



## **Studio del miRNoma corneale nel cheratocono: ricerca dei meccanismi patogenetici e di aspetti traslazionali per diagnosi precoce e indicazioni prognostiche.**

### **Introduzione e Scopo**

Il cheratocono (KTCN) è una patologia oculare caratterizzata dalla progressiva distorsione ed assottigliamento della cornea come conseguenza della ridistribuzione delle fibre di collagene che la compongono [1, 2]. Come conseguenza ed al termine di questo processo degenerativo, la cornea assume una struttura a forma di cono compromettendo la trasmissione della luce alla retina. Sintomi clinici correlati al KTCN includono miopia, astigmatismo irregolare e perdita di acuità visiva [3].

A seconda dello stadio di progressione della patologia, trattamenti con diversi gradi di invasività vengono utilizzati per la riabilitazione visiva del paziente: dalle lenti a contatto nello stadio più precoce del KTCN, fino al trapianto di cornea negli stadi più avanzati, con un rischio di rigetto dal 2 al 68% a seconda della profondità degli strati di cornea coinvolti [4].

Attualmente, nessuna terapia definitiva è disponibile per il trattamento del KTCN anche a causa della mancanza di informazioni complete sui fattori responsabili della patologia. Infatti, le ricerche che studiano i geni coinvolti nel KTCN presentano risultati spesso contrastanti evidenziando la multifattorialità e complessità di questa patologia che include sia fattori genetici che ambientali [5].

Nell'ambito della patogenesi del KTCN, particolare attenzione è posta al ruolo dei microRNA (miRNA) come regolatori dell'espressione genica. Infatti, queste corte sequenze di RNA non codificante (18-25 nucleotidi) consentono di modulare la produzione di proteine influenzando le funzioni biologiche di cellule, tessuti ed organi, compresa la cornea [6]. Alterazioni dei livelli di espressione dei miRNA e dei loro meccanismi di azione compromettono le funzioni fisiologiche e sono state correlate a diverse patologie nell'uomo [7]. Recenti ricerche scientifiche hanno ipotizzato alcuni miRNA come probabili candidati nello sviluppo del KTCN, sebbene il meccanismo patologico non sia stato chiarito [8, 9].

Considerando il calo irreversibile dell'acuità visiva causata dal KTCN e l'eventuale scelta di un trattamento chirurgico più o meno invasivo, una conoscenza più dettagliata della sua patogenesi risulta determinante. L'obiettivo primario dello studio è di approfondire il ruolo di diversi miRNA, per consentire non solo di far luce sui meccanismi di patogenesi ma anche di porre le basi per lo



sviluppo di una diagnosi precoce e di nuovi strumenti prognostici, per una più mirata stratificazione dei pazienti e strategia terapeutica.

Inoltre, essendo i miRNA considerati come regolatori di processi biologici, agire sui loro livelli di espressione (deregolati negli stessi processi) per riportarli a condizioni fisiologiche potrebbe costituire una nuova frontiera terapeutica che ha già evidenziato risultati promettenti in altre patologie (es. modelli di cancro) [10].

### **Metodologia**

Cornee con KTCN e cornee non-patologiche di controllo verranno fornite dall'Istituto Internazionale per la Ricerca e la Formazione in Oftalmologia (IRFO) di Forlì e/o dall' Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara, in seguito a consenso informato scritto dei pazienti donatori. Tra le cornee non-patologiche rientreranno sia cornee rimosse per traumi che cornee della Biobanca dell'Istituto di Forlì non idonee al trapianto.

Le analisi di espressione genica e dei parametri cellulari sui campioni prelevati verranno eseguite presso il “Laboratorio di Biomarcatori, Target Biomolecolari e Medicina personalizzata in Oncologia”, del Dipartimento di Medicina Traslazionale e per la Romagna dell'Università di Ferrara. Si pianifica un approccio a due Task:

**Task #1:** Analisi preliminare dei miRNA in cornee con KTCN e non-patologiche

Si prevede l'analisi dei livelli di espressione dei miRNA al fine di rilevare l'alterazione del pattern di espressione nella condizione patologica (KTCN). Per l'analisi dei miRNA, l'RNA totale verrà estratto da almeno 20 cornee patologiche e 20 cornee non-patologiche; condizioni confondenti che potrebbero influenzare l'espressione dei miRNA (es. infezioni) verranno escluse dallo studio. Per quanto possibile verranno selezionati soggetti in stadi assai diversi dell' evoluzione della patologia. L'espressione dei miRNA sarà correlata con l'andamento clinico della patologia nel singolo soggetto, allo scopo di individuare un pattern di che possa costituire un profilo miRNomico per diagnosi precoci e con valenza prognostica predittiva, ai fini di approcci terapeutici personalizzati e di precisione.

**Task #2:** Valutazione dei miRNA come regolatori della patogenesi e della progressione della patologia

Per l'analisi dei miRNA e la risposta cellulare in seguito a loro variazione, si prevede uno studio pilota con la generazione di colture primarie tridimensionali di cheratinociti derivati da almeno 3 soggetti con KTCN e 3 senza (controllo), seguendo protocolli già pubblicati [11]. In base ai profili dei miRNA ottenuti nella fase 1, i livelli disregolati di miRNA individuati saranno riportati alla situazione fisiologica tramite inibizione o over-espressione. Il confronto di colture tridimensionali non-



patologiche e KTCN non trattate e trattate per i miRNA e per altri parametri cellulari dopo 48 ore, permetterà di valutare il loro coinvolgimento nella patogenesi del KTCN.

### **Risultati attesi**

Lo studio si propone di investigare il ruolo dei miRNA nella patogenesi del KTCN ponendo l'attenzione su di essi come indicatori dello stato di avanzamento della patologia. In questo contesto, il progetto si pone come il primo studio in vitro che valuterà il coinvolgimento di specifici miRNA nel KTCN valutando la loro espressione ed agendo sulla stessa tramite diretta inibizione ed induzione. La comprensione di meccanismi patogenetici del KTCN ha lo scopo di individuare nuovi biomarcatori per monitorare l'andamento della patologia nel singolo paziente, contribuendo a definire una migliore stadiazione della malattia ed una migliore stratificazione dei pazienti per intraprendere una scelta terapeutica il piu' possibile personalizzata e dunque di precisione.

### **Orizzonte temporale**

Si prevede una durata di una prima fase del progetto di 24 mesi a partire dall'arruolamento dei pazienti.

### **Bibliografia**

1. Rabinowitz Y.S., "Keratoconus", *Surv. Ophthalmol.*, vol 42, pp 297-319 (1998).
2. Meek K.M., Tuft S.J., Huang Y., Gill P.S., Hayes S., Newton R.H., Bron A.J., "Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas" *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol 46, pp 1948-1956 (2005).
3. Gore D.M., Watson M.P., Tuft S.J., "Permanent visual loss in eyes with keratoconus", *Acta Ophthalmol.*, vol 92, pp 244-245 (2014).
4. Andreanos K.D., Hashemi K., Petrelli M., Droutsas K., Georgalas I., Kymionis G.D., "Keratoconus Treatment Algorithm", *Ophthalmol. Ther.*, vol 6, pp 245-262 (2017).
5. Loukovitis E., Sfakianakis K., Syrmakesi P., Tsotridou E., Orfanidou M., Bakaloudi D.R., Stoila M., Kozei A., Koronis S., Zachariadis Z., Tranos P., Kozeis N., Balidis M., Gatzoufas Z., Fiska A., Anogeianakis G., "Genetic Aspects of Keratoconus: A Literature Review Exploring Potential Genetic Contributions and Possible Genetic Relationships with Comorbidities", *Ophthalmol. Ther.*, vol 7, pp 263-292 (2018).
6. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs", *Science*, vol 294, pp 853-858 (2001).
7. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C., "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation", *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol 9, pp 402 (2018).



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

**Dipartimento  
di Medicina Traslazionale  
e per la Romagna**

**Università degli Studi di Ferrara**  
Dipartimento di Medicina Traslazionale e per la Romagna  
via Luigi Borsari, 46 - 44121 Ferrara  
Tel. 0532 455752 - Email: dmtr@unife.it Pec: dmtr@pec.unife.it  
Partita Iva 00434690384 - Codice Fiscale 80007370382  
**mtr.unife.it**

8. Moschos M.M., Droutsas K., Sioziou A., Dettoraki M., Gazouli M., “Mutational Analysis of Pre-miR-184 and hsa-mir-568 in Greek Patients With Sporadic Keratoconus”, *Cornea*, vol 35, pp 631-633 (2016).
9. Nowak D.M., Gajecka M., “Non-random Distribution of miRNAs Genes and Single Nucleotide Variants in Keratoconus Loci”, *PLoS One*, vol 10 (2015).
10. Park J.K., Kogure T., Nuovo G.J., Jiang J., He L., Kim J.H., Phelps M.A., Papenfuss T.L., Croce C.M., Patel T., Schmittgen T.D., “miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival”, *Cancer Res.*, vol 71, pp 7608-7616 (2011).
11. Karamichos D., Zareian R., Guo X., Hutcheon A.E., Ruberti J.W., Zieske J.D., “Novel in Vitro Model for Keratoconus Disease”, *J. Funct. Biomater.*, vol 3, pp 760-775 (2012).