

## PROGETTO 4. Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Il progetto sviluppato presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, nelle sedi di Milano e Bergamo è di seguito descritto.

### Razionale e ipotesi dello studio

Le metastasi ossee, derivanti da diversi tipi di tumori primari – soprattutto carcinoma della mammella e della prostata – sono associate a un peggioramento della qualità della vita e della sopravvivenza dei pazienti, e rappresentano quindi un importante problema clinico, tuttora irrisolto. Poche sono le terapie disponibili in clinica, per lo più con finalità palliativa, mirate a contrastare i sintomi e contenere la progressione delle lesioni ossee. Pertanto, è di fondamentale importanza studiare i meccanismi che guidano lo sviluppo di metastasi all'osso, al fine di individuare bersagli per nuove strategie terapeutiche.

Il microambiente tumorale (TME) ricopre un ruolo fondamentale nel sostenere la progressione del tumore e lo sviluppo di metastasi. L'interazione delle cellule tumorali con le cellule residenti e le molecole presenti nella sede ossea regola diversi aspetti dello sviluppo metastatico, quali la migrazione, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali stesse, l'evasione del sistema immunitario e l'attivazione anomala delle cellule deputate al rimodellamento della matrice ossea, portando alla formazione di metastasi ossee osteolitiche (caratterizzate da riassorbimento osseo) o osteoblastiche (associate a anomala deposizione di matrice ossea).

Nel nostro studio ci siamo occupati di due



componenti chiave del microambiente tumorale:

- (i) i macrofagi, cellule dell'immunità innata che regolano la progressione tumorale con esiti opposti in base al loro grado di polarizzazione;
- (ii) la trombospondina-1, una molecola extracellulare nota per la sua attività pleiotropica nel regolare l'interazione tra le cellule tumorali e il microambiente.

### Obiettivi del progetto

Lo scopo di questo progetto è studiare il microambiente (TME) delle metastasi ossee al fine di sviluppare nuovi approcci farmacologici che, agendo su sue componenti cellulari e/o molecolari, possano contrastare lo sviluppo di metastasi all'osso. Lo studio è stato suddiviso in due sottoprogetti:

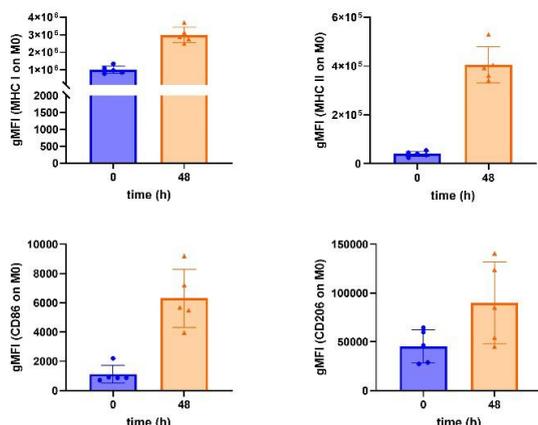
- 1) Sviluppo di formulazioni nanotecnologiche per la modulazione dell'attività dei macrofagi presenti nel microambiente tumorale osseo, volta all'acquisizione di un fenotipo immunostimolante che induca la risposta immunitaria adattativa specifica inibendo la progressione tumorale;
- 2) Analisi del ruolo della TSP-1 nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche, e in particolare della sua attività nel rimodellamento della matrice ossea e nel processo di dormienza delle metastasi, come base per nuovi approcci terapeutici.

### Sottoprogetto 1. modulazione farmacologica dei macrofagi nel microambiente metastatico dell'osso:

#### Stato dell'arte e razionale

I macrofagi sono cellule dell'immunità innata che giocano ruoli importanti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, proteggendo il nostro organismo tramite diversi meccanismi, quali fagocitosi e digestione di particelle estranee, patogeni e detriti cellulari. I macrofagi sono cellule "plastiche", in quanto responsive all'influenza del microambiente circostante, che ne può alterare

l'espressione genica e le funzioni, orientandoli verso uno specifico fenotipo contesto-specifico.



Nel microambiente tumorale, i macrofagi con fenotipo M1 promuovono una risposta immunitaria anti-tumorale, mentre i macrofagi M2 associati al tumore (TAMs) promuovono la progressione tumorale, stimolando i processi di angiogenesi, riparo tissutale, migrazione di cellule tumorali metastatiche, e tramite un'azione soppressiva dei linfociti T citotossici. Ad oggi, modulare il TME e il fenotipo dei macrofagi rappresenta una strategia per lo sviluppo di nuovi approcci immunoterapici contro diverse tipologie di tumore e formazione di metastasi. In questo contesto, il nostro scopo è quello di studiare e sviluppare nuove strategie per veicolare farmaci immunomodulanti verso il microambiente dell'osso, al fine di riprogrammare il fenotipo dei TAMs delle metastasi ossee.

### Risultati e conclusioni

Nel corso dell'anno 2024 sono state studiate e sviluppate varie strategie di targeting mirato alle ossa per veicolare farmaci a questa sede limitandone l'effetto off-target, causa di effetti collaterali. In particolare abbiamo lavorato con un farmaco di cui sono note le sue proprietà immunostimolanti. Ci siamo focalizzati sulla ottimizzazione dell'incapsulamento delle nanoparticelle di organosilica mesoporose (Meso) e sullo sviluppo di un sistema modulare con anticorpi coniugati a farmaci.

Per quanto concerne lo studio delle Meso, è stata ottimizzata la procedura di incapsulamento del farmaco ottenendo circa l'82% di efficienza. Si è quindi proceduto a testare la cinetica di internalizzazione nei macrofagi primari esposti a queste nanoparticelle, che sono state rese

fluorescenti mediante la coniugazione con il marcatore fluorescente cy5. L'analisi della fluorescenza al citofluorimetro ha consentito di stimare l'aumento dell'internalizzazione nel tempo, con la saturazione del segnale a 24-48 h post esposizione.

Successivamente si è proceduto ad esporre cellule primarie macrofagiche alle Meso cariche di farmaco per valutare lo switch fenotipico nelle cellule M0 naive dovuto al rilascio del farmaco nell'arco delle 48h; l'effetto è stato confermato con un aumento di markers tipici del fenotipo M1 pro-infiammatori, quali CD86, MHC-I e MHC-II.

Quindi le Meso cariche sono state adoperate per un esperimento di farmacocinetica *in vivo*, somministrando endovena una dose equivalente di farmaco (2mg/kg) a confronto con la formulazione liposomiale e quella libera; gli animali sono stati sacrificati a diversi tempi e gli organi prelevati per la quantificazione del farmaco mediante spettrometria di massa. I dati hanno evidenziato che le Meso cariche garantiscono una migliore distribuzione ed una permanenza fino a 24h nella sede ossea e tumorale rispetto ai liposomi o al farmaco libero. Inoltre, aumentano la biodisponibilità del farmaco preservandolo dalla degradazione nel plasma.

Si è quindi proceduto ad effettuare un esperimento di attività antitumorale inducendo il tumore alla mammella triplo negativo (TNBC) nei topi mediante inoculo di cellule murine 4T1.2 caratterizzate da alto tropismo osseo. Il trattamento delle Meso cariche è stato confrontato con gli opportuni controlli (veicolo e meso vuote), col farmaco libero, e col trattamento singolo e combinato con la doxorubicina, chemioterapico usato in prima linea. Il trattamento con le Meso cariche è stato in grado di rallentare la crescita tumorale sovrapponendosi all'effetto della doxorubicina, usata come trattamento singolo o in combinazione. Queste nanoparticelle verranno usate con una diversa schedule di trattamento con la doxorubicina e con altri terapeutici al fine di potenziarne l'azione.

In parallelo, in collaborazione con il dipartimento di chimica dell'UniMi, abbiamo sviluppato una piattaforma modulare che combina coniugati di alendronato alla molecola FITC e l'uso di frammenti di anticorpi legati a fluorofori/terapeutici in grado di riconoscere la FITC e localizzarsi alle ossa. Inizialmente, si è provveduto all'ingegnerizzazione di un anticorpo anti FITC, di cui la sequenza del sito

di legame era già nota, per ridurne il peso molecolare (44 KDa) e quindi aumentare la penetrabilità dei tessuti. Il Fab che è stato ottenuto è stato caratterizzato e coniugato alla molecola fluorescente cianina (cy5) per una prima visualizzazione del legame del Fab a FITC. Successivamente il Fab è stato usato per dei saggi di interazione biomolecolare mediante risonanza plasmonica di superficie (SPR) che hanno confermato la capacità di legame del Fab alla FITC. Al contempo sono stati sintetizzati diversi coniugati di alendronato-FITC e sono poi stati adoperati per saggi di competizione indiretta per valutare il candidato ideale che possa esser riconosciuto con alta affinità dal Fab.

Il lotto CS25 è il derivato ideale tale da venire legato con alta affinità e specificità dal Fab, in modo concentrazione-dipendente.

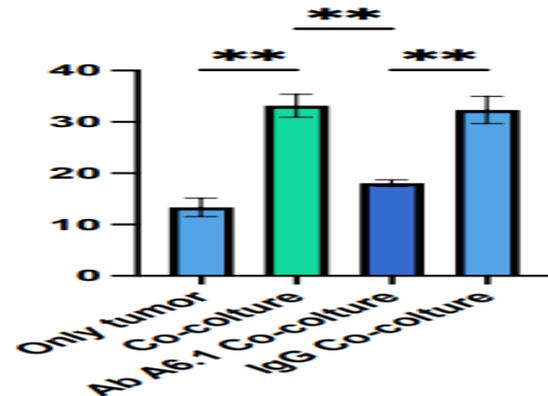
Inoltre, per dimostrare qualitativamente che questo derivato si lega all'idrossiapatite, frammenti di ossa murine sono state incubate con il CS25 e successivamente con il Fab-cy5. Le immagini acquisite al microscopio confocale dimostrano che mentre la FITC libera non è in grado di legarsi alla matrice ossea, il costruito CS25 lo è, consentendo alla FITC di essere riconosciuta dal Fab-cy5.

Questi dati pongono le basi per il proseguimento degli studi che vedono come protagonista lo sviluppo di diverse metodologie di targeting mirato alle ossa.

## Sotto progetto 2. Ruolo della trombospondina-1 nelle metastasi ossee osteolitiche:

### Stato dell'arte e razionale

Le cellule tumorali che invadono l'osso interagiscono con il microambiente dando vita a fenomeni di regolazione reciproca delle diverse tipologie cellulari coinvolte. Da un lato, le cellule tumorali alterano la capacità delle cellule dell'osso di regolare il rimodellamento della matrice ossea. Nel caso delle metastasi ossee osteolitiche, oggetto del nostro progetto di ricerca, la presenza di cellule metastatiche porta a una iperstimolazione della produzione e attività degli osteoclasti, con conseguente eccessiva degradazione della matrice ossea. D'altra parte, il microambiente osseo può determinare se le cellule tumorali prolifereranno a formare una massa metastatica, oppure rimarranno quiescenti, in uno stato di dormienza reversibile che può durare anche per diversi anni. Una proteina che svolge una funzione

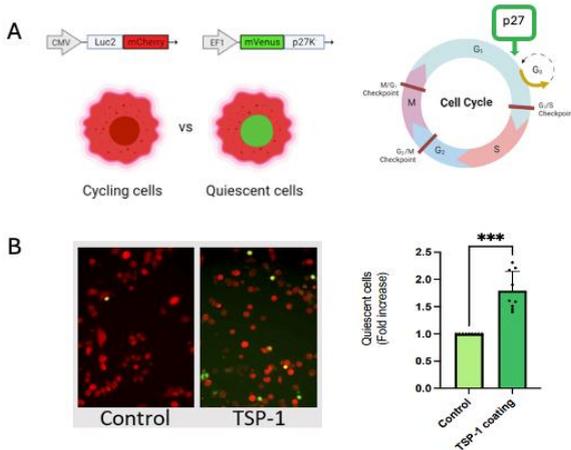


chiave nel coordinare l'interazione tra le cellule tumorali e il microambiente è la trombospondina-1 (TSP-1). TSP-1 è una proteina della matrice extracellulare costituita da diversi domini, ognuno in grado di interagire con ligandi specifici, e di svolgere quindi diverse attività biologiche. L'attività della TSP dipende dalla disponibilità dei suoi domini e dei rispettivi ligandi, e questo è in parte regolato da una proteolisi controllata della TSP-1 da parte di enzimi che liberano frammenti attivi della proteina. Evidenze in letteratura indicano il coinvolgimento della TSP-1 nella regolazione sia della dormienza cellulare di cellule tumorali, sia del rimodellamento osseo.

La ricerca nel 2024 ha avuto lo scopo di studiare il ruolo della TSP-1 nelle metastasi ossee osteolitiche in termini di: (i) effetto sul microambiente osseo, completando l'analisi del suo ruolo su osteoclastogenesi e degradazione della matrice ossea; e (ii) regolazione della dormienza di cellule tumorali disseminate all'osso.

### Risultati e conclusioni

i) Negli anni precedenti avevamo identificato un frammento della TSP-1 in grado di rallentare la comparsa delle metastasi ossee in un modello preclinico di carcinoma della mammella, proteggendo la matrice ossea dalla degradazione. Avevamo inoltre dimostrato che tale frammento riduce significativamente il processo di differenziamento degli osteoclasti in vitro.



Proseguendo su questa linea di ricerca, abbiamo approfondito l'analisi del meccanismo dell'azione di TSP-1 e del suo frammento attivo, analizzando le conseguenze funzionali del legame di TSP-1 e del suo frammento a due molecole fondamentali per il differenziamento degli osteoclasti, RANKL e OPG, che svolgono un'azione opposta su questo processo.

Abbiamo dimostrato che il frammento di TSP-1, pur non interferendo con l'interazione di RANK con il suo ligando fisiologico RANKL, è in grado di inibire il segnale del recettore, bloccandone la capacità di indurre il differenziamento degli osteoclasti.

Abbiamo inoltre dimostrato che alcune cellule presenti nell'ambiente osseo sono in grado di degradare la TSP-1 provocando il rilascio di un frammento corrispondente al frammento attivo della TSP-1, che quindi potrebbe avere un ruolo anche fisiologico nel controllo del rimodellamento osseo.

ii) Abbiamo studiato se la TSP-1 fosse in grado di regolare la dormienza delle cellule tumorali nel microambiente osseo. Abbiamo utilizzato un modello cellulare da noi messo a punto che permette di identificare visivamente le cellule quiescenti tramite il rilevamento di un segnale fluorescente. Abbiamo dimostrato che cellule di midollo osseo sono in grado di indurre la quiescenza di cellule tumorali, con un meccanismo

mediato da TSP-1 tramite l'interazione con recettori specifici sulle cellule tumorali.

### Presentazioni a congressi

1. C. Matteo, R. Becchetti, T. Ceruti, R. Frapolli, M. Zucchetti, A. Dal Corso, and C. Nastasi "Liposomes surface functionalization to target the bone matrix: a chemical challenge for a clinical purpose". Poster presentation, EACR-AACR-IACR 2024 Conference: How to Bring Basic Science Discoveries to the Clinic, Dublino, 27-29 Febbraio.
2. C. Matteo, R. Becchetti, M. Cancelliere, M. Meroni, T. Ceruti, M. Zucchetti, R. Frapolli, A. Dal Corso, and C. Nastasi – "Targeting the bone matrix with liposomes to trigger the tumor microenvironment". Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024.
3. C. Matteo, R. Becchetti, M. Cancelliere, M. Meroni, P. Fabrizio, T. Ceruti, M. Zucchetti, R. Frapolli, A. Dal Corso, and C. Nastasi – "Targeting the bone matrix with liposomes to trigger the tumor microenvironment". Poster presentation, Science-driven approaches to achieve early diagnosis of cancer and to overcome therapy resistance. 64<sup>th</sup> SIC Milan, 25-27 Settembre 2024.
4. Carlessi E., Carminati L., Borsotti P., Colombo M., Grasselli C., Ripamonti M., Sangalli F., Marabese M., Taraboletti G. "Role of thrombospondin-1 in a model of breast cancer dormancy". Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024.
5. Carminati L., Borsotti P., Longhi E., Urbinati, Sangalli F., Rusnati M., Taraboletti G. "Role of thrombospondin-1 in the microenvironment of osteolytic bone metastases". Poster presentation, The Tumour Ecosystem: Cellular Interactions and Therapeutic Opportunities, Bergamo, 19-21 Marzo 2024

### PROGETTO 3. Potenziale diagnostico e terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni batteriche dell'osso

Il Progetto sviluppato presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca ETS, in collaborazione con l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRGB-CNR) presso l'Istituto Clinico Humanitas IRCCS (ICH) è di seguito descritto.



#### Razionale e ipotesi dello studio

L'osteomielite (OM) è un'infezione muscolo-scheletrica grave causata dalla diffusione ematogena di microrganismi patogeni o dalla contaminazione di fratture e impianti chirurgici. È caratterizzata da un intenso rimodellamento osseo ed una marcata infiammazione. Sebbene il trattamento convenzionale dell'OM preveda l'uso di antibiotici, la loro efficacia è limitata dal microambiente osseo (BME), che ostacola la diffusione dei farmaci e favorisce l'emergere di ceppi resistenti.

*Staphylococcus aureus* (SA) è il principale agente eziologico dell'OM. Questo batterio opportunisto colonizza il BME attraverso molecole di adesione ed altera l'omeostasi del tessuto muscoloscheletrico. La pentrassina lunga PTX3 è una proteina che agisce da fattore solubile di riconoscimento del pattern (PRM) ed è prodotta in siti di infezione/infiammazione da diversi tipi cellulari. In particolare, PTX3 è espressa da cellule della linea osteoblastica (programmate per sintetizzare matrice ossea) e ne promuove il differenziamento ad osteoblasti maturi. Questa molecola è stata, infatti, associata a patologie metaboliche, autoimmuni e infiammatorie dello scheletro, il che ne suggerisce il coinvolgimento anche nella risposta immunitaria alle infezioni dell'osso.

Le infezioni periprotetiche (PJI) sono complicanze gravi della chirurgia protesica, la cui diagnosi integra dati clinici e di laboratorio, spesso con risultati incerti. Fattori molecolari e cellulari dell'immunità sono oggetto di intensa ricerca quali potenziali marcatori

diagnostici di PJI. A tal proposito, nostri studi recenti suggeriscono che PTX3 sia un marcatore specifico di PJI in pazienti sottoposti ad artroprotesi di anca (THA) e ginocchio (TKA). Tuttavia, il contributo delle varianti genetiche di PTX3 e delle citochine infiammatorie associate alla sua produzione (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17A) al rischio di PJI non è chiaro. In generale, la relazione tra genetica dell'ospite e rischio di infezione è poco nota in ambito di chirurgia protesica.

L'ipotesi centrale alla base degli studi condotti nel 2024 è che PTX3 sia coinvolta nella patogenesi dell'OM batterica, agendo sia come PRM che come componente del BME, e che quindi possa trovare applicazione nella diagnosi biochimica e genetica di PJI. La nostra ricerca è stata quindi sviluppata su due livelli: modelli animali di patologia ed analisi genetiche in soggetti a rischio di PJI.

#### Obiettivi del progetto

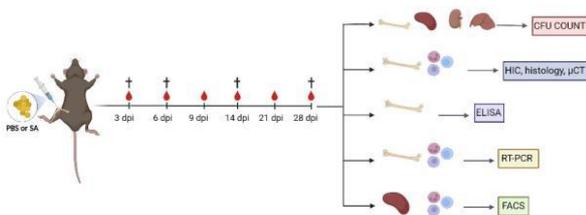
Obiettivo generale delle ricerche svolte nel 2024 (a completamento ed integrazione delle indagini condotte nei due anni precedenti) è stato lo studio della patogenesi dell'OM batterica con un focus specifico su PTX3 quale attore molecolare e marcatore di malattia. Tale obiettivo è stato perseguito implementando una strategia di ricerca multidisciplinare che, spaziando dalla biologia molecolare e cellulare alla microbiologia ed alla diagnostica clinica, è stata declinata secondo i seguenti due sotto-progetti:

- valutare il ruolo di PTX3 nella patogenesi della SA-OM, con riguardo alla infezione locale e sistemica, all'immunità umorale e cellulare, alla risposta antimicrobica e al rimodellamento osseo. A tal fine, è stato implementato un modello animale di OM batterica che ricapitola aspetti fondamentali della infezione associata a fratture esposte ed interventi chirurgici degli arti inferiori;
- studiare la relazione tra la variazione genetica in PTX3 e fattori infiammatori che ne influenzano la produzione (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17A) ed il rischio di PJI in pazienti con THA e TKA. Più in generale, identificare nuove firme genetiche di PJI con potenziale prognostico e diagnostico.

## SOTTO-PROGETTO 1. Ruolo di PTX3 nella patogenesi dell'osteomielite da *Staphylococcus aureus*

### Stato dell'arte e razionale

L'OM si accompagna a rimodellamento tissutale, fragilità scheletrica, infiammazione e dolore. SA, principale agente eziologico dell'OM, è responsabile di circa il 60% dei casi. Questo batterio innesca nell'osso una risposta immunitaria che coinvolge osteoblasti (OBs) e osteoclasti (OCs), oltre a cellule mieloidi e linfoidi. Tale processo porta alla formazione di sequestri ossei, distruzione dell'osso trabecolare e reazioni periostali anomale. Inoltre, SA ha sviluppato una serie di strategie per sfuggire alla risposta immunitaria quali formazione di biofilm, ascessi e colonizzazione delle lacune osteocitarie. Si ritiene che questi meccanismi rendano l'infezione cronica e difficile da trattare con gli antibiotici, di fatto contribuendo allo sviluppo di resistenze antimicrobiche (AMR) ed al conseguente aumento dei costi sanitari e sociali della patologia.



**Figura 1.** Modello murino di osteomielite da SA. (a) Rappresentazione schematica del modello sperimentale utilizzato.

L'immunità innata collabora con le cellule dell'osso nella reazione alla colonizzazione di questo tessuto da parte di SA. Tra le PRM solubili, PTX3 svolge ruoli importanti: viene prodotta in risposta ai patogeni e regola l'infiammazione ed il rimodellamento osseo<sup>4</sup>. Studi preclinici indicano che PTX3 svolge funzioni di protezione dell'ospite nei confronti delle infezioni batteriche e fungine ed è un marcatore di gravità della sepsi<sup>3</sup>. Da notare che questa molecola è importante per la maturazione degli osteoblasti e la mineralizzazione delle fratture ed è stata di recente proposta quale marcatore di infezione periprotetica (PJI). Pertanto, PTX3 rappresenta il candidato ideale

per ricerche sulla patogenesi delle infezioni ossee.

### Risultati e conclusioni

Nel corso del 2024, abbiamo finalizzato gli studi preclinici su questa molecola focalizzandoci in particolare sul modello murino di infezione batterica degli arti inferiori sviluppato negli anni precedenti (si vedano le relazioni scientifiche del 2022 e 2023).

**Modello murino di SA-OM.** Il nostro modello prevede l'iniezione di un ceppo clinico di SA meticillino-sensibile e biofilm-produttore nel canale midollare del femore. Sono stati condotti esperimenti preliminari per determinare la carica batterica massima tollerata. A tal riguardo, a dosi basse ed intermedie ( $10^4$ - $10^5$  CFU/topo), SA era ancora presente nell'arto iniettato e nel fegato dopo 14 giorni, mentre alla dose più alta ( $10^6$  CFU/topo) la qualità dell'osso era fortemente compromessa ed impediva ulteriori analisi. I topi sono stati, quindi, infettati con 10 CFU/topo e sacrificati a diversi tempi (3, 6, 14 e 28 giorni post-infezione, dpi). Abbiamo rilevato batteri vivi solo nell'arto iniettato e nel fegato, senza segni di colonizzazione nell'osso controlaterale ed in altri organi deputati alla rimozione del batterio (milza, reni). Analisi istologiche hanno evidenziato alterazioni strutturali tipiche dell'osteomielite umana, tra cui perdita di osso corticale, reazione periostale, ascessi necrotici e fibrosi midollare. Il nostro modello riproduce, quindi, caratteristiche salienti dell'osteomielite batterica umana, e rappresenta uno strumento ideale per studiare il ruolo di PTX3 in questa patologia.

**Sorgenti e meccanismi di produzione di PTX3.** Abbiamo misurato la concentrazione della proteina PTX3 sia a livello sistemico (nel siero) che locale (nell'osso) ed osservato un aumento transitorio nel siero e nell'osso dopo l'infezione, con un picco a 6 dpi e livelli elevati fino a 28 dpi. L'analisi citofluorimetrica ha rivelato che PTX3 è principalmente prodotta da macrofagi e progenitori di osteoblasti. Inoltre, l'espressione del gene *Ptx3* è più elevata nelle cellule dell'osso che in quelle del midollo. Abbiamo, infine, osservato che l'infezione da SA ha determinato un aumento dei livelli delle citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  e dell'espressione del PRM di membrana Tlr2 nelle cellule del midollo, laddove è noto che TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TLR2 innescano la sintesi di questa pentrassina. Questi dati indicano che in seguito all'inoculo di SA buona parte della proteina PTX3 prodotta nel tessuto muscoloscheletrico provenga da cellule dell'osso e che la produzione della stessa sia dovuta all'azione di fattori solubili dell'infiammazione

nonché al riconoscimento diretto del patogeno da parte di recettori TLR.

**Infezione dell'osso e clearance di SA.** Per valutare il ruolo di PTX3 nella patogenesi dell'osteomielite da SA-OM, abbiamo utilizzato topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> in aggiunta a quelli WT. L'analisi istologica ha mostrato segni di infezione ed alterazioni strutturali in entrambi i gruppi sperimentali, tuttavia i topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> avevano una carica microbica significativamente inferiore sia nell'osso che nel fegato. In seguito all'infezione con una bassa dose di SA (10<sup>4</sup> CFU/topo), gli stessi topi presentavano meno CFU nell'osso rispetto ai corrispettivi WT, suggerendo un effetto dose-indipendente del deficit genetico di PTX3. In un modello di ripristino di funzione, i topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> trattati con una forma ricombinante della proteina PTX3 avevano una carica batterica maggiore rispetto ai controlli trattati con PBS. Inoltre, l'inibizione di PTX3 endogena in topi WT mediante un anticorpo monoclonale riduceva la carica batterica nell'arto infetto. Questi risultati indicano che PTX3 svolge un ruolo specifico e non ridondante nell'infezione dell'osso e suggeriscono la possibilità di sviluppare terapie basate sull'inibizione farmacologica della proteina endogena. Infine, il modello è stato replicato in topi di sesso femminile, indicando che l'effetto di PTX3 sull'infezione da SA non dipende dal sesso.

**Risposta infiammatoria sistemica.** L'OM, specie nella sua forma acuta, è associata a reazioni infiammatorie sistemiche (febbre, affaticamento) in aggiunta a

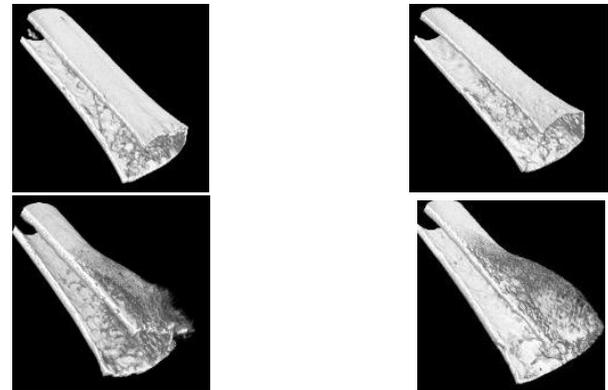


**Figura 2.** PTX3 svolge un ruolo specifico e non ridondante nell'osteomielite da SA. (a) Sezioni di femori infetti da topi WT e *Ptx3*<sup>-/-</sup> da cui si evince la presenza di aggregati batterici nel midollo osseo, ascessi e reazioni periostali anomale nel solo arto iniettato.

quelle locali (dolore, gonfiore). Nel nostro modello, l'infezione da SA ha causato perdita di peso nei topi WT fino a 9 dpi, seguita da un rapido recupero, mentre i topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> hanno guadagnato peso nel corso dell'infezione in misura paragonabile ai controlli trattati con PBS. I livelli sierici di interleuchina-6 (IL-6), una citochina prototipica della fase acuta

dell'infiammazione, sono aumentati nei topi WT; tuttavia, sono sempre stati inferiori a quelli osservati nei topi *Ptx3*<sup>-/-</sup>. L'analisi citofluorimetrica delle popolazioni cellulari della milza ha mostrato che i topi WT infetti avevano segni di infiammazione più pronunciati rispetto ai topi *Ptx3*<sup>-/-</sup>, con un peso della milza superiore. Inoltre, l'infezione da SA in topi WT ha causato un'espansione delle cellule mieloidi ed una contrazione di quelle linfoidi, mentre nei topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> si è osservata una risposta infiammatoria cellulare alterata, con meno neutrofili e monociti e più linfociti T. Questi risultati indicano che l'infezione da SA provoca una risposta infiammatoria sistemica più forte nei topi WT rispetto ai *Ptx3*<sup>-/-</sup>.

**Rimodellamento dell'osso.** L'osteomielite batterica è caratterizzata da alterazioni strutturali della matrice ossea dovute a squilibri funzionali delle cellule

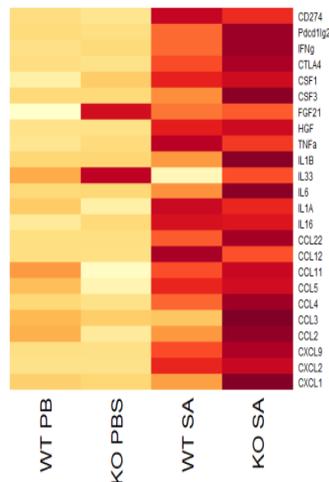


**Figura 3.** Analisi del rimodellamento osseo in topi WT e *Ptx3*<sup>-/-</sup> infettati con SA (o trattati con PBS) a 14 dpi. (a) Immagini rappresentative dei volumi ossei acquisiti mediante micro-CT.

dell'osso. Abbiamo quindi effettuato analisi micro-CT su femori di topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> e WT a 14 dpi. Queste hanno evidenziato una perdita importante di osso trabecolare con deposizione di osso reattivo in regione periostale in topi infetti di entrambi i genotipi. L'entità del danno al tessuto osseo era tale da impedirne valutazioni morfometriche mediante metodiche convenzionali. Abbiamo, quindi, definito una scala di punteggi basata su criteri qualitativi e semi-quantitativi che hanno evidenziato un aumento significativo sia di formazione di osso reattivo che di riassorbimento di osso trabecolare nei topi infetti, senza, tuttavia, differenze apprezzabili tra i due genotipi. Abbiamo, inoltre, analizzato le immagini micro-CT mediante una metodica basata sulla segmentazione della densità della componente minerale. Questa metodica ha consentito di apprezzare un aumento dei volumi a densità media ed una diminuzione di quelli a densità elevata in topi *Ptx3*<sup>-/-</sup> infetti. In linea con questa evidenza, nel femore di questi animali è stata osservata una ridotta

espressione di Osterix, fattore chiave del differenziamento osteogenico. Inoltre, analisi morfometriche dell'arto controlaterale hanno evidenziato una riduzione del volume osseo in topi *Ptx3<sup>-/-</sup>* infetti, probabilmente dovuto ad un minor spessore trabecolare. Questi risultati suggeriscono che l'infezione abbia effetti dominanti (rispetto al genotipo) sul rimodellamento dell'osso inoculato con SA. Tuttavia, la reazione infiammatoria sistemica che ne consegue si associa ad una perdita di tessuto osseo più marcata in assenza di PTX3.

**Risposta immunitaria nell'osso.** Le cellule dell'osso collaborano con quelle dell'immunità nella risposta ai patogeni<sup>10</sup>. Per studiare questa interazione, abbiamo



**Figura 4.** Analisi proteomiche dell'omogenato di osso da topi WT e *Ptx3<sup>-/-</sup>* infettati con SA a 14 dpi. Pannelli proteomici *targeted* sono stati impiegati per misurare i livelli di marcatori infiammatori nell'omogenato osseo.

analizzato le proteine espresse nel tessuto osseo di topi infetti di entrambi i genotipi utilizzando tecniche di proteomica *untargeted*. Queste analisi hanno consentito di identificare 1903 proteine univoche ed evidenziare differenze specifiche tra i due genotipi in condizioni di infezione. 30 di queste proteine presentavano livelli diversi nei topi WT e *Ptx3<sup>-/-</sup>*. In particolare, in questi ultimi abbiamo osservato un aumento della concentrazione di fattori legati alla risposta immunitaria innata e adattativa (immunoglobuline, lisozima 2, aptoglobina, componente C3 del complemento) ed una diminuzione di quella di molecole coinvolte in aspetti del metabolismo cellulare (sintesi di amminoacidi, metabolismo dello zolfo e dell'eme, scambio protonico). Analisi di arricchimento hanno permesso di identificare vie di segnale e processi sottesi a queste molecole, evidenziando il coinvolgimento di vie della risposta immunitaria (cascata del complemento, risposta infiammatoria acuta) e

processi legati al trasporto di ossigeno e della CO<sub>2</sub> (associati a risposte infiammatorie). Il quadro emerso dalle analisi *untargeted* è supportato da approcci di proteomica *targeted* che hanno rilevato livelli più elevati di citochine infiammatorie e mediatori antimicrobici nei topi *Ptx3<sup>-/-</sup>* rispetto a quelli WT.

Il nostro studio conferma il ruolo cruciale della proteina PTX3 nella fisiopatologia dell'osso. In particolare, abbiamo dimostrato il coinvolgimento di questa pentrassina nella patogenesi dell'osteomielite da SA. Le evidenze raccolte suggeriscono che PTX3 regoli e limiti la risposta infiammatoria e antimicrobica nel microambiente osseo durante l'infezione da SA, in particolare nella sua fase acuta. In questo modo, PTX3 favorisce indirettamente la colonizzazione microbica dell'osso. Queste osservazioni rafforzano il potenziale diagnostico di PTX3 nelle infezioni muscoloscheletriche e ne suggeriscono un possibile ruolo quale bersaglio terapeutico nelle osteomieliti batteriche.

## SOTTO-PROGETTO 2. Determinanti genetici della suscettibilità all'infezione della protesi osteoarticolare

### Stato dell'arte e razionale

Le infezioni delle protesi osteoarticolari (PJI) rappresentano una delle complicanze più gravi della chirurgia protesica, con un impatto significativo su morbilità, costi sanitari e mortalità. Esse sono principalmente causate da SA e *Staphylococcus epidermidis* e spesso richiedono trattamenti antimicrobici aggressivi ed interventi di revisione chirurgica dovuti alla limitata penetrazione dei farmaci sistemici nel tessuto osseo ed all'insorgere di fenomeni di farmacoresistenza. Il numero di casi di PJI è destinato ad aumentare a causa dell'incremento degli interventi di artroprotesi d'anca (THA) e ginocchio (TKA) e dell'invecchiamento della popolazione.

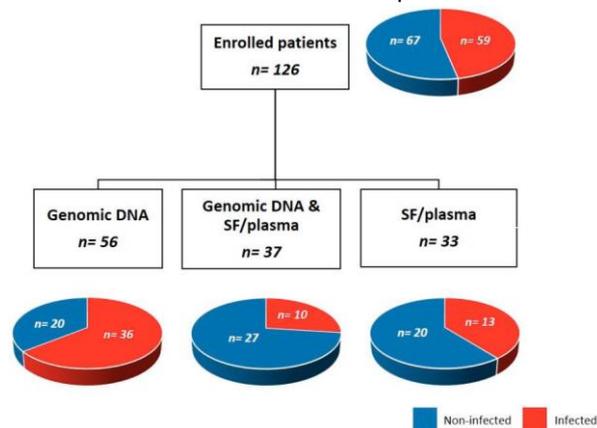
Nel 2018, la European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) ha formulato una definizione di PJI basata su parametri clinici, di laboratorio (es. ESR, CRP, IL-6), imaging (RX, RM, PET) e microbiologici<sup>5</sup>. Tuttavia, il processo diagnostico rimane complesso e talvolta inconcludente. Recenti studi hanno identificato biomarcatori utili nella diagnosi preoperatoria, come  $\alpha$ -defensina, NGAL e, più recentemente, PTX3. In particolare, quest'ultima è emersa quale marcatore specifico di PJI in soggetti con THA e TKA. Tre polimorfismi nel gene *PTX3* (rs2305619, rs3816527, rs1840680) sono stati associati alla concentrazione della proteina in diverse

matrici biologiche ed alla suscettibilità ad infezioni opportunistiche da funghi e batteri. È noto, inoltre, che le citochine infiammatorie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-17A sono in grado di modulare l'espressione di PTX3 e che polimorfismi nei relativi geni sono associati al rischio di infezione dell'osso. È dunque lecito ipotizzare che la variabilità genetica sottesa a queste proteine ne influenzi la concentrazione (quindi, la funzione) nel tessuto muscoloscheletrico e sia associata alla suscettibilità alle PJI.

### Risultati e conclusioni

Nel corso del 2024 abbiamo completato uno studio retrospettivo caso-controllo su una coorte storica di pazienti sottoposti a revisione di THA e TKA presso il Dipartimento di Ortopedia e Chirurgia Traumatologica dell'IRCCS Humanitas Research Hospital. Obiettivo primario dello studio era valutare la relazione tra il rischio di PJI e genotipi/aplotipi di polimorfismi nei geni *PTX3*, *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *IL-17A* e *IL-10*, selezionati sulla base di conoscenze pregresse. Quale obiettivo secondario, abbiamo esaminato la relazione tra queste varianti genetiche e la concentrazione delle proteine corrispondenti nel fluido sinoviale e nel plasma, con particolare attenzione a PTX3, recentemente proposta quale un nuovo marcatore di PJI.

*Popolazione dello studio.* La nostra ricerca si è focalizzata su una sotto-coorte di 126 pazienti arruolati in uno studio precedente che



**Figura 5.** Suddivisione della popolazione dello studio sulla base del materiale biologico analizzato (SF, liquido sinoviale).

soddisfacevano i criteri di inclusione/esclusione per la diagnosi di PJI stabiliti dall'EBJIS. Questa sotto-coorte storica è stata retrospettivamente suddivisa in due gruppi: infetti (casi) e non infetti (controlli). Dei 126 partecipanti, 93 hanno donato un campione di saliva da cui estrarre il DNA per le analisi genetiche. Sono stati inoltre utilizzati campioni di fluido sinoviale

e plasma disponibili dallo studio precedente allo scopo di quantificare le proteine IL-1 $\beta$ , IL-6, CRP e IL-10. Le caratteristiche demografiche e cliniche (sesso, indice di massa corporea, età, indice di comorbidità di Charlson) erano simili tra casi e controlli.

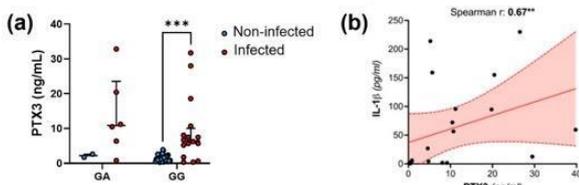
*Microbiologia e marcatori di infiammazione.* Tra i microorganismi isolati nello studio, i batteri del genere *Staphylococcus* sono risultati i più frequenti, con una prevalenza nel sottogruppo di pazienti sottoposti a THA. Dodici pazienti sono stati riscontrati positivi per *S. epidermidis*, cinque per *S. aureus* e sei per altre specie di *Staphylococcus*, tra cui *S. lugdunensis*, *S. caprae* e *S. capitis*. La concentrazione di PTX3 nel fluido sinoviale e nel plasma, di CRP e D-Dimero nel plasma ed i valori della velocità di eritrosedimentazione (ESR) sono stati ottenuti dallo studio precedente. I livelli di PTX3 sinoviale, CRP plasmatico e ESR sono risultati più elevati nei pazienti infetti rispetto ai controlli, mentre PTX3 plasmatico e D-Dimero non mostravano differenze tra i due gruppi. La concentrazione di IL-1 $\beta$ , IL-10 ed IL-6 nel fluido sinoviale è stata invece misurata *ex novo* in 70 pazienti e ne abbiamo osservato valori significativamente maggiori nei soggetti con diagnosi di PJI.

*Variabilità genetica e rischio di PJI.* Il DNA genomico è stato estratto dai campioni di saliva dei pazienti ed analizzato mediante PCR e saggi di genotipizzazione con sonde Taqman. Tra i 14 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) esaminati nel gene *PTX3*, 10 sono risultati monomorfici e uno (rs35948036) raro, in accordo con i dati del database gnomAD. Tre SNPs (rs2305619, rs3816527, rs1840680) erano presenti in entrambe le forme alleliche, coerentemente con le frequenze riportate per la popolazione europea. Di questi rs3816527 è una variante codificante che determina una sostituzione amminoacidica (p.Ala48Asp), mentre gli altri due sono intronici e sono stati precedentemente associati alla suscettibilità ad infezioni opportunistiche. Nella coorte studiata, non sono emerse associazioni tra questi SNPs ed il rischio di PJI. Tuttavia, rs3024491 in IL-10 è risultato più frequente nei controlli rispetto ai casi (51.09% vs. 32.95%,  $p = 0.01$ ), suggerendo un effetto protettivo (OR = 0.47), mentre rs2853550 in IL-1 $\beta$  è stato più rappresentato nei casi (15.56% vs. 4.35%,  $p = 0.01$ ), indicando un aumento del rischio (OR = 4.05). L'analisi aplo-tipica (che valuta combinazioni di varianti genetiche sullo stesso cromosoma) ha, inoltre, evidenziato un'associazione significativa tra l'aplotipo AGG in IL-1 $\beta$  e PJI ( $p = 0.017$ ), mentre aplotipi in IL-10 non hanno mostrato correlazioni con la patologia.

*Variabilità genetica e concentrazione dei marcatori di infiammazione.* Nel nostro precedente studio abbiamo dimostrato che i livelli sinoviali di PTX3 aumentano in maniera specifica in soggetti con PJI. Simili correlazioni sono emerse nella presente ricerca tra la concentrazione di IL-10, IL-1 $\beta$  ed IL-6 nel liquido sinoviale e la presenza di infezione della protesi. È noto che alcune varianti nei geni *PTX3*, *IL-10*, *IL-1 $\beta$*  e *IL-6* ne modulano l'espressione; pertanto, abbiamo studiato la relazione tra i polimorfismi selezionati e la concentrazione delle proteine nel liquido sinoviale e nel plasma. A tal riguardo, l'analisi genotipica ha mostrato che il polimorfismo rs1143634 in *IL-1 $\beta$*  è correlato ai livelli di IL-1 $\beta$  nel liquido sinoviale. Inoltre, rs2853550 in *IL-1 $\beta$*  è risultato associato alla concentrazione sinoviale di PTX3, suggerendone un effetto indiretto sull'espressione della pentrassina. A questo proposito, è interessante notare come i livelli di PTX3 fossero più elevati nei pazienti con PJI omozigoti per la variante G di rs2853550, e correlassero positivamente con i livelli di IL-1 $\beta$  nei pazienti infetti. Questi risultati indicano un'interazione tra la produzione locale di IL-1 $\beta$ , l'induzione di PTX3 e la variabilità nei corrispettivi geni, con potenziali implicazioni diagnostiche nella gestione clinica delle PJI.

### Presentazioni a congressi

1. European Calcified Tissue Society (ECTS) 2024 Congress – 25/28 May 2024, Marseille (FR) - Invited talk
2. 19<sup>th</sup> International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems - 27 May/1 June 2024, Loutraki (GR) - Oral presentation
3. 7<sup>th</sup> European Congress of Immunology (ECI) – 1/4 September 2024, Dublin (IR) - Poster presentation
4. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) – 26/28 September 2024, Barcelona (ES) - Oral presentation



**Figura 6.** Associazioni genetiche e biochimiche tra PTX3 e IL-1 $\beta$ . **(a)** Distribuzione della concentrazione sinoviale di PTX3 nei pazienti infetti e non infetti portatori dei genotipi GA o GG del polimorfismo rs2853550 in IL-1 $\beta$ . **(b)** Correlazione di Spearman tra i livelli sinoviali di IL-1 $\beta$  e PTX3. L'area rossa delimitata dalle linee tratteggiate indica l'intervallo di confidenza (IC) al 95%, mentre la linea continua rappresenta la curva di regressione lineare. \*\*  $p < 0,01$ .

In questo studio abbiamo identificato un pannello di marcatori genetici associati all'infezione della protesi (PJI) in una coorte di pazienti con THA e TKA. La validazione delle associazioni qui descritte in una coorte più ampia e la conferma del valore prognostico di tale "firma" genetica in uno studio prospettico potrebbero aprire la strada a trattamenti preventivi mirati, contribuendo così a ridurre l'impatto sanitario ed economico di queste infezioni.

