



Rendiconto 5 per mille ANNO 2021
Contributo percepito € **352.154,72** In data **20.07.2022**

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente:
FONDAZIONE IRCCS CA’ GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Codice fiscale: **04724150968**
Sede legale: **Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO**
Indirizzo di posta elettronica dell’ente: protocollo@policlinico.mi.it
Dati del rappresentante legale: **Dott. Ezio Belleri ***

Titolo del progetto:

STUDIO FUNZIONALE DEL MICROBIOTA INTESTINALE NELLA PATOGENESI DELLE MALATTIE GASTROINTESTINALI ED EPATICHE CRONICHE

FUNCTIONAL STUDY OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC GASTROINTESTINAL AND HEPATIC DISEASES

Data di inizio progetto: 01.01.2024	Data di fine progetto: 31.12.2025
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 352.154,72	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 400.000,00

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca	€ 190.000,00	€ 190.000,00
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	€ 0,00	€ 0,00
Materiale d’uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	€ 200.000,00	€ 152.154,72
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	€ 0,00	€ 0,00

Elaborazione dati	€	0,00	€	0,00
Spese amministrative	€	0,00	€	0,00
Altro (spese di pubblicazione)	€	10.000,00	€	10.000,00
TOTALE	€	400.000,00	€	352.154,72

Il Responsabile del Progetto
Prof. Flavio Caprioli



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale *
Dott. Ezio Belleri

Il Direttore Generale*
Dott. Ezio Belleri

* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019)

Titolo	<p>STUDIO FUNZIONALE DEL MICROBIOTA INTESTINALE NELLA PATOGENESI DELLE MALATTIE GASTROINTESTINALI ED EPATICHE CRONICHE</p> <p>FUNCTIONAL STUDY OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC GASTROINTESTINAL AND HEPATIC DISEASES</p>
Background del progetto ed obiettivi principali della ricerca	<p>La gran parte delle malattie gastroenterologiche croniche a maggiore impatto sulla vita dei pazienti riconoscono una crescente importanza della composizione e della funzione del microbiota intestinale nell'esordio, nel decorso della malattia e nella risposta alle terapie. Queste malattie, tra cui le malattie infiammatorie intestinali (IBD), l'epatocarcinoma (HCC), la steatosi epatica associata a disfunzione metabolica (MASLD), hanno una patogenesi multifattoriale, e l'interazione tra l'individuo e la flora microbica intestinale sembra svolgere un ruolo chiave attraverso diversi meccanismi patogenetici basati su infiammazione, coagulazione, disfunzione endoteliale. Ad esempio, nelle IBD è stato dimostrato un ruolo diretto del microbiota disbiotico nel promuovere l'attivazione patogena delle cellule immunitarie della mucosa. Nella MASLD la connessione funzionale tra l'intestino e il fegato attraverso i metaboliti di derivazione microbica (definiti come asse intestino-fegato), se interrotta, può contribuire alla steatosi ed infiammazione del fegato con il rischio di sviluppo di fibrosi epatica avanzata/cirrosi. Allo stesso modo, l'evidenza suggerisce che il microbiota intestinale può promuovere lo sviluppo dell'HCC attraverso vari meccanismi e può influenzare l'efficacia della terapia medica modulando la risposta dell'ospite ai farmaci, come la facilitazione dell'efficacia del farmaco, la mediazione della tossicità e l'annullamento degli effetti antitumorali, in particolare sembra influire sull'efficacia dell'immunoterapia. Una categoria di soggetti particolarmente vulnerabili sono i pazienti sottoposti a trapianto di fegato, in cui spesso è presente un'alterazione del microbiota intestinale a cui si associa inoltre un'aumentata permeabilità intestinale che favorisce il passaggio di microorganismi nel torrente circolatorio: in questo contesto, le terapie immunosoppressive necessarie per evitare il rigetto del fegato trapiantato aumentano il rischio di setticemia e infezioni nei mesi successivi l'intervento. Inoltre molti pazienti sottoposti a trapianto sviluppano negli anni alterazioni cardiometaboliche che trovano nella infiammazione e nella conseguente disfunzione endoteliale una base patogenetica comune che predispone allo sviluppo di MASLD che si associa tanto al rischio di malattia cardiovascolare su base atero-trombotica quanto a una cirrosi epatica con necessità di trapianto d'organo.</p> <p>Pertanto, lo studio del microbiota, della sua interazione con l'ospite e dei meccanismi patogenetici capaci di modulare gli attori patogenetici sopra descritti, costituisce un prerequisito per la progettazione di nuovi approcci terapeutici integrati. In questo contesto, l'analisi approfondita della composizione e della funzione della flora batterica enterica e della loro reciproca interazione col fegato ha implicazioni fondamentali nell'identificazione di pattern specifici e impronte funzionali che possano aiutare a fornire migliori opzioni terapeutiche. La manipolazione del microbiota intestinale potrebbe essere una strategia efficace per trattare, prevenire o migliorare la risposta terapeutica in diversi disturbi gastrointestinali.</p> <p>Le malattie infiammatorie intestinali (MICI/ IBD, morbo di Crohn e colite ulcerosa), sono disturbi infiammatori cronici e recidivanti del tratto digestivo derivanti da</p>

una perdita di omeostasi tra il sistema immunitario intestinale e il microbiota intestinale in individui geneticamente predisposti. Risposte immunitarie inappropriate della mucosa, dovute alla disregolazione della tolleranza al microbiota intestinale o della barriera epiteliale che separa i microrganismi dai tessuti sottostanti, possono contribuire allo sviluppo o al perpetuarsi delle IBD. Prove crescenti suggeriscono che lo squilibrio nella composizione del microbioma intestinale, o “disbiosi”, è uno dei fattori ambientali con il maggiore impatto che può promuovere lo sviluppo di IBD, poiché le interazioni del microbiota alterato con l’ospite possono innescare e promuovere alterazioni immunitarie che sono associate alle IBD. Numerose prove dimostrano che i pazienti con IBD condividono specifiche alterazioni del microbioma intestinale correlate alla compromissione di molte funzioni, tra cui il metabolismo degli acidi grassi a catena corta, la biosintesi degli aminoacidi, la regolazione dello stress ossidativo e la produzione di tossine. che possono contribuire, separatamente o insieme, allo sviluppo delle IBD. Molte opzioni terapeutiche, comprese quelle mirate a modulare il microbiota intestinale, sono state sviluppate per i pazienti con IBD, frutto di una ricerca traslazionale di successo. Che il ruolo del microbiota e delle sue alterazioni sia importante nella malattia celiaca, determinandone probabilmente la variabilità delle presentazioni cliniche ma anche la possibile comparsa della refrattarietà alla dieta priva di glutine è molto verosimile. E che modificazioni del microbiota siano alla base di almeno parte delle manifestazioni cliniche delle sindromi gastrointestinali funzionali e del quadro clinico così come delle maggiori complicanze della malattia diverticolare è suggerito sia da evidenze cliniche che da osservazioni sperimentali. La steatosi epatica associata a disfunzione metabolica (MASLD), rappresenta la principale causa di malattia epatica cronica, con una prevalenza globale del 25-35% nella popolazione generale. La MAFLD è altamente prevalente tra i pazienti con diabete di tipo 2 (T2D), che rappresenta anche un fattore di rischio per la progressione a cirrosi e scompenso in questi pazienti. Diversi studi hanno confermato il ruolo del microbioma intestinale nello sviluppo e nella progressione della forma infiammatoria progressiva della MASLD (MASH: steatoepatite metabolica), sia in modelli animali che umani. Il termine “asse intestino-fegato” si riferisce alla comunicazione tra intestino e fegato, il cui equilibrio è finemente modulato da metaboliti (incluso etanolo), acidi biliari e molecole pro/antinfiammatorie. La rottura specifica dell’asse intestino-fegato può quindi portare alla traslocazione dei prodotti batterici attraverso una barriera intestinale più permeabile, con l’effetto di evocare una risposta infiammatoria all’interno del fegato che altera il fenotipo funzionale di cellule endoteliali, stellate ed epatociti con il risultato ultimo di un danno di organo di tipo cronico. Diverse strategie mirate al microbioma intestinale sono state studiate come potenziali opzioni di trattamento per la MASH e/o la fibrosi nei pazienti con MASLD. La sarcopenia – ovvero la diminuzione della massa muscolare - è un noto fattore prognostico negativo per eventi sia epatici che extra-epatici nei pazienti con cirrosi di tutte le eziologie e nei pazienti con malattie metaboliche; il microbioma intestinale è stato associato allo sviluppo di sarcopenia, possibilmente attraverso un “asse intestino-muscolo”. I batteri intestinali possono modulare la massa muscolare come una combinazione dei loro effetti sull’assorbimento dei nutrienti e sul metabolismo energetico, sulla sensibilità all’insulina e sull’infiammazione sistemica di basso grado. Le alterazioni degli aminoacidi a catena ramificata sembrano particolarmente rilevanti per i cambiamenti nella massa muscolare. Allo stesso tempo studi in vitro ed ex vivo hanno mostrato che prodotti di derivazione

batterica possono causare la perdita di un microambiente epatico antitrombotico, antinfiammatorio e antifibrotico che è, di per sé, il presupposto patogenetico per lo sviluppo della malattia cirrotica e delle complicanze ad essa associate. Studi sull'uomo hanno infatti dimostrato che la alterazione del microbiota intestinale può essere target di terapia anche nella malattia avanzata di fegato con potenziale effetto modulante sulle complicanze più avanzate legate all'aumento della fibrosi e della pressione portale.

Le alterazioni del microbioma intestinale umano sono state associate a un ciclo di danno e rigenerazione degli epatociti caratteristico della malattia epatica cronica. Le prove suggeriscono che il microbiota intestinale può promuovere lo sviluppo di HCC attraverso la persistenza di questa infiammazione inducendo cambiamenti genetici ed epigenetici che portano al cancro. Poiché il microbioma intestinale è noto per il suo effetto sul metabolismo dell'ospite e sulla risposta immunitaria, è stato dimostrato che può avere un ruolo nella risposta a strategie terapeutiche come l'immunoterapia e la terapia sistemica per l'HCC. In particolare, il microbiota intestinale può influenzare l'efficacia dell'immunoterapia regolando le risposte agli inibitori del checkpoint immunitario nei pazienti con HCC: Zheng et al. hanno riportato la risposta all'immunoterapia con anticorpi anti-PD-1 in pazienti con HCC refrattario a sorafenib. I responsivi includevano i pazienti con risposta completa, risposta parziale o malattia stabile. Campioni fecali sono stati raccolti ad intervalli. In questo studio, i non-responder avevano un aumento dei proteobatteri a partire dalla terza settimana, che diventavano dominanti entro la dodicesima settimana. Tuttavia, i rispondenti avevano arricchito *Akkermansia muciniphila* e *Ruminococcaceae spp.*. Questi risultati suggeriscono che il microbioma intestinale potrebbe influenzare l'esito dell'immunoterapia anti-PD-1 nei pazienti con HCC. Uno studio coordinato da Pinato ha suggerito che la pregressa antibiotico terapia modificava la risposta all'immunoterapia, condizionando una OS peggiore in pazienti non selezionati trattati con immunoterapia. Questo studio evidenzia ulteriormente come siano urgentemente necessari studi meccanicistici per indagare le alterazioni del microbiota intestinale mediate da antibiotico come determinanti di un esito peggiore durante immunoterapia nel paziente con HCC. Questa condizione è favorita dalla sottostante cirrosi – frequentemente associata a HCC - in quanto la cirrosi è associata sia ad una disbiosi estrema che ad una aumentata permeabilità intestinale, che possono sia favorire la setticemia in determinate condizioni, come il trapianto di fegato, che contribuire alla resistenza ai farmaci. È quindi ragionevole ipotizzare che la modulazione del microbioma intestinale possa avere un impatto sul trattamento dell'HCC e nella gestione del paziente dopo trapianto di fegato. Per quanto concerne la gestione del HCC, presso il National Cancer Institute è stato recentemente avviato uno studio clinico che combina il trattamento con vancomicina con il blocco dei checkpoint immunitari (NCT03785210).

Tra i vari approcci con finalità di modificare funzionalmente il microbiota, il trapianto di microbiota fecale, FMT (trapianto di microbiota fecale) è una nuova tecnica che trapianta la flora microbica da feci umane sane nel tratto gastrointestinale dei pazienti per ricostituire una nuova flora microbica intestinale. L'FMT è un trattamento efficace contro l'infezione ricorrente da *Clostridium difficile*. Inoltre, si è rivelata una terapia promettente per la gestione di numerosi disturbi non trasmissibili, tra cui le malattie infiammatorie intestinali e i disturbi metabolici e quindi potrebbe essere una valida opzione per modificare il microbiota disbiotico dei pazienti affetti da IBD, HCC, MASLD/T2D e nel contesto

	<p>del paziente in lista trapianto, ipotizzando che il rischio di sepsi peri/post-trapianto possa essere prevenuto, in particolare nei pazienti cirrotici colonizzati da microorganismi multiresistenti, eseguendo un trapianto di microbiota intestinale prima dell'operazione.</p>
<p>Materiali (descrizione dettagliata dei reagenti e delle apparecchiature necessarie per l'esecuzione del progetto)</p>	<p>Le apparecchiature e le strumentazioni necessarie per l'esecuzione dei vari studi inclusi nel progetto sono tutte già disponibili presso l'IRCCS oppure in outsourcing presso i service dell'Università degli Studi di Milano. L'acquisizione di materiale riguarderà quindi i kit e i reagenti necessari per l'esecuzione degli esperimenti, descritti parzialmente qui di seguito. Per lo studio della composizione della microflora intestinale il DNA microbico verrà sequenziato attraverso metodiche next generation sequencing (NGS: shallow metagenomics) presso il Laboratorio di Scienze Omiche della Fondazione. Questo permetterà di definire la composizione e inferire la funzione dei microrganismi presenti a livello mucosale e fecale di soggetti affetti da IBD, di pazienti HCC, pazienti cirrotici pre e post-trapianto di fegato, MASLD e T2D e potenzialmente in futuro di soggetti affetti da disturbi gastrointestinali funzionali. Analisi di metabolomica targeted verranno effettuate per confermare specifiche attività metaboliche svolte dai microrganismi, anche precedentemente e a seguito di trattamenti modulatori con finalità predittive e terapeutiche. Queste analisi saranno effettuate longitudinalmente su tutta la casistica inserita nel progetto, sui potenziali donatori di microbiota e sui riceventi di microbiota attraverso FMT.</p> <p>Il DNA batterico verrà estratto dai campioni fecali utilizzando il kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Germania). Il sequenziamento del microbiota fecale umano sarà effettuato mediante sequenziamento dell'intero genoma (WGS). La preparazione delle librerie di sequenziamento verrà effettuata utilizzando il kit di preparazione delle librerie di DNA Nextera XT. Tutte le librerie verranno sequenziate con una corsa Paired-End Illumina NextSeq 2x150bp per ottenere almeno 64 milioni di letture per ciascun campione. Il profilo dei metaboliti fecali verrà valutato attraverso spettrometria di massa (MS/MS), gas cromatografia (GC-MS) o spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMRa seconda del tipo di metaboliti che si intendono caratterizzare ed identificare (proteine, lipidi, metaboliti volatili). La cromatografia liquida - spettrometria di massa (LC-MS) verrà eseguita sulle feci per caratterizzare/quantificare i metaboliti dei sali biliari.</p> <p>Analisi Proteomiche dei campioni di feci verranno effettuati per misurare i livelli di proteine attive nelle feci. Questi includeranno ad esempio proteasi, coinvolte nell'integrità della funzione di barriera, e fosfatasi, coinvolte nella modulazione dei livelli di endotossine. Verranno valutate anche altre attività specifiche del proteoma funzionale, ad esempio le idrolasi dei sali biliari.</p> <p>La sarcopenia e il tessuto adiposo intramuscolare e intermuscolare saranno valutati sulla base di scansioni MRI/CT addominali precedentemente eseguite secondo lo standard di cura o nell'ambito di studi precedenti per queste coorti. I pazienti rappresentativi con o senza sarcopenia, ed i pazienti con MASLD in cui RMN/TC non sono disponibili, saranno invitati per l'analisi dell'impedenza bioelettrica (massa muscolare), forza della presa (forza muscolare), test della velocità dell'andatura a 4 m (prestazioni fisiche).</p> <p><i>L'analisi del sistema immunitario verrà effettuato attraverso analisi immunofenotipica con metodiche di citofluorimetria a flusso su campioni isolati a fresco o in situ su campioni retrospettivi (spatial immunophenotyping e spatial transcriptomic). L'interazione funzionale tra il sistema immunitario e il microbiota sarà valutata attraverso esperimenti in vitro/ex vivo dopo isolamento ed espansione delle cellule immunitarie.</i></p> <p>Le analisi sulla bilancia emostatica e le interazioni con il microambiente infiammatorio sostenuto dalla traslocazione batterica saranno effettuate su plasma con test globali di emostasi primaria, secondaria e fibrinolisi. Tali dati potranno essere incrociati con analisi su attivazione dell'infiammazione comunemente utilizzate nella routine clinica nonché test di laboratorio finalizzati a misurare citochine specifiche dell'infiammazione e di</p>

	attivazione del sistema del complemento. Le analisi bioinformatiche verranno condotte presso il Laboratorio di Scienze Omiche della Fondazione.																												
Risultati e prodotti conseguiti	Le attività di ricerca delle SC proponenti hanno portato alla pubblicazione di numerosi paper scientifici, come testimoniato dalla cospicua produzione riportata all'IRCCS. In particolare, nell'ambito delle IBD sono stati pubblicati studi su meccanismi fisiopatologici associati all'interazione tra il microbiota e il sistema immunitario in pazienti affetti da IBD, sul ruolo della dieta nella modulazione del microbiota intestinale e dell'infiammazione intestinale in pazienti, sull'interazione tra sistema immunitario mucosale e microbiota nella risposta a terapie farmacologiche tradizionali e innovative e a terapie modulatorie della flora intestinale. Esperienze analoghe sono state raccolte anche negli altri campi della gastroenterologia più correlabili allo status microbiotico.																												
Attività previste (metodi – trasferibilità)	<p>In questo studio verranno effettuate delle attività trasversali che interesseranno tutte le SC partecipanti, e attività associate in maniera più specifiche alle singole patologie.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La prima attività è la generazione del gruppo di studio del microbiota. Questa si concretizzerà nell'arruolamento di un biologo responsabile della raccolta, stoccaggio, data recording, estrazione e sequenziamento del microbiota fecale. La seconda persona che verrà reclutata per il gruppo di studio sarà un bioinformatico esperto di analisi avanzate di microbiota che svolgerà le funzioni di analisi dei dati generati sia di sequenziamento del microbiota che di integrazione di questi dati con quelli generati nelle specifiche analisi di proteomica e metabolomica. Le attività di raccolta campioni, preparazione delle libraries e analisi bioinformatica sarà effettuata nei laboratori di Scienze Omiche della Fondazione. 2. La seconda attività trasversale sarà il reclutamento longitudinale di coorti di pazienti affetti da IBD, malattia celiaca, malattia diverticolare soprattutto se sintomatica non complicata, disturbi funzionali, MASLD/T2D, HCC e pazienti sottoposti a trapianto di fegato per HCC o cirrosi scompensata. Verrà raccolto materiale fecale in diversi tempi (pre-post trattamenti) e possibilmente sangue. Su questi pazienti verrà effettuata l'analisi di microbiota con WGS <table border="1" data-bbox="406 1406 1410 1899"> <thead> <tr> <th>Patologia</th> <th>Pazienti (n)</th> <th>Campionamenti (n)</th> <th>Totale (n)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>UC</td> <td>50</td> <td>2</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>HCC (+ICI)</td> <td>50</td> <td>4</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>MASLD senza T2D</td> <td>50</td> <td>2</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>T2D</td> <td>50</td> <td>2</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>LT</td> <td>50</td> <td>2</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Controlli sani</td> <td>50</td> <td>2</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Patologia	Pazienti (n)	Campionamenti (n)	Totale (n)	UC	50	2	100	HCC (+ICI)	50	4	200	MASLD senza T2D	50	2	100	T2D	50	2	100	LT	50	2	100	Controlli sani	50	2	100
Patologia	Pazienti (n)	Campionamenti (n)	Totale (n)																										
UC	50	2	100																										
HCC (+ICI)	50	4	200																										
MASLD senza T2D	50	2	100																										
T2D	50	2	100																										
LT	50	2	100																										
Controlli sani	50	2	100																										

3. La terza attività trasversale sarà l'allestimento di uno o due sham controlled FMT RCTs, identificando una o due patologie più promettenti, anche sulla base delle analisi di microbiota effettuate nell'attività 2, a effettuare un trapianto di microbiota. Questa attività sarà supportata dall'arruolamento ad hoc di una data manager che si occuperà della parte regolatoria e registrativa del trial e della gestione del trial stesso. All'interno delle attività cliniche previste per il trial (arruolamento, monitoraggio clinico specifico per patologia pre-post trattamento) si svolgeranno attività di monitoraggio microbiologiche tra cui il sequenziamento del microbiota del ricevente pre-post FMT, le analisi di metabolomica e dei biomarcatori patologia-specifici che potrebbero essere modulati secondariamente alla modulazione del microbiota.

4. La quarta attività sarà specifica per ciascuna patologia e prevederà l'implementazione di specifiche tecnologie necessarie per i) monitorare l'interazione microbiota-ospite ii) monitorare la modulazione di biomarcatori patologia-specifici e correlarli alla risposta clinica dopo trattamento iii) valutare lo stato infiammatorio iv) identificare nuovi potenziali biomarcatori dopo analisi di WGS

Esempi:

IBD: analisi del sistema immunitario sistemico e mucosale

MASLD/T2D: analisi sarcopenia, analisi metaboliti, analisi acidi biliari,

MASLD.: analisi funzionale di fattori della coagulazione, test globali di emostasi, misurazione citochine infiammatorie, e di attivazione del complemento

HCC: valutazione delle variazioni della risposta ad immunoterapia, modifiche delle concentrazioni di IL, TNF e IFN in corso di trattamenti e in relazione alla composizione del microbiota

LT: valutazione delle complicanze infettive nel periodo precoce post-trapianto, impatto sulla sarcopenia e sullo sviluppo di eventi trombotici

Queste attività avranno delle ricadute positive sia sulle singole SC partecipanti (identificazione di specifiche signatures microbiche in diverse coorti di pazienti, identificazione e monitoraggio di possibili biomarcatori) ma anche per l'intera Area Tematica e possibilmente in futuro anche per altre SC della Fondazione (generazione di una facility di analisi di microbiota, implementazione di tecnologia avanzata WGS per analisi del microbiota, strutturazione e attuazione attraverso RCT di terapie di modulazione del microbiota).