumorale della DHA

1.6.4 Studi clinici recenti sull'utilizzo della DHA come agente antitumorale

1.6.5 Limiti della DHA

1.6.6 Acidi biliari

1.6.7 Ibridi DHA - Acidi Biliari

2. SCOPO DELLA TESI

3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DEGLI IBRIDI NUCLEOSIDI - OSSIDO NITRICO

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Linee cellulari e trattamenti

3.1.2 Apparecchiatura di irradiazione per esperimenti in vitro e valutazione dell'induzione fotochimica di NO

3.1.3 Valutazione degli effetti citotossici e citostatici degli ibridi in assenza di irradiazione

3.1.4 Valutazione degli effetti dell'irradiazione sull'efficacia di dAdo-t-NO e dU-t-NO

3.1.5 Analisi statistica

3.2 Risultati

3.2.1 dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO, in assenza di irradiazione, esercitano un effetto citotossico e citostatico in cellule di colon carcinoma ed epatocarcinoma

3.2.2 In seguito a irradiazione, dU-t-NO riduce il numero di cellule vitali nella linea cellulare RKO e dAdo-t-NO esercita il medesimo effetto sulle linee cellulari RKO e Hep3B2.1-7

4. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DEGLI IBRIDI DHA-ACIDI BILIARI

4.1 Materiali e metodi

4.1.1 Linee cellulari e trattamenti

4.1.2 Analisi della vitalità cellulare, proliferazione, ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi

4.1.3 Analisi in Real-time dell'influenza degli ibridi della DHA sulla migrazione e invasività delle cellule HCT116

4.1.4 Analisi in Real-time dell'influenza degli ibridi della DHA sulla proliferazione delle cellule primarie HUVEC

4.1.5 Analisi in citometria a flusso dell'espressione del recettore 2 del VEGF

4.1.6 Analisi dell'espressione del VEGFR-2 in Real-time PCR (qPCR)

4.1.7 Analisi statistica

4.2 Risultati

4.2.1 *Gli ibridi della DHA riducono il numero di cellule vitali e l'attività metabolica delle cellule di colon carcinoma*

4.2.2 *Gli ibridi della DHA esercitano un potente effetto citostatico nelle cellule di colon carcinoma*

4.2.3 *Gli ibridi della DHA mostrano una minore tossicità nelle cellule non tumorali rispetto alle cellule di colon carcinoma*

4.2.4 *Gli ibridi della DHA inibiscono la migrazione e l'invasività cellulare*

4.2.5 *Gli ibridi della DHA inibiscono la proliferazione e riducono l'espressione del recettore 2 del VEGF in un modello di cellule endoteliali*

5. DISCUSSIONE

6. CONCLUSIONI

7. BIBLIOGRAFIA

ABBREVIAZIONI

2-CdA: 2-Chlorodeoxyadenosine

5-FU: 5-fluorouracile

6-MP: tiopurine 6 mercaptopurina

6-TG: 6-tioguanina

AFB1: esposizione all'aflatossina B1

AFP: alfa-feto proteine

ALD: epatopatia alcolica

Ang-2: angiopoietina-2

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ASR: tasso standardizzato per età

BA: acidi biliari

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

CBP: carboplatin

CDCA: acido chenodesossicolico

cGMP: guanosina monofosfato ciclico

CIMP: fenotipo metilatore delle isole CpG

CIN: instabilità cromosomica

CK1: Casein Kinase 1

CRC: cancro del colon-retto

CRLM: metastasi epatiche da tumore del colon-retto

DHA: diidroartemisinina

dMMR: disfunzione del sistema di mismatch repair

DPYD: diidropirimidina deidrogenasi

ECM: matrice extracellulare

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

EGFR: Estimated Glomerular Filtration Rate

EMT: transizione epitelio-mesenchimale

ERK: segnale extracellulare

FAP: poliposi adenomatosa familiare

FDA: Food and Drug Administration

GC: guanilato ciclasi

GIMP: CpG Island Methylator

GSK3 β : Glycogen synthase kinase-3 beta

HBV: virus dell'epatite B
HCC: carcinoma epatocellulare
HCV: virus dell'epatite C
HNPCC: sindrome di Lynch o cancro coloretale ereditario non poliposico
IARC: Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma
MAPK: MAP-kinase
MASH: steatoepatite associata alla disfunzione metabolica
mCRC: carcinoma coloretale metastatico
MMR: sistema di mismatch repair
MRI: risonanza magnetica
MSI: instabilità dei microsatelliti
NA: analoghi nucleosidici
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NAFLD: steatosi epatica non alcolica
NO: ossido nitrico
NOS: ossido nitrico sintasi
ORR: tasso di risposta oggettiva
OS: sopravvivenza globale
PDGF: fattori di crescita derivati dalle piastrine
PFS: sopravvivenza libera da malattia
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PKC: protein chinasi C
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog)
RFA: ablazione a radiofrequenza
RNS: specie reattive dell'azoto
TACE: chemioembolizzazione transarteriosa
TC: tomografia computerizzata
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
TK: tirosin-chinasi
TME: microambiente tumorale
TNBC: carcinoma mammario triplo negativo
TP53: proteina tumorale 53
UDCA: acido ursodesossicolico

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

VEGFR-2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

1. INTRODUZIONE

Il cancro è una malattia multifattoriale derivante dalle interazioni di complessi fattori genetici e ambientali e, ad oggi, rappresenta una delle principali cause di mortalità a livello globale [1]. Il cancro del colon-retto (CRC) è tra le neoplasie maligne più comuni in tutto il mondo e rappresenta la seconda causa di morte per cancro nelle donne e la terza neoplasia più frequente negli uomini [2]. Secondo una recente stima dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), il carcinoma epatocellulare (HCC) è il sesto tumore più frequentemente diagnosticato e la terza causa di morte per cancro per entrambi i sessi a livello globale [3]. Inoltre, il fegato rappresenta la principale sede di metastasi nei pazienti con cancro del colon-retto, ed è stimato che il 25-30% dei pazienti affetti da CRC svilupperà metastasi epatiche da tumore del colon-retto (CRLM) [4].

1.1 Tumore del colon-retto (CRC)

1.1.1 *Epidemiologia*

Il tumore del colon-retto (CRC) rappresenta una delle principali neoplasie per incidenza e mortalità in Italia e nel mondo. Secondo i dati del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), nel 2022 si sono registrati oltre 1,93 milioni di nuovi casi e circa 935.000 decessi a livello globale per CRC, posizionando questa neoplasia al terzo posto per incidenza e al secondo per mortalità tra tutte le forme di cancro [5].

Nel 2024, sono stati stimati circa 48.706 nuovi casi in Italia, di cui 27.472 negli uomini e 21.233 nelle donne, confermandosi come il secondo tumore più frequente dopo il carcinoma alla mammella [6].

Le stime GLOBOCAN indicano che, in assenza di interventi efficaci, il numero annuo di nuovi casi di CRC potrebbe salire a oltre 3,2 milioni entro il 2040, con un aumento di oltre il 65%, dovuto principalmente all'invecchiamento della popolazione e alla transizione verso stili di vita tipicamente occidentali nei paesi in via di sviluppo [5]. L'Italia presenta un'incidenza di circa 37,2 casi ogni 100.000 abitanti, inferiore rispetto ad altri Paesi europei, ma comunque significativa [7].

Nel 2022, il CRC ha causato 935.173 decessi a livello globale, con un ASR (Age-Standardized Rate) di 8,6 decessi per 100.000 abitanti. La mortalità è

più elevata nei paesi con sistemi sanitari meno sviluppati, dove lo screening e la diagnosi precoce sono meno diffusi [1]. Al contrario, nei paesi ad alto reddito si osserva una tendenza alla riduzione della mortalità grazie all'efficacia dei programmi di screening.

La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi si attesta attorno al 65% negli uomini e al 66% nelle donne, valori in miglioramento rispetto al decennio scorso [7]. Attualmente, si stima che in Italia vivano oltre 442.600 persone con una pregressa diagnosi di tumore del colon-retto (227.600 uomini e 215.000 donne).

1.1.2 Eziologia e fattori di rischio

L'eziologia del cancro del colon-retto è molto complessa e l'interazione tra fattori ambientali e fattori genetici gioca un ruolo importante nello sviluppo della patologia [8]. Il CRC si presenta principalmente in due forme: la forma sporadica, la quale rappresenta circa l'80% dei casi, ed è dovuta a mutazioni somatiche acquisite nel tempo, in assenza di storia familiare; e la forma familiare ed ereditaria, che comprende il restante 20%, con un'alta predisposizione genetica [9].

Il rischio di sviluppare un CRC raddoppia nei soggetti con un parente di primo grado affetto dalla malattia, indicando un'importante componente familiare. In questa categoria rientrano anche le forme ereditarie che sono dovute a mutazioni germinali identificate. Le due sindromi genetiche più rilevanti sono la Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP), causata da mutazioni inattivanti del gene APC (Adenomatous Polyposis Coli), con sviluppo di numerosi polipi adenomatosi e rischio quasi certo di CRC se non trattata, e la sindrome di Lynch o cancro coloretale ereditario non poliposico (HNPCC), legata a mutazioni dei geni del sistema di mismatch repair, responsabile del 3-5% di tutti i CRC [10].

Diversi fattori ambientali legati allo stile di vita, in gran parte modificabili, aumentano il rischio di CRC, come il fumo, l'assunzione eccessiva di alcol, aumento del peso corporeo, e l'assunzione di carne rossa e trasformata. Sebbene il diabete di tipo 2 e il cancro del colon-retto condividano alcuni fattori di rischio (come l'obesità e l'inattività fisica), gli individui con diabete di tipo 2 mantengono un elevato rischio anche dopo aver corretto questi fattori. La ricerca sul microbiota del colon suggerisce che l'infezione causata

da specie batteriche specifiche, come *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides fragilis*, potrebbe aumentare il rischio di cancro del colon-retto [11].

1.1.3 Patogenesi e sviluppo del tumore

Queste diverse eziologie corrispondono a diversi meccanismi molecolari alla base della patogenesi del CRC. Sono presenti due principali vie patogenetiche che causano l'insorgenza del CRC alterando meccanismi molecolari distinti e geni associati [12-14].

La via dell'instabilità cromosomica (CIN), associata al classico modello di progressione adenoma-carcinoma, è la via più comune e responsabile della maggior parte dei CRC sporadici. Le mutazioni interessano geni oncosoppressori e oncogeni come APC (Adenomatous Polyposis Coli), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) e TP53, conducendo a instabilità genetica e progressione tumorale [15].

La via dell'Instabilità dei Microsatelliti (MSI) rappresenta il 10-15% dei casi, è dovuta alla Disfunzione del Sistema di Mismatch Repair (dMMR), spesso correlata a mutazioni germinali (es. sindrome di Lynch). I tumori MSI tendono a localizzarsi nel tratto prossimale del colon e ad avere una prognosi migliore.

Un altro percorso è rappresentato dalla via serrata (Sessile Serrated Pathway), che causa il 10-20% dei CRC e presenta fenotipo metilatore delle isole CpG (CIMP), associato sia alla stabilità che all'Instabilità dei Microsatelliti. Questa via è caratteristica dei tumori con metilazione aberrante e può coesistere con MSI.

Nello specifico, la CIN, la via patogenetica più comune, è osservata sia nelle forme sporadiche che in quelle ereditarie (FAP), caratterizzate da squilibri nel numero di cromosomi. Questi tumori presentano difetti nella segregazione cromosomica, nel mantenimento dei telomeri e nella risposta al danno del DNA, causando infine aneuploidia e perdita di eterozigosi. La CIN rappresenta il fondamento della via classica di progressione adenoma-carcinoma: il primo evento cruciale riguarda l'inattivazione dell'allele normale del gene APC negli individui che ne possiedono già uno mutato. La perdita di funzione di entrambi gli alleli innesca così la formazione dei polipi [13, 14].

Fisiologicamente, APC è coinvolto nel signalling di Wnt, fungendo da scaffold per l'interazione di Axin, CK1 (Casein Kinase 1), PKC (protein-chinasi C) e GSK3 β (Glycogen synthase kinase-3 beta) con la β -catenina, che viene fosforilata e successivamente degradata dal proteasoma. Una volta attivata la via di Wnt, la degradazione della β -catenina viene inibita e questa trasloca nel nucleo, dove agisce come fattore di trascrizione per geni coinvolti nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare, come c-MYC e ciclina D1. Mutazioni di APC impediscono la degradazione della β -catenina e causano l'espressione costitutiva dei suoi geni bersaglio, con conseguente tumorigenesi e invasione [13, 14]. Inoltre, la β -catenina può anche essere sovraespressa come conseguenza della CIN. La sovraespressione di c-MYC è considerata un marcatore di CRC metastatico e un fattore prognostico favorevole correlato alla sopravvivenza [16].

In seguito all'inattivazione di APC, si verificano altre mutazioni che inducono la trasformazione degli adenomi in carcinomi, più frequentemente a livello di oncogeni delle vie delle MAPK (MAP-kinases) e PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), come KRAS, BRAF, PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) e i soppressori tumorali TP53 e PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) [17].

In breve, KRAS è uno dei geni più studiati nella via delle MAP chinasi, poiché le sue mutazioni sono rilevate nel 47-50% dei CRC e sono coinvolte in una varietà di altri tumori. KRAS mutato interviene nella via di signalling di Wnt: è in grado di inibire la funzione di GSK3 β , promuovendo così l'attivazione della β -catenina e la sua traslocazione nel nucleo, con conseguente attivazione di processi collegati alla tumorigenesi [14].

Le mutazioni attivanti della tirosina chinasi c-Src sono eventi precoci presenti in oltre il 70% dei CRC. Esse attivano la via di PI3K/Akt, promuovendo proliferazione, invasione e metastasi. L'inibizione di c-Src può aumentare la sensibilità alla chemioterapia.

La perdita biallelica di PTEN, un regolatore negativo della via di PI3K/Akt, induce un'attivazione costitutiva di questo pathway, associata a metastasi aggressive e prognosi sfavorevole [18].

Un'altra alterazione genetica che contribuisce alla crescita cellulare anomala riguarda la via di signalling del TGF- β : nei CRC con Instabilità Cromosomica (CIN), la perdita del cromosoma 18q compromette il signalling del TGF- β

(Transforming Growth Factor-beta), contribuendo alla deregolazione del ciclo cellulare e ad aumentare la capacità delle cellule di eludere l'apoptosi [13].

Infine, mutazioni o delezioni di TP53 (cromosoma 17q) sono eventi tardivi ma comuni, responsabili della transizione da adenoma a carcinoma.

L'Instabilità dei Microsatelliti (MSI) rappresenta un meccanismo patogenetico meno frequente nel CRC, riscontrato nel 15% dei casi sporadici e in circa l'85% delle forme ereditarie associate alla sindrome di Lynch (HNPCC). L'MSI deriva, come detto, dalla perdita di funzione del Sistema di Mismatch Repair (MMR), responsabile della correzione degli errori di replicazione del DNA. Anomalie nei geni MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2) comportano un accumulo di mutazioni, soprattutto in sequenze microsatelliti, sia codificanti che non codificanti. Questo determina l'alterazione di oncogeni e geni oncosoppressori, contribuendo alla tumorigenesi. I geni MMR possono essere inattivati da mutazioni puntiformi (nelle forme ereditarie) o da ipermetilazione del promotore (nei casi sporadici). Nonostante l'elevata instabilità genomica, i tumori MSI tendono ad avere una prognosi migliore rispetto ad altre forme di CRC [13]. Le vie patogenetiche CIN e MSI sono rappresentate in *Figura 1*.

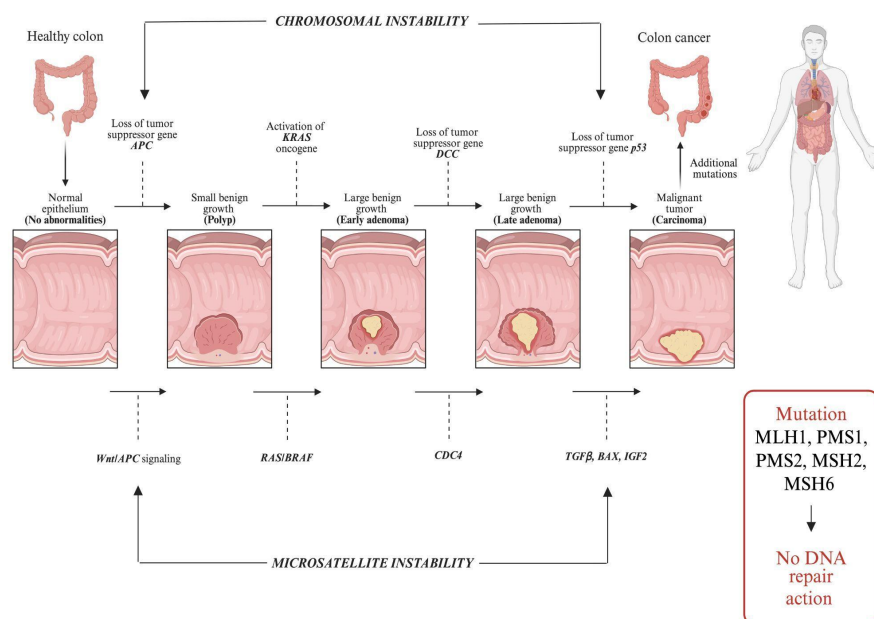


Figura 1. Ruolo delle vie CIN e MSI nella progressione del CRC (Bio Render).

Infine, la via della neoplasia serrata rappresenta un percorso patogenetico frequente nel CRC e si caratterizza per il fenotipo CIMP (CpG Island Methylator), ovvero per l'ipermetilazione di numerosi geni. Questa condizione è causata da un'attività aberrante delle DNA metiltransferasi e/o da una ridotta funzionalità delle demetilasi, che induce instabilità epigenetica. Il risultato è la metilazione anomala dei promotori degli oncogeni, con conseguente sovraespressione, e il silenziamento epigenetico dei geni oncosoppressori. Spesso, queste alterazioni epigenetiche sono accompagnate da modificazioni aberranti degli istoni, con il reclutamento di istone metilasi e deacetilasi. Il percorso serrato può condurre allo sviluppo di CRC sia con stabilità che con instabilità dei microsatelliti, ed è frequentemente associato a mutazioni oncogeniche, in particolare nei geni BRAF e KRAS [12-14]. Il coinvolgimento del fenotipo CIMP nel CRC è illustrato nella *Figura 2*.

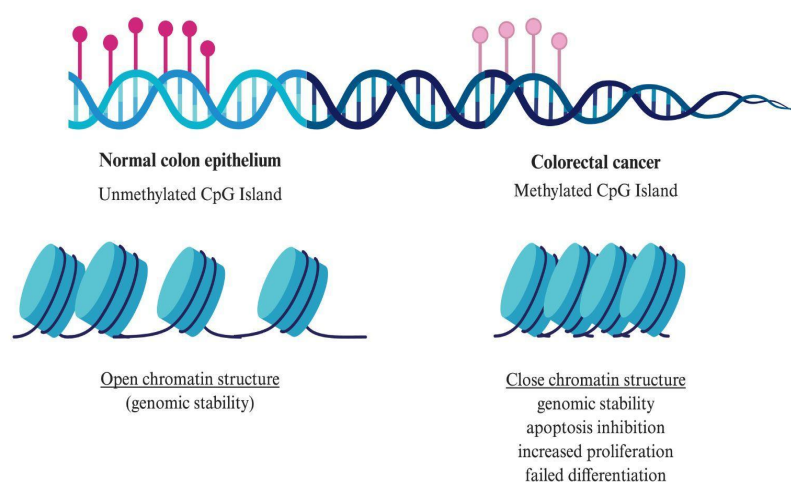


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'instabilità cromosomica dovuta all'ipermetilazione dell'isola CpG nel CRC (Bio Render).

1.1.4 Diagnosi e stadiazione

Una diagnosi appropriata e una corretta stadiazione sono fondamentali per garantire una corretta strategia di trattamento.

Una neoplasia CRC può essere sospettata per alcuni sintomi quali ostruzione intestinale, peritonite e talvolta emorragia intestinale. Il paziente con un CRC precoce nella maggior parte dei casi è del tutto asintomatico, il sospetto può insorgere se il paziente esegue una ricerca del sangue occulto nelle feci con esito positivo.

La colonscopia completa fino al cieco, accoppiata con biopsia di una lesione sospetta, è considerata il gold standard per la diagnosi delle lesioni del colon-retto: questa procedura consente di localizzare il tumore e rappresenta un esame preventivo in quanto consente di asportare polipi, rappresentando così un'opportunità sia diagnostica che terapeutica; i risultati migliori si ottengono per lesioni >6mm. La conferma diagnostica è data dall'esame istologico eseguito su biopsia, o sul polipo resecato.

Talvolta la colonscopia non è sufficiente, soprattutto in presenza di lesioni che impediscono il passaggio dell'endoscopio, ed è necessario eseguire una RX con clisma opaco o colonscopia virtuale: questa consiste nell'ottenere immagini tomografiche dopo l'insufflazione del colon con anidride carbonica e la loro ricostruzione in 2D o 3D, con sensibilità simile ad una colonscopia; alternativamente si esegue una TAC addominale e pelvica a supporto della diagnosi di CRC [19].

Il sistema di stadiazione più utilizzato per il CRC è la stadiazione TNM (Tumor, Node, Metastasis) dell'American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) [20].

Il sistema di stadiazione TNM ha un valore prognostico: l'outcome del tumore coloretale è correlato al TNM (*Tabella 1*).

Tabella 1. Stadiazione TNM dell'American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC).

TUMORE PRIMITIVO (T)

<i>TX</i>	Tumore primitivo non accertabile
<i>T0</i>	Non evidenza di tumore primitivo
<i>Tis</i>	Carcinoma in situ (coinvolgimento della lamina propria ma non della muscularis mucosae)
<i>T1</i>	Tumore che invade la sottomucosa (coinvolgimento della muscularis mucosae ma non della tonaca muscolare)
<i>T2</i>	Tumore che invade la tonaca muscolare
<i>T3</i>	Tumore che penetra attraverso la tonaca muscolare nella sottosierosa o nei tessuti pericolici o perirettali non ricoperti dal peritoneo
<i>T4</i>	Tumore che invade altri organi e altre strutture
<i>LINFONODI REGIONALI (N)</i>	
<i>NX</i>	Linfonodi regionali non valutabili
<i>N0</i>	Linfonodi regionali liberi da metastasi
<i>N1</i>	N1a: un linfonodo regionale positivo

	N1b: due o tre linfonodi regionali positivi
	N1c: non linfonodi regionali positivi ma presenza di depositi tumorali nella sottosierosa, mesentere, pericolon non peritonealizzato, tessuti perirettali/mesorettali o pericolici non peritonealizzati
N2	N2a: da 4 a 6 linfonodi regionali positivi N2b: sette o più linfonodi regionali positivi
<i>METASTASI A DISTANZA (M)</i>	
MX	Metastasi a distanza non accertabili
M0	Assenza di metastasi a distanza rilevabili tramite imaging, non evidenza di tumore in situ o in organi distanti
M1	M1a: un solo sito o organo identificabile, senza metastasi peritoneale M1b: due o più siti o organi identificati senza metastasi peritoneale M1c: metastasi peritoneali identificate, sole o insieme ad un altro sito o organo metastatico

La stadiazione TNM può essere valutata in fase clinica (cT, cN, cM) con valutazione pre-chirurgica e chirurgica, mentre la valutazione dello stadio patologico (pT, pN, pM) richiede l'esame istopatologico.

1.2 Carcinoma epatocellulare (HCC)

1.2.1 Epidemiologia

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta la forma più comune di tumore maligno primitivo del fegato, responsabile della maggior parte dei casi a livello mondiale. Secondo le più recenti stime del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), nel 2022 sono stati diagnosticati 866.136 nuovi casi di tumore al fegato, rendendolo il sesto tumore più frequentemente diagnosticato e la terza causa di morte per cancro, con una mortalità globale di 758.725 decessi [1]. Questi numeri collocano l'HCC tra le principali cause oncologiche di morte, con una letalità molto elevata dovuta spesso a diagnosi tardive e limitate opzioni terapeutiche nei paesi a basso e medio reddito.

Il tasso di mortalità globale standardizzato per età è pari a 7,4 decessi per 100.000 abitanti, con una sopravvivenza globale a 5 anni inferiore al 20%, dati che riflettono la difficoltà diagnostica precoce e la scarsità di trattamenti negli stadi avanzati della malattia [21].

1.2.2 Eziologia e fattori di rischio

I fattori di rischio associati all'HCC, come nel caso del CRC, sono molteplici e comprendono vari elementi. I fattori di rischio più importanti dell'HCC sono l'infezione da Virus dell'Epatite B (HBV) o Virus dell'Epatite C (HCV), l'esposizione all'Aflatossina B1 (AFB1), l'assunzione eccessiva di alcol, la Steatoepatite associata alla Disfunzione Metabolica (MASH) e fattori demografici come sesso, razza ed età [22].

1.2.3 Patogenesi e sviluppo del tumore

L'HCC si sviluppa attraverso un processo graduale che progredisce come segue: epatite cronica, fibrosi epatica, cirrosi epatica e, infine, HCC. Ogni fattore di rischio associato all'HCC provoca epatite cronica attraverso un diverso meccanismo fisiopatologico; tuttavia, una volta che si sviluppa un'inflammatione epatica cronica, la progressione verso l'HCC è la stessa indipendentemente dal fattore causale iniziale [23]. Inoltre, contribuiscono allo sviluppo dell'HCC anche mutazioni genetiche e modificazioni epigenetiche [24].

L'epatite virale associata all'infezione da HCV o HBV è una delle principali cause di HCC nei paesi in via di sviluppo. Sia l'HCV che l'HBV causano epatite cronica che può progredire in HCC, ma attraverso meccanismi diversi. L'HCV infetta gli epatociti, causando l'attivazione delle cellule di Ito che inducono fibrosi. La risposta infiammatoria contro l'HCV coinvolge la produzione di PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), potente stimolatore delle cellule di Ito, che promuove ulteriormente la fibrosi. Inoltre, è stato suggerito che la sovraespressione delle proteine dell'HCV promuova la proliferazione, la trasformazione e la formazione di tumori, influenzando direttamente le vie oncogeniche [25].

A differenza dell'HCV, l'HBV può integrare il proprio genoma nel DNA dell'ospite: questo spiega perché alcuni casi di epatite indotta da HBV progrediscono in HCC senza fibrosi o cirrosi.

L'HBV utilizza la trascrizione inversa per la sua replicazione. L'integrazione del DNA virale avviene precocemente durante l'infezione: infatti l'HCC indotto da HBV può talvolta avere un esordio precoce [26]. L'integrazione del genoma virale porta a instabilità cromosomica, attivazione di oncogeni,

inibizione di geni oncosoppressori ed espressione di proteine virali. Tutti questi fattori guidano la patogenesi dell'HCC. Inoltre, l'infezione da HBV è accompagnata da una significativa infiammazione e fibrosi che contribuiscono allo sviluppo dell'HCC [27].

Come accennato in precedenza, l'alcol è uno dei fattori di rischio significativi per lo sviluppo dell'HCC. L'assunzione prolungata ed eccessiva di alcol porta allo sviluppo di Epatopatia Alcolica (ALD). In caso di consumo eccessivo di alcol, metaboliti dell'alcol, acetaldeide e acetato, si accumulano nel fegato ed esercitano un effetto epatotossico. Inoltre, i livelli di NADH si riducono significativamente, compromettendo la protezione dell'organismo dallo stress ossidativo. In aggiunta, nell'abuso cronico di alcol il sistema enzimatico del citocromo P450 del fegato è sovraregolato e partecipa al metabolismo dell'alcol; ciò si traduce in un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno che contribuiscono al danno epatico [28]. D'altra parte, la malattia epatica può verificarsi senza danni indotti dall'alcol, come nel caso della Steatosi Epatica non Alcolica (NAFLD). I pazienti obesi, affetti da diabete mellito di tipo 2 o con altri disturbi metabolici sono a rischio di sviluppare NAFLD. Lo sviluppo della NAFLD si verifica a seguito dell'accumulo di grasso nel fegato e di alterazioni metaboliche degli epatociti che, a loro volta, provocano l'epatite. Nonostante la diversa fisiopatologia, sia l'ALD che la NAFLD portano infine all'epatite, che può evolvere in HCC [29].

Come già osservato, l'infiammazione cronica e la fibrosi sono due fasi cruciali nello sviluppo dell'HCC. Nell'infiammazione cronica, il danno epatico progressivo e cronico induce la rigenerazione e la proliferazione degli epatociti. Con il passare del tempo, più epatociti si rigenerano, più instabile diventa il genoma e maggiore è la probabilità che acquisiscano una mutazione genetica che promuove il cancro. Inoltre, le cellule implicate nell'infiammazione (neutrofili, macrofagi, linfociti e mastociti), così come i miofibroblasti e le cellule endoteliali del fegato cronicamente infiammato, secernono citochine, chemochine, fattori di crescita e fattori angiogenetici che contribuiscono alla formazione di un ambiente favorevole allo sviluppo tumorale nel fegato. Inoltre, questi fattori attivano vie anti-apoptotiche che promuovono la sopravvivenza degli epatociti [30].

La fibrosi epatica comporta la deposizione incontrollata di matrice extracellulare (ECM) nel parenchima epatico. Questo eccessivo deposito di ECM altera l'architettura del fegato, con conseguente alterazione della funzionalità epatica. Tuttavia, numerosi studi hanno rivelato che il deposito di ECM non si limita a compromettere l'istologia del fegato. La ECM depositata promuove lo sviluppo tumorale alterando e modulando le vie di signalling dei componenti del parenchima epatico, come cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule stromali e cellule infiammatorie. Ad esempio, i componenti della ECM possono legarsi a specifici fattori di crescita o formare complessi con ligandi in grado di interagire con essi, potenziandone l'attività e favorendo così lo sviluppo tumorale [31].

1.2.4 Diagnosi e stadiazione

La diagnosi precoce dell'HCC è cruciale in quanto la malattia viene spesso diagnosticata solo quando i sintomi diventano evidenti, in genere in una fase avanzata.

La diagnosi del cancro al fegato comporta in genere un approccio completo che consiste in esame fisico, valutazione tramite imaging e indagini di laboratorio. Le principali tecniche di imaging utilizzate per la diagnosi dell'HCC sono l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI). Una biopsia epatica può essere eseguita per confermare la diagnosi. Inoltre, per la diagnosi o per il monitoraggio della progressione della malattia vengono regolarmente condotti diversi test di laboratorio, come i test di funzionalità epatica e il test delle alfa-fetoproteine (AFP) [32].

I fattori prognostici più importanti nei pazienti con HCC sono correlati in primo luogo alla lesione tumorale, definita come numero e dimensione dei noduli, presenza di invasione vascolare e diffusione extraepatica; in secondo luogo, alla funzionalità epatica, definita dalla valutazione di Child-Pugh, bilirubina, albumina, ipertensione portale e ascite; e, in ultimo, dallo stato generale del paziente, definito dalla Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS) e dalla presenza di sintomi. L'eziologia invece non è stata identificata come un fattore prognostico indipendente [33]. L'individuazione di marcatori sierologici quali AFP è associata ad una cattiva prognosi e potrebbe predire il rischio di ricorrenza post-resezione, di drop-out nei pazienti in lista d'attesa per trapianto di fegato, di scarsa risposta alle

terapie locoregionali, di bassa sopravvivenza e di recidiva post-trapianto epatico. L'eterogeneità degli studi, però, impedisce di definirne una chiara raccomandazione, ma suggerisce che valori di AFP > 200 (spesso considerati soglia di rischio moderato) e/o >400 ng/ml (soglia più elevata, associata a prognosi peggiore) potrebbero essere considerati come fattori prognostici negativi [34-36].

Il sistema di stadiazione più ampiamente convalidato e inserito nella maggior parte delle linee guida è il sistema BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) raffigurato in *Figura 3*.

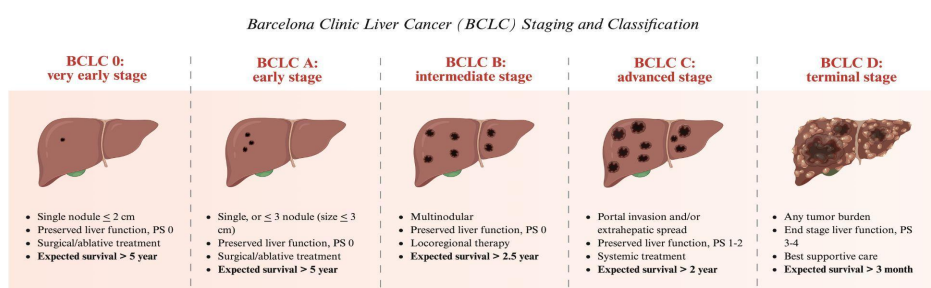


Figura 3. Rappresentazione schematica del sistema di stadiazione BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) (Bio Render).

Questo sistema tiene conto del carico tumorale (compreso il numero e le dimensioni dei noduli, l'invasione vascolare, la diffusione extraepatica), della disfunzione epatica e prevede 5 fasi: stadio molto precoce (0), stadio precoce (A), stadio intermedio (B), stadio avanzato (C) e stadio terminale (D) [37]. Tuttavia, l'eterogeneità all'interno delle fasi BCLC, che può influenzare le strategie terapeutiche consigliate, ha portato alla proposta di sistemi di stadiazione alternativi, come ad esempio [ITA.LI.CA](#), sviluppato dal gruppo Italian Liver Cancer, con una buona discriminazione prognostica [38-39].

1.3 Approcci terapeutici tradizionali e limitazioni

1.3.1 Strategie terapeutiche per il trattamento del CRC

I protocolli di trattamento per il CRC vengono stabiliti in base allo stadio della malattia e, in particolare, variano a seconda che si tratti di malattia localizzata, quindi negli stadi I, II e III, o di malattia metastatica, ovvero allo stadio IV.

La chirurgia rappresenta il trattamento principale e potenzialmente curativo per i pazienti affetti da CRC in fase iniziale. L'intervento chirurgico curativo prevede l'asportazione del tumore primario con margini di resezione adeguati, la linfadenectomia regionale e il ripristino della continuità del tratto intestinale.

La chemioterapia può essere integrata al trattamento chirurgico in fase neoadiuvante o adiuvante. La terapia neoadiuvante, somministrata prima dell'intervento, mira a ridurre il volume tumorale facilitando la resezione chirurgica. La chemioterapia adiuvante, somministrata successivamente alla chirurgia, ha l'obiettivo di eliminare micrometastasi residue e ridurre il rischio di recidiva, con indicazioni che variano in base allo stadio della malattia:

- Stadio I: i pazienti non necessitano di chemioterapia adiuvante; è indicato esclusivamente il follow-up.
- Stadio II: l'utilizzo della terapia adiuvante è controverso. Tuttavia, può essere considerato nei casi che presentano fattori prognostici sfavorevoli (es. invasione vascolare o linfatica, occlusione tumorale o analisi inadeguata dei linfonodi). In questi casi si può ricorrere a fluoropirimidine e oxaliplatino.
- Stadio III: i pazienti sono candidati alla chemioterapia adiuvante, che ha dimostrato di indurre una riduzione del rischio relativo di morte del 33%. Il trattamento standard consiste nella combinazione di oxaliplatino e fluoropirimidine per sei mesi, da iniziare entro 6–8 settimane dalla chirurgia [40].

Numerosi studi hanno confermato l'efficacia della combinazione di 5-fluorouracile (5-FU), acido folinico (leucovorin) e oxaliplatino (FOLFOX-4), con miglioramenti significativi nella sopravvivenza libera da malattia (PFS) a 3 e 5 anni e nella sopravvivenza globale (OS) a 6 e 10 anni, oltre a una riduzione del rischio di recidiva del 20% [41]. Analogamente, lo studio XELOXA ha evidenziato benefici comparabili per la combinazione di capecitabina e oxaliplatino (XELOX) [42]. Questi risultati sostengono l'impiego di FOLFOX-4 o XELOX come prima linea terapeutica.

Infine, prima della somministrazione di fluoropirimidine (5-FU o capecitabina), è raccomandata l'analisi genetica del gene DPYD, che codifica

per l'enzima diidropirimidina deidrogenasi. Le varianti *c.IVS14+1G>A* e *c.2846A>T* sono associate a tossicità grave, con un'incidenza di circa 1 caso ogni 3000 pazienti. La presenza di queste mutazioni rappresenta una controindicazione all'uso delle fluoropirimidine [40].

Circa il 30% dei pazienti riceve una diagnosi di carcinoma coloretale metastatico (mCRC) già in fase avanzata (stadio IV) al momento della prima valutazione clinica. Inoltre, si stima che circa il 35% dei pazienti inizialmente diagnosticati in stadio II o III svilupperanno successivamente una malattia metastatica.

La prognosi dello stadio IV è generalmente sfavorevole, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 10%. In assenza di trattamento chemioterapico e con la sola terapia di supporto ottimale, la sopravvivenza media è di circa 5 mesi.

L'approccio terapeutico al mCRC deve essere pianificato in ambito multidisciplinare, con il coinvolgimento di oncologi, chirurghi, radioterapisti, epatologi e gastroenterologi. Le opzioni di trattamento comprendono principalmente la chemioterapia sistemica, cui si possono affiancare, in base alla localizzazione e alla resecabilità delle metastasi, la chirurgia e, in casi selezionati, la radioterapia [40].

Negli ultimi anni sono stati compiuti importanti progressi nel trattamento del mCRC, grazie sia alla chemioterapia combinata sia all'introduzione di terapie mirate. I principali schemi chemioterapici utilizzati includono FOLFOX (5-fluorouracile in infusione continua, leucovorina e oxaliplatino) e FOLFIRI (5-fluorouracile, leucovorina e irinotecan). L'aggiunta di farmaci mirati, in particolare gli anticorpi monoclonali anti-EGFR (Estimated Glomerular Filtration Rate) (*cetuximab* e *panitumumab*) e l'anticorpo anti-VEGF (*bevacizumab*), ha consentito un incremento significativo della sopravvivenza globale, portandola da circa 12 mesi a oltre 20 mesi nei pazienti selezionati.

Secondo le Linee Guida AIOM 2024, la scelta del trattamento sistemico nel mCRC deve basarsi su una valutazione molecolare accurata. In particolare, la presenza di mutazioni nei geni RAS (KRAS e NRAS) e BRAF deve essere determinata prima dell'inizio della terapia, poiché queste influenzano la risposta agli anticorpi anti-EGFR. Questi ultimi, infatti, sono indicati esclusivamente nei pazienti con tumori RAS e BRAF wild-type. Al contrario,

bevacizumab può essere utilizzato indipendentemente dallo stato mutazionale [40].

Un altro elemento rilevante nella pratica clinica è la farmacogenetica. Prima dell'inizio della terapia con Irinotecan, un farmaco chemioterapico antineoplastico, è raccomandata l'analisi del polimorfismo UGT1A1*28. Questa variante, se presente in omozigosi, è associata a un aumentato rischio di tossicità ematologica (neutropenia) e diarrea, e richiede una riduzione della dose del farmaco per minimizzare gli effetti collaterali.

Le strategie di trattamento includono anche la terapia di mantenimento, che può essere presa in considerazione dopo una risposta favorevole alla fase di induzione. Studi recenti, come lo studio ERMES, hanno dimostrato l'efficacia del mantenimento con *cetuximab* nei pazienti con tumore RAS/BRAF wild-type dopo una fase iniziale con FOLFIRI più *cetuximab* [40].

1.3.2 Strategie terapeutiche per il trattamento dell'HCC

I protocolli raccomandati per il trattamento dell'HCC sono numerosi e variano a seconda dello stadio del tumore e della funzionalità epatica. Lo stato di performance e la funzionalità epatica dei pazienti con HCC hanno un ruolo significativo nella loro prognosi.

La chemioterapia convenzionale e la radioterapia sono notevolmente inefficaci contro l'HCC. Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE), l'ablazione a radiofrequenza (RFA) e la resezione chirurgica come terapie per l'HCC avanzato. Al contrario, il trapianto di fegato è la linea d'azione preferita nelle fasi precoci della malattia. Gli inibitori della tirosin-chinasi (TKI) come *lenvatinib* e *sorafenib*, in combinazione con l'immunoterapia e la terapia anti-angiogenetica come *bevacizumab* e *atezolizumab*, sono trattamenti di prima linea aggiuntivi per l'HCC avanzato [43].

1.3.3 Limiti e resistenza ai trattamenti attuali

I trattamenti del CRC e dell'HCC, nonostante i notevoli progressi avvenuti negli ultimi anni, presentano diverse limitazioni che compromettono l'efficacia e la personalizzazione delle cure. Uno dei principali ostacoli è la resistenza ai farmaci.

Nel caso del CRC la chemioterapia standard con 5-FU, Oxaliplatino e Irinotecan è soggetta a riduzione dell'efficacia nel tempo a causa dell'insorgenza di meccanismi molecolari di resistenza, come ad esempio l'amplificazione del gene *TYMS* o mutazioni di geni coinvolti nella riparazione del DNA [44].

Nell'ambito delle terapie mirate, sempre nel trattamento del CRC, gli anticorpi monoclonali anti-EGFR, come detto in precedenza, sono efficaci solo nei pazienti con mutazioni RAS wild-type. Tuttavia, una gamma significativa di pazienti sviluppa resistenza secondaria o presenta mutazioni RAS/BRAF, rendendo queste terapie inefficaci [45].

Inoltre, l'immunoterapia risulta veramente efficace soltanto nei pazienti con MSI e dMMR, che rappresentano soltanto il 10-15% dei casi di CRC [46].

Anche il trattamento dell'HCC presenta numerose limitazioni cliniche e biologiche: le terapie loco-regionali come la RFA e la TACE sono efficaci solo in stadi intermedi e perdono efficacia in presenza di malattia multifocale, trombosi o scarsa funzionalità epatica. Nel trattamento sistemico, *sorafenib*, che per anni è stato lo standard terapeutico, ha mostrato benefici modesti, in termini di sopravvivenza, e tossicità significativa [47].

L'introduzione di combinazioni immunoterapeutiche come *bevacizumab* e *atezolizumab*, ha migliorato la sopravvivenza globale nei pazienti con HCC non resecabile, ma non tutti rispondono alla terapia e mancano biomarcatori predittivi affidabili [47].

Infine, l'eterogeneità molecolare del CRC e dell'HCC complicano ulteriormente la tollerabilità ai trattamenti e l'accesso alle terapie sistemiche.

1.4 Ibridi molecolari

1.4.1 Definizione di ibridazione molecolare

L'ibridazione di molecole biologicamente attive è un nuovo concetto e un potente strumento nella progettazione e nello sviluppo di farmaci, utilizzato per la terapia di una varietà di malattie [48]. È una strategia di progettazione razionale di ligandi o prototipi basata sul riconoscimento di sottounità farmacoforiche che mantengono caratteristiche preselezionate dei modelli originali [49].

I farmaci ibridi, noti anche come "molecola singola a bersagli multipli" o "ligandi multipli", sono molecole progettate per integrare le caratteristiche strutturali e funzionali di due composti "genitori" biologicamente attivi. Questi composti, detti farmacofori, agiscono in modo indipendente su due distinti bersagli farmacoforici. Le molecole ibride vengono create fondendo o combinando due o più unità farmacoforiche in una nuova struttura molecolare che conserva le attività dei componenti originali. L'obiettivo di questa strategia è ottenere una modalità d'azione multipla in un'unica molecola, con un'efficacia terapeutica potenzialmente superiore rispetto alla somma delle singole attività dei composti di partenza. La presenza simultanea di più farmacofori in un'unica entità molecolare può tradursi in un'efficacia farmacologica sinergica e migliorata. [50].

Inoltre, è importante sottolineare che i farmaci ibridi presentano spesso un'elevata massa molecolare e una marcata lipofilia, caratteristiche che li portano a violare le regole di Lipinski e Veber [51]. In breve, le regole di Lipinski e Veber servono a prevedere se una molecola può essere ben assorbita per via orale (os). Lipinski osserva che i farmaci efficaci per os tendono ad avere massa e lipofilia moderate e pochi gruppi capaci di formare legami idrogeno. Veber aggiunge che una buona biodisponibilità dipende anche da una limitata flessibilità della molecola e da una superficie polare non troppo estesa. Quando questi criteri vengono superati, l'assorbimento si riduce, come accade spesso nei farmaci ibridi [51]. Nonostante ciò, gli ibridi antitumorali offrono vantaggi significativi rispetto ai farmaci convenzionali, poiché sono progettati per agire su bersagli biologici multipli o alternativi. Questo approccio consente di ridurre gli effetti collaterali e di limitare l'insorgenza di resistenze, problematica frequente con i farmaci originari.

Le molecole ibride si distinguono anche per una maggiore affinità verso i bersagli biologici, un'efficacia terapeutica superiore e un profilo di sicurezza migliorato [49, 52]. Attualmente, l'interesse per i farmaci ibridi è in continua crescita, grazie alla possibilità di progettare razionalmente ligandi capaci di modulare selettivamente più bersagli terapeutici. Questo crescente interesse è testimoniato anche dal numero sempre maggiore di pubblicazioni scientifiche dedicate all'argomento.

1.4.2 Il concetto di farmaci ibridi nello sviluppo di agenti antitumorali

I farmaci ibridi possono essere classificati in base al modo in cui i loro componenti farmacoforici sono connessi all'interno della molecola. La progettazione e la sintesi di molecole ibride si basano principalmente su due strategie.

La prima strategia prevede la combinazione di unità farmacoforiche derivate da farmaci esistenti, che può avvenire secondo due modalità:

- a. collegamento diretto di due gruppi farmacoforici, senza alcun distanziatore intermedio;
- b. collegamento tramite un linker o distanziatore, che può essere rigido o flessibile a seconda delle esigenze strutturali e funzionali.

Questi approcci permettono di unire due farmacofori derivati da farmaci che condividono lo stesso meccanismo d'azione, potenziandone l'efficacia, o di combinare farmacofori con meccanismi d'azione differenti, ampliando il profilo terapeutico e colpendo simultaneamente più vie biologiche.

Questa strategia consente l'integrazione funzionale di più farmacofori in un'unica struttura molecolare, con l'obiettivo di mantenere o migliorare l'affinità verso i rispettivi bersagli e l'attività biologica. Il punto di partenza è la selezione di due farmacofori ben caratterizzati e altamente selettivi, seguita dalla scelta di un linker appropriato che consenta di conservarne le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche. Questo approccio è ampiamente utilizzato nello sviluppo di nuovi ibridi antitumorali, grazie alla sua capacità di generare molecole multifunzionali che agiscono contemporaneamente su diversi bersagli cellulari, migliorando l'efficacia terapeutica e riducendo la probabilità di resistenza.

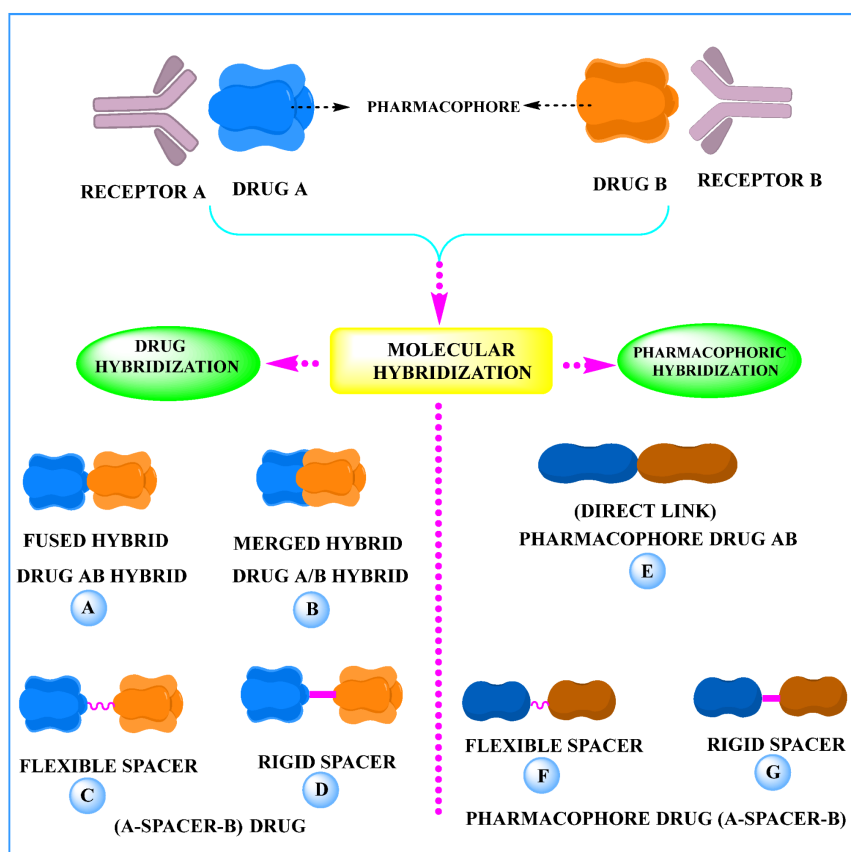


Figura 4. Diversi metodi di ibridazione molecolare. (A) I farmaci A e B sono direttamente collegati tra loro; (B) i farmaci A e B sono fusi l'uno con l'altro; (C) i farmaci A e B sono collegati da un distanziatore flessibile; (D) i farmaci A e B sono collegati attraverso un distanziatore rigido; (E) due parti farmacoforiche sono direttamente collegate tra loro; (F) due parti farmacoforiche sono collegate da un distanziatore flessibile; (G) due parti farmacoforiche sono collegate da un distanziatore rigido [50].

La seconda strategia per la progettazione di farmaci ibridi consiste nel combinare due o più farmaci interi, collegati tra loro direttamente o indirettamente mediante un linker. In base alla modalità di coniugazione e alla struttura risultante, è possibile suddividere gli ibridi in diverse categorie:

- a. Farmaci ibridi direttamente coniugati; in questa classe, le due molecole sono unite tramite un gruppo funzionale reattivo. Le connessioni più comuni includono esteri, carbammati e ammidi, che sono spesso selezionati per la loro suscettibilità all'idrolisi enzimatica *in vivo*. Questo tipo di legame consente il rilascio controllato dei farmaci nelle condizioni fisiologiche appropriate.
- b. Farmaci ibridi fusi o sovrapposti; questi ibridi derivano dalla sovrapposizione strutturale di due molecole bioattive, in cui vengono integrati elementi farmacoforici condivisi. Le molecole

risultanti mostrano nuove architetture molecolari, significativamente diverse dai composti originari, ma sono in grado di mantenere le attività biologiche dei farmaci da cui derivano. Questo approccio può generare nuove entità chimiche con profili farmacologici innovativi.

- c. Farmaci ibridi collegati tramite linker; in questa categoria, i due farmaci sono coniugati attraverso un linker molecolare, con l'obiettivo di fungere da ponte chimico e modulare il rilascio dei farmaci *in vivo*. Tali sistemi si distinguono ulteriormente in base alla cleavabilità del linker, ovvero ibridi collegati tramite linker non scindibili e ibridi tramite linker scindibili. Negli ibridi collegati con linker non scindibili, i due farmaci sono legati tramite legami chimici stabili, non idrolizzabili in condizioni fisiologiche. Questi legami sono progettati per essere resistenti all'azione enzimatica e chimica, garantendo così la stabilità della molecola ibrida durante la sua permanenza nell'organismo. L'efficacia di questi ibridi dipende dalla capacità di ciascun farmaco di mantenere la propria attività, specificità e affinità per il bersaglio biologico, anche all'interno della nuova entità molecolare. Per quanto riguarda gli ibridi collegati con linker scindibili, invece, il linker è progettato per essere scisso selettivamente in condizioni fisiologiche o nel microambiente specifico del sito d'azione. Questa strategia viene adottata per migliorare le proprietà farmacodinamiche, prolungare l'emivita, aumentare la selettività verso il tessuto bersaglio e ottimizzare l'attività terapeutica.

In generale, gli ibridi possono essere progettati combinando farmaci che agiscono attraverso lo stesso meccanismo d'azione, per amplificarne l'effetto, oppure farmaci con meccanismi d'azione diversi, per ottenere un'azione multitarget sinergica. L'obiettivo finale è ottimizzare la selettività tissutale e migliorare il profilo terapeutico rispetto ai singoli farmaci somministrati separatamente [53, 54].

1.5 Ibridi Nucleosidi - Ossido Nitrico

1.5.1 *Nucleosidi: ruolo biologico e applicazioni terapeutiche*

I nucleosidi sono composti organici fondamentali per la struttura degli acidi nucleici, come DNA e RNA. Chimicamente, un nucleoside è costituito da due componenti principali: una base azotata (che può essere una purina o una pirimidina) e uno zucchero pentoso (ribosio nel caso dell'RNA, 2'-deossiribosio nel DNA), uniti tramite un legame β -N-glicosidico. Questo legame si forma tra il carbonio 1' del pentoso e un atomo di azoto della base azotata: l'N9 nelle purine e l'N1 nelle pirimidine [55].

A differenza dei nucleotidi, i nucleosidi non contengono un gruppo fosfato. L'aggiunta di uno o più gruppi fosfato a un nucleoside porta infatti alla formazione di un nucleotide, che rappresenta l'unità base degli acidi nucleici [56].

Una parte significativa degli attuali trattamenti chemioterapici per il cancro prevede l'uso di antimetaboliti, in particolare analoghi nucleosidici (NA) modificati che possiedono la capacità di imitare i nucleosidi nativi purinici o pirimidinici e che possono interrompere le vie metaboliche e regolatorie [57]. Questi composti terapeutici imitano i nucleosidi fisiologici in termini di assorbimento e metabolismo e sono incorporati nel DNA appena sintetizzato, con conseguente inibizione della sua sintesi e cessazione della catena. Alcuni di questi farmaci inibiscono anche gli enzimi chiave coinvolti nella generazione dei nucleotidi e nella sintesi dell'RNA e attivano direttamente la cascata di caspasi. Tutti questi effetti possono portare alla morte cellulare.

La famiglia degli NA comprende vari analoghi purinici e pirimidinici. Tra gli analoghi nei nucleosidi pirimidinici, la citosina arabinoside (ara-C, citarabina) è ampiamente utilizzata nel trattamento della leucemia acuta, mentre la gemcitabina ha più recentemente dimostrato attività nel cancro del pancreas, seno e polmoni. I primi due analoghi delle purine ad essere stati descritti sono stati le tiopurine 6 mercaptopurina (6-MP) e 6-tioguanina (6-TG). Questi composti potrebbero essere più appropriatamente designati come "nucleobasi". Altri nuovi analoghi purinici sono la 2-clorodeossiadenosina (2-CdA) e la fludarabina. Questi ultimi farmaci sono stati utilizzati principalmente nel trattamento delle neoplasie ematologiche di basso grado, ovvero quelle neoplasie che progrediscono lentamente. [58].

L'intervento terapeutico che utilizza analoghi nucleosidici non è privo di problemi e il loro uso è spesso limitato da uno scarso assorbimento cellulare, bassa conversione al metabolita attivo del trifosfato, rapida degradazione o clearance e sviluppo di profili di resistenza in alcuni tipi di cellule [59, 60]. Di conseguenza, la ricerca continua per sviluppare le future generazioni di analoghi nucleosidici che superino alcune di queste limitazioni e forniscano nuove opzioni terapeutiche.

1.5.2 Ossido Nitrico

L'ossido nitrico (NO) è un gas endogeno di breve emivita che agisce come una molecola di signalling fondamentale nell'organismo. Ignarro et al. e Palmer et al. hanno identificato simultaneamente nel 1987 NO come importante mediatore della vasodilatazione prodotto dall'endotelio [61, 62]. NO viene sintetizzato dalle ossido nitrico sintasi (NOS) e, quando prodotto in quantità e tempi adeguati dalle cellule dei mammiferi, svolge un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici. Tuttavia, una sintesi eccessiva e non regolata di NO è stata associata a varie condizioni fisiopatologiche, incluso il cancro. L'espressione di NOS è stata rilevata in diversi tipi di tumori come quelli cervicali, mammari, del sistema nervoso centrale, laringei e della testa e del collo [63, 64]. È stato ipotizzato che NO possa modulare diversi eventi correlati alla progressione tumorale [65]. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che NO eserciti effetti opposti nel contesto tumorale. Nello specifico, a concentrazioni rilevate in numerosi campioni clinici, NO sembra favorire la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali. D'altra parte, sono stati riportati anche effetti citotossici di NO, mediati da meccanismi diretti e indiretti [66, 67]. Tuttavia, i dati clinici su pazienti oncologici rimangono ancora limitati. Le potenziali proprietà antitumorali di NO sono attualmente oggetto di studio per applicazioni terapeutiche, sia come agente singolo che in combinazione con altri composti citotossici.

1.5.3 Attività biologica e fisiologica di NO

NO è sintetizzato da una complessa famiglia di enzimi chiamati ossido nitrico sintasi (NOS). Nei mammiferi esistono tre isoforme principali codificate da geni distinti, NOS₁, NOS₂ e NOS₃, che presentano un'omologia del 51-57%,

ma si differenziano per localizzazione, regolazione, proprietà catalitiche e sensibilità agli inibitori. NOS₁ (nNOS), la prima isoforma purificata e clonata dal tessuto neuronale, e NOS₃ (eNOS), scoperta nelle cellule endoteliali, sono isoforme costitutive perché sono espresse in modo continuo rispettivamente nei neuroni e nelle cellule endoteliali. La loro attività dipende da un aumento del calcio intracellulare e comporta la produzione di basse ma transitorie concentrazioni di NO. Al contrario, NOS₂ (iNOS) è un'isoforma inducibile e calcio-dipendente, attivata da stimoli immunologici in tutte le cellule nucleate dei mammiferi [68]. Una volta indotta, iNOS è in grado di produrre elevate concentrazioni di NO in maniera continuativa per diverse ore o addirittura giorni. Un importante regolatore negativo di NOS₂ è il gene oncosoppressore p53, che rileva livelli elevati di NO intracellulare e ne inibisce l'espressione attraverso un meccanismo di feedback negativo, con rilevanti implicazioni in ambito oncologico [69].

A differenza dei classici messaggeri biologici che agiscono attraverso il legame a recettori specifici, NO esercita i suoi effetti mediante un'ampia varietà di reazioni chimiche, la cui natura dipende dalla sua concentrazione e dal microambiente intra- ed extracellulare [68].

In condizioni fisiologiche, le cellule producono basse ma significative quantità di NO, che risulta coinvolto nella regolazione di risposte infiammatorie e attività antiossidanti [70, 71].

Tuttavia, in presenza di una sovraregolazione di iNOS, la produzione eccessiva di NO può condurre a reazioni come nitrificazione (NO₂), nitrosazione (NO⁺) e ossidazione. In tali contesti, NO può reagire con l'ossigeno (O₂) o con l'anione superossido (O₂⁻), dando origine a specie reattive dell'azoto (RNS), tra cui triossido di azoto (N₂O₃) e perossinitrito (ONOO⁻) [72]. Queste molecole inducono stress nitrosativo e ossidativo: N₂O₃ è un potente agente nitrosante che può modificare biomolecole, generando nitrosammine e nitrosotioili, composti potenzialmente cancerogeni. ONOO⁻ e il suo acido coniugato (ONOOH) sono ossidanti citotossici in grado di ossidare tioili e tioeteri, nitrare residui di tirosina, modificare e ossidare la guanosina, degradare carboidrati, indurre perossidazione lipidica e causare rottura del DNA. Tutti questi effetti contribuiscono al danno cellulare e possono avere un ruolo cruciale nella carcinogenesi [73, 74].

1.5.4 NO e carcinogenesi

Come detto in precedenza, è stato dimostrato che NO ha un duplice ruolo nel contesto tumorale, agendo sia come agente citotossico che come promotore della crescita tumorale [75]. NO è altamente reattivo nei confronti degli acidi nucleici e può indurre mutazioni in caso di esposizione cronica. Un'ipotesi suggerisce che le mutazioni indotte dalla sovraregolazione dell'enzima iNOS, possano contribuire alla carcinogenesi in condizioni di infiammazione cronica [76]. Tuttavia, queste mutazioni possono quindi indurre l'arresto della crescita mediato da p53, l'attivazione dell'enzima di riparazione del DNA e la down-regolazione di iNOS [77]. Pertanto, le mutazioni a carico di TP53 possono rappresentare un punto di svolta critico, capace di deviare l'azione di NO dall'arresto della crescita cellulare e dall'apoptosi verso processi che favoriscono la carcinogenesi [76].

È importante sottolineare che i tumori non sono costituiti da un'unica popolazione cellulare omogenea, ma fanno parte di un ambiente complesso costituito di tessuto connettivo, vasi sanguigni e cellule immunitarie, definito come microambiente tumorale (TME). NO può modulare in modo diverso ciascun componente di questo microambiente [76, 78]. Inoltre, NO può alterare il metabolismo delle cellule tumorali, favorendo l'effetto Warburg e contribuendo alla resistenza chemioterapica [79]. Durante le fasi di formazione e progressione tumorale, NO promuove l'angiogenesi, regola la sorveglianza immunitaria e favorisce le metastasi. Campioni patologici di vari tumori maligni mostrano infatti livelli marcatamente elevati di NO o iNOS. L'aumento dell'espressione di iNOS è stato associato a una prognosi sfavorevole in numerose neoplasie, rendendo iNOS un bersaglio promettente per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche [75].

NO è anche un importante modulatore immunitario del TME. Le cellule immunitarie innate, come i macrofagi e le cellule NK, regolano la produzione di NO durante l'interazione con le cellule tumorali [80, 81]. All'interno del TME, NO è prodotto principalmente dall'enzima iNOS, espresso sia nei macrofagi che nelle cellule tumorali, e in misura molto minore da eNOS e nNOS. NO rappresenta uno dei principali mediatori molecolari con cui i macrofagi attuano la risposta immunitaria contro le cellule tumorali, inducendo apoptosi [82]. Tra i meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione dell'apoptosi vi è il legame del NO con il centro eme a_3 -Cu₂B

del sito catalico della citocromo c ossidasi, competendo con l'ossigeno, e questo provoca l'ossidazione e l'inibizione della catena respiratoria mitocondriale. Questo processo porta all'aumento della permeabilità mitocondriale e al rilascio del citocromo c nel citoplasma. Ulteriori meccanismi includono la fosforilazione e la ritenzione nucleare di p53 e la S-nitrosilazione del fattore di trascrizione NF- κ B, che ne inibisce la capacità di legarsi al DNA, compromettendo così la sua funzione anti-apoptotica [83, 84].

È importante ricordare che l'effetto di NO è altamente dipendente dalla sua concentrazione. Ad alte concentrazioni, NO ha un effetto citotossico, inducendo morte cellulare. Al contrario, a basse concentrazioni può avere un effetto protettivo, favorendo la sopravvivenza cellulare. In particolare, a concentrazioni di 50-100 nM, NO è in grado di fosforilare ERK (Extracellular signal-regulated kinase), attivare la via di AKT e stabilizzare HIF1 α , mentre nell'intervallo 300 nM-1 μ M, NO provoca danni al DNA, attiva p53 e genera stress nitrosativo [85].

L'angiogenesi si sviluppa prevalentemente nelle aree centrali ipossiche del tumore, dove la carenza di ossigeno e nutrienti stimola una risposta adattativa finemente regolata, nella quale NO gioca un ruolo cruciale. In condizioni di ipossia, l'attivazione dei fattori inducibili dall'ipossia HIF-1 e HIF-2 porta all'espressione di diversi fattori di crescita pro-angiogenici, tra cui VEGF, FGF-2, IL-8, PDGF, IGF2 e TGF β . Normalmente, in condizioni normossiche, HIF1 α e HIF1 β vengono rapidamente degradati. Tuttavia, in ambienti ipossici (<5% di ossigeno) e in presenza di bassi livelli di NO e specie di azoto reattive (RNS), questi fattori vengono stabilizzati e promuovono la trascrizione di geni pro-angiogenici [86-88].

Oltre a regolare l'espressione genica, basse concentrazioni di NO influenzano direttamente il destino delle cellule endoteliali. In particolare, l'attivazione della guanilato ciclasi (GC) da parte di NO porta ad un aumento dei livelli intracellulari di cGMP (*Figura 5*), che agisce direttamente sull'endotelio per promuovere la sua riorganizzazione in strutture vascolari simili a capillari [89].

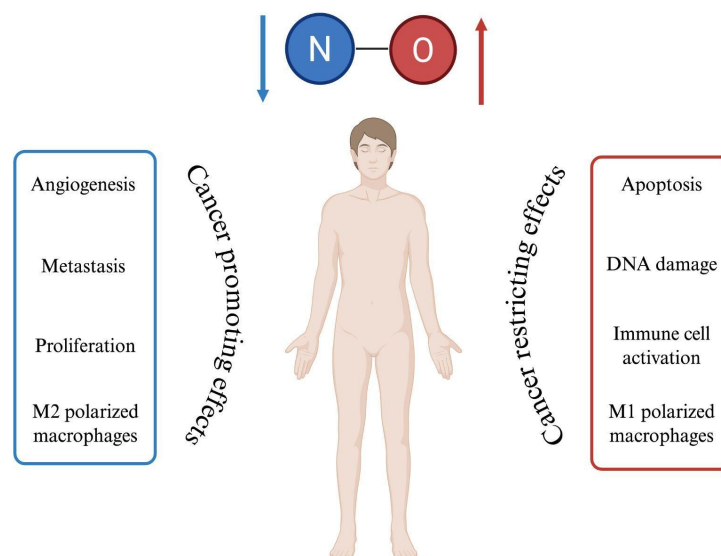


Figura 5. Effetti delle diverse concentrazioni di NO sulla tumorigenesi. Basse concentrazioni di NO migliorano i processi molecolari che mantengono la normale fisiologia cellulare, ma possono influenzare la progressione del cancro attivando la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la metastasi e il differenziamento di cellule immunitarie ad attività immunosoppressive, come i macrofagi M2. Alte concentrazioni di NO portano fisiologicamente a danni al DNA, attivazione di p53 e stress nitrosativo, che può promuovere la carcinogenesi, ma nel microambiente tumorale promuovono processi che attivano una risposta immunitaria antitumorale e migliorano l'efficacia chemioterapica (Bio Render).

Inoltre, bassi livelli di NO sono in grado di attivare le metalloproteinasi della matrice (MMP-1, -9, -13), enzimi deputati alla degradazione dei componenti della matrice extracellulare. Questo processo facilita sia la migrazione delle cellule tumorali oltre la massa tumorale, sia l'invasione delle cellule endoteliali nel tumore, contribuendo alla formazione di nuovi vasi sanguigni [90, 91].

In sintesi, livelli ridotti di NO favoriscono un ambiente tumorale pro-angiogenico, sostenendo il rilascio dei fattori di crescita sopracitati, la riorganizzazione dell'endotelio e la rimodellazione della matrice extracellulare, tutti elementi fondamentali per lo sviluppo della componente vascolare del tumore.

1.5.5 NO donors

I donatori di ossido nitrico (NO donors) sono composti chimici capaci di rilasciare NO all'interno del corpo, esercitando effetti biologici simili a quelli del NO endogeno, come vasodilatazione, azione antiapoptotica, effetti antimicrobici.

L'NO è una molecola segnale chiave nel corpo umano, ma quando la sua produzione endogena è alterata o insufficiente, i donatori esogeni di NO diventano un valido strumento terapeutico. Una volta rilasciato, l'NO diffonde liberamente attraverso le membrane cellulari e attiva l'enzima guanilato ciclasi nelle cellule bersaglio, in particolare nelle cellule muscolari lisce della parete dei vasi sanguigni. Ciò provoca un aumento di cGMP (guanosina monofosfato ciclico), che riduce i livelli intracellulari di calcio, causando il rilassamento del tessuto muscolare liscio, inducendo vasodilatazione e migliorando, quindi, il flusso sanguigno. Inoltre, l'NO inibisce l'aggregazione piastrinica, impedendo la formazione di trombi, e modula la risposta infiammatoria [92].

I donatori di NO si classificano in base alla struttura chimica, al meccanismo di rilascio e alla velocità di liberazione di NO. Tra i più noti troviamo i nitrati organici, come la nitroglicerina, isosorbide dinitrato e isosorbide mononitrato, ampiamente utilizzati in ambito cardiologico per trattare condizioni come l'angina pectoris, l'ipertensione e l'insufficienza cardiaca. Questi composti rilasciano NO attraverso processi enzimatici intracellulari e sono caratterizzati da un'azione rapida, anche se soggetta allo sviluppo di tolleranza in caso di uso prolungato [92].

Ci sono inoltre i nitriti, sia organici che inorganici, come il nitrito di sodio e il nitrito di amile. Questi composti possono rilasciare NO in condizioni specifiche, come durante l'ipossia o lo stress ossidativo, e vengono talvolta impiegati in situazioni di emergenza cardiovascolare o come antidoti.

Un'altra categoria è costituita dagli S-nitrosotiooli che agiscono come riserve intracellulari di NO. Questi composti rilasciano NO in modo più controllato, partecipando alla regolazione di numerosi processi biologici.

Le sydnonimines sono invece donatori di NO che non richiedono attivazione enzimatica per rilasciarlo. Sono noti per la loro capacità di esercitare effetti vasodilatatori prolungati e sono utilizzati in alcuni paesi per il trattamento dell'angina e di altre patologie vascolari.

Infine, esistono composti più recenti e sperimentali, come i diazeniumdiolati che rilasciano NO in modo prevedibile e controllato. Questi vengono principalmente impiegati nell'ambito della ricerca preclinica, poiché mimano con buona precisione la produzione endogena di NO e consentono un'analisi accurata degli effetti fisiologici del composto.

Complessivamente, ciascuna tipologia di donatore NO presenta specifiche caratteristiche farmaco-cinetiche e -dinamiche, rendendoli adatti a determinati contesti clinici. La scelta del composto più idoneo dipende da molteplici fattori: la patologia da trattare, la velocità di rilascio di NO, la durata dell'effetto e il profilo di rischio del paziente [92].

1.5.6 Studi clinici recenti sull'utilizzo di NO come agente terapeutico

Negli ultimi anni, diversi studi clinici hanno esplorato l'utilizzo di NO come agente terapeutico in ambito oncologico, focalizzandosi in particolare sulle sue potenzialità antitumorali. Le evidenze emergenti mostrano che la modulazione dei livelli di NO, attraverso l'impiego di donatori diretti o l'inibizione selettiva di iNOS, può influenzare significativamente la progressione tumorale e la risposta alle terapie convenzionali.

Uno degli studi clinici più promettenti in corso è uno studio di fase 1b ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05351502): NCT05351502), sponsorizzato dalla Beyond Cancer Ltd., che valuta la sicurezza e l'efficacia della somministrazione intratumorale di dosi molto elevate di NO (noto come LV UNO) in combinazione con inibitori dei checkpoint immunitari anti-PD-1, come nivolumab o pembrolizumab. Questo studio è rivolto a pazienti con tumori solidi cutanei o sottocutanei non resecabili, già trattati in precedenza con immunoterapia. I dati preclinici suggeriscono che l'iniezione locale di NO ad alta concentrazione possa aumentare l'espressione tumorale di PD-L1 e migliorare significativamente la sopravvivenza, rispetto all'impiego del solo anti-PD-1. Lo studio ha iniziato l'arruolamento dei pazienti nel 2025 e mira a valutare la tollerabilità, la sicurezza, il tasso di risposta oggettiva (ORR) e la durata della risposta secondo i criteri RECIST 1.1 e iRECIST.

Un altro filone di ricerca clinica si concentra sull'impiego dell'inibitore di NOS, L-NMMA (NG-monometil-L-arginina), con l'obiettivo di ridurre la produzione endogena di NO da parte di iNOS. In particolare, uno studio di fase 1/2 (NCT02834403) ha valutato la combinazione di L-NMMA con

taxani (paclitaxel o docetaxel) in pazienti affetti da carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), sia localmente avanzato (LABC) che metastatico. I risultati sono stati particolarmente incoraggianti nei pazienti con LABC, dove è stata osservata una risposta oggettiva complessiva dell'81,8%, mentre nei casi metastatici l'ORR è stata del 15,4%.

Nel complesso questi studi delineano due strategie terapeutiche distinte ma complementari basate sul metabolismo dell'NO: da un lato l'impiego locale di NO ad alte concentrazioni per potenziare l'efficacia dell'immunoterapia, dall'altro l'inibizione sistemica della sintesi di NO per il trattamento dei tumori che ne inducono un'elevata sintesi, al fine di contrastare la crescita tumorale e la resistenza alle terapie.

1.5.7 Ibridi nucleosidi - NO

Il nostro interesse per lo sviluppo di composti ibridi multitarget per applicazioni farmacologiche ci ha portato ad esplorare molecole in grado di rilasciare NO in risposta a specifici stimoli esterni. In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su ibridi contenenti un'unità donatrice di NO, come la 4-nitro-3-(trifluorometil)anilina, capace di liberare NO mediante fotoinduzione, secondo il meccanismo illustrato in *Figura 6A* [93]. Un vantaggio significativo di questa molecola risiede nella sua unità nitrobenzenica, che risulta non tossica per le cellule sia prima che dopo il rilascio di NO [94]. Inoltre, la presenza di un gruppo amminico libero (-NH₂) fornisce un sito chimicamente reattivo per la coniugazione, senza interferire con il meccanismo fotoattivabile del rilascio di NO [93].

Nell'ambito di un precedente studio [95], è stata indagata la coniugazione di nucleosidi o acidi biliari con la 4-nitro-3-(trifluorometil)anilina, realizzando una piccola "libreria" di composti ibridi. In particolare, è stato utilizzato come partner di coniugazione la 2'-deossadenosina e sono stati selezionati gli acidi biliari ursodesossicolico e chenodesossicolico. Le proprietà fotofisiche e l'attività antiproliferativa di questi ibridi sono state valutate *in vitro* su linee cellulari tumorali, tra cui la linea leucemica K562 e cellule di carcinoma del colon HCT116.

Gli esperimenti fotochimici hanno confermato l'effettivo rilascio di NO da parte di tutti gli ibridi sintetizzati, attivato esclusivamente dalla luce visibile. In particolare, nel caso dell'ibrido dAdo-S-NO (*Figura 6B*), è stata valutata

l'attività antiproliferativa sulle cellule HCT116, sia in condizioni di buio che dopo esposizione alla luce. Dopo 40 minuti di irradiazione ($\lambda = 420 \text{ nm}$, 7 mW cm^{-2}), il valore di IC_{50} dell'ibrido si è ridotto di oltre il 50%, passando da $66.2 \text{ }\mu\text{M}$ a $31.0 \text{ }\mu\text{M}$ [95].

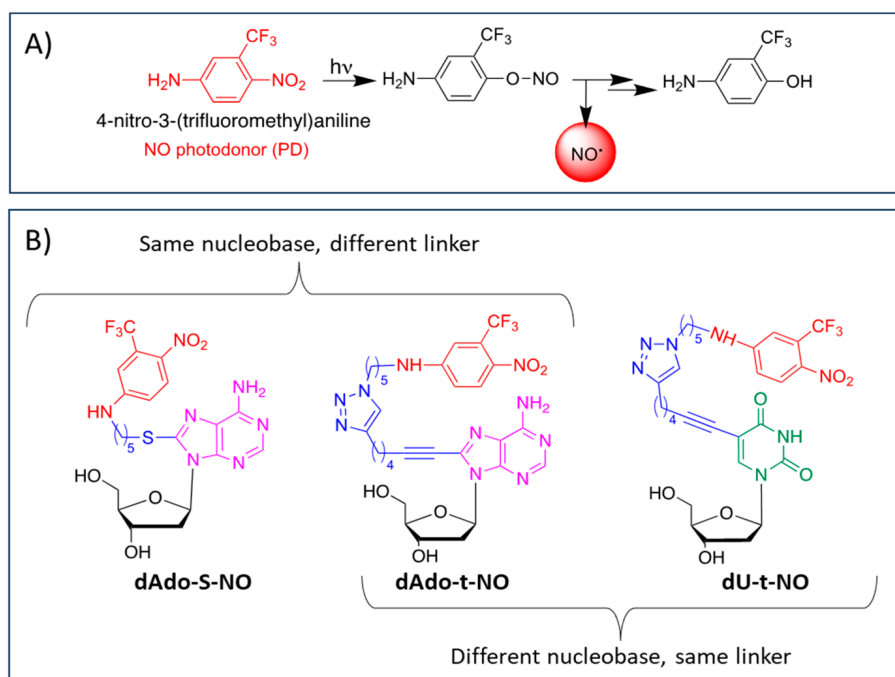


Figura 6. In (A), struttura molecolare della 4-nitro-3-(trifluoromethyl)aniline e meccanismo di rilascio di NO; in (B) struttura molecolare degli ibridi dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO [96].

Questo risultato rappresenta la prima evidenza sperimentale di un'attività combinata chemio- e fototerapeutica *in vitro* per una singola molecola all'interno di questa classe di composti. Sulla base di questi promettenti dati, è stata intrapresa la progettazione di una nuova serie di ibridi nucleoside - donatore di NO, variando la nucleobase e/o l'unità di collegamento. Questi studi sono proseguiti su diverse linee cellulari.

1.6 Ibridi DHA - Acidi Biliari

1.6.1 Diidroartemisinina

L'Artemisinina, un composto estratto dall'*Artemisia Annua L.*, una pianta appartenente alla famiglia delle Composite annuali, è utilizzata nella medicina tradizionale cinese da oltre 2000 anni. La diidroartemisinina (DHA) rappresenta il primo derivato di nuova generazione ottenuto da questa

molecola. L'Artemisinina e i suoi derivati (noti come ARTs) hanno curato oltre un milione di pazienti affetti da malaria [97]. A Tu Youyou, pioniera di questa scoperta, sono stati conferiti numerosi riconoscimenti, tra cui il Premio Lasker-DeBakey per la ricerca clinica nel 2011 e il Premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia nel 2015 [98].

Nel 1973, il gruppo di ricerca di Tu Youyou riuscì a sintetizzare la DHA mediante riduzione dell'Artemisinina con boroidruro di sodio. La presenza di un gruppo ossidrilico nella struttura della DHA non solo ha potenziato l'attività antimalarica dell'Artemisinina, ma ha anche fornito un punto di partenza per la sintesi di una vasta gamma di suoi derivati. Tra i principali farmaci antimalarici sviluppati a partire dalla DHA si annoverano artesunato, artemeter e arteeter [99]. Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che il principale metabolita attivo di questi farmaci è proprio la DHA, suggerendo che essi agiscano principalmente attraverso il rilascio di DHA *in vivo*, considerandola dunque la molecola chiave [100]. La DHA, con formula molecolare $C_{15}H_{24}O_5$ e peso molecolare 284,35 (Figura 7), si è affermata come farmaco antimalarico rapido, efficace e a bassa tossicità.

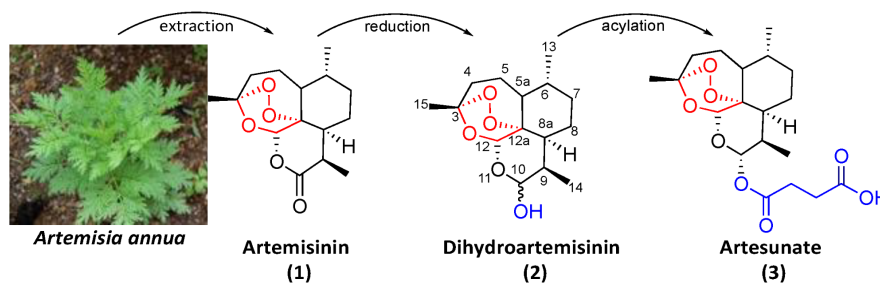


Figura 7. Immagine di *Artemisia Annua* e strutture molecolari di artemisinina (1), diidroartemisinina (2) e artesunato (3) [101].

Rispetto all'Artemisinina, la DHA presenta una migliore solubilità in acqua e un'efficienza antimalarica superiore, risultando oltre 10 volte più efficace. Inoltre, il tasso di recidiva della malaria dopo trattamento con DHA è estremamente basso (1,95%). Dopo il grande successo ottenuto negli anni '90 con il trattamento della malaria, il gruppo Tu Youyou ha iniziato a indagare nuove potenziali indicazioni terapeutiche della DHA, ottenendo risultati promettenti, in particolare nella terapia del lupus eritematoso sistemico [102].

Queste scoperte indicavano che la DHA poteva avere applicazioni terapeutiche più ampie oltre alla sua già consolidata attività antimalarica.

In questo contesto, la DHA ha suscitato un crescente interesse per le sue potenzialità antitumorali, grazie alla sua bassa tossicità e al profilo di sicurezza ben documentato.

1.6.2 Effetti antitumorali della DHA

La DHA ha dimostrato effetti antitumorali su numerosi tipi di cancro, tra cui tumore al polmone, alla mammella, alla prostata, alle ovaie e tumori del sistema digerente. In generale, la DHA si è rivelata efficace nel contrastare la progressione tumorale attraverso diversi meccanismi, tra cui l'inibizione della proliferazione cellulare, l'induzione di apoptosi, la soppressione della metastatizzazione e dell'angiogenesi.

In particolare, è stato dimostrato che la DHA esercita potenti effetti antitumorali *in vitro* e *in vivo* attraverso l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali. Haijun Sun et al. hanno osservato che la DHA inibisce la crescita di cellule di carcinoma gastrico (MGC803, BGC823 e SGC7901) riducendo l'espressione di alcuni marcatori di proliferazione, tra cui PCNA, ciclina E e ciclina D1. Inoltre, la DHA ha dimostrato di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 [103]. Parallelamente, la DHA sembra aumentare l'espressione di Bax e attivare la caspasi-9, riducendo al contempo i livelli di Bcl-2, Bcl-xL, ciclina E, CDK2 e CDK4, portando all'arresto del ciclo nelle cellule di carcinoma esofageo [104]. Kui Liao et al. hanno riscontrato che la DHA inibisce la crescita delle cellule A549 (tumore polmonare non a piccole cellule) attraverso l'inibizione della via di signaling AKT/GSK-3 β /Cyclin D1, provocando l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 [105]. Inoltre, in cellule di HCC, la DHA può bloccare la proliferazione inducendo l'arresto del ciclo nella fase G2/M [106]. Infatti, la DHA ha dimostrato anche forti effetti antitumorali *in vivo*, dal momento che è stato osservato che essa inibisce la crescita di xenotrapianti tumorali di SGC7901, Eca109 ed Ec9706 [103, 107].

Nello specifico per quanto riguarda il carcinoma coloretale, uno studio di Peng Han et al. ha evidenziato che la soppressione di Rac1, una piccola GTPasi, potenzia l'effetto di inibizione della crescita e di arresto del ciclo cellulare indotto dalla DHA nelle linee cellulari di colon carcinoma HCT116

e RKO. L'associazione della DHA con un siRNA per Rac1 in modelli animali ha mostrato un effetto antitumorale significativamente amplificato. In sintesi, il silenziamento di Rac1 potenzia l'attività antitumorale della DHA nel colon carcinoma, principalmente tramite l'inibizione dell'attivazione del fattore nucleare NF-kB [108].

L'inibizione dell'angiogenesi tumorale è una strategia chiave nelle terapie anticancro. È stato dimostrato che la DHA esercita un effetto significativo sull'attività angiogenica. In particolare, la DHA inibisce in modo marcato la proliferazione, la migrazione e la formazione di strutture tubulari da parte delle cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVEC) [109]. Shuangjia Wang et al. hanno osservato che la DHA inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale in cellule di carcinoma pancreatico, riducendo l'attività di legame di NF-kB al DNA e down-regolando l'espressione di geni pro-angiogenici a valle [110]. Un altro studio ha dimostrato che la DHA regola reti microRNA-mRNA che promuovono l'apoptosi e inibiscono l'angiogenesi nel tumore pancreatico, risultati confermati anche *in vivo* [111]. Inoltre, è stato evidenziato che la DHA induce autofagia nelle cellule HUVEC attraverso l'inibizione della via di signalling AKT/mTOR [112]. Un ulteriore studio ha riportato che la DHA aumenta l'espressione del recettore 1 del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR-1) tramite l'upregolazione del fattore di trascrizione ETS-1. È stato quindi ipotizzato che l'effetto anti-angiogenico della DHA possa essere mediato principalmente dall'inibizione dell'angiogenesi dipendente da VEGFR-2 [113].

Tuttavia, ci sono ancora alcune limitazioni per quanto riguarda gli studi sulle proprietà antitumorali della DHA. Di conseguenza, sarà necessario in futuro rivedere gli schemi di dosaggio o progettare nuovi derivati molecolari della DHA, in modo da ridurre la sua tossicità e i suoi effetti collaterali.

1.6.3 Terapia combinata - miglioramento dell'effetto antitumorale della DHA

La combinazione di più farmaci rappresenta una strategia terapeutica comune nella pratica clinica oncologica. Tuttavia, la resistenza multipla delle cellule tumorali e gli effetti collaterali associati ai farmaci chemioterapici spesso compromettono l'efficacia del trattamento [114]. È interessante notare che la terapia combinata può potenziare l'effetto antitumorale dei farmaci e, in

alcuni casi, persino contrastare la resistenza farmacologica [115]. Diversi studi hanno dimostrato che la DHA presenta un'attività antitumorale più marcata quando somministrata in sinergia con diversi farmaci chemioterapici. Inoltre, la DHA si è dimostrata in grado di superare la resistenza farmacologica in alcune linee cellulari tumorali. Recentemente, anche alcune nuove associazioni terapeutiche sono state impiegate in combinazione con la DHA per il trattamento del cancro. Ad esempio, l'associazione tra DHA e carboplatino (CBP) ha dimostrato di indurre una marcata inibizione della crescita delle cellule di cancro ovarico, sia *in vitro* sia in modelli xenotrapiantati, probabilmente attraverso l'attivazione di recettori di morte cellulare e della via mitocondriale dell'apoptosi caspasi-dipendente [116]. Inoltre, nel trattamento del NSCLC, è stato osservato che la DHA potenzia l'effetto inibitorio del gefitinib, un farmaco comunemente usato per NSCLC localizzato o metastatico. In particolare, la combinazione DHA - gefitinib ha inibito la migrazione e l'invasività delle cellule NCI-H1975, interferendo con la via di signalling AKT/mTOR/STAT3, e ha indotto l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M [117]. Infine, nell'HCC e nel cancro pancreatico, la DHA in combinazione con gemcitabina ha indotto l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 e promosso l'apoptosi. In particolare, la DHA ha inibito l'attivazione della via di NF-kB indotta dalla gemcitabina. Anche nei modelli xenotrapiantati *in vivo*, questi risultati sono stati confermati [118, 119].

Di seguito, in *Tabella 2*, un riassunto delle combinazioni terapeutiche di DHA e farmaci chemioterapici, in cui sono indicate le dosi efficaci sia *in vitro* sia *in vivo*, per il trattamento del carcinoma colon-rettale [108].

<i>Carcinoma colon - rettale</i>	
<i>HCT116 tumor xenograft model</i>	
Combinazione	Rac1 siRNA
Dose efficace	Rac1 siRNA: 2 nmol/die per 2 giorni (iniezione intratumorale) DHA :10 mg/kg/die per 21 giorni (i.p.)
Effetti	Inibizione crescita tumorale; riduzione attività di legame al DNA di NF-κB; aumento dell'espressione di p21, caspasi-3 clivato e PARP clivato; diminuzione dell'espressione di PCNA, ciclina D1 e CDK4.
<i>HCT116 and RKO cells</i>	
Combinazione	Rac1 siRNA
Dose efficace	DHA: 10-50 μM
Effetti	Inibizione proliferazione cellulare; induzione di apoptosi e arresto del ciclo cellulare nella fase G1; aumento dell'espressione di caspasi-3 clivato e PARP clivato; inibizione migrazione cellulare; inibizione della trascrizione mediata da NF-κB.

1.6.4 Studi clinici recenti sull'utilizzo della DHA come agente antitumorale

Jansen et al. hanno studiato l'effetto clinico e la sicurezza di Arteminol-R (DHA per somministrazione orale) in pazienti con cancro cervicale avanzato. Dieci pazienti sono state trattate con DHA per 28 giorni, con monitoraggio dei sintomi clinici, delle perdite vaginali, del dolore e delle reazioni avverse. Inoltre, è stata analizzata mediante immunohistochimica l'espressione di marcatori tumorali nei campioni di biopsia. Nel complesso, i risultati hanno mostrato che il trattamento con DHA ha indotto un'attenuazione dei sintomi e il tempo medio per la scomparsa dei sintomi è diminuito rispetto a quello osservato nel gruppo di controllo. Non si sono verificati effetti gravi o potenzialmente letali legati al trattamento con DHA. Inoltre, l'espressione di alcuni marcatori di proliferazione come p53, EGFR e Ki-67 è stata ridotta; il numero di vasi sanguigni CD31-positivi, marker endoteliale spesso utilizzato

come indicatore di angiogenesi, è diminuito e l'espressione del recettore della transferrina 1 (CD71) è aumentata. Pertanto, questo studio ha fornito una base per ritenere che la DHA potrebbe migliorare i sintomi clinici delle pazienti con cancro cervicale avanzato e ha dimostrato di essere ben tollerata [120]. Tuttavia, è necessario condurre ulteriori studi di sopravvivenza in pazienti con cancro cervicale avanzato per valutare la reale efficacia.

Inoltre, sono presenti solo tre studi clinici sulla DHA nei database Clinicaltrials.gov e Chinadrugtrials.org.cn. Di questi, uno solo riguarda l'effetto antitumorale della DHA: si tratta di uno studio di fase II (NCT03402464), che valuta l'efficacia della combinazione di DHA e Icotinib (farmaco antitumorale utilizzato per il trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) con mutazioni specifiche dell'EGFR) in pazienti affetti da NSCLC positivo per EGFR. Il regime terapeutico prevede la somministrazione orale di DHA a 20 mg/die nei giorni 1-3, 40 mg/die nei giorni 4-6, e 80 mg/die due volte al giorno fino a regressione della malattia o tossicità non tollerabile. Questo studio è ancora in corso.

Gli altri due studi clinici riguardano il trattamento del lupus eritematoso sistemico, entrambi in fase II, e sono registrati con i numeri CTR20171440 e NCT03396393.

Alla luce di questi dati, è evidente che la DHA potrebbe avere un elevato potenziale terapeutico; tuttavia, la ricerca clinica sulla DHA come agente antitumorale è ancora agli inizi e rimane frammentaria.

1.6.5 Limiti della DHA

Nonostante i promettenti risultati in merito all'impiego della DHA in ambito oncologico, permangono alcune limitazioni negli studi riguardanti i suoi effetti antitumorali. In primo luogo, il meccanismo d'azione attraverso cui la DHA esercita la sua attività antitumorale non è ancora del tutto chiaro e necessita di ulteriori approfondimenti. In secondo luogo, le vie metaboliche della DHA *in vivo* non sono state ancora sufficientemente studiate, elemento fondamentale per comprendere meglio il suo meccanismo d'azione. In terzo luogo, la neurotossicità e l'ototossicità riscontrate nei trial preclinici non possono essere trascurate: pertanto, sarà importante sviluppare in futuro nuove formulazioni o dosaggi per minimizzare tali effetti collaterali e la tossicità correlata alla DHA. Infine, dato il limitato numero di studi clinici in

ambito oncologico, l'efficacia terapeutica e la capacità di superare le eventuali resistenze farmacologiche della DHA in ambito clinico rimangono ancora da definire.

1.6.6 Acidi biliari

Gli acidi biliari (BA) sono molecole endogene sempre più studiate, non solo per il loro ruolo nella digestione dei lipidi, ma anche per le loro proprietà antitumorali. L'acido ursodesossicolico (UDCA) è un acido biliare idrofilo, ed ha dimostrato di essere citostatico in modelli cellulari di tumore al pancreas, riducendo la proliferazione cellulare, e di down-modulare i marcatori della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e favorire uno stato di stress ossidativo e nitrosativo associato a perossidazione lipidica [121]. Inoltre, in cellule di cancro gastrico resistenti ai farmaci, l'UDCA è in grado di indurre morte cellulare tramite autofagia, soprattutto quando le vie dell'apoptosi sono compromesse [122].

Per quanto riguarda l'acido chenodesossicolico (CDCA), alcuni suoi derivati sintetici hanno dimostrato attività apoptotica nei confronti di cellule di glioblastoma *in vitro* e *in vivo*, con effetti quali attivazione delle caspasi, perdita del potenziale mitocondriale e rilascio di citocromo c [123]. Inoltre, CDCA può favorire la proliferazione di cellule epiteliali intestinali (modello IPEC-J2) regolando il ciclo cellulare, migliorando la funzione mitocondriale e riducendo lo stress ossidativo a basse concentrazioni: ciò suggerisce che il suo effetto è fortemente dipendente dal contesto cellulare e dalla dose [124]. Quindi, UDCA e CDCA mostrano attività biologiche opposte: possono proteggere cellule sane da apoptosi e attivare percorsi di morte cellulare (apoptosi, autofagia) o bloccare la crescita in cellule tumorali [125].

1.6.7 Ibridi DHA – Acidi Biliari

Gli acidi biliari, come accennato precedentemente, sono dotati di attività farmacologicamente rilevanti, tra cui la capacità di inibire la crescita di diverse linee cellulari tumorali, attraverso meccanismi che includono l'induzione di apoptosi, alterazioni di membrana, modulazione dei recettori nucleari e stress ossidativo [126]. Tuttavia, la loro bassa citotossicità ($IC_{50} > 100 \mu M$) in modelli cellulari tumorali ne limita l'uso diretto come agenti

antitumorali, favorendone invece l'impiego come scaffold per lo sviluppo di ibridi anticancro di nuova generazione [125, 126].

Gli acidi biliari offrono diversi siti modificabili chimicamente e possono migliorare la biodisponibilità, l'assorbimento orale, la selettività cellulare e la veicolazione mirata di altri farmaci, grazie alle loro proprietà anfifiliche, alla stabilità in condizioni di pH variabile e alla capacità di interagire con recettori specifici [127-129]. Nell'ultimo decennio, l'interesse per gli ibridi a base di BA come agenti antitumorali è cresciuto in modo significativo. I BA sono stati coniugati con un'ampia gamma di composti bioattivi naturali e sintetici, inclusi farmaci antitumorali in uso clinico, per migliorarne l'efficacia e la selettività terapeutica [130].

Recentemente il gruppo di ricerca di Marchesi E. ha esplorato approcci sintetici per la produzione di ibridi di DHA-BA, utilizzando sia reazioni di condensazione che click chemistry [131]. È importante sottolineare che anche il tipo di linker può influenzare l'attività biologica degli ibridi. In particolare, l'anello triazolico è noto per migliorare i profili farmacologici, farmacocinetici e fisico-chimici dei composti bioattivi, tanto da poter essere considerato esso stesso un farmacoforo [132]. Sulla base di questi promettenti studi, è stata intrapresa la progettazione di una nuova serie di ibridi molecolari DHA-BA, con potenziale attività antitumorale su modelli di CRC (*Figura 8*).

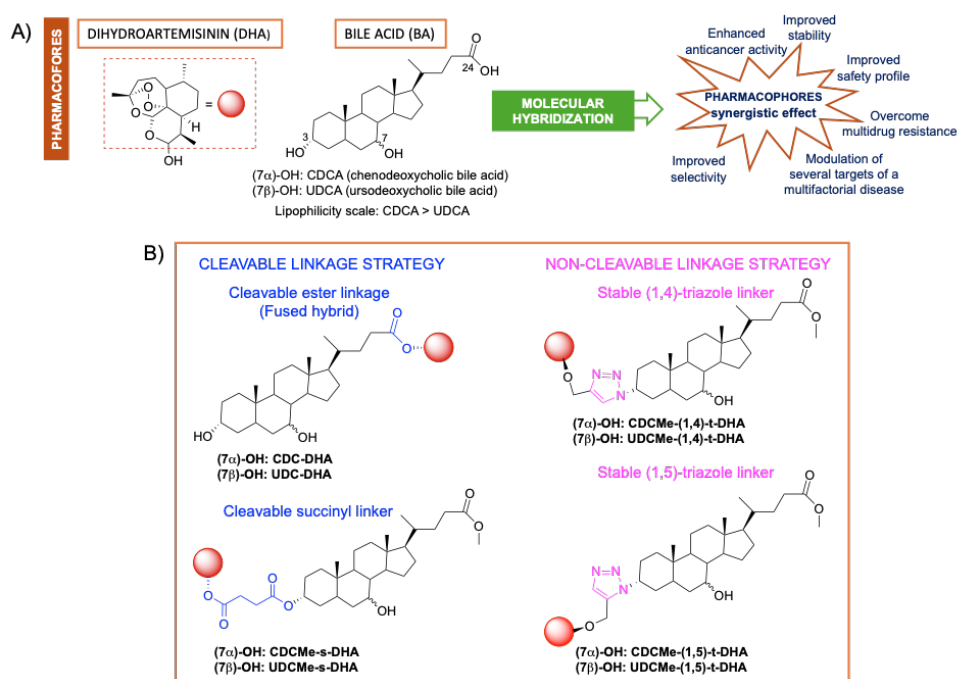


Figura 8. (A) Struttura molecolare della Diidroartemisinina (DHA) e acidi biliari (BA) selezionati. (B) Strutture molecolari degli ibridi DHA-BA.

2. SCOPO DELLA TESI

Il cancro del colon-retto è tra i tumori più frequenti e ha causato oltre 900.000 decessi nel 2022 in tutto il mondo, così come il carcinoma epatocellulare che ha provocato 758.725 decessi. Nonostante l'elevato numero di opzioni terapeutiche raccomandate per il trattamento di questi tumori, sussiste ancora la necessità di nuove terapie. La ricerca mira ad aumentare l'efficacia dei farmaci in uso, ridurre gli effetti collaterali e contrastare il fenomeno della multifarmacoresistenza, offrendo inoltre più opzioni per i pazienti con forme di cancro più rare che non possono essere trattati con le terapie standard.

Scopo di questa tesi è stato valutare biologicamente due differenti classi di ibridi molecolari, progettate secondo la strategia dell'ibridazione molecolare, che mira a combinare in un'unica molecola due o più farmacofori dotati di attività biologiche complementari, con l'obiettivo di ottenere composti caratterizzati da un profilo farmacologico potenziato e da una maggiore efficacia terapeutica.

Il primo gruppo di composti oggetto di studio è costituito da ibridi *nucleosidi - ossido nitrico*, sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Daniela Perrone del Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Prevenzione. L'interesse verso questi ibridi nasce dalle proprietà biologiche dei loro costituenti. Innanzitutto, l'ossido nitrico (NO) è noto per la sua capacità di indurre apoptosi cellulare ed inibire l'angiogenesi, due processi fondamentali nella soppressione della crescita tumorale. Inoltre, esso presenta una breve emivita, caratteristica che potrebbe ridurre una possibile tossicità e migliorando quindi la qualità del trattamento. I nucleosidi, invece, dal punto di vista biologico, possono comportarsi come antimetaboliti e possono inibire la divisione cellulare e la replicazione virale con potenziali benefici terapeutici. Gli ibridi presi in esame (d-ADO-S-NO, d-ADO-t-NO e d-U-t-NO) sono stati ottenuti mediante coniugazione della 2'-deossiadenosina e della 2'-deossiuridina con la 1-nitro-2(trifluorometil)anilina, gruppo fotodonnatore di NO.

La seconda classe di composti analizzata riguarda gli ibridi *diidroartemisinina - acidi biliari*. La DHA è stata coniugata con acidi biliari, in particolare l'acido ursodesossicolico e l'acido chenodesossicolico, noti per la loro capacità di migliorare la biodisponibilità dei farmaci e migliorarne la permeabilità cellulare.

In particolare, gli ibridi fusi UDC-DHA e CDC-DHA sono stati ottenuti sfruttando direttamente i gruppi funzionali già presenti nei farmacofori progenitori. Gli ibridi coniugati tramite linker scindibili, UDCMe-s-DHA e CDCMe-s-DHA, sono stati sintetizzati utilizzando un'unità spaziatrice scindibile originariamente non presente in nessuno dei due farmacofori. Inoltre, quattro ibridi coniugati con anello triazolico, ovvero UDCMe-(1,4)-t-DHA, UDCMe-(1,5)-t-DHA, CDCMe-(1,4)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA, sono stati preparati tramite click chemistry, attraverso la formazione di linker bioisosterici non scindibili a base di 1,4 e 1,5 triazoli. Questa combinazione mira, dunque, a potenziare l'attività biologica della DHA, migliorandone la stabilità, la penetrazione nei tessuti e la capacità di superare i fenomeni di resistenza ai farmaci osservati in alcune linee cellulari tumorali. Il lavoro di tesi, quindi, si propone di valutare l'attività biologica di entrambe le tipologie di ibridi, analizzandone gli effetti su modelli cellulari *in vitro*, al fine di evidenziare eventuali proprietà antitumorali e di fornire un contributo alla comprensione del potenziale terapeutico dell'ibridazione molecolare come approccio innovativo nello sviluppo di nuovi agenti bioattivi.

3. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DEGLI IBRIDI NUCLEOSIDI – OSSIDO NITRICO

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Linee cellulari e trattamenti

La valutazione degli effetti biologici dei tre ibridi nucleosidi-NO, un ibrido della 2'-deossiuridina contenente un gruppo fotodatore di NO (dU-t-NO) e due ibridi analoghi della 2'-deossiadenosina (dAdo-S-NO e dAdo-t-NO), è stata eseguita sulla linea cellulare RKO di colon carcinoma umano e sulla linea cellulare Hep3B2.1-7 di epatocarcinoma umano, entrambe acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Le cellule RKO e Hep3B2.1-7 sono state coltivate in DMEM (Corning, Glendale, AZ, USA) addizionato con il 10% di siero bovino fetale (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomicina (soluzione L-glutamina-penicillina-streptomicina da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Entrambe le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂ e al 90% di umidità.

Sia le cellule di colon carcinoma, sia quelle di epatocarcinoma sono state valutate inizialmente in assenza di fotoinduzione, in seguito al trattamento con diverse concentrazioni di dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO. Successivamente, sono stati valutati gli effetti dell'irradiazione, effettuato con l'apparecchio custom-made descritto di seguito, sull'efficacia di dAdo-t-NO e dU-t-NO nelle RKO e sull'efficacia dell'ibrido dAdo-t-NO nelle Hep3B2.1-7.

3.1.2 Apparecchiatura di irradiazione per esperimenti in vitro e valutazione dell'induzione fotochimica di NO

L'Apparecchio di irradiazione "custom-made" utilizzato negli esperimenti sulle cellule era costituito da un supporto con telaio in alluminio che sorreggeva, alla base, una matrice di 100 × 80 mm di 48 LED, derivata da una striscia LED UV SMD5050 e alimentata da un alimentatore a 24 V, modello Mean Well HLG-100H-24B. Ogni LED UV era in grado di generare fino a 10 mW di potenza radiante ottica a una lunghezza d'onda con picco a 380 nm. Il telaio poteva ospitare piastre di coltura cellulare standard posizionate ad un'altezza regolabile per regolare la densità di potenza ottica al valore desiderato. In alternativa, il

dispositivo era dotato di una sorgente che irradia dall'alto verso il basso realizzata agganciando uno dei sei LED di una Intelligent LED Strip Solutions modello ILS-XC06-S410-SD111 a una fibra ottica che montava una lente di collimazione all'estremità di uscita fissata al telaio di supporto. La singola sorgente LED era regolabile orizzontalmente e verticalmente per produrre un'illuminazione uniforme su un punto di circa 5 cm di diametro. La lunghezza d'onda del picco del singolo LED era di 420 nm e la densità di potenza è stata mantenuta nell'intervallo di 0.5-1.5 mW/cm² sul piano della cella. Per modulare il profilo spettrale del LED al fine di eliminare le lunghezze d'onda inferiori a 410 nm è stato utilizzato un filtro Schott GG420 (*Figura 9*). La fotogenerazione di NO è stata determinata valutando la quantità di nitrito formata in seguito ad irradiazione degli ibridi per 40 minuti con la sorgente LED a 420 nm utilizzando il sistema di reagenti Griess Reagent System (Promega, Madison, WI, USA), seguendo le istruzioni del produttore.

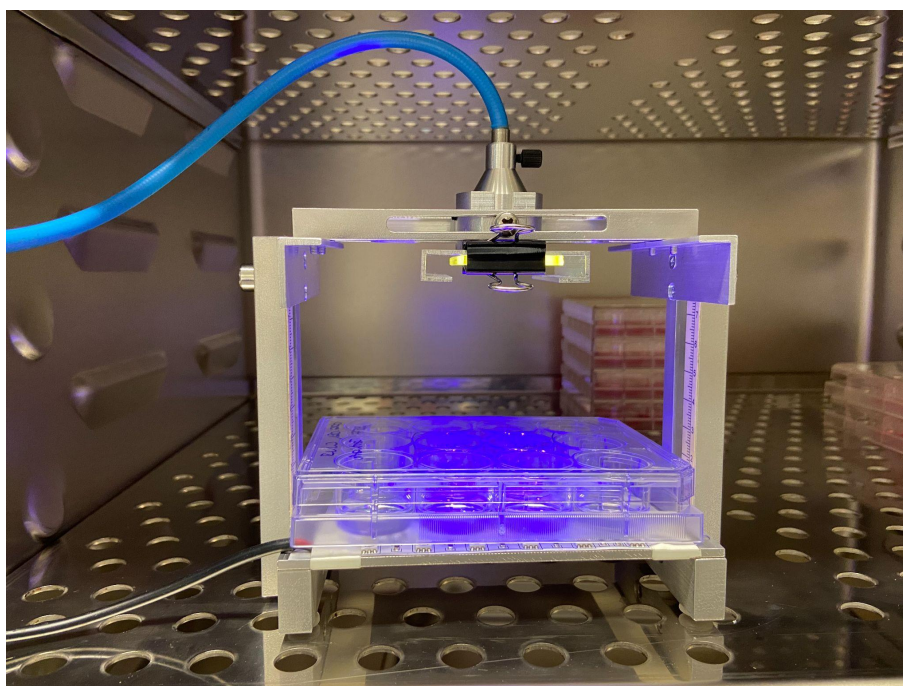


Figura 9. Apparato di irradiazione custom-made per gli esperimenti in vitro.

3.1.3 Valutazione degli effetti citotossici e citostatici degli ibridi in assenza di irradiazione

Per la valutazione degli effetti biologici degli ibridi, le molecole sono state ricostituite in DMSO, la cui concentrazione finale non ha mai superato lo 0.1%.

In una prima serie di esperimenti, le linee cellulari RKO e Hep3B2.1-7 sono state trattate per 36 o 72 ore con diverse concentrazioni di dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO (intervallo: 10-100 μ M) e mantenute al buio, in assenza di irradiazione. Dopo 36 ore di trattamento, è stata effettuata l'analisi del ciclo cellulare in citometria a flusso mediante saggio di proliferazione cellulare con BrdU, il quale permette di determinare la percentuale di cellule nelle diverse fasi G0/G1, S e G2/M.

A questo scopo, le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-BrdU (5-bromodeossiridina) in grado di legarsi alla BrdU precedentemente incorporata nel DNA, in seguito alla permeabilizzazione delle cellule e denaturazione del DNA effettuata con acido cloridrico. Nello specifico, trascorso il tempo di trattamento delle cellule RKO e Hep3B2.1-7, queste ultime sono state incubate con BrdU 10 μ M per 1.5 ore a 37°C in incubatore. Le cellule sono state poi staccate mediante tripsinizzazione, raccolte, centrifugate, fissate in etanolo freddo al 70% per 20 minuti a temperatura ambiente e lavate con PBS 1X (phosphate-buffered saline, Euroclone, Milano, Italia) contenente lo 0.1% di BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich); le cellule sono state quindi risospese in una soluzione denaturante di HCl 2N ed incubate per 20 minuti, dopodiché esse sono state trattate con sodio borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0.1M al fine di inattivare l'HCl. A questo punto, le cellule sono state poi incubate con un'anticorpo primario anti-BrdU (BioLegend, San Diego, CA, USA) alla concentrazione di 0.5 mg/mL per 20 minuti a temperatura ambiente, lavate con PBS 1X addizionato dello 0.1% di BSA e successivamente incubate, sempre per 20 minuti a temperatura ambiente, con un'anticorpo secondario coniugato FITC (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA) alla concentrazione di 1.5 mg/mL. Infine, i campioni sono stati colorati con PI (50 μ g/mL, Sigma-Aldrich) e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente per poi procedere immediatamente all'acquisizione tramite citofluorimetro BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Josè, CA, USA).

L'analisi dei dati riguardanti il ciclo cellulare è stata eseguita utilizzando il software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Gli effetti degli ibridi sulla vitalità e sull'attività metabolica delle cellule RKO e Hep3B2.1-7 sono stati valutati dopo 72 ore di trattamento mediante conta con Trypan Blue, utilizzando una camera di Burker, e tramite saggio colorimetrico MTT, utilizzando il Cell Proliferation Kit I (Roche Diagnostics Corporation,

Indianapolis, IN, USA). Il saggio colorimetrico MTT si basa sull'utilizzo di un sale di tetrazolio, il bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive di scindere l'anello tetrazolico della molecola MTT di colore giallo per dare origine a un sale di formazano di colore violetto. In particolare, le cellule RKO e Hep3B2.1-7, dopo i trattamenti, sono state incubate con l'MTT per 4 ore a 37°C, dopodiché il sale di formazano è stato solubilizzato utilizzando la specifica soluzione fornita dal kit affinché potesse poi essere effettuata la quantificazione. Quest'ultima è stata eseguita utilizzando un lettore di micropiastre TECAN Infinite® M Plex (Tecan Trading AG, Männedorf, Svizzera, CH), misurando l'assorbanza a 570 nm.

La citotossicità degli ibridi è stata confermata anche dall'analisi della percentuale di apoptosi mediante citometria a flusso. A tal fine, le cellule sono state colorate con Annessina V-FITC e Ioduro di Propidio (PI; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). L'Annessina V ha la capacità di legarsi alla fosfatidilserina, un fosfolipide che normalmente si trova nel lato interno della membrana cellulare, ma che durante le prime fasi dell'apoptosi (apoptosi precoce) viene esposta sulla superficie cellulare esterna. Il PI, invece, è un intercalante del DNA che emette fluorescenza nel rosso, e che può penetrare nelle cellule e intercalarsi stechiometricamente nel DNA solo nel caso in cui la membrana cellulare non sia integra e quindi anche nelle fasi tardive dell'apoptosi.

In particolare, il protocollo di colorazione con Annessina V-FITC/PI prevede, trascorsi gli opportuni tempi di incubazione con i trattamenti, il distacco delle cellule mediante tripsinizzazione, la loro raccolta in tubi da citofluorimetria e la centrifugazione a 1250 rpm per 6 minuti. Una volta eliminato il surnatante, il pellet cellulare viene risospeso in PBS 1X per lavare le cellule dai residui di terreno ed incubato per 15 minuti in ghiaccio con Annessina V a una concentrazione finale di 0.25 µg/ml e PI (concentrazione finale 5 µg/mL) nello specifico binding buffer fornito dal kit. Dopo la colorazione, i campioni sono stati acquisiti immediatamente al citofluorimetro. Anche in questo caso, l'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Per una valutazione comparativa dei valori di IC₅₀ degli ibridi, la linea cellulare RKO è stata anche trattata con una dose scalare di Paclitaxel (intervallo: 1-500 nM), utilizzata come farmaco di riferimento, seguendo il protocollo

precedentemente descritto [133]. In particolare, le cellule sono state incubate con Paclitaxel per 4 ore e poi i trattamenti sono stati rimossi e sostituiti con medium fresco completo; dopo altre 72 ore, il numero di cellule vitali e l'apoptosi sono stati valutati come descritto sopra.

3.1.4 Valutazione degli effetti dell'irradiazione sull'efficacia di dAdo-t-NO e dU-t-NO

In una seconda serie di esperimenti, è stato valutato l'effetto del rilascio di NO sulla vitalità cellulare in seguito a fotoattivazione degli ibridi. A questo proposito, le cellule RKO sono state trattate per 72 ore con 50 e 100 μM di ibridi dAdo-t-NO o dU-t-NO, mentre le cellule Hep3B2.1-7 sono state trattate con 50 e 100 μM dell'ibrido dAdo-t-NO. Dopo 12 ore di trattamento, entrambe le linee cellulari sono state irradiate per 40 minuti utilizzando l'apparato sopra descritto (*Figura 9*). L'irradiazione è stata eseguita a 37 °C in presenza del 5% di CO₂ e 90% di umidità e successivamente le cellule sono state mantenute in questo ambiente fino a 72 ore dal trattamento iniziale, per poi essere analizzate per valutare la citotossicità indotta da dAdo-t-NO o dU-t-NO tramite conta con Trypan Blue e analisi dell'apoptosi, come descritto precedentemente. Parallelamente a questi esperimenti, le cellule sono state anche sottoposte agli stessi trattamenti al buio, in assenza di irradiazione, come controllo.

3.1.5 Analisi statistica

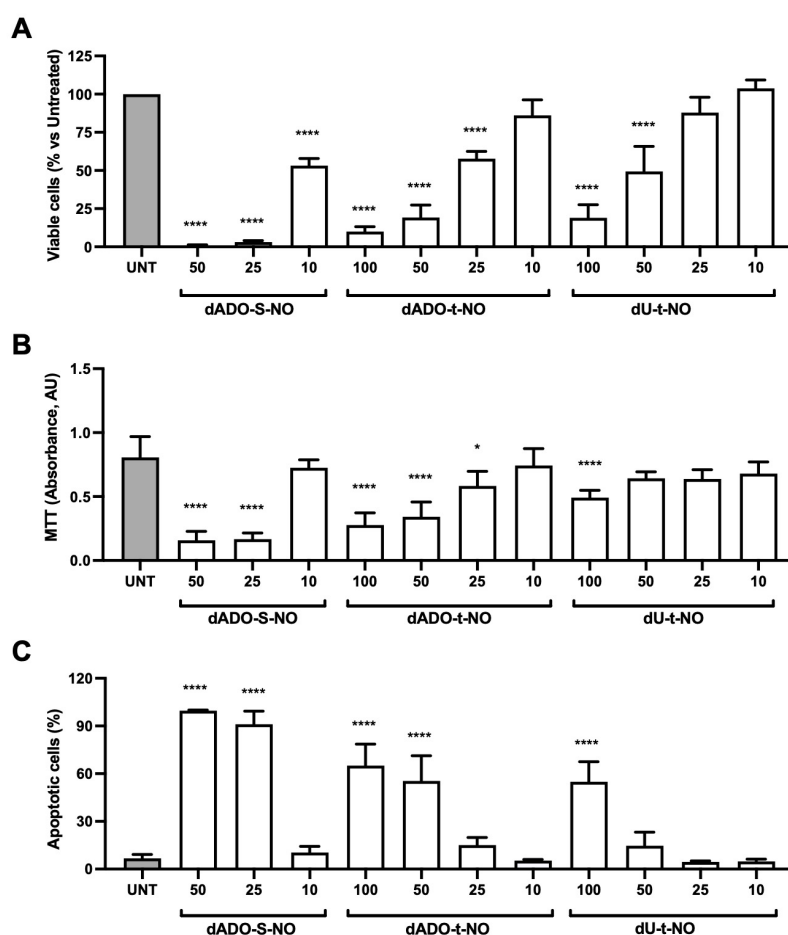
Per la valutazione degli effetti biologici degli ibridi, sono stati analizzati dati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti, mediante test one-way ANOVA seguito dal post-hoc test di Bonferroni (per correzioni multiple) utilizzando il software GraphPad Prism, versione 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

I risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD) di esperimenti ripetuti. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$. I valori IC₅₀ sono stati calcolati utilizzando il software GraphPad Prism, versione 8.4.2 (GraphPad Software).

3.2 RISULTATI

3.2.1 *dAdo-S-NO*, *dAdo-t-NO* e *dU-t-NO*, in assenza di irradiazione, esercitano un effetto citotossico e citostatico in cellule di colon carcinoma ed epatocarcinoma

Gli effetti biologici dei tre ibridi sono stati inizialmente testati, in assenza di irradiazione, sulla linea cellulare RKO di colon carcinoma umano. Come mostrato in *Figura 10A-B*, *dAdo-S-NO*, *dAdo-t-NO* e *dU-t-NO* inducevano una riduzione dose-dipendente del numero di cellule vitali e della proliferazione cellulare di RKO dopo 72 ore di trattamento.



*Figura 10. Effetti biologici di dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO sulla linea cellulare RKO. Valutazione della vitalità cellulare (A), proliferazione (B) e apoptosi (C) nelle cellule RKO trattate per 72 h con tre diverse concentrazioni di dAdo-S-NO (50; 25; 10 μM) o quattro differenti concentrazioni (100; 50; 25; 10 μM) di ciascuno dei seguenti ibridi: dAdo-t-NO e dU-t-NO. Le incubazioni con gli ibridi sono state eseguite al buio. I risultati sono riportati come media ± DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.*

In particolare, dAdo-S-NO si è dimostrato efficace nel ridurre, in modo dose-dipendente, il numero di cellule vitali e la proliferazione cellulare delle RKO a tutte le concentrazioni testate, soprattutto se usato alle concentrazioni di 25 e 50 μM . D'altra parte, dAdo-t-NO era significativamente efficace nell'intervallo di 25-100 μM ; tuttavia, induceva solo una leggera riduzione della vitalità cellulare se usato alla concentrazione di 10 μM . Al contrario, l'ibrido dU-t-NO era in grado di ridurre significativamente il numero di cellule vitali a 50 e 100 μM e solo leggermente a 25 μM , ma sembrava essere quasi inefficace se usato a 10 μM . La valutazione dei livelli di apoptosi indotti nella linea cellulare RKO da dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO rifletteva essenzialmente gli effetti dipendenti dalla dose esercitati sulla vitalità cellulare. Infatti, un effetto apoptotico significativo veniva indotto da dAdo-S-NO a 25 e 50 μM , dAdo-t-NO a 50-100 μM e dU-t-NO a 100 μM (*Figura 10C*).

Analogamente, l'analisi dell'effetto degli ibridi sulla linea cellulare Hep3B2.1-7 di epatocarcinoma umano, sempre in assenza di irradiazione, dimostrava la loro efficacia nel ridurre la vitalità cellulare in modo dose-dipendente (*Figura 11*). Gli effetti più importanti su questa linea cellulare in termini di riduzione del numero di cellule e della proliferazione cellulare venivano indotti da dAdo-S-NO alle concentrazioni di 25 e 50 μM e da dAdo-t-NO e dU-t-NO a 50-100 μM , anche se dU-t-NO era un po' meno efficace rispetto a dAdo-t-NO (*Figura 11A-B*).

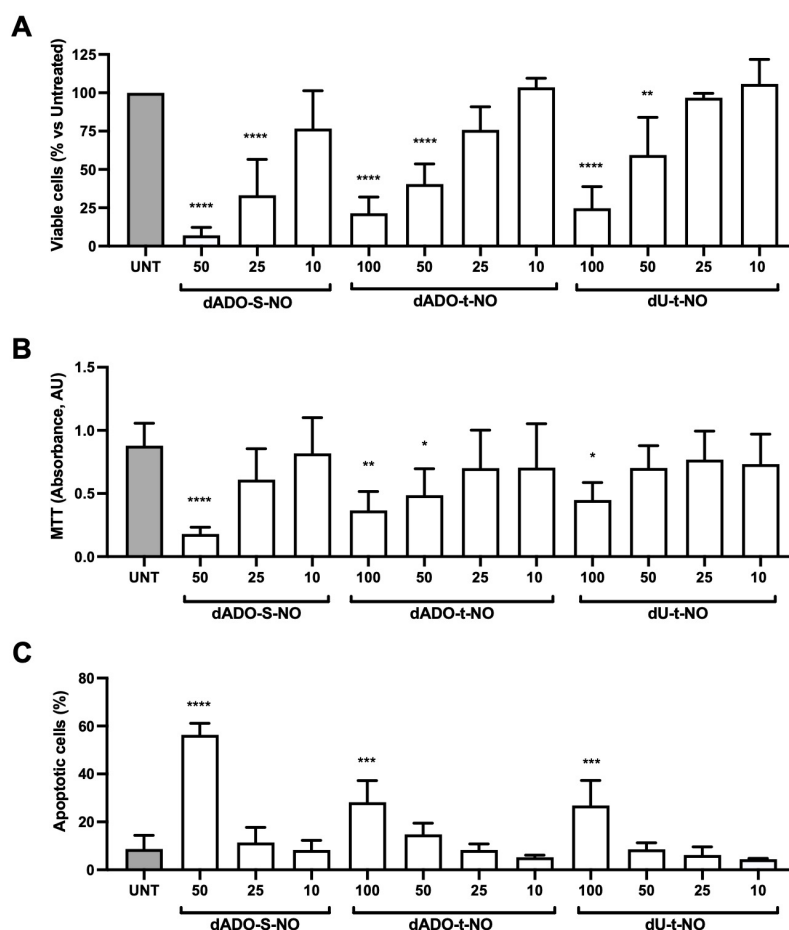


Figura 11. Effetti biologici di dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO sulla linea cellulare Hep 3B2.1-7. Valutazione della vitalità cellulare (A), proliferazione (B) e apoptosi (C) nelle cellule Hep 3B2.1-7 trattate per 72 h con tre diverse concentrazioni di dAdo-S-NO (50; 25; 10 μM) o quattro differenti concentrazioni (100; 50; 25; 10 μM) di ciascuno dei seguenti ibridi: dAdo-t-NO e dU-t-NO. Le incubazioni con gli ibridi sono state eseguite al buio. I risultati sono riportati come media ± DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

Le differenze dell'efficacia dei tre ibridi sulle cellule RKO e Hep 3B2.1-7 risultavano evidenti anche osservando i loro valori di IC_{50} , mostrati nella Tabella 3, che riporta anche i valori di IC_{50} del Paclitaxel, usato come farmaco di riferimento.

Tabella 3. Valori di $IC_{50} \pm SEM$ (errore standard della media) di ciascun ibrido e del Paclitaxel, riportati per le due linee cellulari, RKO e Hep 3B2.1-7.

<i>Compound</i>	<i>RKO</i> <i>IC₅₀ (μM)</i>	<i>Hep 3B2.1-7</i> <i>IC₅₀ (μM)</i>
<i>dAdo-S-NO</i>	10.39 ± 0.13	17.64 ± 2.19
<i>dAdo-t-NO</i>	27.61 ± 1.22	44.46 ± 3.45
<i>dU-t-NO</i>	51.74 ± 2.69	61.66 ± 5.29
<i>Paclitaxel</i>	5.01 x 10 ⁻³ ± 0.74 x 10 ⁻³	0.41 ± 0.12

Nel caso delle cellule Hep 3B2.1-7, solo le concentrazioni più elevate dei tre ibridi inducevano un'apoptosi significativa, come mostrato nella *Figura 11C*. Da notare che abbiamo scelto di utilizzare diversi intervalli di concentrazioni per dAdo-S-NO (50–10 μM) e dAdo-t-NO/dU-t-NO (100–10 μM) sulla base della diversa efficacia sia sulla linea cellulare RKO che su Hep 3B2.1-7.

In questa prima serie di esperimenti, eseguiti in assenza di irradiazione, abbiamo anche analizzato l'effetto degli ibridi sul ciclo cellulare delle RKO e Hep 3B2.1-7. Come mostrato nella *Figura 12* e nella *Figura 13*, tutti e tre i composti provocavano un arresto del ciclo cellulare in modo dose-dipendente, effetto che, però, non era rilevabile alla concentrazione di 10 μM. Da notare che la concentrazione di 25 μM sembrava essere meno efficace sulle cellule Hep 3B2.1-7 rispetto alla linea cellulare RKO.

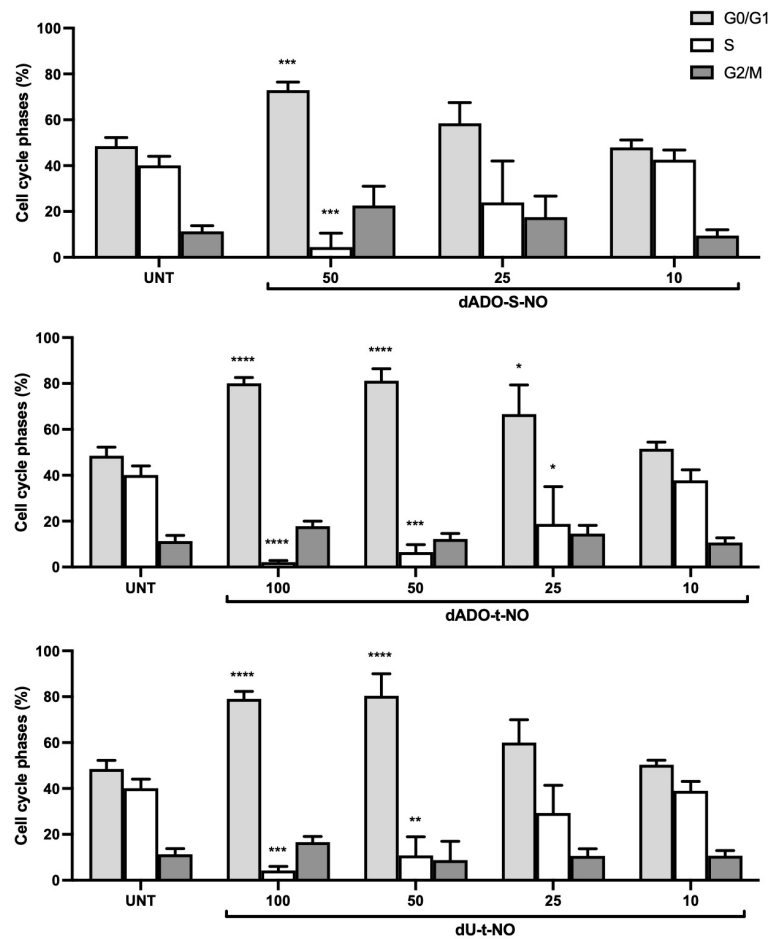


Figura 12. Effetti dei tre ibridi sul ciclo cellulare delle cellule RKO. La figura mostra la distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare dopo trattamento per 36 h con tre diverse concentrazioni di dAdo-S-NO (50; 25; 10 μ M) o quattro differenti concentrazioni (100; 50; 25; 10 μ M) di ciascuno dei seguenti ibridi: dAdo-t-NO e dU-t-NO. Le incubazioni con gli ibridi sono state eseguite al buio. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

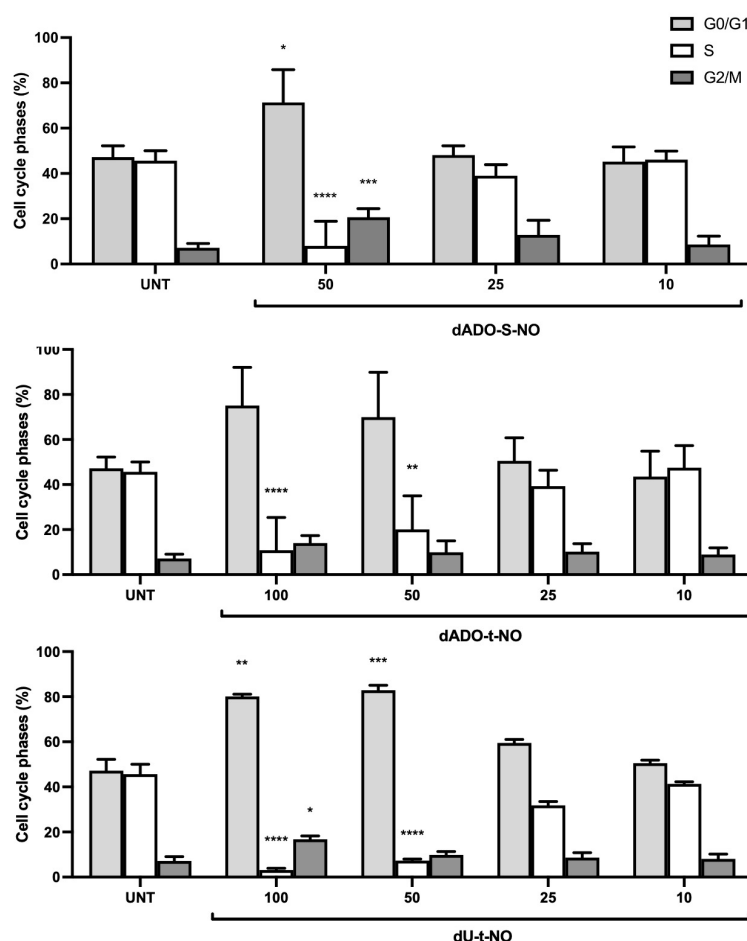


Figura 13. Effetti dei tre ibridi sul ciclo cellulare delle cellule Hep 3B2.1-7. La figura mostra la distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare dopo trattamento per 36 h con tre diverse concentrazioni di dAdo-S-NO (50; 25; 10 μ M) o quattro differenti concentrazioni (100; 50; 25; 10 μ M) di ciascuno dei seguenti ibridi: dAdo-t-NO e dU-t-NO. Le incubazioni con gli ibridi sono state eseguite al buio. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

3.2.2 In seguito a irradiazione, dU-t-NO riduce il numero di cellule vitali nella linea cellulare RKO e dAdo-t-NO esercita il medesimo effetto sulle linee cellulari RKO e Hep3B2.1-7

Con l'obiettivo di generare livelli di NO in grado di esercitare attività antitumorale attraverso il rilascio fotochimico, per gli esperimenti con irradiazione abbiamo scelto di testare dAdo-t-NO e dU-t-NO alle concentrazioni più alte (50 e 100 μ M) sulle cellule RKO [134]. L'analisi degli effetti di dAdo-t-NO e dU-t-NO sul numero di cellule vitali non ha dimostrato alcuna differenza significativa tra cellule non irradiate e irradiate secondo il protocollo descritto

nella sezione Materiali e Metodi (Figura 14A-B). Anche nell'analisi dell'apoptosi non è stata rilevata alcuna differenza tra le cellule trattate in presenza o in assenza di irradiazione. Da notare che non è stata osservata alcuna differenza significativa per entrambi gli ibridi in termini di vitalità e livello di apoptosi basali (cellule non trattate) quando si confrontavano cellule non trattate con cellule irradiate dopo il tempo di incubazione totale (72 ore), escludendo il fatto che l'irradiazione stessa potesse essere la causa di una riduzione basale della vitalità cellulare.

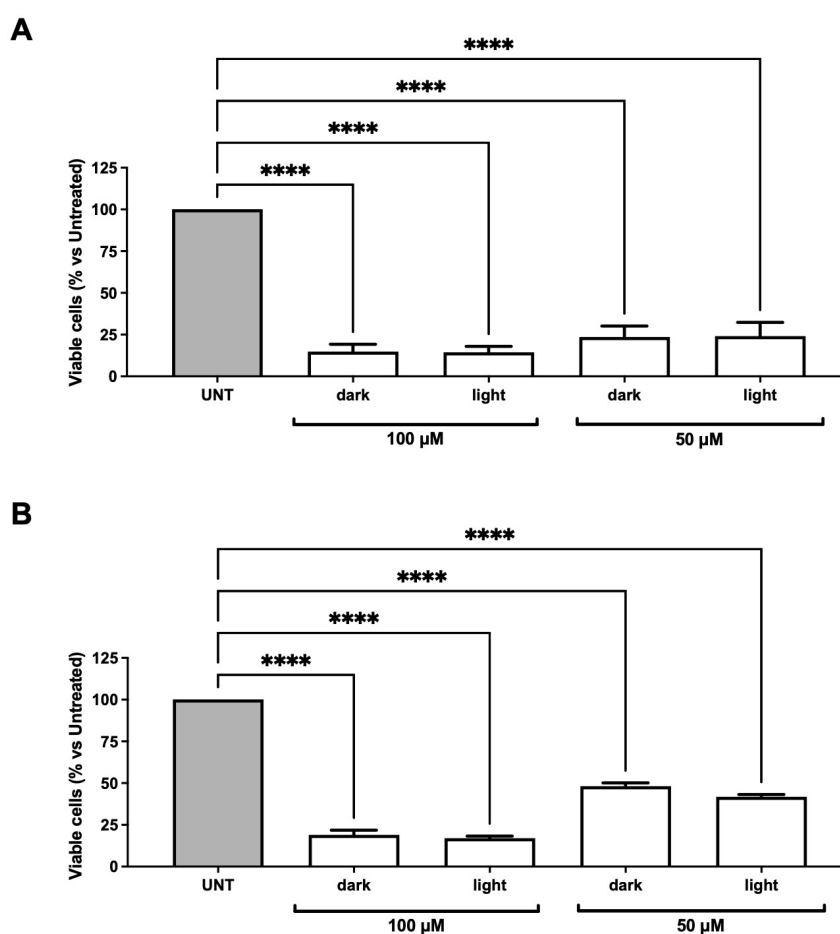


Figura 14. Effetti comparativi di dAdo-t-NO e dU-t-NO sulla riduzione del numero di cellule RKO al buio (dark) o dopo l'irradiazione (light). La figura mostra gli effetti di 50 e 100 μ M degli ibridi dAdo-t-NO (A) e dU-t-NO (B). I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

L'ibrido dAdo-t-NO è stato testato, in seguito a irradiazione, anche sulla linea cellulare Hep3B2.1-7. Anche in questo caso, l'analisi dell'effetto di dAdo-t-NO sul numero di cellule vitali e sull'induzione di apoptosi non ha mostrato alcuna

differenza significativa se le cellule venivano mantenute al buio o irradiate (Figura 15). Da notare che anche nel caso delle cellule Hep3B2.1-7, come per la linea cellulare RKO, non è risultata evidente alcuna differenza significativa tra la percentuale di cellule vitali o il livello di apoptosi delle cellule non irradiate o irradiate dopo il tempo complessivo di trattamento alle condizioni basali (cellule non trattate).

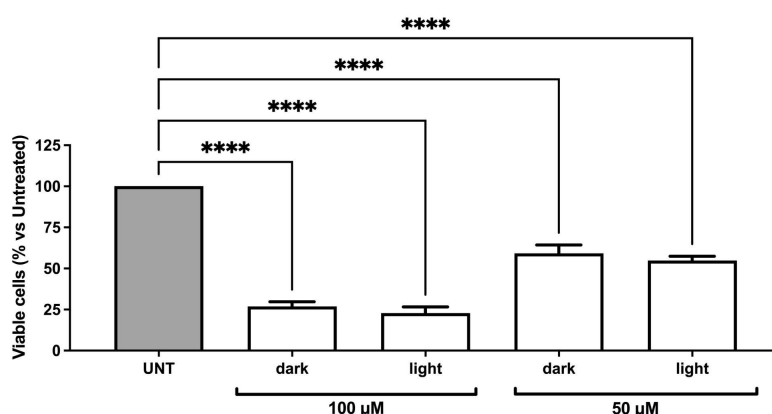


Figura 15. Effetti di dAdo-t-NO sulla riduzione del numero delle cellule Hep 3B2.1-7 al buio (dark) o dopo l'irradiazione (light). La figura mostra gli effetti di 50 e 100 μM dell'ibrido dAdo-t-NO. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

4. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DEGLI IBRIDI DHA-ACIDI BILIARI

4.1 MATERIALI E METODI

4.1.1 Linee cellulari e trattamenti

Gli effetti biologici della DHA e di tutti i nuovi ibridi DHA-BAs sintetizzati sono stati valutati su un modello *in vitro* di carcinoma di colon umano, la linea cellulare HCT116, acquistata dall'ATCC.

Le cellule HCT116 sono state coltivate in DMEM (Corning) addizionato con il 10% di FBS (Gibco), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomicina (Sigma-Aldrich).

La linea cellulare 3T3-L1, anch'essa ottenuta dall'ATCC, è stata utilizzata come linea cellulare non tumorale per valutare la potenziale tossicità della DHA e degli ibridi. A tale scopo, le cellule sono state coltivate in DMEM contenente il 10% di FBS (Gibco), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomicina (Sigma-Aldrich).

Le cellule endoteliali HUVEC sono state acquistate da Lonza (Basilea, Svizzera) e coltivate in fiasche e/o multiwells cottate con fibronectina (Sigma-Aldrich; 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) utilizzando un terreno di coltura EGM-2 completo (Lonza) contenente il 2% di FBS, idrocortisone, hFGF (Human Fibroblast growth factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), R3-IGF-1 (Recombinant analog of human Insulin-like Growth Factor-I), acido ascorbico, hEGF (Human Epidermal Growth Factor), GA-1000 (Gentamicin and Amphotericin) e eparina. Le HUVEC sono state utilizzate ai passaggi tra 1 e 15.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂ e al 90% di umidità.

Per valutare gli effetti biologici degli ibridi e confrontarli con l'attività antitumorale della DHA, tutte le molecole sono state ricostituite in DMSO, la cui concentrazione finale per i trattamenti cellulari non ha mai superato lo 0.1%. Nella prima serie di esperimenti, le cellule HCT116 sono state trattate con 50 μM di DHA o 5 μM di ibridi DHA-BAs per 24, 36 o 72 ore, a seconda del tipo di analisi eseguita. Successivamente, sono stati testati gli effetti dei diversi composti sulla vitalità cellulare, la proliferazione, il ciclo cellulare e la capacità di migrazione/invasione.

Le concentrazioni e i time point per i trattamenti con DHA e ibridi sono stati determinati in seguito a test preliminari. In tutti gli esperimenti, sono stati valutati anche gli effetti biologici degli acidi biliari ursodesossicolico e chenodesossicolico (rispettivamente UDCA e CDCA), utilizzati alla stessa concentrazione degli ibridi (5 μ M), mentre il DMSO è stato utilizzato come controllo (CTRL).

Le cellule 3T3-L1 sono state sottoposte agli stessi trattamenti descritti per la linea cellulare HCT116 per valutare gli effetti della DHA e degli ibridi sulla vitalità e la proliferazione cellulare.

Per gli esperimenti sulle HUVEC, le cellule sono state trattate per 72 ore con le stesse concentrazioni di DHA e di ibridi selezionati utilizzate per le linee cellulari HCT116 e 3T3-L1, per poi andare a valutare i loro effetti sulla proliferazione cellulare, sull'attività metabolica e sull'espressione del recettore 2 del VEGF-A.

4.1.2 Analisi della vitalità cellulare, proliferazione, ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi

Dopo 36 ore di trattamento, è stata utilizzata la citometria a flusso per analizzare gli effetti della DHA e dei suoi ibridi sul ciclo cellulare delle cellule HCT116. A tale scopo, le cellule sono state preparate secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.1.3 e acquisite utilizzando il citofluorimetro FACSCalibur e il software CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, USA) per valutare le percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Anche in questo caso, l'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software FlowJo TM v10.10 (BD Life Sciences).

Dopo 72 ore di trattamento, invece, la vitalità e la proliferazione cellulare sono state valutate sulle linee cellulari HCT116, 3T3-L1 e HUVEC mediante conta con Trypan Blue e saggio colorimetrico MTT (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis), seguendo le istruzioni del produttore. La quantificazione del saggio MTT è stata eseguita utilizzando anche in questo caso un lettore di micropiastre TECAN Infinite® M Plex (Tecan Trading AG).

Per confermare gli effetti della DHA e degli ibridi su tutte le linee cellulari, è stata sempre osservata la morfologia cellulare; per le HUVEC, le immagini sono state anche acquisite utilizzando un sistema di microscopio EVOS XL (Advanced Microscopy Group, AMG, Washington, USA).

Allo stesso time-point (72 ore dopo il trattamento), il potenziale effetto pro-apoptotico degli ibridi della DHA è stato valutato mediante citometria a flusso dopo doppia colorazione delle cellule HCT116 utilizzando un kit annessina V-FITC/ioduro di propidio (PI; Beckman Coulter Inc.), seguendo le istruzioni del produttore. Anche in questo caso, i dati sono stati ottenuti utilizzando un citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences) e analizzati con il software FlowJo TM (BD Life Sciences).

4.1.3 Analisi in Real-time dell'influenza degli ibridi della DHA sulla migrazione e invasività delle cellule HCT116

La migrazione in real-time delle HCT116 è stata valutata utilizzando lo strumento xCELLigence RTCA DP (Agilent, Santa Clara, CA, USA), utilizzando le specifiche piastre CIM (Agilent), camere Boyden integrate elettronicamente. In particolare, le piastre CIM, costituite da due camere (inferiore e superiore), presentano microelettrodi integrati localizzati al di sotto di una membrana microporosa di polietilene tereftalato (PET) disposta sul fondo della camera superiore attraverso cui può avvenire la migrazione. Le cellule migrano dalla camera superiore, attraverso la membrana, nella camera inferiore in risposta ad un chemioattrattore posto nella camera inferiore (nel nostro caso FBS al 10%) e, aderendo ai microelettrodi, inducono un segnale di impedenza correlato al numero di cellule migrate. Lo strumento xCELLigence RTCA DP registra in tempo reale i valori di impedenza legati alla migrazione cellulare, per poi convertirli in un parametro adimensionale, chiamato “Cell Index” (CI), proporzionale al numero di cellule migrate.

Per gli esperimenti di migrazione, le cellule HCT116 sono state trattate per 24 ore in piastre da 6 pozzetti in DMEM completo con DHA, ibridi DHA-BAs, UDCA, CDCA e veicolo (DMSO), utilizzato come controllo, come descritto sopra. Dopo i trattamenti, le cellule sono state mantenute in DMEM addizionato con l'1% di FBS e antibiotici per 2 ore prima di essere staccate e contate accuratamente. Quindi, lo stesso numero di cellule (3×10^4 cellule/pozzetto) è stato seminato nella camera superiore delle piastre CIM, utilizzando DMEM contenente l'1% di FBS e antibiotici, seguendo le istruzioni del produttore. Le camere inferiori delle piastre CIM sono state riempite con DMEM addizionato con il 10% di FBS e antibiotici. Infine, le piastre sono state inserite nello strumento e i dati di migrazione sono stati registrati ogni 5 minuti.

Lo strumento xCELLigence RTCA DP (Agilent) e le piastre CIM sono stati anche utilizzati per i test di invasività, seguendo lo stesso protocollo sperimentale utilizzato per la valutazione della migrazione, ma in questo caso la parte inferiore della camera superiore è stata ricoperta con uno strato di Matrigel diluito 1:20 (BD Biosciences). Anche per i test di invasività, i dati sono stati registrati ogni 5 minuti.

4.1.4 Analisi in Real-time dell'influenza degli ibridi della DHA sulla proliferazione delle cellule primarie HUVEC

Gli effetti in real-time della DHA e di ibridi selezionati sulla proliferazione delle cellule HUVEC sono stati valutati utilizzando lo strumento xCELLigence RTCA DP (Agilent) e piastre specifiche (E-plates, Agilent), che presentano microelettrodi sul fondo.

Innanzitutto, sono stati aggiunti 50 μ L di terreno completo EGM-2 ai pozzetti delle E-plates, che sono state poi collegate al sistema xCELLigence per la registrazione del background prima di seminare le cellule HUVEC (4×10^3 cellule/pozzetto) risospese in 100 μ L di terreno completo. Le cellule poi sono state lasciate sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 50 μ L di terreno contenente i trattamenti. Nello specifico, le cellule sono state trattate con DHA, ibridi selezionati della DHA, UDCA, CDCA e con il veicolo come descritto sopra. Infine, le piastre sono state inserite nello strumento a 37°C in presenza del 5% di CO₂ e 90% di umidità e l'analisi della proliferazione cellulare è proseguita fino a 72 ore. Per i test di proliferazione cellulare, lo strumento xCELLigence RTCA DP registra in tempo reale i valori di impedenza relativi alla vitalità e alla proliferazione cellulare, convertendoli in "Cell Index" (CI). In questi esperimenti, l'impedenza è stata misurata ogni 5 minuti.

4.1.5 Analisi in citometria a flusso dell'espressione del recettore 2 del VEGF

La potenziale modulazione, da parte della DHA e dei suoi ibridi, dell'espressione di superficie del recettore 2 del VEGF (VEGFR-2) nelle cellule HUVEC è stata valutata mediante citometria a flusso. A tale scopo, le cellule sono state trattate per 72 ore con DHA, ibridi selezionati, UDCA, CDCA e veicolo. Le cellule sono state quindi raccolte dopo tripsinizzazione, lavate con PBS 1X (Euroclone),

centrifugate a $300 \times g$ per 5 minuti e risospese in una mix di colorazione. In particolare, l'immunofenotipizzazione è stata eseguita secondo protocolli standard con un anticorpo Anti-Human CD309 PE Mouse pre-titolato (VEGFR-2, clone ES8-20E6; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germania). Per escludere le cellule morte, è stato aggiunto alla mix di colorazione il colorante di vitalità LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) e le cellule sono state incubate con tale mix per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi lavate nuovamente e acquisite immediatamente con il citofluorimetro BD FACSCalibur utilizzando il software CellQuest (tutti di BD Biosciences). L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software FlowJo™ (BD Life Sciences). Il livello di espressione di VEGFR-2 è stato quantificato valutando statisticamente la differenza nelle intensità medie di fluorescenza tra popolazioni colorate e non colorate utilizzando un'equazione metrica di risoluzione modificata da Ortyn et al. [135].

La modifica ha comportato l'adeguamento delle deviazioni standard per la dimensione della popolazione, come espresso dal seguente test per la differenza tra le medie dei campioni con varianze sconosciute: livello di espressione = $(\text{media colorata} - \text{media non colorata}) / \sqrt{((SD^2 \text{ colorata}/N \text{ colorata}) + (SD^2 \text{ non colorata}/N \text{ non colorata}))}$.

4.1.6 Analisi dell'espressione del VEGFR-2 in Real-time PCR (qPCR)

La potenziale modulazione dell'espressione di VEGFR-2 da parte della DHA e di suoi ibridi selezionati nelle cellule HUVEC è stata valutata anche mediante real-time PCR. Come precedentemente descritto, le cellule sono state trattate per 72 ore con DHA, ibridi selezionati, UDCA, CDCA e veicolo. L'RNA totale è stato estratto utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen SpA, Milano, Italia) seguendo il protocollo del produttore e quantificato utilizzando uno spettrofotometro Cary 60 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). L'espressione di VEGFR-2 (ID Hs00911700_m1; Thermo Fisher Scientific) è stata valutata tramite PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) utilizzando un sistema QuantStudio™3 Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific). I livelli relativi di RNA sono stati quantificati utilizzando il metodo $2^{-\Delta Ct}$, con dati normalizzati all'espressione del gene housekeeping RPL13A (ID Hs03043885) per tenere conto delle potenziali variazioni nella quantità e qualità dell'RNA nei campioni.

4.1.7 Analisi statistica

Per la valutazione degli effetti biologici degli ibridi, i dati, ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono stati analizzati, salvo diversa indicazione, mediante test one-way ANOVA seguito dal post-hoc test di Bonferroni (per correzioni multiple) o mediante Student's t-test utilizzando il software GraphPad Prism, versione 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD) di esperimenti ripetuti. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$.

4.2 RISULTATI

4.2.1 *Gli ibridi della DHA riducono il numero di cellule vitali e l'attività metabolica delle cellule di colon carcinoma*

In una prima serie di esperimenti, volti a verificare le proprietà biologiche degli ibridi della DHA, sono stati analizzati i loro effetti sulla vitalità cellulare, sull'attività metabolica, sul ciclo cellulare e sull'induzione dell'apoptosi sulla linea cellulare HCT116.

Osservando le cellule HCT116 dopo 72 ore di trattamento, è stato possibile verificare che tutti gli ibridi della DHA, utilizzati alla concentrazione di 5 μM , dimostravano un potente e significativo effetto citostatico, riducendo il numero di cellule vitali in modo comparabile o superiore alla DHA, che era stata utilizzata tuttavia ad una concentrazione 10 volte superiore (50 μM) (*Figura 16A*). In particolare, di tutte le molecole testate, gli ibridi legati con un linker non scindibile, contenenti sia acido biliare UDC che CDC (UDCMe-(1,4)-t-DHA, UDCMe-(1,5)-t-DHA, CDCMe-(1,4)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA), si sono rivelati i più efficaci nel ridurre il numero di cellule vitali rispetto non solo agli ibridi legati con linker fusi o linker scindibili ma anche alla DHA stessa (*Figura 16A*).

L'analisi dell'attività metabolica delle HCT116 (eseguita tramite test MTT) ha confermato che l'effetto significativo degli ibridi alla concentrazione di 5 μM era molto simile all'attività della DHA utilizzata alla concentrazione di 50 μM dopo 72 ore di trattamento, ma non ha evidenziato alcuna differenza rilevante nell'efficacia dei diversi ibridi (*Figura 16B*).

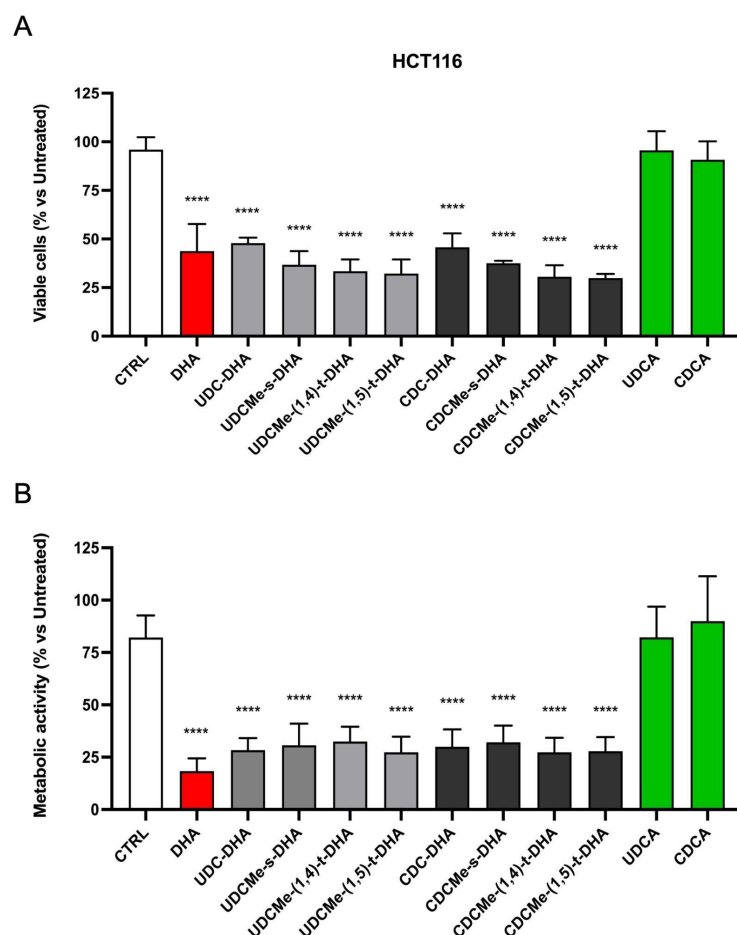


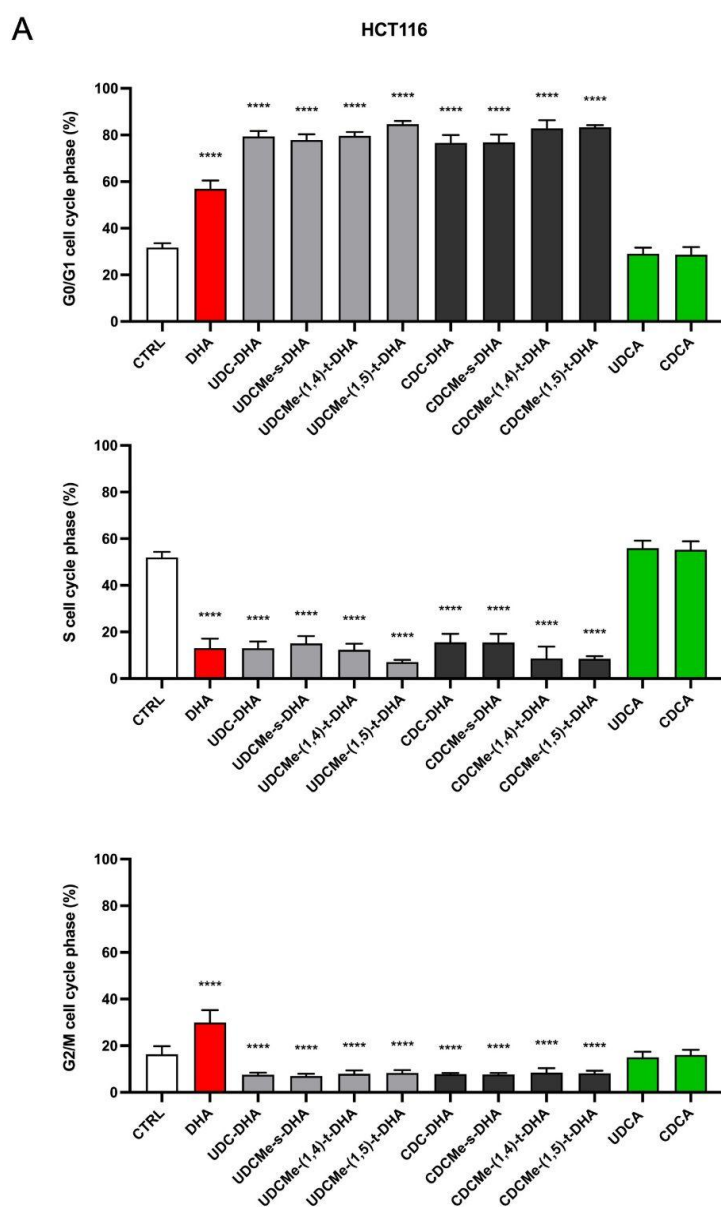
Figura 16. Effetti biologici della DHA e degli ibridi DHA-BAs sulla linea cellulare HCT116. La vitalità cellulare (A) e l'attività metabolica (B) sono state valutate nelle cellule HCT116 trattate per 72 h con 50 μ M di DHA e 5 μ M di ciascuno dei suoi ibridi. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).

Inoltre, né il veicolo (DMSO) né gli acidi biliari riducevano in modo significativo le cellule vitali o l'attività metabolica se confrontati rispettivamente con le cellule non trattate e con il controllo.

4.2.2 Gli ibridi della DHA esercitano un potente effetto citostatico sulle cellule di colon carcinoma

Alla luce di questi risultati, nello stesso set di esperimenti, è stato studiato il potenziale effetto degli ibridi della DHA sul ciclo cellulare dopo 36 ore di trattamento. È stato osservato che nella linea cellulare HCT116, tutti gli ibridi provocavano un blocco significativo del ciclo cellulare nella fase G0/G1 rispetto al controllo, riducendo fortemente la fase S, e questo giustificava la forte

riduzione del numero di cellule vitali osservata a 72 ore di trattamento. Inoltre, anche nel caso dell'analisi del ciclo cellulare, l'effetto citostatico degli ibridi utilizzati alla concentrazione 5 μ M era paragonabile a quello della DHA utilizzata a 50 μ M e, anche in questo caso, né il controllo (DMSO) né gli acidi biliari esercitavano alcun effetto significativo rispetto ai rispettivi controlli, come descritto sopra (*Figura 17A-B*).



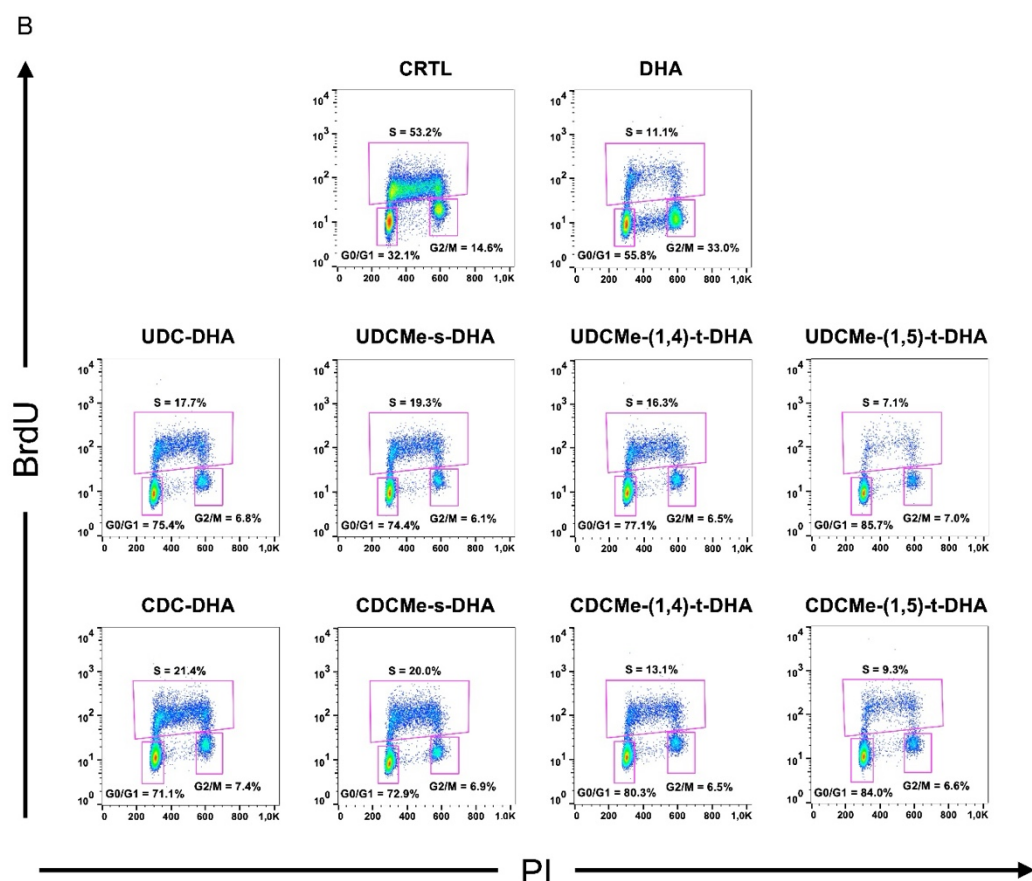


Figura 17. Effetti biologici della DHA e degli ibridi sul ciclo cellulare delle HCT116. Distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare (A) dopo trattamento per 36 h con 50 μ M di DHA e 5 μ M di ciascuno dei suoi ibridi. In (B) un pannello rappresentativo di citofluorimetria che mostra la distribuzione delle cellule HCT116 nelle fasi del ciclo cellulare dopo trattamento con ibridi selezionati. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).

La valutazione di un possibile effetto citotossico ha rivelato che gli ibridi click UDCMe-(1,4)-t-DHA, UDCMe-(1,5)-t-DHA, CDCMe-(1,4)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA, usati a 5 μ M, inducevano, nelle cellule HCT116, un livello di apoptosi paragonabile a quello causato dalla DHA non coniugata utilizzata però alla concentrazione 50 μ M (Figura 18).

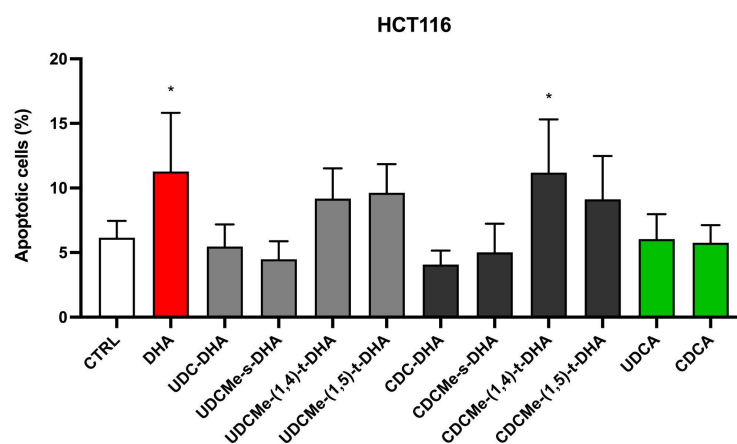


Figura 18. Effetti biologici della DHA e degli ibridi DHA-BAs nell'induzione di apoptosi sulla linea cellulare HCT116. Valutazione dell'apoptosi nelle cellule HCT116 trattate per 72 h con 50 μ M di DHA e 5 μ M dei suoi ibridi. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$ rispetto al controllo (CTRL).

4.2.3 Gli ibridi della DHA mostrano una minore tossicità nelle cellule non tumorali rispetto alle cellule di colon carcinoma

Per verificare la possibile tossicità degli ibridi della DHA su cellule non tumorali, è stata confrontata l'attività metabolica della linea cellulare 3T3-L1, trattata per 72 ore, con i dati MTT ottenuti dalle cellule HCT116. Come mostrato nella Tabella 4, tutti gli ibridi sono apparsi meno efficaci nel ridurre l'attività metabolica delle cellule 3T3-L1 rispetto alle linee cellulari tumorali, anche se, nella maggior parte dei casi, in modo non significativo. Al contrario, la DHA sembrava esercitare effetti simili sull'attività metabolica di 3T3-L1 e HCT116 (Tabella 4).

Tabella 4. Media $\pm$ D.S. dei dati di proliferazione delle cellule 3T3-L1 e HCT116 (espressi come percentuale rispetto alle cellule non trattate) dopo trattamento di 72 h con DHA o ibridi della DHA.

<i>Compound</i>	<i>3T3-L1</i>	<i>HCT116</i>
<i>DHA</i>	18.17 $\pm$ 5.350	18.35 $\pm$ 6.103
<i>UDC-DHA</i>	42.97 $\pm$ 4.035	28.36 $\pm$ 5.738
<i>UDCMe-s-DHA</i>	40.77 $\pm$ 4.531	30.66 $\pm$ 10.35
<i>UDCMe-(1,4)-t-DHA</i>	36.40 $\pm$ 6.119	32.85 $\pm$ 7.672
<i>UDCMe-(1,5)-t-DHA</i>	31.69 $\pm$ 5.953	27.38 $\pm$ 7.404
<i>CDC-DHA</i>	38.27 $\pm$ 7.289	29.95 $\pm$ 8.361
<i>CDCMe-s-DHA</i>	39.29 $\pm$ 5.494	32.12 $\pm$ 7.924
<i>CDCMe-(1,4)-t-DHA</i>	35.21 $\pm$ 5.262	27.35 $\pm$ 6.942
<i>CDCMe-(1,5)-t-DHA</i>	33.19 $\pm$ 6.010	27.83 $\pm$ 6.765

4.2.4 Gli ibridi della DHA inibiscono la migrazione e l'invasività cellulare

In una seconda serie di esperimenti, il potenziale effetto degli ibridi della DHA sulla migrazione cellulare delle HCT116 è stato analizzato in real-time utilizzando lo strumento xCELLigence RTCA DP. Tutti gli ibridi e anche la DHA hanno dimostrato di ridurre significativamente la migrazione cellulare. In particolare, l'UDCMe-(1,5)-t-DHA è risultato l'ibrido più efficace (*Figura 19A*) e ha mostrato un'attività inibitoria della migrazione significativamente maggiore rispetto alla DHA, come mostrato anche dai valori di slope (*Figura 19A*), anche se utilizzato a una concentrazione 10 volte inferiore. D'altra parte, nessun effetto significativo è stato esercitato da entrambi gli acidi biliari durante tutto il corso degli esperimenti.

I test di invasività hanno mostrato risultati simili: infatti, tutti gli ibridi inibivano significativamente la capacità di invasione delle HCT116 e l'UDCMe-(1,5)-t-DHA sembrava essere il più efficace (*Figura 19B*).

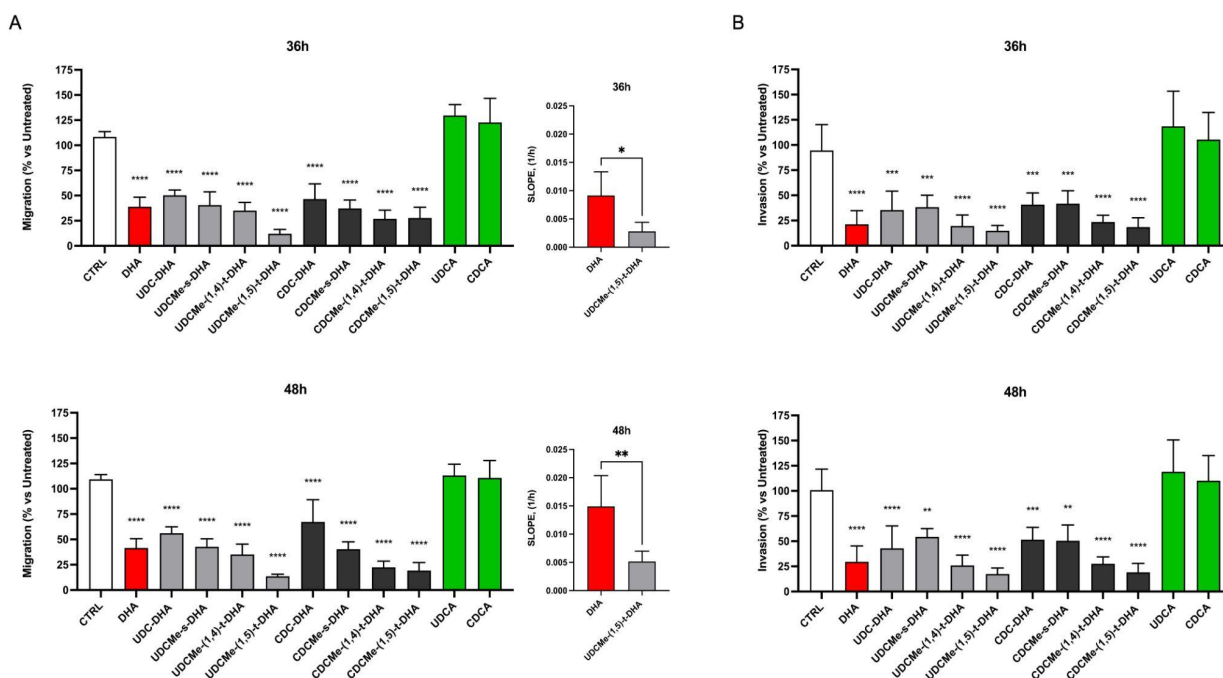


Figura 19. Valutazione degli effetti della DHA e degli ibridi DHA-BAs sulla migrazione e invasività delle cellule HCT116. La migrazione cellulare (A) e l'invasività (B) sono state valutate in real-time mediante lo strumento xCELLigence RTCA DP. Gli istogrammi mostrano l'effetto di pretrattamenti di 24 h con DHA e ibridi DHA alle concentrazioni rispettivamente di 50 μ M e 5 μ M, dopo 36 e 48 h di migrazione cellulare (A) e invasività (B). In (A) sono mostrati anche i valori della pendenza (slope), che descrivono la ripidità, l'inclinazione, il gradiente e il tasso di variazione delle curve CI nel tempo, per la migrazione delle cellule pre-trattate con DHA e UDCMe-(1,5)-t-DHA. I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).

4.2.5 Gli ibridi della DHA inibiscono la proliferazione e riducono l'espressione del recettore 2 del VEGF in un modello di cellule endoteliali

Con l'obiettivo di indagare il potenziale effetto degli ibridi della DHA sul compartimento vascolare, che ha un ruolo fondamentale nella progressione tumorale, abbiamo successivamente testato gli effetti di ibridi selezionati, in primo luogo sulla proliferazione e sull'attività metabolica di cellule endoteliali HUVEC. In particolare, abbiamo scelto di concentrarci su ibridi con linker non scindibile (UDCMe-(1,4)-t-DHA, UDCMe-(1,5)-t-DHA, CDCMe-(1,4)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA), dal momento che si erano dimostrati i più efficaci sulle cellule HCT116.

Osservando le analisi in real-time della proliferazione cellulare, eseguite con lo strumento xCELLigence RTCA DP, abbiamo verificato che la DHA e tutti gli

ibridi testati erano in grado di ridurre significativamente la proliferazione cellulare delle HUVEC (*Figura 20A-B*), tenendo conto tuttavia del fatto che la DHA era utilizzata ad una concentrazione 10 volte superiore rispetto agli ibridi. Ai tempi più tardivi di trattamento, tutti gli ibridi con linker non scindibile, utilizzati alla concentrazione di 5 μ M, riducevano la crescita cellulare in modo comparabile, se non superiore, rispetto alla DHA, utilizzata, come detto, a 50 μ M (*Figura 20A-B*).

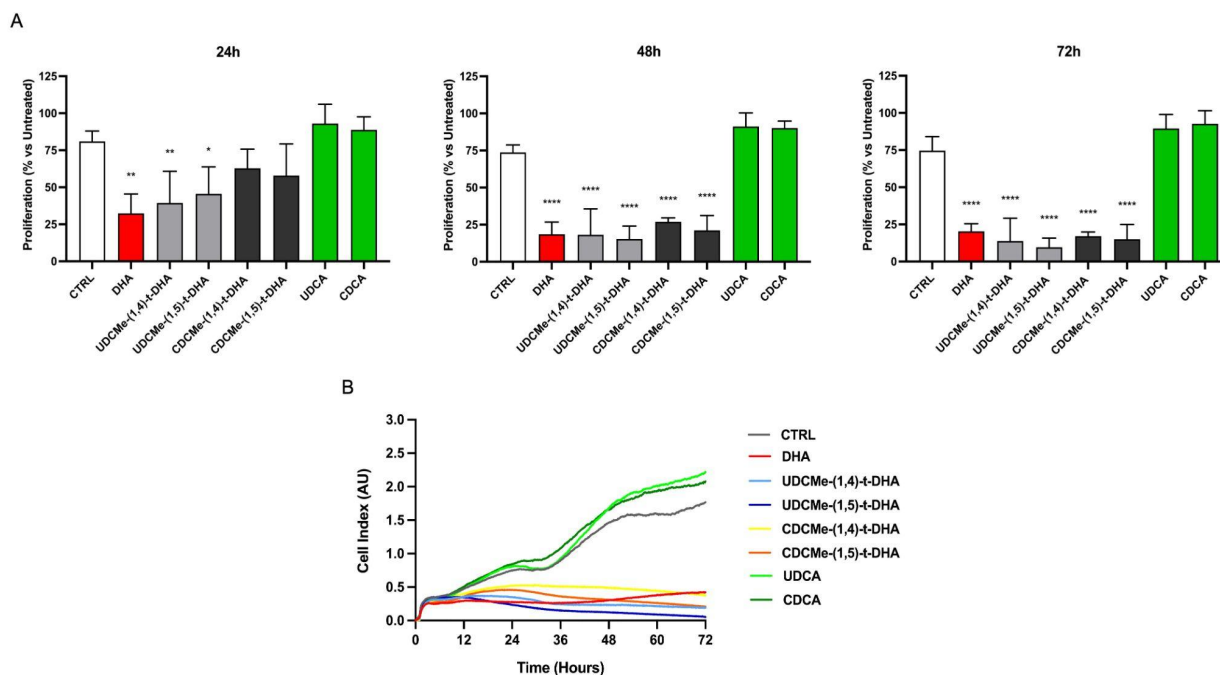


Figura 20. Valutazione degli effetti della DHA e di suoi ibridi sulle cellule endoteliali HUVEC. In (A) è mostrata l'analisi della proliferazione cellulare, valutata in real-time mediante lo strumento xCELLigence RTCA DP, a 24, 48 e 72 h dopo il trattamento. I dati riportano l'analisi dei valori di Cell Index (CI) ottenuti trattando le cellule con 50 μ M di DHA e 5 μ M di ibridi selezionati della DHA nei tempi indicati. In (B) è riportato un time-course rappresentativo della proliferazione delle HUVEC valutato con lo strumento xCELLigence RTCA DP. In (A), i risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni.

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).*

La valutazione del numero di cellule vitali e l'analisi dell'attività metabolica dopo 72 ore di trattamento hanno supportato l'evidenza, dimostrata dai test di proliferazione in real-time, che l'efficacia degli ibridi utilizzati alla concentrazione di 5 μ M era paragonabile a quella della DHA utilizzata 10 volte più concentrata; inoltre, il CDCMe-(1,5)-t-DHA riduceva in modo più efficace il numero di cellule vitali rispetto agli altri ibridi con linker non scindibili e

significativamente rispetto alla DHA ($p=0.0236$; analisi statistica dei dati di CDCMe-(1,5)-t-DHA vs DHA eseguita tramite t-test) e all'UDCMe-(1,4)-t-DHA ($p=0.0486$; analisi statistica dei dati di CDCMe-(1,5)-t-DHA vs UDCMe-(1,4)-t-DHA eseguita tramite t-test) (Figura 21A). Gli acidi biliari, invece, come previsto, non influenzavano significativamente la proliferazione delle cellule HUVEC né la loro vitalità o attività metabolica. I dati relativi agli effetti degli ibridi sulla vitalità e sull'attività metabolica delle cellule HUVEC sono stati supportati anche dall'analisi morfologica, eseguita allo stesso time point (Figura 21B).

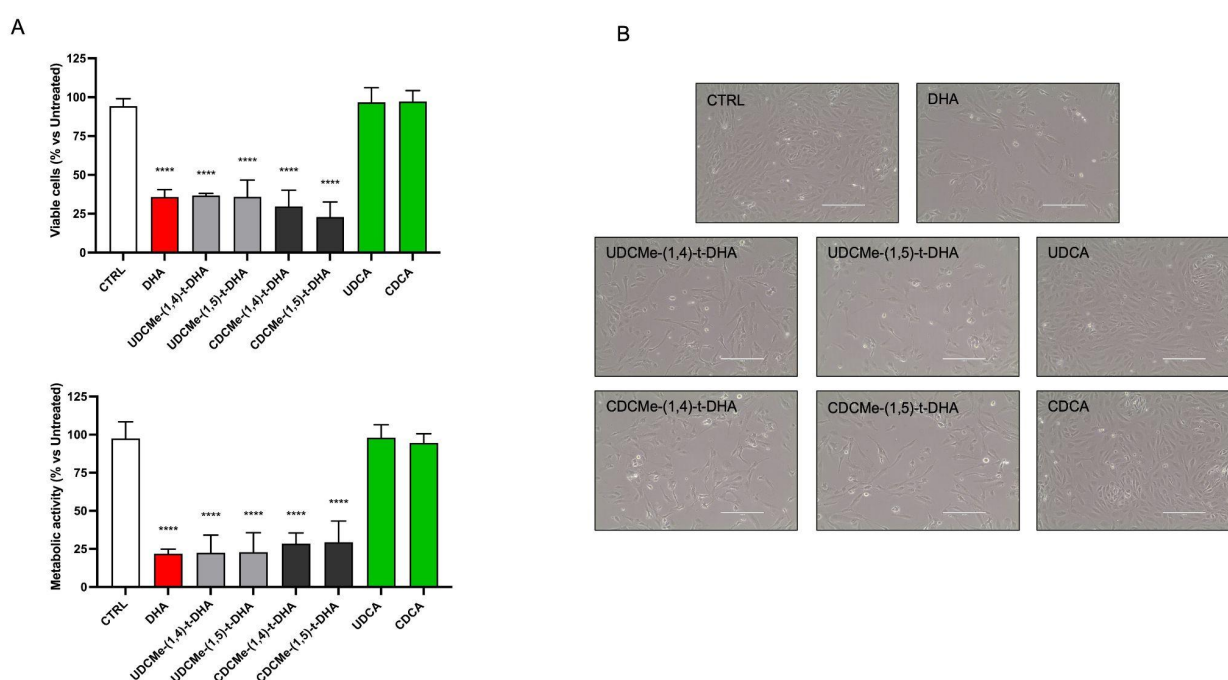


Figura 21. Valutazione degli effetti della DHA e dei suoi ibridi sulle cellule endoteliali HUVEC. In (A) la vitalità cellulare e l'attività metabolica delle cellule HUVEC sono state analizzate dopo 72 h di trattamento con 50 μM di DHA e 5 μM di ibridi DHA-BAs selezionati. In (B) è mostrato un pannello rappresentativo di immagini in contrasto di fase delle cellule HUVEC esposte per 72 h ai trattamenti indicati (barra: 200 μM). I risultati sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).

Nello stesso set di esperimenti, è stata anche valutata la possibile capacità degli ibridi della DHA di modulare l'espressione di superficie del recettore 2 del VEGF (VEGFR-2). L'analisi citofluorimetrica di VEGFR-2 ha rivelato che gli ibridi con linker non scindibile, se utilizzati a 5 μM , riducevano fortemente l'espressione di questo recettore e il loro effetto era paragonabile alla riduzione

di VEGFR-2 indotta dalla DHA, utilizzata, tuttavia, a 50 μM (Figura 22A-B).
Ciò è stato confermato anche dall'analisi in real-time PCR.

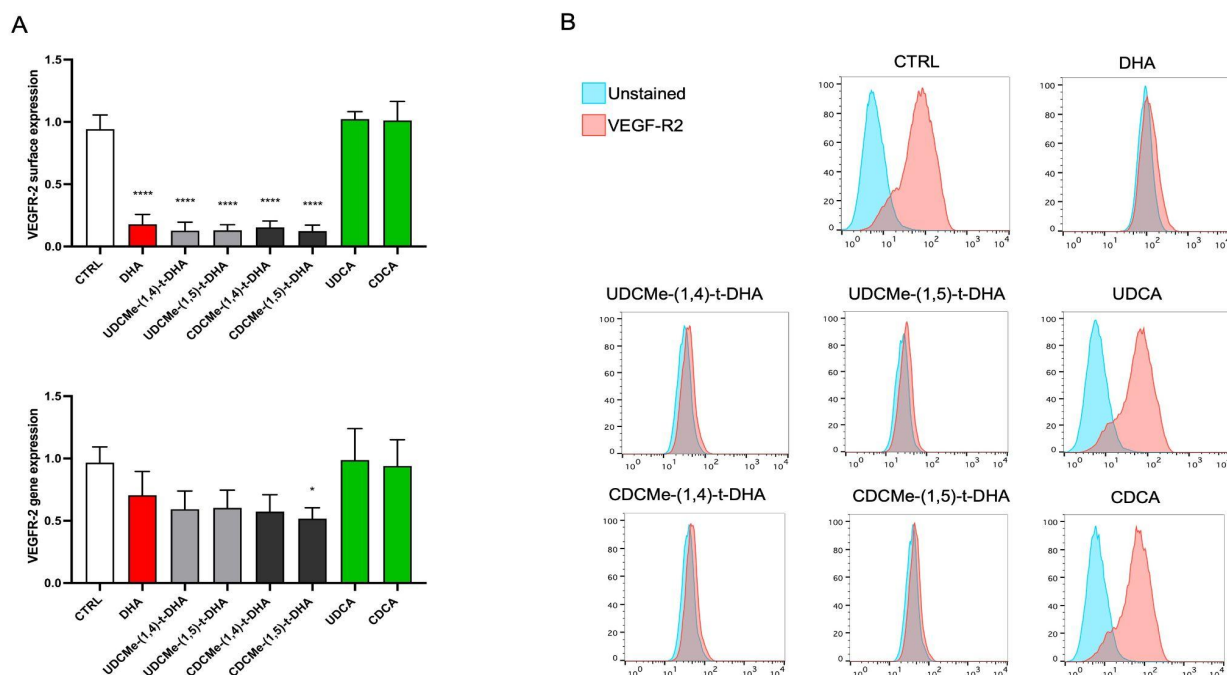


Figura 22. Valutazione degli effetti della DHA e dei suoi ibridi sull'espressione di VEGFR-2 nelle cellule endoteliali HUVEC. In (A) l'espressione di VEGFR-2 è stata valutata mediante citometria a flusso e in real-time PCR dopo 72 h di trattamento con 50 μM di DHA e 5 μM di ibridi selezionati della DHA. In (B) è mostrato un pannello citofluorimetrico rappresentativo di analisi di VEGFR-2 sulle cellule HUVEC trattate per 72 h con i trattamenti indicati. I risultati, espressi come fold dell'espressione di VEGFR-2 rispetto alle cellule non trattate, sono riportati come media $\pm$ DS di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post-hoc di Bonferroni. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ rispetto al controllo (CTRL).

5. DISCUSSIONE

Il CRC è tra le neoplasie più comuni al mondo e rappresenta la seconda causa di morte per cancro [2]. Si prevede che l'incidenza e il tasso di mortalità aumenteranno nei prossimi anni, nonostante i progressi compiuti negli ultimi decenni nello screening, nella diagnosi e nella terapia. Ciò è correlato a un numero crescente di fattori di rischio, come l'invecchiamento della popolazione nei paesi sviluppati, lo stile di vita sedentario, il fumo, le abitudini alimentari scorrette e l'obesità, che si aggiungono alla predisposizione genetica [5]. Oggigiorno, la patogenesi di questo carcinoma è ben definita: diverse alterazioni genetiche sono alla base dell'attivazione di vie di trasformazione e dello sviluppo di polipi (adenomi) nella parete dell'intestino crasso. La formazione di polipi è determinata dall'accumulo di molteplici lesioni genetiche, spesso presenti in cellule caratterizzate da una mutazione preesistente. I geni mutati che guidano la trasformazione degli adenomi in adenocarcinomi sono comuni nelle forme sporadiche, ereditarie e familiari di CRC, il che significa che le vie intracellulari che determinano le caratteristiche di questi tumori sono definite e individuabili [12-14]. Nell'ottica di una terapia personalizzata, il trattamento di questo tipo di neoplasia tiene conto non solo dello stadio della patologia ma anche della presenza di mutazioni genetiche.

La chirurgia è considerata l'unico trattamento risolutivo se esiste la possibilità di resecare il tumore con margini netti ed è adatta per CRC di stadio 0 (in situ) e I. La chemioterapia è raccomandata come trattamento preoperatorio per i pazienti di stadio II, mentre è necessaria sia prima che dopo l'intervento chirurgico per i pazienti di stadio II ad alto rischio e per i pazienti di stadio III, con l'obiettivo di ridurre la massa tumorale prima della resezione e, in seguito, controllare la recidiva della malattia [19].

Il CRC di stadio IV richiede particolare attenzione e coordinamento da parte di un team multidisciplinare. Nei pazienti con metastasi operabili, si utilizza spesso una terapia sistemica mirata a ridurre le dimensioni delle lesioni. Questo trattamento, chiamato anche terapia di “downstaging”, ha lo scopo di diminuire la massa tumorale fino a rendere possibile un intervento chirurgico completo (resezione R0) oppure un'ablazione totale delle metastasi (A0). In questo modo, anche metastasi inizialmente difficili da rimuovere possono diventare trattabili con successo [19, 40].

Le terapie palliative sono raccomandate nei pazienti non resecabili, per ridurre i sintomi e migliorare la qualità della vita. Per tutti questi diversi stadi (stadio II, III e IV), la chemioterapia raccomandata è una combinazione di due o tre farmaci citotossici, che in alcuni casi possono essere somministrati in combinazione con agenti biologici mirati per colpire contemporaneamente diversi target tumorali. Nonostante gli avanzamenti nell'ambito della ricerca e della terapia, anche i trattamenti combinati non garantiscono la guarigione completa: il 30-50% dei pazienti trattati per CRC localizzato va incontro a recidiva, così come il 55-80% dei pazienti sottoposti a intervento chirurgico per la rimozione delle metastasi [41].

Per quanto riguarda l'HCC, esso rappresenta la forma più comune di tumore primitivo del fegato ed è attualmente, insieme al CRC, una delle neoplasie più mortali a livello mondiale [1]. Ha origine dagli epatociti e si sviluppa frequentemente in un contesto di malattia epatica cronica, in particolare cirrosi, epatite virale (HBV e HCV), steatoepatite non alcolica (NASH) ed epatite da abuso di alcol [22]. La sua insorgenza è spesso silente e la diagnosi avviene in fase avanzata, quando le opzioni terapeutiche diventano limitate.

Nonostante i progressi degli ultimi anni, l'HCC rimane una patologia ad alta aggressività biologica e con una prognosi generalmente sfavorevole. Le terapie attualmente disponibili (resezione chirurgica, trapianto di fegato, ablazione e immunoterapie) offrono benefici significativi solo in alcuni pazienti. Inoltre, la resistenza ai farmaci, l'eterogeneità del tumore e la frequente coesistenza di una compromissione funzionale del fegato limitano ulteriormente l'efficacia dei trattamenti esistenti.

In questo scenario, vi è un urgente bisogno di nuove terapie per migliorare il tasso di risposta, ridurre la chemioresistenza, minimizzare le recidive e colpire diversi meccanismi di crescita tumorale e metastasi.

La valutazione biologica di derivati nucleosidici neosintetizzati in grado di rilasciare ossido nitrico (NO) in condizioni controllate ha avuto l'obiettivo di indagare la loro attività citotossica e pro-apoptotica. In particolare, sono stati presi in esame tre ibridi: dAdo-S-NO, dAdo-t-NO e dU-t-NO, derivati rispettivamente dalla 2'-deossiadenosina e dalla 2'-deossiuridina. Questi composti, contenenti un'unità fotodona di NO, sono stati valutati sia in condizioni di "buio" (senza irradiazione) sia in seguito ad irradiazione.

I test biologici condotti su due linee cellulari tumorali, RKO (colon carcinoma) e Hep3B2.1-7 (epatocarcinoma), hanno mostrato che tutti gli ibridi sono in grado di esercitare attività citostatica e citotossica significative. I valori di IC₅₀, compresi tra 10.39 e 61.66 µM, indicano una potenza citotossica moderata ma consistente, con una leggera citoselettività verso la linea RKO, dal momento che queste cellule di colon carcinoma risultano più sensibili al trattamento con gli ibridi esaminati rispetto alle cellule di epatocarcinoma.

Dal punto di vista strutturale, lo studio SAR (Structure-Activity Relationship), svolto dal gruppo della Prof.ssa Perrone, ha evidenziato differenze rilevanti tra i derivati a base di adenina e quelli a base di uracile. In particolare, i composti dAdo-S-NO e dAdo-t-NO hanno mostrato una maggiore citotossicità e una selettività più marcata rispetto all'ibrido dU-t-NO. Questo risultato suggerisce che la natura del nucleoside influenzi significativamente l'interazione del composto con il sistema biologico, probabilmente in termini di permeabilità, stabilità e riconoscimento enzimatico.

Parallelamente, anche l'analisi dell'apoptosi ha confermato una maggiore efficacia degli ibridi sulla linea RKO rispetto alle Hep3B2.1-7. Questo risultato è coerente con la maggiore riduzione di cellule vitali osservata nelle cellule di colon carcinoma e rafforza l'ipotesi che questi ibridi possano agire più efficacemente su cellule neoplastiche di origine intestinale.

Nonostante sia stato possibile dimostrare che tutti i derivati erano in grado di rilasciare NO *in vitro*, a concentrazione nell'ordine delle micromoli, la fotoattivazione non ha prodotto un incremento apprezzabile della loro attività citotossica e pro-apoptotica, ovvero i risultati dei test condotti dopo l'irradiazione non hanno mostrato differenze significative rispetto ai rispettivi esperimenti effettuati al "buio". Questo dato suggerisce che, nelle condizioni fotochimiche utilizzate, il rilascio di NO non sia stato sufficiente a indurre una risposta biologica rilevabile. L'insufficiente effetto della fotoinduzione potrebbe essere attribuito anche a problemi di biodisponibilità o limitata permeabilità cellulare, nonché a possibili interferenze tra il meccanismo fotochimico e il microambiente biologico. Tuttavia, i risultati ottenuti in assenza di irradiazione confermano l'intrinseco potenziale citotossico e pro-apoptotico di questi derivati, rendendoli interessanti candidati per ulteriori ottimizzazioni.

Un secondo obiettivo di questa tesi è stato quello di migliorare il profilo farmacologico della diidroartemisinina (DHA) mediante la sintesi di ibridi

molecolari con acidi biliari endogeni (BAs), in particolare con l'acido ursodesossicolico (UDCA) e l'acido chenodesossicolico (CDCA). Questi acidi biliari mostrano proprietà fisico-chimiche differenti, che si riflettono anche sul loro comportamento biologico. UDCA, più idrofilo e dotato di un consolidato profilo di sicurezza clinica, è noto per le sue proprietà antitumorali e chemio-preventive; al contrario, CDCA risulta più lipofilo e presenta una diversa interazione con le membrane cellulari.

Tutti gli ibridi neosintetizzati sono stati valutati per la prima volta sulla linea cellulare di carcinoma coloretale HCT116 ed hanno mostrato un'attività antiproliferativa superiore rispetto alla DHA non coniugata.

Il trattamento delle cellule tumorali con i derivati DHA-BA ha determinato un arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1, già evidente dopo 36 h di esposizione a una concentrazione di 5 μ M, un ordine di grandezza inferiore rispetto ai 50 μ M richiesti dalla DHA libera per ottenere effetti comparabili. Questa evidenza indica che la coniugazione con acidi biliari aumenta notevolmente l'attività biologica della DHA. La diminuzione della popolazione in fase S suggerisce che gli ibridi inibiscano attivamente la proliferazione, impedendo l'ingresso delle cellule in fase G2/M. È interessante notare che gli ibridi "click" con triazolo, in particolare UDCMe-(1,5)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA, hanno mostrato la maggiore efficacia nell'indurre l'arresto in G0/G1, verosimilmente tramite una regolazione selettiva di cicline precoci (es. cicline D/CDK4), analogamente a quanto osservato per altri derivati ibridi della DHA [136].

Le analisi dell'apoptosi hanno evidenziato che i derivati click, sia con UDCA che con CDCA, sono in grado di indurre citotossicità nelle HCT116 in maniera comparabile alla DHA non coniugata ma a concentrazioni dieci volte inferiori rispetto a quest'ultima. L'efficacia di questi derivati DHA-BA nell'indurre apoptosi suggerisce che l'ibridazione molecolare potrebbe svolgere un'azione duplice: da un lato andare a stabilizzare la molecola e migliorarne la biodisponibilità, dall'altro potenziarne l'effetto attraverso la modulazione di vie di signaling comunemente attivate dalla DHA, come quelle di PI3K/AKT e MAPK.

Oltre all'attività antiproliferativa, un'ulteriore potenzialità dei derivati della DHA è la loro capacità di modulare fenomeni legati alla progressione tumorale, quali la migrazione e l'invasività cellulare. Questi due processi rappresentano passaggi essenziali nella progressione metastatica: la migrazione consente alle

cellule neoplastiche di diffondere oltre la sede del tumore primario, mentre l'invasività permette loro di attraversare la matrice extracellulare e i tessuti circostanti. L'analisi condotta sulle cellule HCT116 ha evidenziato come tutti gli ibridi sviluppati siano in grado di ridurre in modo significativo sia la capacità migratoria che invasiva rispetto ai controlli non trattati. In particolare, il derivato UDCMe-(1,5)-t-DHA ha mostrato l'effetto più pronunciato, superiore anche a quello della DHA libera usata a concentrazione 10 volte maggiore, confermando l'efficacia dell'utilizzo di non-cleavable linker nel potenziare l'attività anti-metastatica, presumibilmente in termini di aumento della stabilità, maggiore internalizzazione cellulare o modulazione di pathway coinvolti nella motilità cellulare. Tali evidenze suggeriscono che la struttura molecolare dei nuovi ibridi DHA-BA possa portare non solo al miglioramento dell'efficacia antiproliferativa della molecola d'origine, ma anche agli impatti sui meccanismi fisiopatologici che inducono un aumento dell'aggressività del tumore.

Un aspetto rilevante dell'attività antitumorale della DHA riguarda la sua capacità di inibire i processi di angiogenesi, fondamentali per la crescita e la diffusione del tumore [109, 113]. È ormai noto che l'angiogenesi costituisca un processo cruciale per lo sviluppo e la sopravvivenza della massa tumorale: la formazione di nuovi vasi sanguigni permette, infatti, al tessuto neoplastico di ottenere un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti, oltre a facilitare la metastatizzazione. Alla luce di tali premesse, la valutazione dell'attività antiangiogenica degli ibridi DHA-BA in cellule endoteliali umane di vena ombelicale (HUVEC), un modello sperimentale ampiamente validato per lo studio della fisiologia e della patologia vascolare, diventa particolarmente rilevante [137].

Le HUVEC rappresentano il gold standard per lo studio dell'angiogenesi *in vitro* poiché conservano le principali caratteristiche morfologiche e funzionali dell'endotelio umano, inclusa l'espressione di recettori specifici come VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2). Questo recettore tirosin-chinasico di membrana è il principale mediatore degli effetti biologici del VEGF-A, che comprendono proliferazione, migrazione e differenziamento delle cellule endoteliali. La sua attivazione promuove il rimodellamento vascolare e la formazione di nuovi capillari, processi essenziali non solo per l'angiogenesi fisiologica ma anche per quella tumorale.

L'impiego delle HUVEC in questo studio ha permesso, quindi, di valutare la capacità dei nuovi ibridi DHA-BA di interferire con i meccanismi che regolano

la proliferazione e l'attivazione endoteliale. I risultati hanno confermato che gli ibridi ottenuti tramite click chemistry (UDCMe-(1,4)-t-DHA, UDCMe-(1,5)-t-DHA, CDCMe-(1,4)-t-DHA e CDCMe-(1,5)-t-DHA) erano in grado di inibire la proliferazione endoteliale e ridurre l'espressione del VEGFR-2 in maniera più efficace rispetto alla DHA libera.

Questa osservazione suggerisce che l'ibridazione con acidi biliari potenzi la capacità della DHA di interferire con il pathway VEGF/VEGFR-2, una delle principali vie di promozione dell'angiogenesi tumorale. In particolare, la maggiore efficacia dei derivati click rispetto alla DHA non coniugata potrebbe essere attribuita alla loro maggiore stabilità chimica e a una migliore interazione con la membrana della cellula endoteliale.

Nel complesso, l'utilizzo delle HUVEC come modello cellulare ha consentito di confermare che gli ibridi DHA-BA possiedono un'attività biologica multitarget, agendo non solo sulla proliferazione e sull'apoptosi delle cellule tumorali, ma anche sul compartimento vascolare che sostiene la crescita del tumore. L'inibizione della via di signaling mediata da VEGFR-2 rappresenta dunque un ulteriore meccanismo attraverso cui questi composti potrebbero contribuire a limitare la progressione neoplastica e la formazione di metastasi.

6. CONCLUSIONI

Gli ibridi studiati, sia DHA-BA sia nucleosidi-NO, hanno complessivamente dimostrato un marcato potenziale antitumorale. I derivati nucleosidi-NO hanno mostrato una rilevante attività citotossica e pro-apoptotica, più marcata sulle cellule di colon carcinoma rispetto a quelle di epatocarcinoma, evidenziando quindi anche una specifica cito-selettività. Parallelamente, gli ibridi DHA-BA sono risultati particolarmente efficaci nell'inibire la proliferazione cellulare e ridurre in maniera significativa i processi di migrazione e invasività delle cellule tumorali, effetti ulteriormente potenziati dalla coniugazione con acidi biliari tramite reazioni di click chemistry, che sembrano migliorare stabilità, biodisponibilità e interazioni con bersagli cellulari specifici. L'impiego del modello endoteliale ha inoltre permesso di mettere in evidenza l'attività anti-angiogenica di questi composti, con particolare riferimento all'espressione di VEGFR-2, cruciale per la crescita e la diffusione tumorale. La capacità degli ibridi "click" di interferire con la neoangiogenesi tumorale suggerisce che tali ibridi possano agire non solo direttamente sulle cellule tumorali, ma anche sul loro microambiente, limitando la formazione di condizioni favorevoli alla progressione metastatica.

Complessivamente, i dati ottenuti suggeriscono che entrambe le classi di ibridi possiedono un profilo farmacologico multitarget estremamente promettente, potendo interferire simultaneamente con diversi meccanismi chiave della carcinogenesi.

Queste caratteristiche rendono tali molecole candidate interessanti per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, potenzialmente più efficaci e selettive rispetto agli approcci convenzionali.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021 Oct;14(10):101174. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101174
3. Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, Sarkar D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res*. 2021;149:1-61. doi: [10.1016/bs.acr.2020.10.001](https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001)
4. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*. 15 gennaio 2018;18(1):78. doi: [10.1186/s12885-017-3925-x](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3925-x)
5. Ferlay J. et al. (2023). Cancer Today: GLOBOCAN 2022 estimates of incidence and mortality worldwide. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int>
6. IDI - Istituto Dermopatico dell'Immacolata. "Tumore del colon-retto: incidenza e prevenzione." 2024. www.idi.it
7. Ministero della Salute. "Screening del tumore del colon-retto." 2024. www.salute.gov.it
8. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2019;14:89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072
9. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. (2022). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 51(1): 1–18. doi: [10.1016/j.gtc.2021.09.003](https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.09.003)
10. Boland CR, Goel A. (2023). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 165(3): 792–810. doi: [10.1053/j.gastro.2023.03.002](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.03.002)

11. Evelien Dekker, Pieter J Tanis, Jasper L A Vleugels, Pashtoon M Kasi, Michael B Wallace, Colorectal cancer, *The Lancet*, Volume 394, Issue 10207, 2019, Pages 1467-1480, ISSN 0140-6736. [doi: 10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
12. Dekker, E.; Tanis, P. J.; Vleugels, J. L. A.; Kasi, P. M.; Wallace, M. B. Colorectal Cancer. *The Lancet* 2019, 394 (10207), 1467–1480. [doi: 10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
13. Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Dieste, A. P.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG January 19, 2017. [doi: 10.3390/ijms18010197](https://doi.org/10.3390/ijms18010197)
14. Wang, W. S.; Chen, P. M.; Su, Y. Colorectal Carcinoma: From Tumorigenesis to Treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. March 2006, pp 663–671. [doi: 10.1007/s00018-005-5425-4](https://doi.org/10.1007/s00018-005-5425-4)
15. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713-732. doi: 10.1038/s41575-019-0189-8
16. Toon, C. W.; Chou, A.; Clarkson, A.; DeSilva, K.; Houang, M.; Chan, J. C. Y.; Sioson, L. L.; Jankova, L.; Gill, A. J. Immunohistochemistry for Myc Predicts Survival in Colorectal Cancer. *PLoS One* 2014, 9 (2). [doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0087456](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087456)
17. Koerner, C.; Morris, A.; Dinallo, A.; Shaffer, V.; Balch, G. Colon. *Anatomic, Physiologic, and Therapeutic Principles of Surgical Diseases: A Comprehensive, High-Yield Review* 2023, 221–248. [doi: 10.1007/978-3-031-25596-0_15](https://doi.org/10.1007/978-3-031-25596-0_15)
18. Atreya, C. E.; Sangale, Z.; Xu, N.; Matli, M. R.; Tikishvili, E.; Welbourn, W.; Stone, S.; Shokat, K. M.; Warren, R. S. PTEN Expression Is Consistent in Colorectal Cancer Primaries and Metastases and Associates with Patient Survival. *Cancer Med* 2013, 2 (4), 496–506. [doi: 10.1002/CAM4.97](https://doi.org/10.1002/CAM4.97)

19. De Rosa M., Pace U., Rega D., Costabile V., Duraturo F., Izzo P., Delrio P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 34:1087-1096. doi: 10.3892/or.2015.4108
20. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9. doi: [10.3322/caac.21388](https://doi.org/10.3322/caac.21388)
21. Bray, F. et al. (2023). The global burden of liver cancer: current status and future trends. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20, 204–216. doi: [10.1038/s41575-022-00666-2](https://doi.org/10.1038/s41575-022-00666-2)
22. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J Hepatol*. 2020 Feb;72(2):250-261. doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.025.
23. Pinter M, Trauner M, Peck-Radosavljeic M, Seighart W. Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000042. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000042
24. Khemlina G, Ikeda S, Kurzrock R. The biology of hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Mol Cancer*. 2017;16(1). doi: 10.1186/s12943-017-0712-x
25. Goossens N, Hoshida Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*. 2015;21(2):105. doi:10.3350/cmh.2015.21.2.105
26. Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao J, Dushkeiko G. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(2). doi: 10.1128/cmr.00046-19
27. D’souza S, Lau KC, Coffin CS, Patel TR. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2020;26(38):5759–83. doi: 10.3748/wjg.v26.i38.5759.

28. Rocco A, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi-Zamparelli M, Nardone G. Alcoholic disease: liver and beyond. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14652. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14652
29. Neuschwander-Tetri B. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2017;15(1). doi: 10.1186/s12916-017-0806-8
30. Affo S, Yu L, Schwabe R. The role of cancer associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer. *Annu Rev Pathol*. 2017;12(1):153–86. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100322.
31. Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med*. 2020;245(2):96–108. doi: 10.1177/1535370219898141
32. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, Roberts LR, Heimbach JK. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018 Aug;68(2):723-750. doi: [10.1002/hep.29913](https://doi.org/10.1002/hep.29913)
33. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1 aprile 2010;51(4):1274–83. doi: [10.1002/hep.23485](https://doi.org/10.1002/hep.23485)
34. Notarpaolo A, Layese R, Magistri P, Gambato M, Colledan M, Magini G, et al. Validation of the AFP model as a predictor of HCC recurrence in patients with viral hepatitis-related cirrhosis who had received a liver transplant for HCC. *JHepatol*. 1 marzo 2017;66(3):552–9. doi: [10.1016/j.jhep.2016.10.038](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.038)
35. Mazzaferro V, Sposito C, Zhou J, Pinna AD, De Carlis L, Fan J, et al. Metroticket 2.0 Model for Analysis of Competing Risks of Death After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 1 gennaio 2018;154(1):128–39. doi: [10.1053/j.gastro.2017.09.025](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.025)
36. Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including α -Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria.

Gastroenterology. 1 ottobre 2012;143(4):986-994.e3.
doi: [10.1053/j.gastro.2012.05.052](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.052)

37. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol* 2022;76:681-693.
doi: [10.1016/j.jhep.2021.11.018](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.018)
38. Parikh ND, Singal AG. The ITA.LI.CA staging system: a novel staging system for hepatocellular carcinoma. *PLoS Med* 2016;13:e1002005.
doi: [10.1371/journal.pmed.1002005](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002005)
39. Yau T, Tang VY, Yao TJ, Fan ST, Lo CM, Poon RT. Development of Hong Kong Liver Cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2014;146:1691-1700.e3. doi: [10.1053/j.gastro.2014.02.032](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.032)
40. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) - Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM). Edizione 2024, Aggiornata a gennaio 2024.
https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG+146_Colon_agg2024.pdf/dal580a0-6c03-8199-5b20-5f47af42cc54?t=1724662895701
41. André T., Boni C., Navarro M., Tabernero J., Hickish T., Topham C., Bonetti A., Clingan P., Bridgewater J., Rivera F., de Gramont A. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27:3109-3116. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6771
42. Schmoll H. J., Tabernero J., Maroun J., de Braud F., Price T., Van Cutsem E., Hill M., Hoersch S., Rittweger K., Haller D. G. (2015). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results of the NO16968 randomized controlled phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 33:3733-3740. doi: 10.1200/JCO.2015.60.9107

43. Chakraborty, E.; Sarkar, D. Emerging Therapies for Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Cancers* 2022, 14, 2798. doi: [10.3390/cancers14112798](https://doi.org/10.3390/cancers14112798)
44. Haynes J, Manogaran P. Mechanisms and Strategies to Overcome Drug Resistance in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2025 Feb 25;26(5):1988. doi: 10.3390/ijms26051988
45. Zhou Y, Wu S, Qu FJ. Therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor signaling pathway in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2024; 16(6): 2362-2379. doi: [10.4251/wjgo.v16.i6.2362](https://doi.org/10.4251/wjgo.v16.i6.2362)
46. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, Diaz LA Jr. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jun;16(6):361-375. doi: 10.1038/s41575-019-0126-x
47. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008 Jul 24;359(4):378-90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857
48. Moustafa, A.M.Y.; Bakare, S.B. Synthesis of some hybrid 7-hydroxy quinolinone derivatives as anti breast cancer drugs. *Res. Chem. Intermed.* 2019, 45, 3895–3912. doi:[10.1007/s11164-019-03827-y](https://doi.org/10.1007/s11164-019-03827-y)
49. Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P.; Dhar, K. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 77, 422–487. doi: [10.1016/j.ejmech.2014.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018)
50. Singh, A.K.; Kumar, A.; Singh, H.; Sonawane, P.; Paliwal, H.; Thareja, S.; Pathak, P.; Grishina, M.; Jaremko, M.; Emwas, A.-H.; et al. Concept of Hybrid Drugs and Recent Advancements in Anticancer Hybrids. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1071. doi: [10.3390/ph15091071](https://doi.org/10.3390/ph15091071)

51. Szumilak, M.; Wiktorowska-Owczarek, A.; Stanczak, A. Hybrid drugs—A strategy for overcoming anticancer drug resistance? *Molecules* 2021, 26, 2601. doi: [10.3390/molecules26092601](https://doi.org/10.3390/molecules26092601)
52. Abbot, V.; Sharma, P.; Dhiman, S.; Noolvi, M.N.; Patel, H.M.; Bhardwaj, V. Small hybrid heteroaromatics: Resourceful biological tools in cancer research. *RSC Adv.* 2017, 7, 28313–28349. doi: <https://doi.org/10.1039/C6RA24662A>
53. Zheng, W.; Zhao, Y.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Wu, K.; Wang, F. Multi-targeted anticancer agents. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17, 3084–3098. doi: [10.2174/1568026617666170707124126](https://doi.org/10.2174/1568026617666170707124126)
54. Chamseddine, I.M.; Rejniak, K.A. Hybrid modeling frameworks of tumor development and treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2020, 12, e1461. doi: [10.1002/wsbm.1461](https://doi.org/10.1002/wsbm.1461)
55. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed.
56. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J., Stryer, L. (2015). *Biochemistry*, 8th ed.
57. Jordheim, L.P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013, 12, 447–464. doi: [10.1038/nrd4010](https://doi.org/10.1038/nrd4010)
58. Flotho, C.; Claus, R.; Batz, C.; Schneider, M.; Sandrock, I.; Ihde, S.; Plass, C.; Niemeyer, C.M.; Lübbert, M. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2009, 23, 1019–1028. doi: [10.1038/leu.2008.397](https://doi.org/10.1038/leu.2008.397)
59. Galmarini, C.; Mackey, J.; Dumontet, C. Nucleoside analogues: Mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 2001, 15, 875–890. doi: [10.1038/sj.leu.2402114](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402114)

60. Jordheim, L.; Dumontet, C. Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1776, 138–159. doi: [10.1016/j.bbcan.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.004)
61. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84: 9265-9269. doi: [10.1073/pnas.84.24.9265](https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265)
62. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*. 1987, 327: 524-526. doi: [10.1038/327524a0](https://doi.org/10.1038/327524a0)
63. Thomson LL, Lawton FG, Knowles RG, Basley JE, Riversomoreno V, Moncada S: NO synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res*. 1994, 54: 1352-1354. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7509718/>
64. Reveneau S, Arnould L, Jolimoy G, Hilpert S, Lejeune P, Saint-Giorgio V, Belichard C, Jeannin JF: Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptor. *Lab Invest*. 1999, 79: 1215-1225. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10532585/>
65. Ying L, Hofseth LJ: An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res*. 2007, 67: 1407-1410. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-06-2149](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2149)
66. Shang ZJ, Li JR, Li ZB: Effects of exogenous nitric oxide on oral squamous cell carcinoma: an in vitro study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002, 60 (8): 905-910. doi: [10.1053/joms.2002.33860](https://doi.org/10.1053/joms.2002.33860)
67. Harada K, Supriatno, Kawaguchi S, Tomitaro O, Yoshida H, Sato M: Overexpression of iNOS gene suppresses the tumorigenicity and metastasis of oral cancer cells. *In Vivo*. 2004, 18 (4): 449-455. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15369183/>
68. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991, 43: 109-142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1852778/>

69. Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain SP, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR, Harris CC: p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nat Med.* 1998, 12: 1371-1376. doi: [10.1038/3957](https://doi.org/10.1038/3957)
70. Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA: Nitric oxide: I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Gastrointest Liver Physiol.* 1999, 39: 315-321. doi: [10.1152/ajpgi.1999.276.2.G315](https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.2.G315)
71. Kanner J, Harel S, Granit R: Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 1991, 289 (1): 130-136. doi: [10.1016/0003-9861\(91\)90452-o](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90452-o)
72. Subapriya R, Kumaraguruparan R, Ramachandran CR, Nagini S: Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. *Clin Biochem.* 2002, 35: 489-493. doi: [10.1016/s0009-9120\(02\)00340-5](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00340-5)
73. Wink DA, Mitchell JB: The chemical biology of NO. Insights into regulation, protective and toxic mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998, 25 (4/5): 434-456. doi: [10.1016/s0891-5849\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00092-6)
74. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White RC, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM: Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1411: 385-400. doi: [10.1016/s0005-2728\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00028-6)
75. Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadgil, A.R.; Joshi, V. Nitric oxide and cancer: A review. *World J. Surg. Oncol.* 2013, 11, 118. doi: [10.1186/1477-7819-11-118](https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118)
76. Lala, P.K.; Chakraborty, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2001, 2, 149–156. doi: [10.1016/S1470-2045\(00\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00256-4)
77. Weiming, X.U.; Liu, L.Z.; Loizidou, M.; Ahmed, M.; Charles, I.G. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* 2002, 12, 311–320. doi: [10.1038/sj.cr.7290133](https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290133)

78. Whiteside, T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008, 27, 5904–5912. doi: [10.1038/onc.2008.271](https://doi.org/10.1038/onc.2008.271)
79. Peñarando, J.; Aranda, E.; Rodríguez-Ariza, A. Immunomodulatory roles of nitric oxide in cancer: Tumor microenvironment says “NO” to antitumor immune response. *Transl. Res.* 2019, 210, 99–108. doi: [10.1016/j.trsl.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.03.003)
80. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003, 73, 209–212. doi: [10.1189/jlb.0602325](https://doi.org/10.1189/jlb.0602325)
81. Mosser, D.M.; Zhang, X. Activation of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008, 83, 14.2.1–14.2.8. doi: [10.1002/0471142735.im1402s83](https://doi.org/10.1002/0471142735.im1402s83)
82. Weigert, A.; Brüne, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 2008, 19, 95–102. doi: [10.1016/j.niox.2008.04.021](https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.021)
83. Brüne, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* 2003, 10, 864–869.; Jeannin, J.-F.; Leon, L. doi: [10.1038/sj.cdd.4401261](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401261)
84. Cortier, M.; Sassi, N.; Paul, C.; Bettaieb, A. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide* 2008, 19, 158–163. doi: [10.1016/j.niox.2008.04.024](https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.024)
85. Wink, D.A.; Hines, H.B.; Cheng, R.Y.S.; Switzer, C.H.; Flores-Santana, W.; Vitek, M.P.; Ridnour, L.A.; Colton, C.A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.* 2011, 89, 873–891. doi: [10.1189/jlb.1010550](https://doi.org/10.1189/jlb.1010550)
86. Nizet, V.; Johnson, R.S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9, 609–617. doi: [10.1038/nri2607](https://doi.org/10.1038/nri2607)
87. Walmsley, S.R.; Chilvers, E.R.; Whyte, M.K.B. Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function. *Arthritis Res. Ther.* 2009, 11, 219. doi: [10.1186/ar2632](https://doi.org/10.1186/ar2632)

88. Rahat, M.A.; Bitterman, H.; Lahat, N. Molecular mechanisms regulating macrophage response to hypoxia. *Front. Immunol.* 2011, 2, 45. doi: [10.3389/fimmu.2011.00045](https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00045)
89. Ridnour, L.A.; Thomas, D.D.; Donzelli, S.; Espey, M.G.; Roberts, D.D.; Wink, D.A.; Isenberg, J.S. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 1329–1337. doi: [10.1089/ars.2006.8.1329](https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1329)
90. Ziche, M.; Morbidelli, L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur. Cytokine Netw.* 2009, 20, 164–170. doi: [10.1684/ecn.2009.0169](https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0169)
91. Ridnour, L.A.; Windhausen, A.N.; Isenberg, J.S.; Yeung, N.; Thomas, D.D.; Vitek, M.P.; Roberts, D.D.; Wink, D.A. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 16898–16903. doi: [10.1073/pnas.0702761104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702761104)
92. Sunil J. Wimalawansa Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* · August 2008. doi: [10.1517/14656566.9.11.1935](https://doi.org/10.1517/14656566.9.11.1935)
93. Sortino, S. Photoactivated Nanomaterials for Biomedical Release Applications. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 301–318. doi: [10.1039/C1JM13288A](https://doi.org/10.1039/C1JM13288A)
94. Sharma, N.; Dhyani, A.K.; Marepally, S.; Jose, D.A. Nanoscale Lipid Vesicles Functionalized with a Nitro-Aniline Derivative for Photoinduced Nitric Oxide (NO) Delivery. *Nanoscale Adv.* 2020, 2, 463–469. doi: [10.1039/c9na00532c](https://doi.org/10.1039/c9na00532c)
95. Navacchia, M.L.; Fraix, A.; Chinaglia, N.; Gallerani, E.; Perrone, D.; Cardile, V.; Graziano, A.C.E.; Capobianco, M.L.; Sortino, S. NO Photoreleaser-Deoxyadenosine and -Bile Acid Derivative Bioconjugates as Novel Potential Photochemotherapeutics. *ACS Med. Chem. Lett.* 2016, 7, 939–943. doi: [10.1021/acsmedchemlett.6b00257](https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00257)
96. Marchesi, E.; Melloni, E.; Casciano, F.; Pozza, E.; Argazzi, R.; De Risi, C.; Preti, L.; Perrone, D.; Navacchia, M.L. Evaluation of Anticancer

Activity of Nucleoside–Nitric Oxide Photo-Donor Hybrids. *Molecules* 2024, 29, 3383. doi: [10.3390/molecules29143383](https://doi.org/10.3390/molecules29143383)

97. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 1985;228:1049-55. doi: [10.1126/science.3887571](https://doi.org/10.1126/science.3887571)
98. Neill US. From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. *J Clin Invest*. 2011;121:3768-73. doi: [10.1172/jci60887](https://doi.org/10.1172/jci60887)
99. Efferth T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2017;46:65-83. doi: [10.1016/j.semcancer.2017.02.009](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.009)
100. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med*. 2011;17:1217-20. doi: [10.1038/nm.2471](https://doi.org/10.1038/nm.2471)
101. Marchesi E, Perrone D, Navacchia ML. Molecular Hybridization as a Strategy for Developing Artemisinin-Derived Anticancer Candidates. *Pharmaceutics*. 2023 Aug 23;15(9):2185. doi: [10.3390/pharmaceutics15092185](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092185)
102. Li WD, Dong YJ, Tu YY, Lin ZB. Dihydroarteannuin ameliorates lupus symptom of BXSB mice by inhibiting production of TNF-alpha and blocking the signaling pathway NF-kappa B translocation. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:1243-50. doi: [10.1016/j.intimp.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.03.004)
103. Sun H, Meng X, Han J, Zhang Z, Wang B, Bai X. et al. Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer-an in vitro and in vivo study. *Tumour Biol*. 2013;34:3791-800. doi: [10.1007/s13277-013-0963-0](https://doi.org/10.1007/s13277-013-0963-0)
104. Du XX, Li YJ, Wu CL, Zhou JH, Han Y, Sui H. et al. Initiation of apoptosis, cell cycle arrest and autophagy of esophageal cancer cells by dihydroartemisinin. *Biomed Pharmacother*. 2013;67:417-24. doi: [10.1016/j.biopha.2013.01.013](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.01.013)
105. Liao K, Li J, Wang ZL. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3 beta/cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549

- lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:8684-91.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25674233/>
106. Zhang CZ, Zhang HT, Yun JP, Chen GG, Lai PBS. Dihydroartemisinin exhibits antitumor activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83:1278-89.
doi: [10.1016/j.bcp.2012.02.002](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.002)
 107. Jiang C, Li S, Li Y, Bai Y. Anticancer Effects of Dihydroartemisinin on Human Esophageal Cancer Cells In vivo. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018;2018:875974. doi: [10.1155/2018/8759745](https://doi.org/10.1155/2018/8759745)
 108. Han P, Luan Y, Liu YL, Yu ZW, Li JW, Sun ZC. et al. Small interfering RNA targeting Rac1 sensitizes colon cancer to dihydroartemisinin-induced cell cycle arrest and inhibited cell migration by suppressing NF kappa B activity. *Mol Cell Biochem*. 2013;379:171-80.
doi: [10.1007/s11010-013-1639-1](https://doi.org/10.1007/s11010-013-1639-1)
 109. Chen H. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacological Research*. 2003;48:231-6.
doi: [10.1016/s1043-6618\(03\)00107-5](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(03)00107-5)
 110. Wang SJ, Sun B, Cheng ZX, Zhou HX, Gao Y, Kong R. et al. Dihydroartemisinin inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by targeting the NF-kappaB pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68:1421-30. doi: [10.1007/s00280-011-1643-7](https://doi.org/10.1007/s00280-011-1643-7)
 111. Li YL, Wang YW, Kong R, Xue DB, Pan SH, Chen H. et al. Dihydroartemisinin suppresses pancreatic cancer cells via a microRNA-mRNA regulatory network. *Oncotarget*. 2016;7:62460-73.
doi: [10.18632/oncotarget.11517](https://doi.org/10.18632/oncotarget.11517)
 112. Liu J, Ren YJ, Hou YL, Zhang CQ, Wang B, Li XR. et al. Dihydroartemisinin Induces Endothelial Cell Autophagy through Suppression of the Akt/mTOR Pathway. *J Cancer*. 2019;10:6057-64.
doi: [10.7150/jca.33704](https://doi.org/10.7150/jca.33704)
 113. Niu N, Yu CM, Li LQ, Liu Q, Zhang WQ, Liang KL. et al. Dihydroartemisinin enhances VEGFR1 expression through up-

regulation of ETS-1 transcription factor. *J Cancer*. 2018;9:3366-72. doi: [10.7150/jca.25082](https://doi.org/10.7150/jca.25082)

114. Jessmon P, Boulanger T, Zhou W, Patwardhan P. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017;17:427-37. doi: [10.1080/14737140.2017.1299575](https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575)
115. Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*. 2011;71:3-10. doi: [10.1016/j.lungcan.2010.08.022](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.08.022)
116. Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1358-70. doi: [10.1111/j.1582-4934.2008.00360.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00360.x)
117. Jin H, Jiang AY, Wang H, Cao Y, Wu Y, Jiang XF. Dihydroartemisinin and gefitinib synergistically inhibit NSCLC cell growth and promote apoptosis via the Akt/mTOR/STAT3 pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16:3475-81. doi: [10.3892/mmr.2017.6989](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6989)
118. Hou JM, Wang DS, Zhang RW, Wang H. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: In vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clinical Cancer Research*. 2008;14:5519-30. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-08-0197](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0197)
119. Wang SJ, Gao Y, Chen H, Kong R, Jiang HC, Pan SH. et al. Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2010;293:99-108. doi: [10.1016/j.canlet.2010.01.001](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.001)
120. Jansen FH, Adoubi I, Comoe JCK, De Cnodder T, Jansen N, Tschulakow A. et al. First Study of Oral Artenimol-R in Advanced Cervical Cancer: Clinical Benefit, Tolerability and Tumor Markers. *Anticancer Res*. 2011;31:4417-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22199309/>
121. Kovács P, Schwarcz S, Nyerges P, Bíró TI, Ujlaki G, Bai P, Mikó E. Anticarcinogenic effects of ursodeoxycholic acid in pancreatic

adenocarcinoma cell models. *Front Cell Dev Biol.* 2024 Dec 11;12:1487685. doi: [10.3389/fcell.2024.1487685](https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1487685)

122. Lim SC, Han SI. Ursodeoxycholic acid effectively kills drug-resistant gastric cancer cells through induction of autophagic death. *Oncol Rep.* 2015 Sep;34(3):1261-8. doi: [10.3892/or.2015.4076](https://doi.org/10.3892/or.2015.4076)
123. Yee SB, Yeo WJ, Park BS, Kim JY, Baek SJ, Kim YC, Seo SY, Lee SH, Kim JH, Suh H, Kim ND, Lim YJ, Yoo YH. Synthetic chenodeoxycholic acid derivatives inhibit glioblastoma multiform tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2005 Sep;27(3):653-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16077913/>
124. Xu L, Li Y, Wei Z, Bai R, Gao G, Sun W, Jiang X, Wang J, Li X, Pi Y. Chenodeoxycholic Acid (CDCA) Promoted Intestinal Epithelial Cell Proliferation by Regulating Cell Cycle Progression and Mitochondrial Biogenesis in IPEC-J2 Cells. *Antioxidants (Basel).* 2022 Nov 18;11(11):2285. doi: [10.3390/antiox11112285](https://doi.org/10.3390/antiox11112285)
125. Goossens JF, Bailly C. Ursodeoxycholic acid and cancer: From chemoprevention to chemotherapy. *Pharmacol Ther.* 2019 Nov;203:107396. doi: [10.1016/j.pharmthera.2019.107396](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107396)
126. Di Ciaula, A.; Wang, Q.-H.; Molina-Molina, E.; Baccetto, R.L.; Calamita, G.; Palmieri, V.O.; Portincasa, P. Bile Acid and Cancer: Direct and environmental-dependent effects. *Ann. Hepatol.* 2017, 16, s87–s105. doi: [10.5604/01.3001.0010.5501](https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5501)
127. Dalpiaz, A.; Paganetto, G.; Pavan, B.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Beggiato, S.; Perrone, D. Zidovudine and Ursodeoxycholic Acid Conjugation: Design of a New Prodrug Potentially Able To Bypass the Active Efflux Transport Systems of the Central Nervous System. *Mol. Pharm.* 2012, 9, 957–968. doi: [10.1021/mp200565g](https://doi.org/10.1021/mp200565g)
128. Faustino, C.; Serafim, C.; Rijo, P.; Reis, C.P. Bile acids and bile acid derivatives: Use in drug delivery systems and as therapeutic agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016, 13, 1133–1148. doi: [10.1080/17425247.2016.1178233](https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1178233)

129. Pavlovic, N.; Golocorbin-Kon, S.; Danic, M.; Stanimirov, B.; Al-Salami, H.; Stankov, K.; Mikov, M. Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic. Profiles Front. Pharmacol. 2018, 9, 1283. doi: [10.3389/fphar.2018.01283](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01283)
130. Rathod NV, Mishra S. Bile Acid-conjugate as a Promising Anticancer Agent: Recent Progress. Curr Med Chem. 2024;31(26):4160-4179. doi: [10.2174/0109298673274040231121113410](https://doi.org/10.2174/0109298673274040231121113410)
131. Marchesi, E.; Chinaglia, N.; Capobianco, M.L.; Marchetti, P.; Huang, T.E.; Weng, H.C.; Guh, J.H.; Hsu, L.C.; Perrone, D.; Navacchia, M.L. Dihydroartemisinin–Bile Acid Hybridization as an Effective Approach to Enhance Dihydroartemisinin Anticancer Activity. ChemMedChem 2019, 14, 779–787. doi: [10.1002/cmdc.201800756](https://doi.org/10.1002/cmdc.201800756)
132. Xu, Z.; Zhao, S.J.; Liu, Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. Eur. J. Med. Chem. 2019, 183, 111700. doi: [10.1016/j.ejmech.2019.111700](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111700)
133. Melloni, E.; Marchesi, E.; Preti, L.; Casciano, F.; Rimondi, E.; Romani, A.; Secchiero, P.; Navacchia, M.L.; Perrone, D. Synthesis and Biological Investigation of Bile Acid-Paclitaxel Hybrids. *Molecules* 2022, 27, 471. doi: [10.3390/molecules27020471](https://doi.org/10.3390/molecules27020471)
134. Miranda KM, Ridnour LA, McGinity CL, Bhattacharyya D, Wink DA. Nitric Oxide and Cancer: When to Give and When to Take Away? Inorg Chem. 2021 Nov 1;60(21):15941-15947. doi: [10.1021/acs.inorgchem.1c02434](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02434)
135. Ortyn WE, Hall BE, George TC, Frost K, Basiji DA, Perry DJ, Zimmerman CA, Coder D, Morrissey PJ. Misurazione della sensibilità e compensazione nell'imaging spettrale. Cytometry A. 2006 agosto 1;69(8):852-62.
136. Wang, CZ., Wan, C., Li, CH. et al. Ruthenium–dihydroartemisinin complex: a promising new compound for colon cancer prevention via G1 cell cycle arrest, apoptotic induction, and adaptive immune

regulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 93, 411–425 (2024).
doi: [10.1007/s00280-023-04623-7](https://doi.org/10.1007/s00280-023-04623-7)

137. Cao Y. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) in Pharmacology and Toxicology: A Review. *J Appl Toxicol*. 2025 Aug 13. doi: [10.1002/jat.4885](https://doi.org/10.1002/jat.4885)