



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche

Coordinatrice: Prof.ssa Margherita Maioli

Tesi di Dottorato:

**IL RUOLO DEI miRNA NELL'
ADENOCARCINOMA DEL DOTTO PANCREATICO**

Ph. D. Thesis:

**THE ROLE OF miRNAs IN PANCREATIC DUCTAL
ADENOCARCINOMA**

Relatore:

Prof. Roberto Madeddu

Candidata:

Dott.ssa Grazia Fenu

1. INDICE

1. INDICE	1:2
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUZIONE	7
3.1. LE NEOPLASIE PANCREATICHE	7
3.1.1. CLASSIFICAZIONE	7
3.1.2. ADENOCARCINOMA DEL DOTTO PANCREATICO	7
3.2. EPIDEMIOLOGIA DELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO	9
3.3. FATTORI DI RISCHIO	12
3.3.1. FATTORI DI RISCHIO CORRELATI ALLO STILE DI VITA E ALL'AMBIENTE	12
3.3.2. COMORBIDITÀ	14
3.3.3. SINDROMI EREDITARIE E SUSCETTIBILITÀ GENETICA	16
3.4. LESIONI PRECANCEROSE	19
3.4.1. NEOPLASIA INTRAEPITELIALE PANCREATICA (PANIN)	19
3.4.2. NEOPLASIA PAPILLARE INTRADUTTALE MUCINOSA (IPMN)	20
3.4.3. NEOPLASIA CISTICA MUCINOSA (MCN)	20
3.5. ADENOCARCINOMA DEL DOTTO PANCREATICO: PRESENTAZIONE CLINICA, DIAGNOSI E STADIAZIONE	21
3.5.1. PRESENTAZIONE CLINICA	21
3.5.2. DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	21
3.5.3. BIOMARCATORI DIAGNOSTICI	22
3.5.4. STADIAZIONE	23
3.6. STRATEGIE TERAPEUTICHE NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO	25
3.6.1. RESEZIONE CHIRURGICA	26
3.6.2. TERAPIA ADIUVANTE PER IL PDAC RESECABILE	26
3.6.3. TERAPIA NEOADIUVANTE	27
3.6.4. LA TERAPIA NEL TUMORE PANCREATICO METASTATICO	28
3.6.5. TERAPIA TARGETIZZATA	29
3.6.6. IMMUNOTERAPIA	29
3.7. CANCEROGENESI PANCREATICA: EVENTI E PATHWAY COINVOLTI	30
3.7.1. MODELLI DI PROGRESSIONE TUMORALE	30
3.7.2. ALTERAZIONI GENETICHE NEI TUMORI PRIMARI	32
3.7.3. VIE DI SEGNALE COINVOLTE NELLA CANCEROGENESI PANCREATICA	34
3.8. LA TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE NEL PDAC	37
3.9. CELLULE STAMINALI TUMORALI (CSC)	38
3.9.1. CELLULE STAMINALI E CELLULE STAMINALI TUMORALI	38
3.9.2. IL RUOLO DELLE CSC NEI MODELLI DI CANCEROGENESI	39

3.9.3.	RUOLO DEL MICROAMBIENTE	41
3.10.	CELLULE STAMINALI TUMORALI E PDAC	42
3.10.1.	IL MICROAMBIENTE TUMORALE NEL PDAC	42
3.10.2.	CELLULE STAMINALI TUMORALI PANCREATICHE	43
3.10.3.	VIE DI SEGNALAZIONE DEREGOLATE NELLE CSC DEL PANCREAS	46
3.11.	I MICRORNA (MIRNA)	50
3.11.1.	BIOGENESI E MECCANISMO D'AZIONE DEI MIRNA	50
3.11.2.	FUNZIONI DEI MIRNA	52
3.11.3.	I MIRNA NEL CONTESTO PATOLOGICO	52
3.12.	I MIRNA NEL PDAC	54
3.12.1.	I MIRNA NELL'ADENOCARCINOMA DEL DOTTO PANCREATICO	54
3.12.2.	I MIRNA COME MARCATORI DIAGNOSTICI E PROGNOSTICI	56
3.12.3.	MIRNA COME TARGET TERAPEUTICI	57
3.12.4.	ESOSOMI	58
3.12.5.	MIRNA E CELLULE STAMINALI TUMORALI	58
4.	SUMMARY OF THE INTRODUCTION	60
5.	OBIETTIVO DEL LAVORO	68
6.	AIM OF THE STUDY	70
7.	EXPERIMENTAL WORKFLOW	72
8.	MATERIALI E METODI	73
8.1.	PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO	73
8.1.1.	METANALISI	73
8.1.2.	SELEZIONE DEI PAZIENTI	75
8.1.3.	RACCOLTA DEI CAMPIONI	76
8.1.4.	LINEE CELLULARI	77
8.1.5.	ARRICCHIMENTO IN CSC	78
8.1.6.	ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE	78
8.1.7.	REAL – TIME PCR	79
8.2.	PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE	81
8.2.1.	TRASFEZIONE TRANSIENTE CON MIR-216A-5P E MIR-125A-5P	81
8.2.2.	RAZIONALE PER LE ANALISI FUNZIONALI:	82
8.2.3.	SAGGI CITOFLUORIMETRICI PER VALUTARE L'ESPRESSIONE DEI MARCATORI DI CSC PANCREATICHE	83
8.2.4.	ESTRAZIONE DELL'RNA	84
8.2.5.	RETROTRASCRIZIONE	84
8.2.6.	REAL – TIME PCR	85
8.2.7.	SAGGIO DI FORMAZIONE DELLE COLONIE	85

8.2.8.	ALAMAR BLUE ASSAY	86
9.	RISULTATI	87
9.1.	PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO	87
9.1.1.	RISULTATI DELLA METANALISI	87
9.1.2.	VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA SUL SIERO	90
9.1.3.	VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA SU BIOPSIE SOLIDE PATOLOGICHE E LORO CONTROPARTI SANE	92
9.1.4.	VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA SU MODELLI IN-VITRO DELLA PATOLOGIA	92
9.1.5.	VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA SUI MODELLI DI CSC PANCREATICHE	93
9.2.	PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE	96
9.2.1.	ANALISI CITOFLUORIMETRICHE	96
9.2.2.	SAGGIO DI FORMAZIONE DELLE COLONIE	100
9.2.3.	REAL – TIME PCR PER I GENI DELLA STAMINALITÀ E DELL’EMT	103
9.2.4.	EFFETTI DI MIR-216A-5P E MIR-125A-5P SULLA VITALITÀ DEI MODELLI IN VITRO	111
10.	DISCUSSIONE	113
10.1.	PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO	114
10.2.	PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE	121
11.	CONCLUSIONI	126
12.	CONCLUSIONS	129
13.	BIBLIOGRAFIA	131
14.	RINGRAZIAMENTI	139

2. ABSTRACT

The present thesis derives from 3-year PhD project focused on biomarker discovery for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma diagnosis and prognosis.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) poses a significant challenge due to late-stage diagnoses resulting from nonspecific early symptoms and the absence of early diagnostic biomarkers. MicroRNAs (miRNAs) play a crucial role in regulating diverse biological processes, with their abnormal expression observed in various diseases, including cancer. The experimental workflow has been divided into two sections. The first, a discovery study, merges *in silico*, *ex vivo* and *in vitro* experiments to identify PDAC-associated miRNAs. The second part is a functional study aimed at characterizing the effects of miR-216a-5p and miR-216b-5p in the acquisition or regression of Cancer Stem Cells (CSCs) traits.

Initially, miRNA profiling datasets from GeoDataset underwent a meta-analysis, revealing a set of PDAC-associated miRNAs. The panel was then investigated in serum and solid biopsies of 37 PDAC patients, as well as in multiple PDAC cellular models. The focus was extended towards exploring the possible role of PDAC-associated microRNAs to the (CSC) phenotype, by inducing CSC-rich pancreatospheres from PDAC cell lines. Then, the role of miR-216a-5p and miR-125a-5p in the expression of CSC markers, pluripotency genes, and EMT genes, as well as in clonogenic activity and cellular vitality, was evaluated in adherent BxPC-3 and AsPC-1 cells and their CSC-like models following transient transfection.

Meta-analysis showed differentially expressed miRNAs in blood samples and cancerous tissues of patients, partially aligning with our patient data. *In vitro* tasks confirmed the aberrant expression of PDAC-associated miRNAs. Globally, our results suggest that miR-216a-5p and miR-216b-5p could exert a dual role in PDAC while miR-4486, miR-361-3p, miR-125a-5p, miR-320d could promote PDAC initiation and progression. MiR-125a-5p demonstrated a promoting role for the CSC

phenotype by enhancing the expression of CD44/CD24/CxCR4 markers, Oct-4, and Sox2 genes. MiR-216a-5p exhibited a noteworthy behavior that partially validated the previous hypothesis regarding its possible dual function.

This study contributed to an enhanced comprehension of the role of miRNAs in the development and progression of PDAC. Furthermore, it sheds new light on the miRNA landscape in PDAC and its intricate interplay with CSCs, providing insights for diagnostic and therapeutic improvements.

3. INTRODUZIONE

3.1. LE NEOPLASIE PANCREATICHE

3.1.1. **Classificazione**

Il tumore pancreatico consiste di differenti sottotipi istologici che includono l'adenocarcinoma duttale comune (PDAC), la neoplasia intraduttale papillare mucinosa (IPMN), il tumore neuroendocrino del pancreas (pNET), il carcinoma adenosquamoso del pancreas, le neoplasie cistiche mucinose (MCN), il carcinoma a cellule acinari del pancreas (ACC), il cistoadenoma sieroso (CSA), il carcinoma a cellule squamose del pancreas (SCC) e infine il tumore solido pseudopapillare (SPN) [1].

I tumori del pancreas sono classificati sulla base delle indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, considerando l'aspetto macroscopico della neoplasia (solido, cistico, intraduttale), la linea di differenziazione cellulare (duttale, acinare, endocrina) e il grado di differenziamento. Quest'ultimo è basato sulla valutazione combinata di caratteristiche istologiche tra cui i gradi di differenziamento ghiandolare, il numero di mitosi per campo, le caratteristiche dei nuclei e la produzione di mucina e permette la classificazione del tumore nei gradi 1, 2 e 3 [2,3].

3.1.2. **Adenocarcinoma Del Dotto Pancreatico**

L'adenocarcinoma del dotto pancreatico (PDAC) è la forma più diffusa di tumore del pancreas e riguarda circa l'85,8% dei casi. La sua diffusione è tale che, quando si parla di tumore pancreatico, ci si riferisce comunemente all'adenocarcinoma del dotto pancreatico [2]. Le lesioni che caratterizzano il PDAC si presentano generalmente come masse sode, di colore bianco-giallo e scarsamente demarcate che oscurano la normale architettura pancreatica.

Dal punto di vista microscopico il PDAC è una neoplasia epiteliale invasiva che, nei tumori moderatamente o ben differenziati presenta strutture ghiandolari e duttali con modello di crescita disordinato e produzione di mucina mentre nelle forme scarsamente differenziate è caratterizzato

da ghiandole piccole e scarsamente definite, singole cellule infiltranti e scarsa produzione di mucina [4,5].

Il 65% di casi di PDAC si verifica al livello della testa del pancreas, il 15% nel corpo e nella coda del pancreas mentre la restante percentuale coinvolge diffusamente la ghiandola [6]. Il PDAC tende a infiltrarsi insidiosamente nei tessuti circostanti, e invade siti distinti in funzione delle aree primariamente interessate dalla neoplasia: quando si forma al livello della testa del pancreas invade il dotto biliare comune e/o il dotto di Wirsung dando luogo a stenosi che risultano in dilatazioni prossimali di entrambi i dotti; nei casi più avanzati coinvolge la papilla di Vater e la parete del duodeno. Quando riguarda il corpo o la coda del pancreas il PDAC tende a ostruire il dotto di Wirsung determinando cambiamenti nel parenchima pancreatico che includono la formazione di cisti di ritenzione, dilatazione del dotto e atrofia fibrosa del parenchima stesso. Inoltre, il PDAC del corpo e della coda tende a invadere primariamente la milza, lo stomaco, la ghiandola surrenale sinistra, peritoneo e colon. Nella maggior parte dei casi, al momento della diagnosi la patologia si è già diffusa oltre il pancreas e le metastasi linfonodali non sono rare. L'invasione perineurale è un meccanismo abbondantemente sfruttato dal PDAC per raggiungere queste strutture [5].

3.2. EPIDEMIOLOGIA DELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO

Il tumore pancreatico è una patologia estremamente letale. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni è pari al 12% ma tende a variare in funzione dello stadio della patologia al momento della diagnosi: nel 47% dei pazienti viene diagnosticato con metastasi a distanza e presenta una sopravvivenza a 5 anni del 3%; il 28% dei pazienti presenta un tumore diffuso ai linfonodi regionali e mostra una sopravvivenza del 15%. Il tumore è localizzato nel 15% dei casi, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 44% [7]. Tale patologia compare con maggiore frequenza nelle persone di età compresa tra i 65 e i 74 anni. Il 77,8 % dei casi viene diagnosticato nelle classi di età comprese fra 55 anni e 84 mentre il 12,1% dei pazienti ha un'età superiore a 84 anni. La mortalità correlata al tumore viene influenzata anche dalla classe di età d'appartenenza [8] [7].

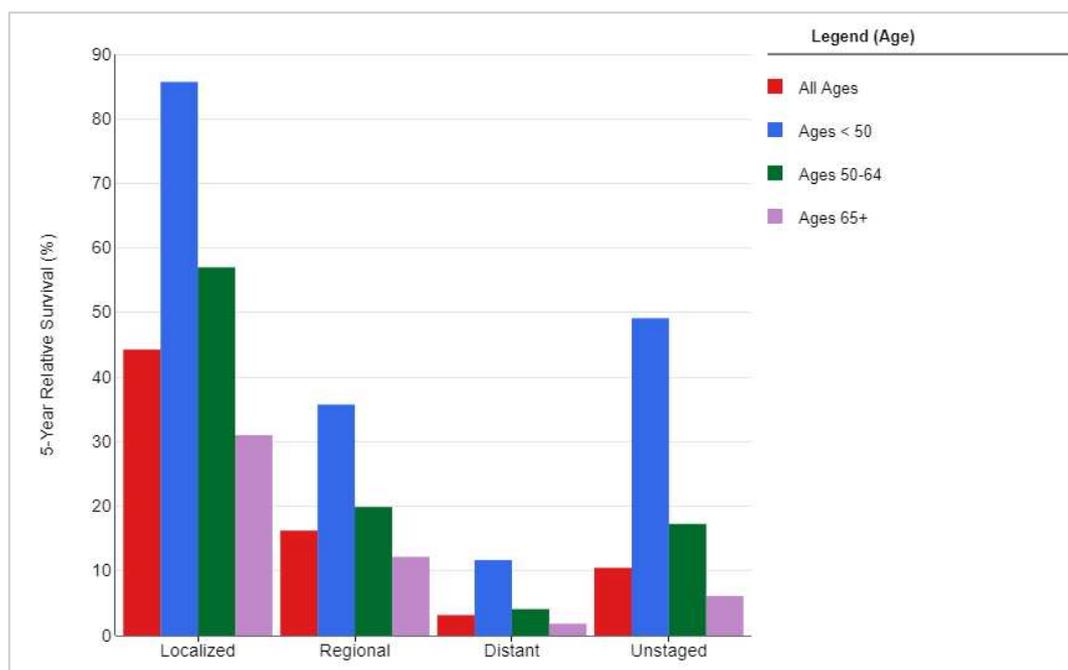


Figura 1: Tassi di sopravvivenza relativa a 5 anni, per il periodo compreso fra il 2013 e il 2019, in funzione dello stadio della patologia al momento della diagnosi e dell'età, considerando entrambi i sessi e tutte le etnie. Fonte: Osservatorio SEER, data del download 11/05/2023 (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>).

È stato osservato come paesi con un elevato indice di sviluppo umano (HDI), calcolato sulla base dell'aspettativa di vita, del livello di educazione e della qualità della vita, manifestino incrementati tassi d'incidenza e mortalità nel contesto del tumore pancreatico rispetto ai paesi con un HDI

inferiore [9]. L'incidenza globale, standardizzata per età (Age Standardized Rate) è pari a 4,8 casi ogni 100000 abitanti. I più alti tassi d'incidenza sono stati riscontrati in Europa e Nord America [10].

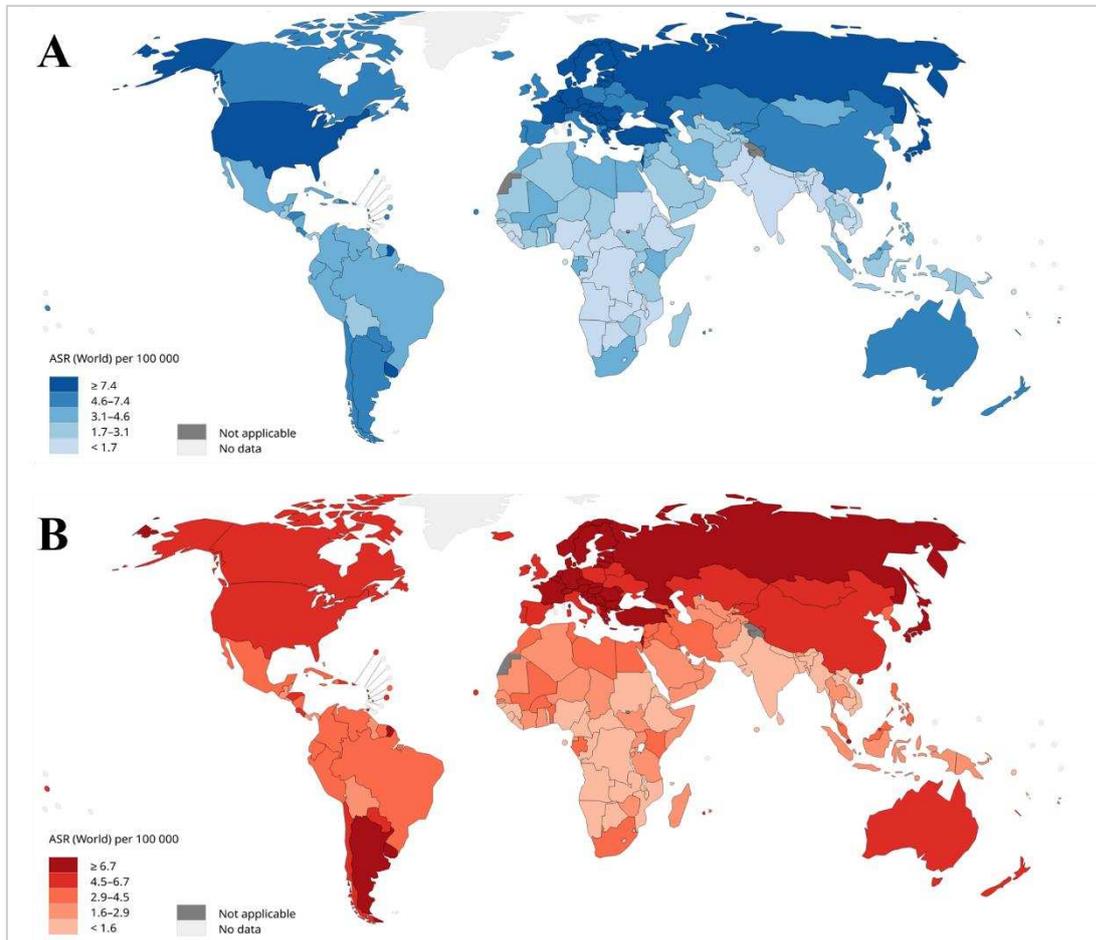


Figura 2: Tassi di incidenza (A) e mortalità (B) stimati per il PDAC, standardizzati per età, su entrambi i sessi e tutte le età. Source: Globocan.

Seppure non sia la patologia neoplastica con maggiore incidenza emerge il fatto che il tasso di incidenza e quello di mortalità sono quasi sovrapponibili. Per l'anno 2024 negli Stati Uniti sono stati stimati 66440 nuovi casi, di cui 34530 uomini e 31910 donne, e 51750 decessi, di cui 27720 uomini e 24480 donne [7,11]. Il PDAC è la terza causa di morte correlata a tumore e si stima che entro il 2030 diventi la seconda [8,11]. In Europa l'incidenza del tumore pancreatico occupa l'ottava posizione tra tutte le patologie neoplastiche e la sesta in relazione alla morte correlata a tumore [8]. In Italia in riferimento all'anno 2020, l'Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM) riporta 14155 nuove diagnosi e 12917 decessi per tumore al pancreas [12]. L'incidenza osserva un

gradiente Nord-Sud, con un numero maggiore di casi nella parte meridionale del Paese. Il tumore pancreatico rappresenta in Italia la quarta causa di morte correlata a tumore nelle femmine e la sesta negli uomini. La sopravvivenza a 5 anni è dell'8.1%, a 10 anni si riduce al 3%.

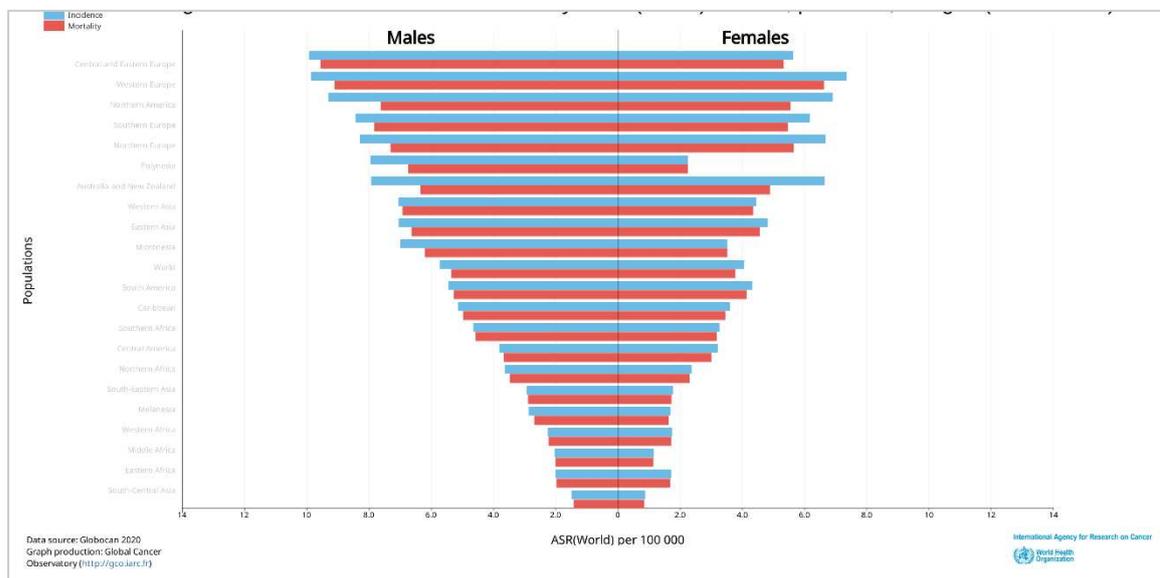


Figura 3: Tassi di mortalità e incidenza (2020) del PDAC standardizzati per età. Fonte: Globocan.

Nonostante i tassi di incidenza e mortalità relativamente costanti in molti paesi ad alto rischio, il progressivo invecchiamento della popolazione mondiale favorisce un incremento del numero dei casi di tumore pancreatico. Questa tendenza, unitamente ai buoni risultati ottenuti nel miglioramento della prognosi di altre patologie tumorali, concorrerà a rendere l'adenocarcinoma pancreatico una delle principali cause di morte correlata a tumore in numerosi paesi.

3.3. FATTORI DI RISCHIO

L'adenocarcinoma pancreatico è una patologia multifattoriale la cui origine non è nota; tuttavia, caratteristiche individuali, stile di vita, ambiente e condizioni cliniche concorrono al suo sviluppo. Tra questi, i fattori di rischio non modificabili associati alle caratteristiche individuali includono l'età, il genere, il gruppo sanguigno d'appartenenza, l'etnia, la storia familiare di PDAC e la suscettibilità genetica. Lo stile di vita e l'ambiente costituiscono i fattori di rischio modificabili per il PDAC e contribuiscono alla patologia in relazione alle abitudini alimentari, all'esposizione a elementi in traccia e ad altre molecole note per cancerogenicità, al fumo di sigaretta, al consumo d'alcol, all'attività fisica e all'obesità. La presenza di patologie quali pancreatite, diabete e infezioni contribuisce ad incrementare il rischio [8,9,13][14].

3.3.1. Fattori di rischio correlati allo stile di vita e all'ambiente

❖ *Fumo di sigaretta*

Tra i numerosi fattori di rischio che esercitano un ruolo causativo nello sviluppo del tumore pancreatico, il fumo di sigaretta presenta la più forte associazione positiva [14]. Numerosi studi dimostrano come il fumo di sigaretta incrementi considerevolmente la probabilità di sviluppare il tumore pancreatico e riduca il tempo di sopravvivenza; tale rischio aumenta proporzionalmente all'aumentare del numero di sigarette/die. [8,13,15] Smettere di fumare comporta una riduzione considerevole della probabilità di sviluppare il tumore pancreatico ed inoltre, a 10-20 anni dalla cessazione diventa sovrapponibile a quello di un non fumatore [13].

❖ *Consumo d'alcol*

Studi di popolazione hanno permesso di osservare come il consumo abituale o occasionale di elevati quantitativi di alcol incrementi il rischio di sviluppare il tumore al pancreas; inoltre, maggiore è la quantità di alcol che viene assunta, maggiore è il rischio. L'assunzione di alcol è negativamente correlata con il tempo di sopravvivenza a seguito della diagnosi. Nessuna associazione è stata riscontrata con un basso consumo di alcol [8].

❖ *Indice di massa corporea (bmi) e alimentazione*

Un incrementato indice di massa corporea e l'obesità costituiscono fattori di rischio per molteplici disordini metabolici e possono incrementare la probabilità di sviluppare il tumore pancreatico [8]. Il pancreas partecipa alla digestione e al metabolismo di zuccheri, proteine e lipidi. Per questa ragione la dieta esercita un ruolo importante nella patogenesi del tumore pancreatico [8]. L'assunzione di carne, soprattutto carne rossa cucinata ad alte temperature, e di amine eterocicliche ad essa associate possono avere un effetto mutagenico complessivo e indurre lo sviluppo di tumori del pancreas esocrino. I cibi che vengono processati con il calore possono contenere prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs), i quali accelerano marcatamente lo sviluppo del tumore pancreatico [14].

❖ *Esposizione ambientale a fattori di rischio*

I fattori di rischio ambientali più comunemente associati al tumore pancreatico sono gli idrocarburi, i metalli pesanti, le particelle fini organiche e inorganiche e le radiazioni ionizzanti.

I composti idrocarburici sono sostanze molto diffuse nell'ambiente. Un incremento nel rischio di sviluppare il tumore pancreatico è stato riportato a seguito dell'esposizione a tricloroetilene, bifenile policlorinato, cloruro di metilene, cloruro di vinile e tetracloroetilene. L'esposizione a idrocarburi clorurati è stata riportata come uno dei più accertati fattori di rischio per il tumore pancreatico [16].

Uno studio volto a investigare la tossicità di cadmio (Cd), selenio (Se), nickel (Ni), piombo (Pb) e arsenico (As) presenti nel fumo di sigaretta ha permesso di osservare un incremento del rischio di sviluppare il tumore pancreatico nei soggetti con le più elevate concentrazioni di Cd, Pb e As. L'esposizione umana involontaria al Cd è degna di nota in quanto è attualmente uno degli inquinanti ambientali e occupazionali più abbondanti. Numerosi studi confermano il suo ruolo tossico su molti sistemi d'organo e la sua tossicità dipende dalla dose, dalla via e dalla durata dell'esposizione. Il cadmio e i suoi composti sono stati classificati nel 1993 come molecole a comprovata carcinogenicità dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) sulla base di studi epidemiologici che hanno mostrato una connessione causale con il tumore dei polmoni. Dal

momento che il pancreas è un organo di accumulo del cadmio, sono numerosi gli studi che dimostrano la correlazione di tale metallo con il rischio di sviluppo della patologia [17]. L'esposizione a particelle inorganiche come fattore di rischio per la cancerogenesi è stata affrontata in un gran numero di studi, con particolare riferimento all'asbesto e alle fibre di vetro o di silice. Il rischio di sviluppare il tumore pancreatico è stato riscontrato incrementato in una popolazione tedesca di artigiani della porcellana esposti alle fibre di silice. Inoltre, altre associazioni positive per il PDAC sono state riscontrate per l'asbesto e per la polvere prodotta da polimeri sintetici [16]. Infine, individui esposti a dosi variabili di radiazioni ionizzanti presentano un rischio incrementato di sviluppare il PDAC [16].

3.3.2. Comorbidità

L'inizio e la progressione del tumore pancreatico sono correlati alla presenza di altre patologie, tra cui pancreatite cronica, lesioni cistiche del pancreas, diabete mellito di tipo II e infezioni.

❖ *Pancreatite*

La pancreatite acuta, malattia infiammatoria del pancreas esocrino, è associata a lesione e necrosi del tessuto pancreatico; spesso rappresenta un sintomo precoce della neoplasia. È stato dimostrato come nei pazienti che hanno presentato un primo episodio di pancreatite acuta non progredita a cronica il rischio di sviluppare il tumore pancreatico sia pari allo 0,4%. Tuttavia, tale rischio incrementa di nove volte nei pazienti in cui la pancreatite acuta progredisce a cronica, suggerendo in tal senso lo screening per il PC sui pazienti che hanno avuto almeno un episodio di pancreatite. La pancreatite cronica è una malattia infiammatoria che causa la sostituzione del parenchima pancreatico con tessuto fibroso [14].

❖ *Diabete*

Numerosi studi hanno dimostrato come il diabete sia un importante fattore di rischio per il tumore pancreatico. A sua volta, il PDAC induce un potenziale stato "diabetogenico", infatti iperglicemia

o diabete vengono riscontrati nell'80% dei pazienti, entrambi nelle fasi pre-sintomatiche della patologia [14].

❖ *Lesioni cistiche del pancreas*

A questa categoria afferiscono le pseudocisti pancreatiche (PPC) e le neoplasie cistiche pancreatiche (PCN). Il rischio di andare incontro a una neoplasia avanzata nei pazienti cui è stata fatta una diagnosi di IPMN si accresce notevolmente quando è coinvolto il dotto principale. Il rischio di sviluppare la patologia tumorale aumenta del 10-39% nei pazienti con neoplasia cistica mucinosa (MCN) andati incontro a resezione chirurgica [8].

❖ *Infezioni*

Una metanalisi di otto studi ha dimostrato come le infezioni da epatite B e da epatite C siano associate a un incremento del rischio di sviluppare il tumore pancreatico [18]. Negli ultimi 30 anni l'infezione da *Helicobacter Pylori* ha attirato un'attenzione crescente in quanto si ritiene costituisca un fattore di rischio indipendente e prevenibile per il tumore gastrico e per altri tumori del tratto digestivo incluso il pancreas [14,16].

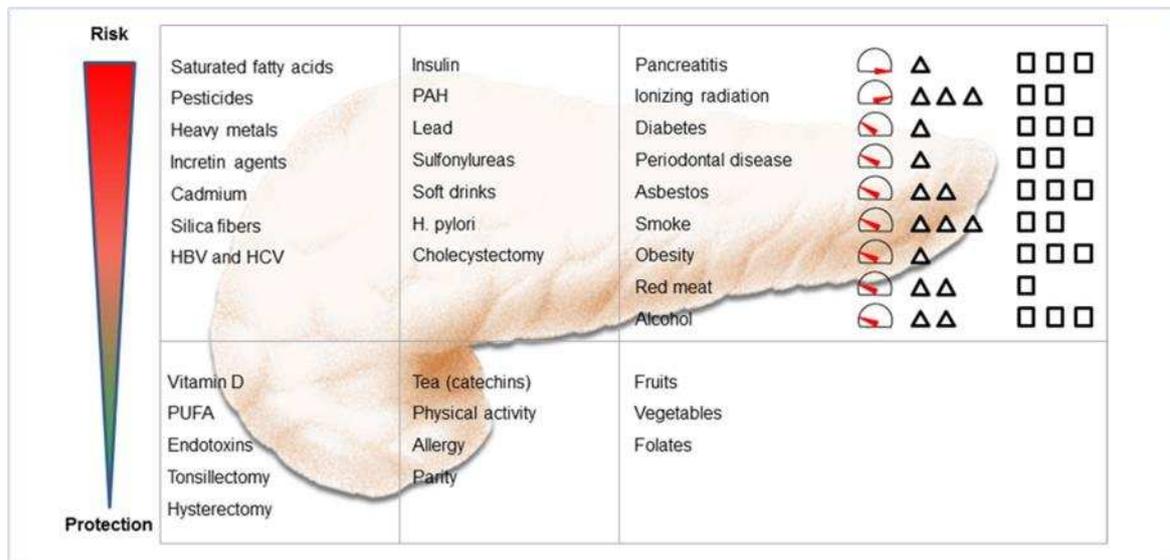


Figura 4: Fattori protettivi e di rischio per il PDAC. I fattori protettivi e di rischio sono classificati in tre categorie definite "non chiare", "probabili" e "accertate" (elencate da sinistra a destra) in base ai risultati riportati nella maggior parte degli studi analizzati. Si riportano i livelli di rischio di ogni studio più ampio per mezzo di indicatori, mentre le figure geometriche evidenziano il "peso" del ruolo di iniziazione (triangolo) e di promozione (quadrato) [16].

3.3.3. Sindromi Ereditarie e Suscettibilità Genetica

Il tumore pancreatico, come altre patologie oncologiche, è il risultato di mutazioni genetiche ereditarie ed acquisite. Circa il 10% di tutti i casi di PDAC è associato a sindromi ereditarie. Mentre le basi genetiche della maggior parte dei cluster familiari di tumore pancreatico non sono state ancora del tutto chiarite, è stato possibile individuare alcuni geni di suscettibilità [19]. Le sindromi ereditarie associate a un aumentato rischio di sviluppare il PDAC includono la sindrome di Peutz-Jeghers (PJS), la pancreatite ereditaria, melanoma multiplo atipico familiare (FAMMM), sindrome ereditaria del cancro ovarico e del seno (HBOC), sindrome di Lynch (LS), poliposi adenomatosa familiare (FAP), sindrome di Li-Fraumeni (LF), fibrosi cistica e atassia-telangiectasia (AT) [8,14].

- *Sindrome di Peutz – Jeghers e mutazioni a carico di STK11/LKB1*

Si tratta di una rara malattia caratterizzata da pigmentazione mucocutanea, polipi amartomatosi a livello gastrointestinale e un forte incremento del rischio di sviluppare patologie tumorali sia gastrointestinali che extra-intestinali. Nella maggior parte dei casi ha origine a partire da mutazioni germinali sul gene STK11/LKB1 [20]. Per gli individui con tale sindrome il rischio di sviluppare un tumore nel corso della vita è pari al 90%. Tra gli individui colpiti da altre sindromi ereditarie, i pazienti PJS presentano il più alto rischio di sviluppare il tumore pancreatico con un'età di esordio inferiore alla norma, con una mediana a 54 anni [21, 23].

- *Pancreatite ereditaria (HP) e mutazioni a carico di PRSS1 E SPINK1*

Tale patologia è caratterizzata da attacchi ricorrenti di pancreatite acuta. La pancreatite ereditaria è legata a mutazioni nella linea germinale dei geni PRSS1 e SPINK1 che impediscono l'inattivazione della tripsina, rendendo persistente l'attivazione dello zimogeno e l'auto-digestione del tessuto pancreatico. Nei pazienti con HP il rischio di sviluppare il PDAC è 69 volte più alto e si riduce l'età di esordio [20-23].

- *Melanoma multiplo atipico familiare (FAMMM) e mutazioni a carico di CDKN2A*

La sindrome FAMMM si presenta comunemente con un gran numero di nevi atipici (> 50) ed è accompagnata da una storia familiare di melanoma che riguarda uno o più parenti di primo o secondo grado [21]. Il 30 – 40% dei casi sono ascrivibili a mutazioni a carico del gene CDKN2A e, rispetto alla popolazione normale, i portatori della variante patogenica manifestano un incremento da 15 a 80 volte del rischio di sviluppare il tumore pancreatico [8, 20-23].

- *Sindrome dei tumori ereditari di mammella e ovaio (HBOC) e mutazioni a carico di BRCA1/2*

Le varianti genetiche su BRCA1 e BRCA2 predispongono allo sviluppo dei tumori ereditari della mammella e dell'ovaio (HBOC). Le proteine codificate dai due geni giocano un ruolo importante nei meccanismi di riparo del DNA. Mutazioni germinali sui geni BRCA1 e BRCA2 si riscontrano nel 5 – 9% dei casi di tumore pancreatico. Infine, entrambi sono stati associati a una precoce età di insorgenza del PDAC [8, 20, 22].

- *Sindrome di Lynch (LS) e mutazioni a carico dei geni MMR*

La sindrome di Lynch è la causa più comune di tumore del colon-retto. Alla base di tale patologia sono mutazioni inattivanti a carico di uno dei quattro geni coinvolti nei mismatch-repair (MMR), MLH1, MSH2, MSH6 and PSM2 [21]. È stato osservato come i portatori di mutazioni germinali a carico di questi geni presentino un rischio di sviluppare il tumore pancreatico 8,6 volte maggiore rispetto ai non portatori [8, 20 - 23].

- *Poliposi adenomatosa familiare (FAN) e mutazioni a carico di APC*

È una rara sindrome ereditaria che risulta da mutazioni a carico del gene APC. L'inattivazione delle sue funzioni di oncosoppressione induce la rapida proliferazione cellulare che risulta nella formazione di polipi nel tratto gastrointestinale [20]. Il rischio di sviluppare il tumore pancreatico aumenta di 4 volte nei pazienti con FAP [21, 23].

- *Li-Fraumeni syndrome (LF) e mutazioni a carico di TP53*

Mutazioni germinali a carico del gene TP53 costituiscono la causa principale della sindrome di Li-Fraumeni. Tra le patologie tumorali il cui sviluppo aumenta nei pazienti con la sindrome LF, è stato riportato anche il PDAC che presenta un incremento del rischio pari al 7% [20,21, 23].

- *Fibrosi cistica (CF) e mutazioni a carico di CFTR*

La fibrosi cistica rappresenta la più comune malattia genetica nelle popolazioni caucasiche. La sua eziologia è legata a una mutazione a carico del gene CFTR. È stato riportato un incrementato rischio di sviluppare il tumore pancreatico nei pazienti con fibrosi cistica e nei soggetti portatori di mutazioni a carico del gene CFTR rispetto ai non portatori [21].

- *Atassia – telangiectasia (AT) e mutazioni a carico di ATM*

Tale patologia, anche nota come sindrome di Louis-Bar, è un disordine raro, caratterizzato da telangiectasia, immunodeficienza e neurodegenerazione centrale e periferica. È strettamente associata a mutazioni a carico del gene ATM, coinvolto nei meccanismi di riparo del DNA. Mutazioni a carico del gene ATM si riscontrano in una percentuale compresa fra l'1-5% dei casi di tumore pancreatico [22,23].

3.4. LESIONI PRECANCEROSE

Le conoscenze attuali in merito alla cancerogenesi pancreaticca postulano, come per gli altri tumori, una progressione graduale dalla neoplasia intraepiteliale, fino al tumore invasivo. Le lesioni precancerose meglio caratterizzate nel contesto pancreaticco sono le neoplasie pancreatiche intraepiteliali (PanIN), le neoplasie papillari intraduttali mucinose (IPMN) ed infine le neoplasie cistiche mucinose [24,25].

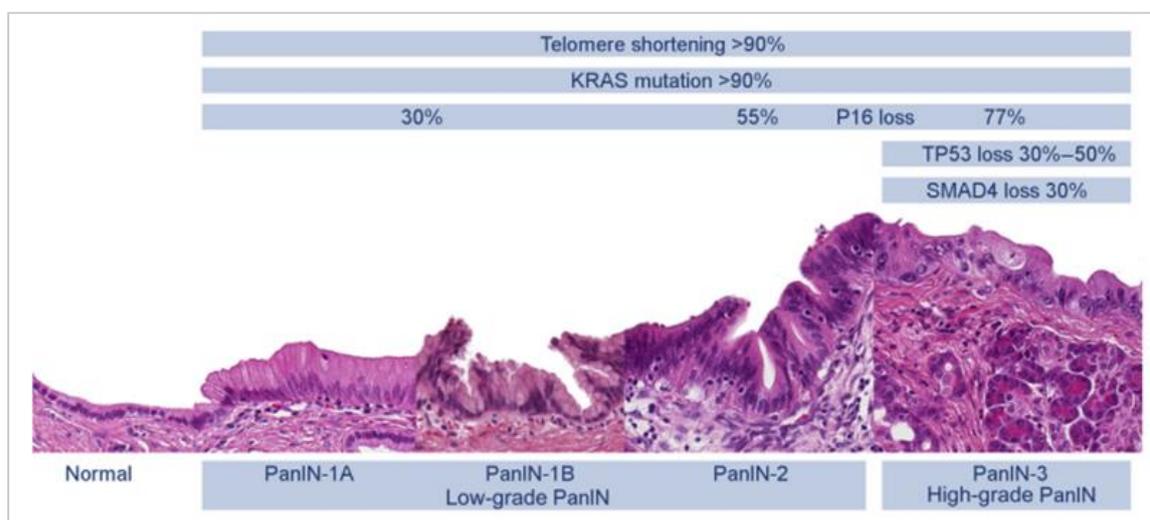


Figura 5: La progressione delle lesioni PanIN è associata a un incremento di atipia cellulare e accumulo di mutazioni genetiche. Le PanIN-1 mostrano una minima atipia cellulare: le PanIN-1A esibiscono un modello di crescita piatto mentre le PanIN-1B sono caratterizzate dalla formazione di micropapille. Le PanIN-2 perdono polarità cellulare. Le PanIN-3 (high-grade PanIN) presentano la più severa atipia cellulare [26].

3.4.1. Neoplasia intraepiteliale pancreaticca (PanIN)

Si tratta della lesione precancerosa più comune. Le lesioni PanIN si riscontrano nell'82% dei casi di carcinoma invasivo del pancreas, nel 60% dei casi di pancreatite cronica e nel 16% dei casi nel pancreas normale. A causa delle loro piccole dimensioni non vengono rilevate con tecniche di imaging e non sono associate a sintomi e segni clinici specifici. Le neoplasie intraepiteliali vengono spesso individuate accidentalmente, a seguito della resezione del pancreas o su campioni biotipici [26]. La classificazione di tali lesioni dipende dal grado di atipia strutturale e citologica. Le PanIN di basso grado, precedentemente definite PanIN-1 e PanIN-2, sono lesioni piatte o papillari con atipia cellulare da lieve a moderata. Tali lesioni vengono accidentalmente individuate tra la

popolazione di età superiore ai 50 anni. Le PanIN di alto grado, precedentemente classificate come PanIN-3, sono lesioni papillari caratterizzate da perdita di polarità, stratificazione irregolare, atipia citologica severa, mitosi e occasionale necrosi intraluminale. Nei pazienti PDAC è comune il riscontro di lesioni PanIN [27].

3.4.2. Neoplasia papillare intraduttale mucinosa (IPMN)

Neoplasie cistiche epiteliali che producono mucina e insorgono nel dotto pancreatico o nelle sue diramazioni. Le lesioni IPMN hanno dimensioni superiori a 1 cm e possono essere singole o multifocali. La maggior parte delle neoplasie papillari intraduttali mucinose si osserva nella testa del pancreas e nel processo uncinato ma può insorgere anche nelle altre parti della ghiandola. Le IPMN vengono distinte in funzione della localizzazione in lesioni del dotto principale (MD-IPMN) e delle sue ramificazioni (BD-IPMN). Comunemente, le prime sono maggiormente associate al PDAC rispetto alle BD-IPMN. Il grado di atipia citologica e strutturale delle lesioni ne permette la classificazione in IPMN di basso e alto grado: nelle prime la displasia è di grado basso-intermedio, nelle seconde è di alto grado [27]. Dal punto di vista istologico vengono individuati i sottotipi intestinale, gastrico-foveolare, pancreatobiliare e oncocitico [27]. Il problema clinico principale nel trattamento dei pazienti con diagnosi di IPMN è capire se e quando le lesioni possano essere resecate: nei pazienti con displasia di alto grado si dovrebbe procedere alla resezione mentre nei casi con IPMN di basso grado il decorso clinico può essere seguito in sicurezza anche senza andare incontro a resezione chirurgica [4,28].

3.4.3. Neoplasia cistica mucinosa (MCN)

Si tratta di neoplasie non invasive secernenti mucina che insorgono al di fuori dei grandi dotti del pancreas. Si riscontrano esclusivamente nel corpo e nella coda del pancreas e sono più comuni nelle donne rispetto agli uomini. Diversamente dalle IPMN, le MCN sono prevalentemente solitarie e le cisti non comunicano con il sistema duttale pancreatico. Le neoplasie cistiche mucinose sono le lesioni precancerose meno frequenti [27]. Anche le MCN, come le precedenti lesioni precancerose, vengono classificate sulla base del grado di displasia citologica e circa un terzo dei casi è associato

all'adenocarcinoma invasivo [4,28]. Rispetto alle altre lesioni precancerose, le MCN presentano una tendenza nettamente inferiore di evolvere a tumori maligni [27].

3.5. ADENOCARCINOMA DEL DOTTO PANCREATICO: PRESENTAZIONE CLINICA, DIAGNOSI E STADIAZIONE

L'adenocarcinoma pancreatico rimane una delle patologie tumorali più sfidanti dal punto di vista clinico a causa della diagnosi tardiva e della sua resistenza ai farmaci chemioterapici [29]. La diagnosi precoce garantisce un trattamento curabile grazie alla resezione chirurgica, per questo un'accurata diagnosi precoce può migliorare i risultati terapeutici [30].

3.5.1. **Presentazione clinica**

La maggior parte dei pazienti con PDAC non presenta i segni della patologia fino alle fasi più avanzate della stessa. I sintomi sono spesso vaghi e aspecifici e si riportano comunemente senso di inappetenza, difficoltà digestive, variazioni nel comportamento intestinale, fatica, perdita di peso, dolore addominale o alla schiena. Tali segni possono variare in funzione dell'area del pancreas interessata dalla neoplasia [29,31].

3.5.2. **Diagnostica per immagini**

La diagnosi del tumore pancreatico si basa su tecniche di imaging, che comprendono tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica (MRI), tomografia a emissione di positroni (PET) ed ecoendoscopia (EUS) che vengono utilizzate parallelamente all'analisi patologica delle biopsie tissutali e al dosaggio di marcatori sierici [32]. Le tecniche di imaging sono fondamentali anche nella stadiazione, nel pianificare la gestione della malattia, nella valutazione post-operatoria e nell'individuazione delle recidive [33].

L'EUS rappresenta il test più sensibile, specifico e accurato nella diagnosi del PDAC, con un'accuratezza diagnostica del 98%. Inoltre, consente l'esecuzione dell'agoaspirato per la diagnosi

citopatologica. Tuttavia, in presenza di un sospetto di PDAC si ricorre con maggiore frequenza alla CT, che manifesta una performance eccellente nel valutare la progressione della malattia locale, l'invasione vascolare, il coinvolgimento dei linfonodi e le metastasi a distanza [33].

Nella pratica clinica, sulla base dei riscontri radiografici e sul grado di contatto tra tumore e vasi è possibile individuare le seguenti categorie di resecabilità: resecabile, borderline resecabile, localmente avanzato e malattia metastatica [32]. In genere, in presenza di una massa solida con sospetto di neoplasia, prima dell'intervento non è richiesta la biopsia. La conferma istologica dovrebbe essere sempre ottenuta nei tumori resecabili borderline e suscettibili di chemioterapia [3].

3.5.3. Biomarcatori diagnostici

Le biopsie liquide rappresentano una tecnica minimamente invasiva per la diagnosi e il follow-up molecolare del paziente. Il più grande vantaggio del ricorso a biopsie liquide, quali siero, urine, saliva e liquido cerebro-spinale, è la possibilità di confrontare campioni seriali dello stesso paziente e generare una lettura in tempo reale dell'eterogeneità tumorale, della progressione molecolare della patologia e dell'eventuale risposta/resistenza alle terapie. Il ricorso alla valutazione di biomarcatori su biopsie liquide è in forte aumento e introduce una nuova era nella diagnosi e nella gestione dei pazienti tumorali [33, 34].

L'antigene carboidratico 19-9 (CA19-9) è l'unico biomarcatore ad essere stato approvato dalla U.S Food and Drug Administration (FDA) per il PDAC ma viene utilizzato anche nel contesto di patologie gastrointestinali, urologiche, ginecologiche e polmonari. L'utilizzo nella pratica clinica è limitato dalla sua scarsa sensibilità e specificità (rispettivamente 80% e 75%) [33]. La performance del CA19-9 per la diagnosi del PDAC migliora nei pazienti sintomatici. Inoltre, è stato dimostrato come in combinazione con altri marcatori il suo valore diagnostico aumenti [30, 32].

Le molecole MIC-1, CEA, CA125 e CA242 sono state considerate per la diagnosi del tumore pancreatico. Tra questi, l'antigene Carcino Embrionario (CEA) è riconosciuto come marcatore tumorale nel carcinoma colon-rettale. Studi recenti hanno mostrato una correlazione tra il CEA e

patologie non intestinali che riguardano stomaco, polmoni, reni e pancreas. È stato osservato come utilizzando la combinazione di CA19-9, CEA, CA125 e CA242 la sensibilità incrementi al 90,4% e la specificità al 93,8%, valori notevolmente maggiori rispetto a quelli che si ottengono con i marcatori presi singolarmente [33].

Ulteriori potenziali biomarcatori in studio sono le cellule tumorali circolanti (CTCs), che derivano dall'invasione vascolare del tumore e indicano dispersione metastatica della patologia. Evidenze scientifiche suggeriscono il ruolo potenziale del DNA circolante (ctDNA) come marcatore prognostico. È costituito da 150 – 200 paia di basi frammentate, derivate dalla necrosi delle cellule tumorali.

L'espressione differenziale di numerosi microRNA (miRNA) può essere utilizzata per discriminare soggetti con patologie rispetto a individui sani. Le loro potenzialità nel contesto del PDAC verranno trattate successivamente. Infine, le vescicole extra-cellulari o esosomi circolanti sono state recentemente studiate nel contesto della diagnosi precoce del PDAC, con risultati promettenti [33].

Nonostante numerose evidenze testimonino l'efficacia di differenti molecole nella diagnosi del PDAC, mancano marcatori rilevabili nell'intervallo di tempo compreso tra le fasi di inizio e progressione, quando la patologia è potenzialmente curabile [35]. Per la diagnosi precoce dell'adenocarcinoma pancreatico non esiste alcun biomarcatore o pannello di biomarcatori con appropriata accuratezza diagnostica.

3.5.4. **Stadiazione**

Ai fini della stadiazione si ricorre al sistema TNM, basato sull'ottava edizione dall'American Joint Committee on Cancer Staging Manual (2017)[3,36]:

- Il parametro T indica le dimensioni del tumore principale;
- Il parametro N indica l'estensione verso i linfonodi;

- Il parametro M descrive l'estensione del tumore verso gli organi vicini (fegato, polmoni, peritoneo).

Sulla base della combinazione tra i parametri TNM è possibile individuare quattro differenti stadi dell'adenocarcinoma pancreatico:

- Stadio 0: il tumore è localizzato agli strati superiori delle cellule del dotto pancreatico, non invade i tessuti più profondi e non manifesta un'estensione extra-pancreatica. Può essere definito carcinoma in situ o neoplasia pancreatica intraepiteliale di grado III (PanIN III);
- Stadio IA: il tumore ha dimensioni inferiori a 2 cm e non mostra estensione extrapancreatica (T1) ai linfonodi (N0) o ad altre parti del corpo (M0);
- Stadio IB: il tumore è ancora confinato al pancreas ma ha dimensioni superiori a 2 cm (T2); non si è diffuso ai linfonodi (N0) o ad altre parti del corpo (M0);
- Stadio IIA: il tumore è cresciuto al di fuori del pancreas (duodeno, dotto biliare o altri tessuti peripancreatici) ma non ha invaso i vasi maggiori o i nervi importanti (T3); non si osserva diffusione nodale (N0) né ad altre parti del corpo (M0);
- Stadio IIB: il tumore può crescere o meno al di fuori del pancreas (duodeno, dotto biliare o altri tessuti circostanti) ma non invade i vasi maggiori o i nervi (T1 – T2 – T3), si è diffuso ai linfonodi vicini (N1) ma non ad altre parti del corpo (M0);
- Stadio III: il tumore è cresciuto al di fuori del pancreas e ha invaso la maggior parte dei vasi importanti e nervi (T4); può avere o meno raggiunto i linfonodi vicini (N0 – N1) ma non coinvolge altre parti del corpo (M0);
- Stadio IV: il tumore si è diffuso alle altre parti del corpo (metastasi – M1).

3.6. STRATEGIE TERAPEUTICHE NELL'ADENOCARCINOMA PANCREATICO

La risposta di un paziente al trattamento e il decorso clinico della patologia dipendono da vari fattori che includono la biologia del tumore, lo stato di salute del paziente ed il modello di progressione del tumore stesso [37].

Il PDAC ha una prognosi infausta e la mediana di sopravvivenza è pari a 10 – 12 mesi a seguito di trattamenti terapeutici e soli 5 – 6 mesi nei pazienti che non ricevono un trattamento [29]. La resezione chirurgica del pancreas rimane la sola e potenzialmente curativa opzione per i pazienti con PDAC ma è praticabile esclusivamente nelle fasi precoci della malattia: per questa ragione, al momento della diagnosi, solo il 20% dei pazienti è candidabile [25,38].

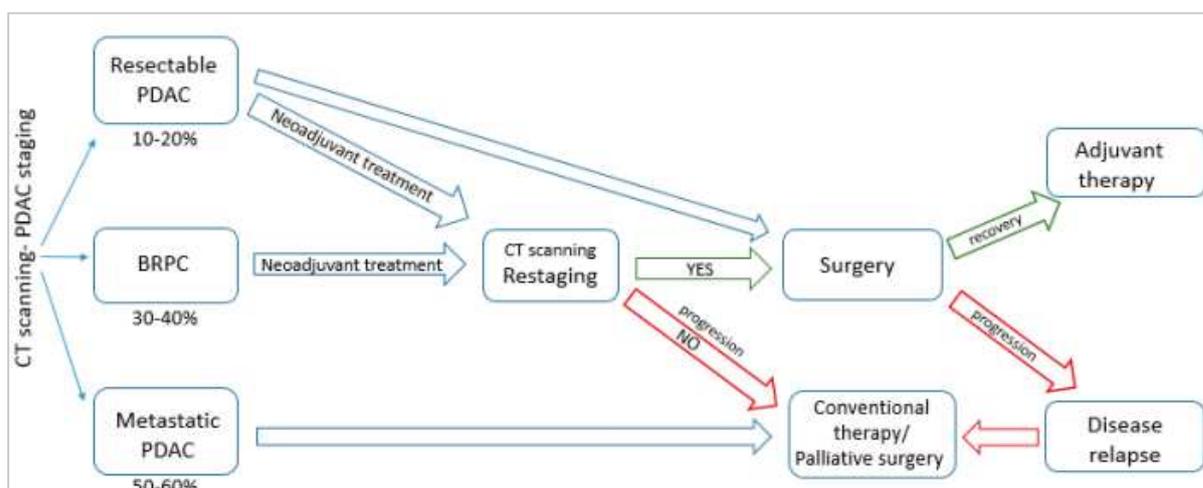


Figura 6: Schema delle strategie terapeutiche adottate a seguito di una diagnosi di PDAC: la freccia con i bordi verdi indica il successo della procedura, quella con i bordi rossi il fallimento della stessa [38].

3.6.1. **Resezione chirurgica**

La scelta della procedura operatoria da adottare per la resezione del tumore dipende dalla localizzazione della lesione e dalla sua diffusione, dall'esperienza del chirurgo e dallo stato di salute del paziente. Quest'ultimo è uno dei principali fattori prognostici. Per i pazienti candidabili alla resezione del pancreas (resecabili o borderline resecabili) le opzioni chirurgiche sono le seguenti: pancreaticoduodenectomia (rimozione della testa/corpo del pancreas e degli organi vicini), pancreatectomia distale (corpo, coda del pancreas e milza), pancreatectomia totale (rimozione integrale del pancreas e degli organi vicini) e chirurgia palliativa mediante l'applicazione di stent o bypass per alleviare i sintomi dell'ostruzione dello sbocco gastrico o biliare [38]. Di recente, tecniche chirurgiche minimamente invasive si sono affermate anche nel contesto della chirurgia pancreaticca dimostrando in alcuni casi fattibilità, sicurezza ed efficacia rispetto agli approcci convenzionali [25, 39]. L'obiettivo della resezione chirurgica è quello di ottenere una resezione R0, associata a margini istologicamente liberi e a un significativo miglioramento della sopravvivenza rispetto a quella R1 [25]. La sopravvivenza a 5 anni per i pazienti sottoposti a chirurgia è pari al 20% e la mediana di sopravvivenza è pari a 18 – 24 mesi. Anche nei pazienti con resezione completa il tasso di ricorrenza locale è pari al 35 – 60% e il tasso di recidiva sistemica è alto, pari all'80 – 90% [40].

3.6.2. **Terapia adiuvante per il PDAC resecabile**

Poiché il 70% dei pazienti sottoposti a resezione del pancreas va incontro a recidive, la chemioterapia adiuvante è raccomandata in tutti i casi di resezione, inclusi i tumori con stadio T1N0 [40]. Studi condotti su pazienti non metastatici hanno permesso di assistere a un breve ma significativo beneficio della terapia adiuvante, somministrata a seguito dell'intervento chirurgico. Tuttavia, quello della terapia adiuvante rimane un campo controverso, in quanto i risultati dei trial clinici oscillano tra un beneficio della sopravvivenza e un impatto negativo sulla salute del paziente. Circa il 60% dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica presenta tempi di recupero più lunghi, rendendo inadeguato il trattamento post-operatorio pianificato. A tal proposito, lo standard di cura

per i pazienti che hanno subito la resezione del pancreas dipende strettamente dalla forma fisica post-operatoria. La terapia a base di mFOLFIRINOX, combinazione di 5-fluorouracile, ossaliplatino, irinotecan e leucovorin, viene utilizzata per pazienti con buona forma fisica mentre la combinazione di gemcitabina e capecitabina viene somministrata ai pazienti con un peggiore stato di salute [25]. Infine, numerosi trials attualmente in corso stanno valutando l'uso combinato del FOLFIRINOX o della gemcitabina con Abraxane o nab-paclitaxel a seguito del trattamento chirurgico.

3.6.3. **Terapia neoadiuvante**

Se le tecniche diagnostiche non hanno rilevato metastasi a distanza, il trattamento raccomandato è la terapia neoadiuvante. Tale strategia, comune nel trattamento dei tumori al seno o al colon retto, presenta l'obiettivo di ridurre la stadiazione tumorale, incrementare il numero di pazienti eleggibili alla resezione chirurgica e aumentare la probabilità di ottenere una resezione R0 [40]. Inoltre, prima dell'intervento chirurgico i pazienti mostrano una migliore tolleranza alla chemioterapia [31, 40]. Differenti strategie terapeutiche preoperatorie sono state considerate in funzione dello stadio della patologia al momento della diagnosi.

L'applicazione della terapia neoadiuvante nei pazienti colpiti da tumore pancreatico resecabile rimane controversa, dal momento che ritardare la chirurgia potrebbe risultare nella progressione della stessa. D'altro canto, il trattamento preoperatorio riduce il rischio di disseminazione tumorale durante l'intervento e può migliorare la risposta del paziente ai trattamenti post-operatori. Le strategie terapeutiche proposte per questa fase si basano sulla gemcitabina da sola o in combinazione con altri composti citotossici quali cisplatino, ossaliplatino, paclitaxel e 5-FU.

Nel trattamento del PDAC borderline resecabile (BRPC), le terapie basate sulla combinazione della gemcitabina con composti citotossici quali capecitabina, ossaliplatino, 5-FU, docetaxel (NeoGemTax) e con radioterapia hanno mostrato un modesto incremento del tasso di resecabilità e della probabilità di ottenere resezioni R0.

Sebbene con risultati meno promettenti e più contraddittori, le terapie neoadiuvanti sono state considerate anche nel contesto del tumore pancreatico localmente avanzato (LAPC). Le formule a base di gemcitabina in combinazione con ossaliplatino (NeoGemOx), capecitabina, PEFG/PEXG (cisplatino, epirubicina, 5-FU/capecitabina e gemcitabina) o PDXG (docetaxel replacing epirubicin) hanno mostrato risultati promettenti nella conversione del tumore da localmente avanzato a resecabile e incrementato il numero di pazienti da sottoporre alla chirurgia.

La terapia ottimale, la sua durata e il momento più adeguato al suo inizio devono ancora essere individuati. Finora non c'è stato alcun consenso in merito al vantaggio del trattamento preoperatorio su quello post-operatorio rendendo controverso il ricorso a tale strategia terapeutica [38].

3.6.4. La terapia nel tumore pancreatico metastatico

Per i pazienti PDAC che presentano malattia avanzata o metastasi la prognosi è infausta e la chemioterapia o la combinazione di chemioterapia e radioterapia rappresentano le opzioni principali. Entrambi gli approcci sono correlati a un lieve aumento del tasso di sopravvivenza e una riduzione dei sintomi correlati al tumore.

La strategia terapeutica e la scelta di un trattamento mono o multifarmaco dipende strettamente dalla forma fisica del paziente. La combinazione di differenti farmaci incrementa la risposta antitumorale del paziente ma è associata a maggiore tossicità e incidenza di effetti avversi che possono rendere inefficaci le terapie e portare alla loro precoce interruzione [38].

Per alcuni decenni il trattamento a singolo agente con gemcitabina ha rappresentato il trattamento d'elezione per i pazienti con PDAC non resecabile ma non è stata associata a significativi incrementi della sopravvivenza. Le combinazioni a base di Gemcitabina con S-1 e capecitabina hanno rappresentato una valida opzione per il trattamento del PDAC avanzato. L'effetto della combinazione gemcitabina/nab-paclitaxel ha significativamente superato la terapia a singolo agente e posto le basi per l'ottenimento dell'approvazione da parte della FDA e l'istituzione del regime terapeutico Abraxane – gemcitabina come opzione terapeutica di prima linea per i pazienti con

PDAC avanzato o metastatico. Recentemente, anche il FOLFIRINOX ha mostrato di essere un efficace trattamento nei pazienti con tumore metastatico [38].

3.6.5. **Terapia targetizzata**

Le conoscenze attuali sui cambiamenti molecolari che guidano lo sviluppo, la progressione e la metastasi del tumore pancreatico permettono di individuare distinti pathway bersaglio su differenti sottopopolazioni di pazienti. Identificare precocemente tali gruppi può rendere possibile lo sviluppo di terapie personalizzate e il miglioramento della prognosi [29]. Numerosi trial volti a valutare l'effetto della combinazione di farmaci citotossici con inibitori dei pathway più comunemente alterati nel PDAC, sono attualmente in atto. Tuttavia, a causa della natura eterogenea del tumore pancreatico e delle sue complesse interazioni stromali, la maggior parte delle terapie targetizzate ha fallito nel fornire benefici clinici rispetto ai trattamenti standard. L'unica eccezione riguarda il farmaco erlotinib, un inibitore del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) il quale, in combinazione con la gemcitabina, ha mostrato un moderato seppure significativo incremento della sopravvivenza [38].

3.6.6. **Immunoterapia**

Nel contesto del PDAC, l'immunoterapia ha dimostrato un'efficacia marginale in termini di sopravvivenza. La scarsa sensibilità della patologia alle terapie immunitarie è legata al microambiente tumorale denso e inaccessibile, nel quale si riscontrano caratteristiche fibrotiche, ipossiche e immunosoppressive, tali da rendere il tumore immunologicamente freddo.

Le terapie immunitarie possono essere distinte in immunomodulatori (inibitori del check-point immunitario, agonisti immunostimolanti, citochine, anticorpi bispecifici), virus oncolitici, terapie cellulari adottive (cellule T e NK), e vaccini [41].

Le strategie di immunoterapia in studio nel contesto del PDAC e i trial clinici in atto sono numerosi. Tuttavia, i risultati ottenuti sono ancora precoci e richiedono ulteriori investigazioni per essere resi applicabili sui pazienti [38,41,42].

3.7. CANCEROGENESI PANCREATICA: EVENTI E PATHWAY COINVOLTI

3.7.1. Modelli di progressione tumorale

L'evoluzione tumorale è il risultato dell'instabilità genomica che deriva da mutazioni somatiche, riarrangiamenti cromosomici, alterazioni del numero di copie e cambiamenti epigenetici. Questi si traducono nella riduzione dell'espressione di oncosoppressori e nell'attivazione di oncogeni che divincolano le cellule colpite dai loro cicli regolatori. Tali eventi molecolari sono favoriti dalla selezione naturale in quanto le cellule neoplastiche presentano il vantaggio della crescita competitiva. Gli studi sull'adenocarcinoma del dotto pancreatico hanno permesso di elaborare due distinti modelli di progressione tumorale:

- Il modello di progressione graduale prevede la displasia sequenziale e la progressione verso la malignità attraverso le lesioni precursori della patologia (PanIN, IPMN, MCN). Prende le mosse dall'osservazione che ad un maggiore grado di displasia delle lesioni precancerose corrisponde un maggiore accumulo di alterazioni genetiche.
- Il modello di progressione evolutiva scandita postula un breve periodo di latenza per l'acquisizione di proprietà invasive e metastatiche. La sua definizione deriva dall'osservazione che inattivazioni a carico dei geni driver del PDAC possono presentarsi simultaneamente piuttosto che gradualmente. Queste risultano in riarrangiamenti cromosomici complessi che inducono un rapido sviluppo tumorale [43,44].

Dato il coinvolgimento del dotto pancreatico nel PDAC si è ampiamente ritenuto che le lesioni precursori si sviluppessero a partire da mutazioni a carico delle cellule epiteliali del dotto pancreatico. Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato come le cellule acinari possano differenziarsi a cellule progenitrici duttali (metaplasia acino-duttale) e come mutazioni a carico di KRAS inducano le cellule acinari a generare lesioni neoplastiche con una frequenza 100 volte superiore rispetto a quelle duttali [45]. La metaplasia duttale si configura come la risposta delle cellule acinari del pancreas allo stress cellulare e si ritiene che questo possa dare origine alle lesioni

PanIN. In condizioni fisiologiche, si presume che la metaplasia duttale rappresenti un adattamento protettivo dagli enzimi digestivi acinari che danneggiano i dotti adiacenti [33].

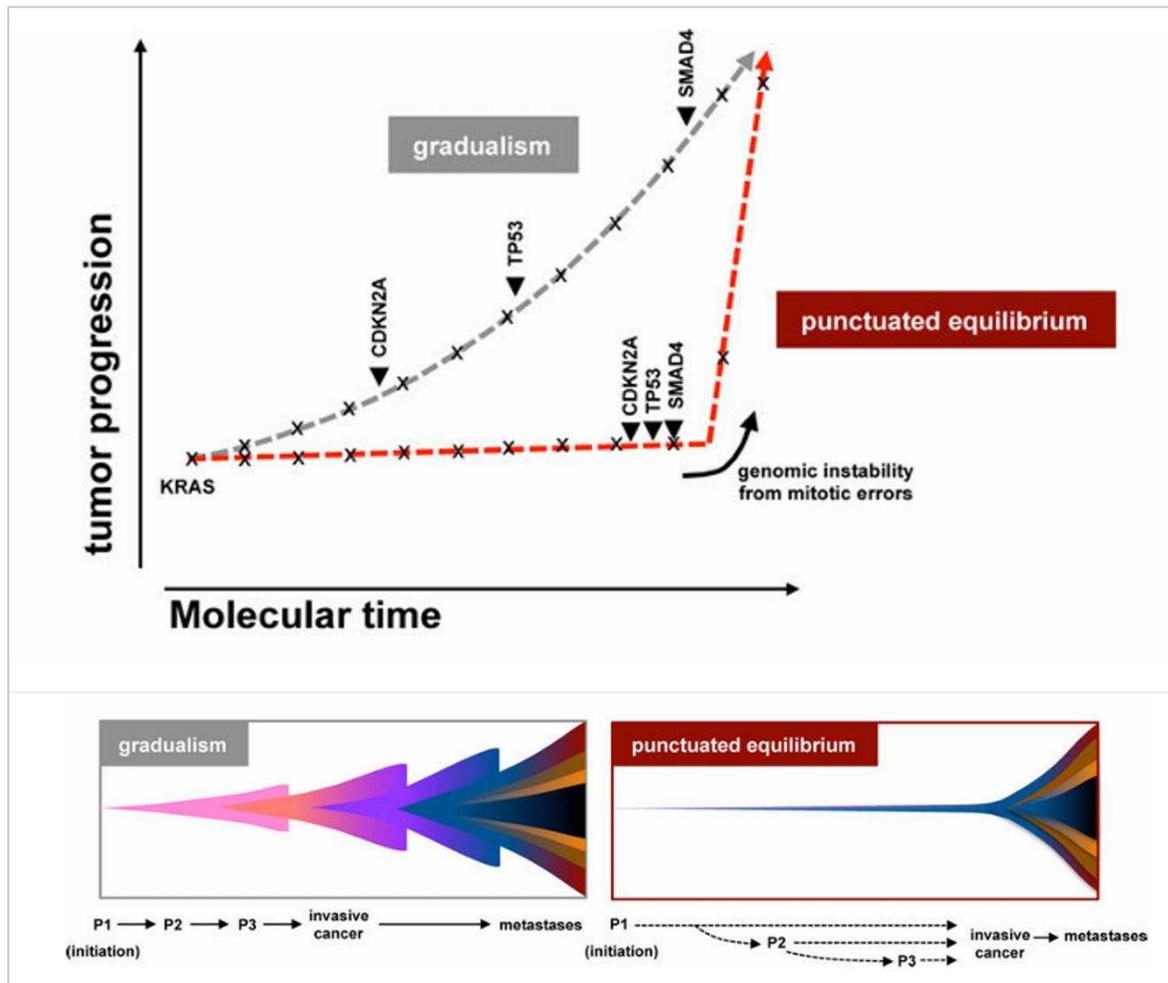


Figura 7: Modelli di progressione del PDAC. La figura illustra il classico modello dell'evoluzione graduale (in grigio) e il modello alternativo di progressione scandita (in rosso). Nel primo, si assiste a un periodo di latenza tra le mutazioni driver e i molteplici eventi trasformanti richiesti per lo sviluppo del tumore. Nell'equilibrio scandito, lo sviluppo tumorale include gli eventi di inizio tumorale e quelli di trasformazione tumorale. In questo modello, la maggior parte delle mutazioni (indicate con x) si svilupperebbe in una fase piuttosto estesa mentre la trasformazione legata a instabilità genetica (indicata con le punte delle frecce) conduce rapidamente al tumore invasivo e alla metastasi [46].

3.7.2. Alterazioni genetiche nei tumori primari

❖ *Mutazioni somatiche semplici e geni driver*

L'analisi di mutazioni puntiformi e piccole inserzioni e delezioni, chiamate mutazioni somatiche semplici, ha rivelato la presenza di quattro geni comunemente alterati nei pazienti colpiti da PDAC: KRAS nel 90% dei casi, TP53 nell'80%, CDKN2A nel 60% e SMAD4 nel 40%. Questi sono seguiti da geni che presentano alterazioni con una frequenza superiore a quella attesa ma una bassa prevalenza individuale, tra i quali ARID1A, KDM6A, RNF43, TGF- β e TGFBR2, GNAS, MAP3K21, BRAF e SMARCA4, ACVR2A, ACVR1B e NRAS. I geni più frequentemente mutati nelle lesioni PanIN sono anche quelli più diffusi nel PDAC. I quattro geni driver principali hanno l'impatto maggiore sulla progressione del PDAC. Inoltre, l'elevata frequenza delle mutazioni a carico di KRAS unitamente all'attivazione precoce dello stesso gene implica che l'attivazione oncogenica della via di segnalazione RAS guidi l'iniziazione del PDAC [45].

❖ *Varianti strutturali, alterazioni del numero di copie e instabilità genomica.*

Varianti strutturali quali alterazione del numero di copie e riarrangiamenti cromosomici sono stati associati alla progressione del PDAC. La ricorrente acquisizione o perdita del numero di copie colpisce alcuni noti oncogeni, tra cui KRAS, GATA6, MET, NOTCH1, ERBB2, AKT2, MYC e alcuni oncosoppressori che includono CDKN2A, SMAD4, TP53, BRCA1, ARID1A, PTEN, PBRM1 e SMARCA4. Inoltre, nel PDAC sono stati identificati cambiamenti cromosomici associati a errori mitotici quali poliploidia e cromotrips. Poiché la cromotrips può indurre acquisizione e perdita simultanea e non sequenziale di numerosi geni driver, in alcuni casi, i pattern d'instabilità genomica osservati sono affini a un modello di progressione puntata [43].

❖ *Evoluzione clonale e progressione tumorale*

Prevalenza e distribuzione delle alterazioni genetiche in vari tipi di tumore sono rappresentate metaforicamente come montagne e colline nel paesaggio genomico neoplastico. Tale scenario nel tumore pancreatico è dominato da quattro grandi montagne, ognuna delle quali alterata nella

maggior parte dei pazienti e considerata driver inequivocabile per l'iniziazione e la progressione del PDAC.

Nowell descrisse elegantemente l'evoluzione della crescita tumorale intesa come un processo Darwiniano adattivo guidato da mutazioni somatiche con selezione subclonale. A causa dei normali tassi di errore della replicazione del DNA, ogni divisione cellulare risulta in tre mutazioni somatiche, la maggior parte delle quali colpisce regioni intergeniche senza arrecare conseguenze funzionali. L'aumentato tasso di mutazione che può essere indotto dall'esposizione ad agenti mutageni (esogeno) o a instabilità genetica (endogeno) accelera tale sistema di evoluzione Darwiniana fornendo ulteriore variabilità genetica.

All'inizio della neoplasia una mutazione somatica conferisce un vantaggio selettivo di crescita, seguito dall'espansione clonale. Nel corso della tumorigenesi mutazioni somatiche aggiuntive si fissano clonalmente in quanto forniscono un vantaggio in termini di sopravvivenza, ad esempio aumentata proliferazione, resistenza all'apoptosi o evasione dal sistema immunitario.

Nel caso dello sviluppo dell'adenocarcinoma del dotto pancreatico l'evento iniziale è probabilmente una mutazione somatica su un hotspot oncogenico chiave. Le mutazioni KRAS si presentano precocemente nella cancerogenesi pancreatica, in quanto loro alterazioni sono osservabili in tutti i gradi delle lesioni PanIN. La proporzione di cellule con una mutazione KRAS aumenta gradualmente all'aumentare del grado di displasia riflettendo probabilmente l'espansione clonale nel tempo. Questa osservazione è applicabile anche agli altri geni driver quali CDKN2A, TP53 e SMAD4 in cui il numero di cellule con alterazioni cresce al passare dalle lesioni PanIN di alto grado al carcinoma invasivo. Seppure il ruolo critico dei geni driver nella tumorigenesi pancreatica sia ben stabilito, l'ordine esatto e il ritmo al quale queste alterazioni si manifestano è intensamente dibattuto. Il modello di progressione graduale per la tumorigenesi pancreatica è stato recentemente messo in discussione alla luce del fatto che un singolo evento di cromotripsia può portare alla perdita simultanea di numerosi geni oncosoppressori. Il modello di evoluzione puntata può parzialmente spiegare la rapida progressione della malattia osservata in alcuni pazienti con

tumore pancreatico. Tuttavia, sebbene tali eventi cromosomici catastrofici possano guidare la progressione tumorale in alcuni sottogruppi di pazienti, non è utile a spiegare il tipico accumulo di mutazioni driver riscontrate all'interno della maggior parte delle lesioni precursori.

Un ulteriore passo evolutivo nel destino di una cellula tumorale è la disseminazione e l'espansione su siti a distanza. Per spiegare la formazione di metastasi sono stati proposti due modelli complementari:

- il modello di progressione lineare descrive un accumulo graduale di cambiamenti genetici fino all'acquisizione da parte di una cellula di autonomia di distacco dal tumore primario;
- il modello di progressione parallela prevede una diffusione precoce e un accumulo indipendente di cambiamenti genetici sia al sito primario che metastatico.

Nel PDAC le mutazioni sui geni driver sembrano essere uniformi tra tumori primari e metastasi a distanza. Modelli matematici costruiti sui dati di sequenziamento suggeriscono un'ampia finestra temporale tra l'iniziazione tumorale e l'acquisizione di abilità metastatica. Tali riscontri sono a supporto del modello di progressione lineare che predomina nel PDAC, caratterizzato da una disseminazione tardiva di specifici subcloni metastatici dal tumore primario [47].

3.7.3. Vie di segnalazione coinvolte nella cancerogenesi pancreaticca

❖ *Oncogene KRAS*

Mutazioni puntiformi a carico del gene *Kras* sono presenti nella maggior parte dei pazienti con PDAC, rappresentano l'alterazione genetica più primitiva e originano nelle lesioni pancreatiche precoci, come le PanIN di basso grado. Per avere costante proliferazione e sopravvivenza, le cellule tumorali pancreatiche necessitano della continua segnalazione di *Kras*. In normali condizioni fisiologiche l'oncogene si trova in uno stato inattivato. Tuttavia, mutazioni a suo carico risultano in un'attivazione costitutiva del gene: una volta attivata, la segnalazione di KRAS si propaga a valle e coinvolge vari pathway effettori della sua segnalazione quali Raf/MAPK/Erk, PI3Ks/(PDK-1)/Akt, RalGEFs e fosfolipasi C ϵ , portando a incrementate divisioni cellulari, crescita,

differenziamento e sopravvivenza e attivando l'invasione neoplastica e la metastasi. Numerosi studi in vivo hanno dimostrato come le mutazioni attivanti sul gene KRAS costituiscano il processo iniziale della tumorigenesi pancreatico. Tuttavia, osservazioni condotte su modelli murini testimoniano che KRAS mutato da solo non sia in grado di risultare nel PDAC ma che sia necessaria la partecipazione di altri fattori [33,48].

❖ *Oncosoppressori TP53, SMAD4/DPC4 e P16/CDKN2A*

Nel tumore pancreatico l'oncosoppressore più frequentemente attivo è P16/CDKN2A che blocca l'ingresso nella fase S del ciclo cellulare.

SMAD4 esercita un ruolo chiave nella trasduzione del segnale nel pathway del TGF- β ed è inattivato nel 55% dei pazienti con tumore pancreatico. La perdita dell'attivazione di SMAD-4 conferisce vantaggio di crescita alle cellule tumorali pancreatiche dello stadio PanIN tardivo attraverso l'annullamento del segnale guidato da TGF- β . I pazienti sottoposti a resezione chirurgica che presentino il gene SMAD-4 attivo, presentano una sopravvivenza maggiore.

TP53 è inattivato nel 50 – 75% dei pazienti con PDAC. Le mutazioni a carico di TP53 risultano nella perdita delle sue funzioni e conseguentemente nel vantaggio di sopravvivenza e crescita da parte delle cellule che portano aberrazioni cromosomiche nello stadio PanIN tardivo.

L'inattivazione di CDKN2A e di TP53 risulta nell'instabilità genetica dovuta alla rimozione dei punti di controllo del ciclo cellulare. Inoltre, l'effetto immunosoppressore dell'inattivazione della TP53 può potenziare la progressione del PDAC. L'acquisizione di queste mutazioni risulta nella progressione delle PanIN nel tumore pancreatico [33,48].

❖ *Segnalazione mediata da recettori dei fattori di crescita*

Alcuni fattori di crescita e loro recettori sono iperespressi nel tumore pancreatico. Questi includono: EGF e EGFR, FGF e FGFR, IGF e IGFR, PDGF, VEGF e RAGE.

EGFR è un recettore intracellulare attivato dall'interazione con i suoi ligandi EGF e TGF- α . L'iperpressione di tale molecola è stata riscontrata nel 90% dei pazienti PDAC e gioca un ruolo

significativo nelle recidive e nelle metastasi epatiche. In numerosi tumori il fattore di crescita insulinico (IGF) e i suoi ligandi sono stati identificati come fattori pilota nella regolazione dell'angiogenesi, dell'invasione e della sopravvivenza cellulare. L'espressione prominente di IGF1 e IGF1R è stata associata a ridotta sopravvivenza e stadio avanzato nel PDAC. In una sottoclasse di tumori pancreatici l'iperespressione dei recettori FGFR-1 e FGFR-2 e dei loro ligandi contribuisce all'angiogenesi e alla mitogenesi. Al VEGF è associata l'induzione della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule endoteliali mediata dal legame con i suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2. Elevata espressione dell'mRNA di VEGF è stata osservata nei tessuti colpiti da adenocarcinoma pancreatico ed è stata correlata con la progressione della patologia. Il recettore per i prodotti finali della glicazione (RAGE) appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline transmembrana e gioca un ruolo speciale nella tumorigenesi pancreatico e nel conferimento della resistenza ai farmaci [48].

3.8. LA TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE NEL PDAC

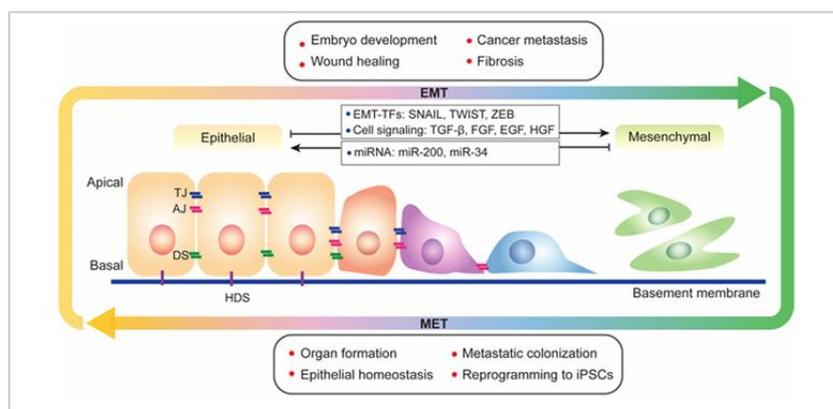


Figura 8: la transizione epitelio-mesenchimale e il suo processo inverso [49]

Evidenze recenti dimostrano che la disseminazione delle cellule cancerose dal tumore primario del pancreas e le metastasi epatiche si manifestano prima ancora che la malattia sia stata diagnosticata, presumibilmente durante gli stadi iniziali della stessa. La maggior parte delle morti correlate a tumore pancreatico ha luogo poiché nella malattia metastatica la Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT) concorre alla rapida progressione della patologia. Durante l'EMT le cellule epiteliali perdono i marcatori E-caderina, occludina, claudina, laminina-1 e acquisiscono marcatori mesenchimali quali N-caderina, vimentina e fibronectina. Nel contesto tumorale l'EMT è ritenuta necessaria ai fini dei processi di intravasazione, extravasazione, invasione e metastasi in generale. Durante la progressione del tumore la transizione epitelio-mesenchimale è guidata da una fitta rete di vie di segnalazione che coinvolge sia componenti non solubili (acido ialuronico e collagene) sia fattori solubili della matrice cellulare (Wnt, FGF, HGF, Notch, membri della famiglia del TGF- β , TNF- α e HIF1- α). L'induzione di fattori di trascrizione quali Snail 1/2, Zeb-1/2 e membri della famiglia bHLH (E12, E-47 e Twist) rappresenta l'evento primario di segnalazione associato all'EMT. La repressione del gene CDH1 che codifica per la E-caderina è una caratteristica comune dei fattori di trascrizione pre-menzionati e costituisce un importante passo primario nella transdifferenziazione dal fenotipo epiteliale a quello mesenchimale, nell'invasione e nella metastasi [49].

3.9. CELLULE STAMINALI TUMORALI (CSC)

3.9.1. Cellule staminali e cellule staminali tumorali

Le cellule staminali (SCs) presentano due caratteristiche essenziali: l' autorinnovamento, che risulta dall' illimitata capacità proliferativa, e il differenziamento, ovvero l' abilità di dare luogo a differenti tipi cellulari. In virtù di tale potenziale differenziativo, le SCs vengono classificate in totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti e unipotenti. Le prime presentano il più elevato potenziale differenziativo, sono tipiche dello zigote e dei primi stadi dello sviluppo embrionale e sono in grado di dare origine sia all' embrione che ai suoi annessi. Le cellule che derivano dalla massa interna della blastocisti sono pluripotenti e possono dare origine a tutte le strutture embrionali ma non agli annessi extra-embryonali. Queste vengono comunemente definite cellule staminali embrionali (ESCs). Al progredire dello sviluppo, il potere differenziativo si riduce. Le cellule staminali adulte (ASCs) sono multipotenti o unipotenti, si riscontrano in un gran numero di tessuti e persistono per l' intera durata della vita. Il loro ruolo è quello di contribuire all' omeostasi tissutale. Tali cellule possono auto-rinnovarsi ma non possiedono un' illimitata capacità replicativa [50,51].

Le cellule staminali tumorali (CSCs) costituiscono una sottopopolazione di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità, in grado di dare inizio e ricapitolare il tumore primario a seguito di passaggi seriali su topi immunodeficienti [52]. Tale sottopopolazione contribuisce alle fasi di inizio, progressione e metastasi del tumore, alla resistenza ai farmaci chemioterapici e alle recidive tumorali.

Sebbene le CSCs condividano numerosi pathway con le cellule staminali normali (NSC), subiscono riprogrammazione e deregolazione di alcune vie di segnalazione. Infatti, esse sfuggono ai meccanismi di controllo che regolano i pathway della staminalità e questo risulta nella tendenza a proliferare in modo incontrollato, dando luogo a popolazioni con fenotipo molecolare e cellulare alterato [53,54]. Un' ulteriore importante differenza tra NSCs e CSCs è la progenie: le prime differenziano in cellule progenitrici che a loro volta proliferano rapidamente, dando luogo a vari

tipi cellulari che non conservano a lungo la capacità proliferativa. Al contrario, la progenie tumorale che deriva dalle CSC possiede un potenziale proliferativo e di sopravvivenza essenzialmente illimitato e con maggiore plasticità rispetto alle cellule derivanti dalle NSCs.

La frequenza delle CSC varia considerevolmente in funzione del tipo di tumore considerato, oscillando tra una popolazione dell'1% nella leucemia mieloide acuta e nel carcinoma epatico fino all'82% che si osserva nella leucemia linfoblastica acuta [54].

3.9.2. Il ruolo delle CSC nei modelli di cancerogenesi

In virtù della capacità di autorinnovarsi e amplificarsi in maniera incontrollata, le CSCs possono dare luogo a popolazioni molto eterogenee di cellule tumorali, complicando la prognosi e la risposta alle terapie antitumorali. Attualmente, l'origine, il mantenimento, l'eterogeneità e la progressione tumorale vengono spiegati da due distinti modelli i quali, benchè siano dissimili e attribuiscono un peso differente alle CSC e al microambiente, non sono mutuamente esclusivi [54].

❖ *Modello dell'evoluzione clonale o stocastico*

Per il modello stocastico della cancerogenesi tutte le cellule cancerose sono inizialmente biologicamente equivalenti. Poiché tali cellule sono geneticamente instabili possono accumulare, nel tempo, alterazioni genetiche ed epigenetiche che incrementano l'aggressività del tumore, l'invasività e la resistenza ai farmaci chemioterapici. Una selezione operata sui nuovi tratti acquisiti può quindi incrementare l'eterogeneità tumorale e guidare la progressione della patologia. [54]

❖ *Modello gerarchico o delle CSC*

Il modello gerarchico afferma che una piccola sottopopolazione di cellule staminali all'interno del tumore è in grado di autorinnovarsi e differenziarsi in vari tipi cellulari, con abilità e fenotipo differenti. Come risultato del processo di differenziamento a partire da cellule staminali, i tumori sono caratterizzati da una gerarchia di tipi cellulari che includono CSC altamente tumorigeniche dalle quali trovano origine progenitori intermedi e cellule figlie differenziate. Per il modello gerarchico, tali CSC sono l'origine della tumorigenesi e dell'eterogeneità tumorale [52,54].

❖ *Modello di plasticità*

Un modello alternativo basato sulla plasticità cellulare fornisce un quadro di riferimento unificante che correla i modelli precedentemente descritti, postulando che le cellule tumorali possano interconvertirsi tra il fenotipo staminale e quello differenziato. Sulla base del modello di plasticità, processi intrinseci delle cellule tumorali o stimoli provenienti dal microambiente tumorale possono indurre cellule tumorali differenziate a riacquisire i tratti delle cellule staminali. Al contrario, queste ultime possono differenziarsi a cellule tumorali non staminali. Tale modello correla i concetti di plasticità e staminalità all'EMT.

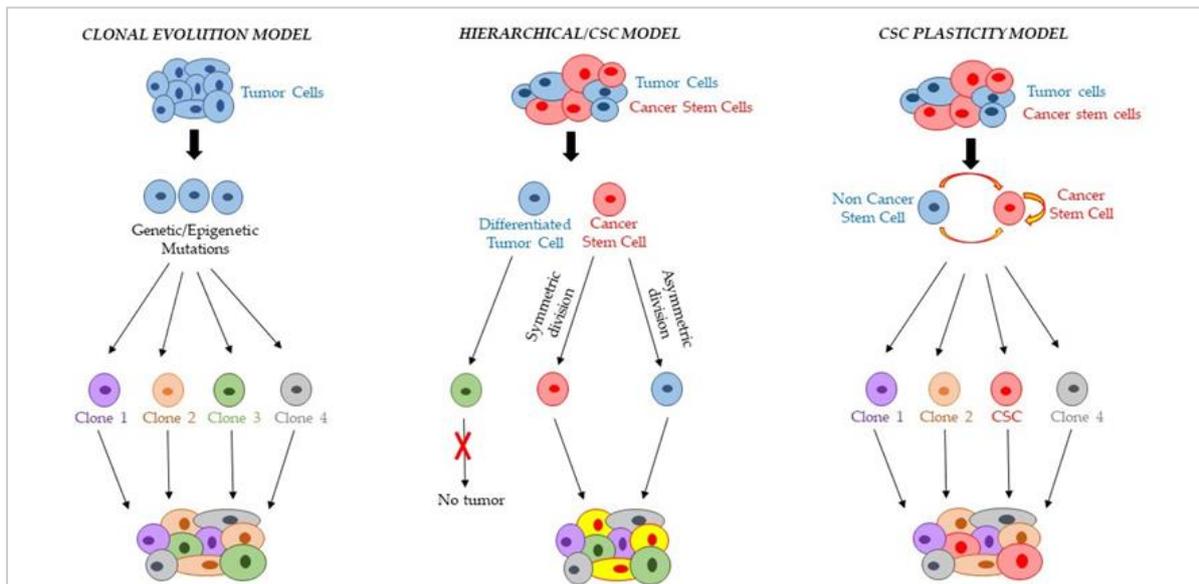


Figura 9: Differenti modelli di cancerogenesi ed eterogeneità tumorale. Sulla base del modello di evoluzione clonale tutte le cellule in un tumore hanno lo stesso potenziale tumorigenico. Le cellule possono acquisire mutazioni genetiche ed epigenetiche, generando diversi cloni con la medesima proprietà tumorigenica. Al contrario, per il modello gerarchico, solo le CSCs possono iniziare e supportare la crescita tumorale. Le CSCs possono indurre l'eterogeneità tumorale attraverso divisioni asimmetriche e simmetriche. Queste ultime sono responsabili del mantenimento delle CSCs. Per il modello di plasticità la gerarchia tumorale è molto dinamica: le cellule plastiche sono in grado di modificare il loro fenotipo da staminale a non staminale sulla base di stimoli intrinseci ed estrinseci, inducendo a loro volta l'eterogeneità tumorale [55].

3.9.3. Ruolo del microambiente

Le NSCs si riscontrano all'interno di microambienti che fungono da reservoirs per rimpiazzare le cellule perse a causa del danno o dell'invecchiamento cellulare. Durante la tumorigenesi il microambiente delle NSC può rappresentare un rifugio per le CSC e diventare una riserva di cellule tumorali tale da costituire ad esempio, la causa di recidive tumorali [54]. Il microambiente tumorale è un mezzo complesso all'interno del quale è possibile distinguere compartimenti cellulari e acellulari. I primi sono caratterizzati sia da cellule maligne che non maligne come macrofagi associati a tumore, linfociti B e T, linfociti Natural Killer, linfociti T Natural Killer, cellule dendritiche, neutrofili associati al tumore, cellule soppressorie di derivazione mieloide, cellule endoteliali e fibroblasti associati a tumore. La componente acellulare si identifica nella presenza di varie molecole che includono citochine, chemochine, vescicole e componenti della matrice extracellulare. I vari elementi costitutivi del microambiente tumorale collaborano per evadere dal sistema immunitario e minimizzare gli effetti delle terapie.

Il microambiente tumorale esercita un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione del tumore. Una complessa rete di segnalazione intercellulare tra le CSC e i costituenti del microambiente modula i pathway di segnalazione intracellulari delle CSC per promuovere la staminalità, la plasticità, la transizione epitelio-mesenchimale e la metastasi. In alcuni tumori la relazione tra CSC e microambiente è bidirezionale con elementi del microambiente che influenzano il comportamento delle CSC mentre queste ultime modificano reciprocamente il loro stesso microambiente. Le interazioni immuno-mediate, l'angiogenesi e la secrezione di fattori di regolazione sono alcuni tra i processi che concorrono al ruolo del microambiente nella crescita tumorale. [54,56]

3.10. CELLULE STAMINALI TUMORALI E PDAC

3.10.1. Il microambiente tumorale nel PDAC

Il microambiente del PDAC è caratterizzato da uno stroma denso per la presenza di fibroblasti associati a tumore (CAFs) che costituiscono il 90% della sua massa. L'abbondanza di CAFs deve la sua origine alle cellule stellate del pancreas, che si attivano a seguito di un danno o di infiammazione cronica. I CAFs rilasciano grandi quantità di matrice extracellulare (ECM) che include acido ialuronico e collagene. Questo contribuisce alla formazione di una barriera densa e solida che previene l'infiltrazione delle cellule del sistema immunitario. Tale stroma non solo rende complesso il trasporto dei farmaci chemioterapici ma determina un aumento di pressione interstiziale che induce ipossia e ipovascolarizzazione, elementi chiave del TME del PDAC.

Il microambiente del PDAC è altamente innervato. Infatti, le cellule tumorali rilasciano neurotrofine per facilitare l'infiltrazione neurale e la crescita del tumore. Le cellule immunitarie più abbondanti del PDAC sono i macrofagi associati a tumore (MATs), le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs) e linfociti-T regolatori. I macrofagi con fenotipo M2-like, i linfociti T-regolatori e le MDSCs bloccano o sopprimono l'infiltrazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ nel microambiente del PDAC, creando un ambiente fortemente immunosoppressivo [56].

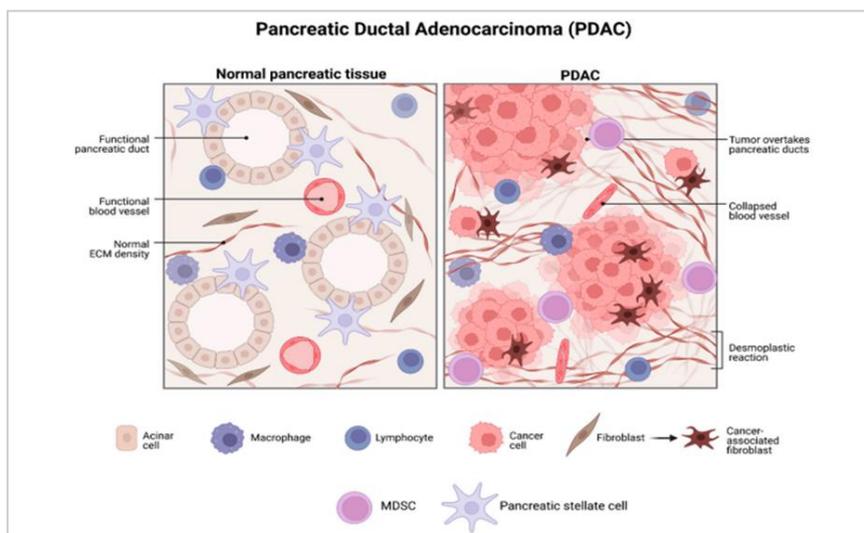


Figura 10: Rappresentazione schematica del microambiente nel pancreas normale (sinistra), caratterizzato da regolare architettura tissutale, e microambiente nel PDAC (destra). In quest'ultimo si riscontrano zone fortemente desmoplastiche, architettura pancreatica irriconoscibile, infiltrazione immunitaria, abbondanza di cellule stromali, grandi quantità di ECM e assenza di vasi sanguigni (ambiente ipossico).

3.10.2. Cellule staminali tumorali pancreatiche

Nel 2007 Li et al. hanno identificato la prima sottopopolazione di cellule staminali tumorali pancreatiche (PaCSCs) rappresentative dell'1% di tutte le cellule cancerose nel PDAC. In particolare, identificarono una sottopopolazione di cellule cancerose pancreatiche le quali, in qualità di PaCSCs, presentavano la specifica combinazione CD44+CD24+ESA+ di marcatori cellulari di superficie. Studi successivi hanno dimostrato che le PaCSCs possono essere identificate attraverso numerosi biomarcatori [57].

❖ *CD44*

Si tratta di una glicoproteina transmembrana coinvolta in un gran numero di funzioni cellulari. CD44 è recettore di membrana per l'acido ialuronico e l'interazione con il suo ligando ne induce un cambio conformazionale cui segue l'attivazione di molteplici vie di segnalazione intracellulare (Ras, MAPK, PI3K) associate alla promozione della proliferazione cellulare, dell'adesione, della migrazione e dell'invasione. Nel PDAC, tale molecola è iperespressa nelle biopsie patologiche rispetto alla controparte sana; inoltre, il marcatore è stato associato a chemioresistenza [58,59].

❖ *EpCAM o CD326*

La molecola di adesione epiteliale, nota anche come antigene epiteliale specifico (ESA) o EpCAM, è stata riscontrata in vari tumori. Nel PDAC avanzato, elevati livelli di EpCAM sono stati correlati a una ridotta sopravvivenza [59]. Il suo ruolo nel contesto tumorale è associato all'attivazione della trascrizione di geni responsabili della proliferazione cellulare (c-Myc e cicline A ed E) e all'inibizione della risposta immunitaria reagendo con il recettore LAIR1 [58]. Infine, si stima che l'espressione di EpCAM sia parallela al processo EMT, alla metastasi e all'espressione di altri marcatori di staminalità [58].

❖ *CD133*

CD133 o Prominina-1 è una glicoproteina transmembrana riconosciuta come marcatore di CSC in differenti tumori. Tale molecola regola un ampio spettro di vie di segnalazione che includono Akt,

Bcl-2, Src, Ras e i suoi effettori a valle, tra cui ERK, JNK, PI3K, STAT3 e p38K. Per il suo coinvolgimento con i pathway Notch e Sonic Hedgehog (Shh), è stata correlata ad alterazioni a carico del ciclo cellulare, a resistenza ai farmaci e alla crescita indipendente dall'ancoraggio. Attraverso la reazione con HDAC6, β -catenina e α -tubulina, CD133 favorisce l'attivazione della via di segnalazione Wnt promuovendo il processo EMT il quale, a sua volta, favorisce l'invasività delle cellule tumorali e la metastasi [58,60]. Nel PDAC, l'espressione tissutale di CD133 è correlata con un'incrementata velocità di invasione linfatica e metastasi nodali, unitamente a una ridotta sopravvivenza a 5 anni [58].

❖ *CxCR-4*

CXCR-4 è un recettore accoppiato a proteina G ed è uno dei più comuni nelle patologie tumorali. Nel PDAC è direttamente implicato nell'invasione e nella metastasi, in virtù del crosstalk con Akt, ERK, c-myc, β -catenina, NF- κ B, e p53. L'attivazione di CXCR-4 contribuisce alla chemioresistenza, alla promozione dell'EMT e all'acquisizione del fenotipo staminale da parte delle cellule tumorali. Nel PDAC, l'espressione di CXCR-4 sulla superficie delle cellule tumorali può condurre le cellule metastatiche verso i tessuti che esprimono SDF-1, suo ligando. Inoltre, l'iperespressione di CXCR-4 è associata a prognosi infausta, ridotta sopravvivenza complessiva, e aumentata probabilità di recidive [58,59,60].

❖ *CD24*

Il CD24 è una piccola proteina di membrana ancorata al glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Nelle lesioni precancerose del pancreas, la sua espressione tende a incrementare all'aumentare del grado di atipia cellulare. CD24 supporta la motilità, l'invasione, la diffusione e la metastasi. Regola, inoltre, l'attività del pathway Wnt/ β -catenina [58,59, 60].

❖ *ALDH1*

Le cellule staminali tumorali sono caratterizzate dall'espressione dell'enzima aldeide-deidrogenasi 1. La forma ALDH1A1 contribuisce alla sopravvivenza delle CSCs riducendo la quantità di ROS,

i quali inibiscono la metilazione del DNA e i meccanismi di riparo. Bassi livelli di ROS permettono alle CSCs di evitare l'apoptosi. Le cellule ALDH1+ manifestano una capacità clonogenica superiore rispetto a quelle ALDH1-, sono altamente tumorigeniche e vanno incontro a EMT [53,58].

❖ *C-Met*

Si tratta di un recettore tirosin-chinasico la cui stimolazione anomala avvia il programma di crescita invasiva all'interno delle cellule tumorali. L'interazione con il suo ligando, il fattore di crescita degli epatociti (HGF), stimola l'attivazione di una serie di pathway, tra cui PI3K/Akt, (JAK)/STAT, Ras/ MAPK, Src e Wnt/ β -catenina associati a proliferazione, resistenza all'apoptosi, EMT, angiogenesi, invasione e metastasi. Nelle neoplasie pancreatiche, c-Met è coinvolto nell'interazione tumore-stroma, nella resistenza alla gemcitabina e nella metastasi. Dal punto di vista clinico, l'iperespressione di C-Met rappresenta un fattore prognostico avverso nei pazienti con PDAC e presenta una diretta correlazione con lo stadio tumorale e la ridotta sopravvivenza [60].

❖ *DCLK-1*

All'interno della ghiandola pancreatica, DCLK-1 è espresso nell'epitelio acinare. In condizioni fisiologiche, le cellule DCLK-1+ assicurano la rigenerazione del pancreas a seguito di un danno o di pancreatite cronica. Inoltre, l'iperespressione della molecola è responsabile della regolazione di numerosi pathway intracellulari coinvolti nella trasformazione maligna del tessuto pancreatico e dovuti principalmente a meccanismi mediati da microRNA. Le cellule del PDAC DCLK+ mostrano capacità tumorigeniche e sono in grado di formare organoidi. Evidenze testimoniano il suo coinvolgimento nel processo EMT [58,59,60].

3.10.3. Vie di segnalazione deregolate nelle CSC del pancreas

Le cellule staminali tumorali pancreatiche sono caratterizzate dall'attivazione aberrante di molteplici vie di segnalazione, normalmente attive durante lo sviluppo embrionale. La deregolazione delle vie Shh, Wnt, Notch, JAK-STAT, Nodal/Activin e Hippo permette alle CSC di mantenere l'autorinnovamento, di acquisire simultaneamente la chemioresistenza e incrementare le capacità tumorigenica e metastatica [58].

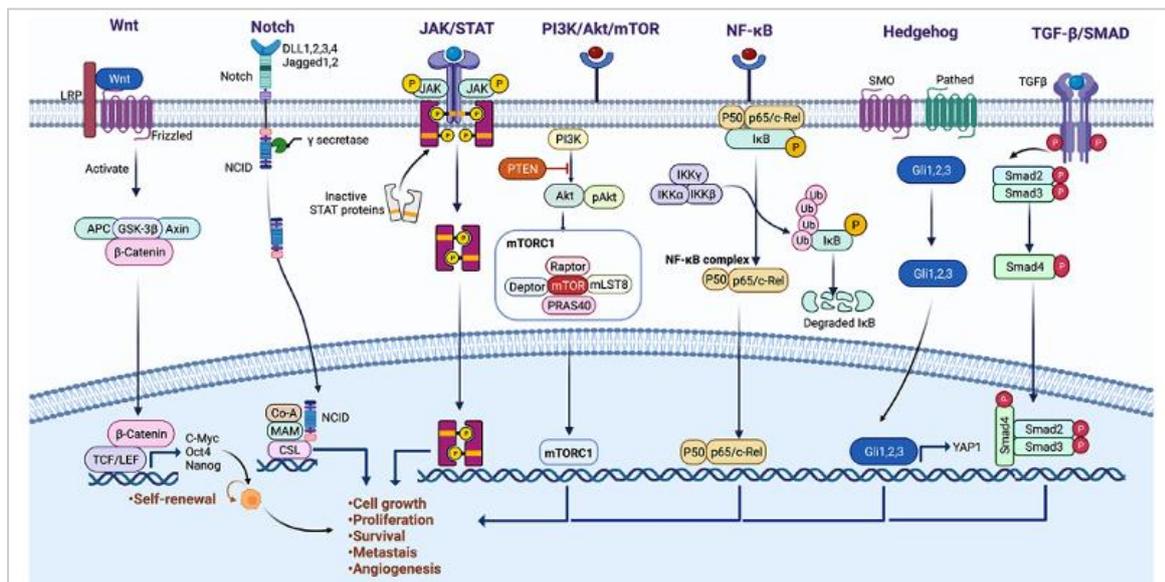


Figura 11: Alcune vie di segnalazione coinvolte nelle CSC del pancreas [61].

❖ Via di segnalazione Notch

Durante lo sviluppo embrionale, tale via di segnalazione è coinvolta nella regolazione dell'embriogenesi, del differenziamento cellulare, della morte programmata e della proliferazione. In condizioni fisiologiche, nel tessuto pancreatico umano adulto l'attività del pathway Notch è assente. Al contrario, le cellule cancerose esprimono varie molecole associate a Notch tra le quali i ligandi JAG1, JAG2, DLL1, DLL3, DLL4 e i recettori transmembrana Notch1-4. L'attivazione di Notch determina il rilascio di un dominio intracellulare che trasloca nel nucleo. A livello nucleare induce la trascrizione di geni target quali survivin, cMyc, Nanog, Oct-4 e Sox2, tramite i quali Notch contribuisce all'autorinnovamento delle PaCSC [57,58].

❖ *Via di segnalazione Hedgehog*

Il pathway Hedgehog (Hh) è il maggiore orchestratore dei processi riguardanti la morfogenesi, il controllo del differenziamento cellulare, la determinazione del destino cellulare, il mantenimento delle cellule staminali, dell'auto-rinnovamento e della polarità tissutale. Normalmente tale via di segnalazione cessa di funzionare al termine dell'embriogenesi, tuttavia, la sua riattivazione aberrante è stata associata all'invasività del PDAC e alla tumorigenesi. Il ligando Shh è espresso nel 70% dei tumori pancreatici e anche dalle PaCSCs. Gli eventi che seguono l'attivazione di tale via consistono nella trascrizione di geni responsabili dell'auto-rinnovamento cellulare, della proliferazione e della chemioresistenza [58,60].

❖ *Via di segnalazione Wnt*

La via di segnalazione Wnt è un pathway evolutivamente conservato ed esercita un ruolo cruciale sia nello sviluppo embrionale che nella cancerogenesi. La via Wnt/ β -catenina è uno dei principali pathway coinvolti nel differenziamento, proliferazione e mantenimento delle CSC. È possibile distinguere una via canonica β -catenina-dipendente e una via non-canonica β -catenina-indipendente. Entrambe le vie sono state correlate a cellule pancreatiche fortemente tumorigeniche, alla promozione della staminalità, del processo EMT e all'acquisizione di chemioresistenza; Wnt5A, un ligando della via non canonica, contribuisce alla sopravvivenza delle cellule tumorali riducendo l'apoptosi indotta dai trattamenti chemioterapici [57,58,60].

❖ *Hippo pathway*

Durante lo sviluppo del tessuto pancreatico il pathway Hippo regola il differenziamento e la proliferazione cellulare, l'apoptosi e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali. Tale via di segnalazione è sottoposta a molteplici meccanismi di controllo e all'interferenza mediata da distinti pathway molecolari che possono influenzare indipendentemente i suoi coattivatori trascrizionali, YAP o TAZ. L'accesso nucleare di tali molecole subisce una fine regolazione tale per cui le forme fosforilate delle stesse si accumulano al livello citoplasmatico e non raggiungono il nucleo. Al contrario l'assenza di fosforilazione è associata all'ingresso nucleare e all'attivazione della

trascrizione. Nel PDAC, la sovraregolazione di YAP e TAZ è associata ad un incremento dell'espressione di CD44, CD133, Sox2, Sox9, Nanog e ALDH, della chemioresistenza, dell'espressione del trasportatore ABCG2 e a maggiore clonogenicità. Inoltre, i due coattivatori trascrizionali mediano il processo EMT. Infatti, senza l'accumulo intranucleare di YAP e TAZ viene impedito ai tessuti epiteliali di acquisire il fenotipo mesenchimale; l'assenza di tale processo ha un impatto negativo sulla staminalità delle cellule tumorali [58].

❖ *Via di segnalazione JAK/STAT*

L'effetto regolatorio di questa via di segnalazione viene esercitato su proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi, angiogenesi, metastasi, evasione immunitaria e su pathway correlati a fattori di crescita. La via di segnalazione JAK/STAT comprende tre componenti principali:

1. Recettori che legano citochine e fattori di crescita; sono privi di attività chinasi ma associati a tirosin-chinasi.
2. Famiglia JAK di tirosin-chinasi (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2); quando un ligando interagisce con un recettore della via JAK/STAT, l'attivazione induce la fosforilazione di residui tirosinici su proteine target.
3. La famiglia dei fattori di trascrizione STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6); l'attivazione di tali molecole ne induce la traslocazione nucleare, dove attiva la trascrizione di specifici geni target.

Nei casi di PDAC è più comune riscontrare l'espressione di STAT3. Attraverso il pathway di JAK/STAT le cellule di PDAC acquisiscono un incrementato tasso proliferativo, in quanto tale via accelera la transizione tra la fase G1 ed S del ciclo cellulare. Senza l'attività di STAT3 le PaCSCs presentano una ridotta capacità di formare sferoidi tumorali e mantenere la staminalità [58].

❖ *Via di segnalazione Nodal/activin*

Il pathway Nodal/Activina fa parte della superfamiglia del TGF- β e gioca un ruolo significativo nel mantenere la pluripotenza delle ESCs e il differenziamento durante l'embriogenesi attraverso

l'induzione dei segnali di Oct4, Nanog, Wnt3, FGF. L'attivazione di questa via di segnalazione innesca la fosforilazione dei fattori Smad 2 e Smad 3. Questi ultimi si legano dando luogo a un complesso che reagisce con Smad 4, trasloca nel nucleo e innesca l'espressione genica. Le PaCSCs CD133+ esprimono le proteine Cripto 1,3 Activina e Nodal e un'aumentata espressione del recettore ALK4. Studi condotti sulla segnalazione Nodal/Activina nelle CSCs pancreatiche hanno dimostrato che l'inibizione di questo pathway determina una ridotta tumorigenicità delle PaCSCs, un decremento dell'abilità di formare sferoidi, dell'auto-rinnovamento e della resistenza alla gemcitabina [57,58].

❖ *Via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR*

Tale via di segnalazione esercita il suo controllo su proliferazione, angiogenesi, metabolismo e differenziamento. Si ritiene che il pathway PI3K/Akt/mTOR venga riattivato nelle PaCSCs. Uno studio recente ha infatti dimostrato come l'inibizione di questa via di segnalazione risulti nella riduzione delle caratteristiche staminali delle cellule cancerose e della progressione del PDAC [57].

❖ *Via di segnalazione MAPK-ERK*

Il pathway delle MAP chinasi esercita un ruolo fondamentale nel controllare una grande varietà di segnali che regolano la crescita cellulare e il differenziamento. Nel PDAC, la via KRAS trasduce il segnale a quella MAPK per regolare la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi. Infatti, le mutazioni KRAS attivano vie di segnalazione a valle come quella mediata dalle chinasi ERK, risultando nella trasformazione cellulare e nella tumorigenesi. Le CSC CD133+ mostrano un'incrementata fosforilazione di ERK1/2 dovuta all'aumentata segnalazione di MAPK. La segnalazione operata dalle chemochine CCL21 e CCR7, unitamente ai pathway ERK/NFκB, promuove il processo EMT e la metastasi del PDAC [62].

3.11. I microRNA (miRNA)

I microRNA costituiscono una superfamiglia di RNA non codificanti, evolutivamente conservati, a singolo filamento e con lunghezza compresa tra 19 e 24 nucleotidi. Le funzioni biologiche di tali molecole sono state estensivamente studiate, rivelando che i miRNA esercitano un ruolo di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica che si riflette sullo sviluppo embrionale, sul differenziamento cellulare, sul metabolismo, sull'organogenesi e sull'apoptosi [63]. L'osservazione che variazioni nei livelli di espressione dei microRNA siano frequenti in numerose patologie umane ha suggerito il ricorso a tali molecole come potenziali biomarcatori o target terapeutici [63,64].

3.11.1. Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNA

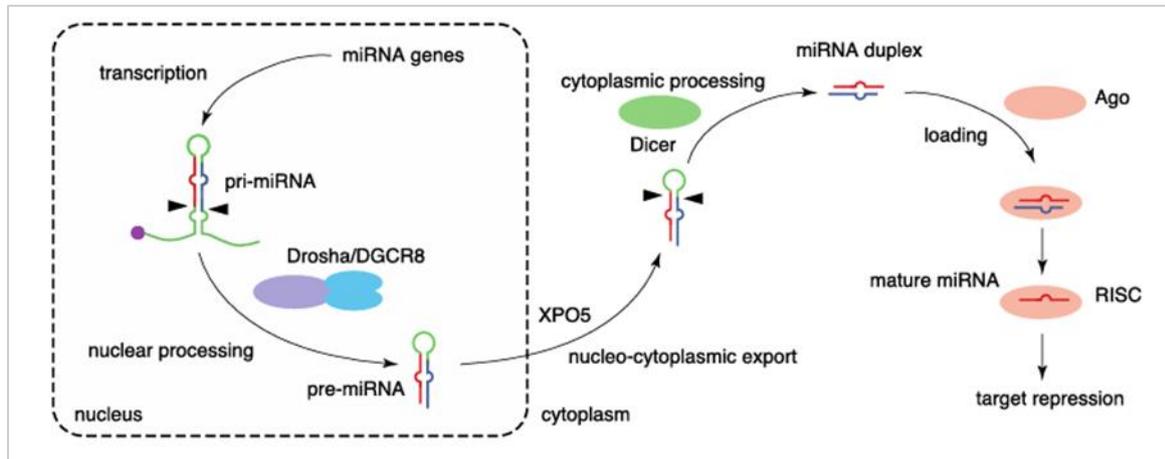


Figura 12: Biogenesi canonica dei microRNA. La biogenesi dei miRNA include molteplici fasi: la trascrizione dei trascritti primari, il processamento nucleare mediato da Drosha, l'esportazione nucleo-citoplasmatica ad opera di XPO5, il processamento citoplasmatico da parte di Dicer ed infine l'allestimento del complesso RISC con le proteine Ago.

La trascrizione dei microRNA avviene a partire da sequenze geniche non codificanti per proteine o da sequenze clusterizzate codificanti per microRNA. Inoltre, sequenze per i microRNA si possono riscontrare su introni codificanti per proteine. In questo caso si parla di miRNA intergenici e verranno trascritti con il gene ospite e processati separatamente per produrre microRNA maturi e indipendenti [65,66].

La biogenesi dei microRNA ha inizio all'interno del nucleo con la trascrizione, operata dall'RNA polimerasi II, del gene miRNA-codificante per ottenere il trascritto primario (pri-miRNA). Il pri-miRNA viene processato da un complesso proteico chiamato Microprocessore che consiste di una

proteina chiamata DGCR8 capace di legare l'RNA a doppio filamento e dalla ribonucleasi Drosha: DGCR8 lega il terminale a singolo filamento del pri-miRNA e orienta il dominio catalitico della ribonucleasi in maniera tale da tagliare il trascritto e rilasciare il pre-miRNA, che presenta una struttura ansa-stelo (stem-loop) e una lunghezza pari a 60 - 100 nucleotidi. I pre-miRNA vengono trasportati al citoplasma dalle proteine trasportatrici Exportina-5 (XPO-5) e Ran-GTP6 [67,68].

Nel citoplasma, il pre-miRNA viene processato dall'enzima Dicer, una ribonucleasi di classe III, che agisce in associazione alla proteina TRBP per ottenere una molecola di RNA a doppio filamento (miRNA-duplex) lunga circa 20 nucleotidi: un filamento è chiamato "filamento principale" e l'altro "passeggero". Il miRNA-duplex viene caricato sulla proteina Argonata (AGO) con l'aiuto delle chaperonine ATP-dipendenti. Queste ultime aiutano l'Argonata ad avere una conformazione aperta e ad alta energia, adeguata a legare il rigido miRNA-duplex. In seguito al caricamento del duplex, la proteina Ago ritorna al suo stato fondamentale e subisce un cambio conformazionale che favorisce l'espulsione del miRNA passeggero per formare una molecola di microRNA matura a singolo filamento [66,69]. La proteina AGO media l'assemblaggio di un complesso ribonucleoproteico chiamato RISC del quale la proteina è componente fondamentale. La formazione del complesso RISC stabilizza sia le proteine AGO che i microRNA. Il complesso formatosi lega preferenzialmente il 3'UTR del mRNA target, in maniera sequenza specifica, e induce la repressione del bersaglio [66,68]. Il riconoscimento dei target dei microRNA dipende da una sequenza di 2 - 7 nucleotidi. Per questa ragione, poiché la sequenza di riconoscimento è molto breve, un microRNA è capace di riconoscere centinaia di mRNA bersaglio [66]. Il tipo di interazione che si stabilisce tra il miRNA e il suo target influisce sul meccanismo d'inibizione del processo traduzionale. I più comuni meccanismi di silenziamento miRNA-mediato includono la degradazione del messaggero, il decapping o la deadenilazione [65].

3.11.2. Funzioni dei miRNA

I microRNA giocano ruoli significativi nella determinazione del destino cellulare e in numerose altre funzioni biologiche, dalla proliferazione alla morte cellulare: rappresentano componenti molecolari critiche per la cellula, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche [67]. Nel citoplasma l'RNA messaggero (mRNA) si trova nel milieu cellulare dei microRNA e viene sottoposto a differenti gradi di repressione. I miRNA innalzano uno strato di controllo genico post-trascrizionale il quale completa ed estende la regolazione dell'espressione genica. A tal proposito, i microRNA nei metazoi sono stati descritti come gli scultori del trascrittoma: la trascrizione e gli altri eventi nucleari innalzano una colonna di espressione genica e i microRNA la scalfiscono. Alle volte la loro funzione innesca o affina una transizione evolutiva; più comunemente aggiunge complessità e controllo all'architettura dell'espressione genica, garantendo livelli ottimali di proteine su ogni cellula di un tessuto [69].

3.11.3. I miRNA nel contesto patologico

Alterazioni nei pattern di espressione dei miRNA sono state riportate nel contesto di varie patologie umane, tra cui malattie cardiovascolari, metaboliche, diabete, nella patogenesi virale e nei tumori [63].

I microRNA sono stati correlati a numerosi processi che riguardano le fasi di inizio, progressione e metastasi tumorale [68]. Le alterazioni genetiche, le modificazioni epigenetiche e la regolazione della trascrizione sono alcuni tra i meccanismi proposti per spiegare il coinvolgimento dei microRNA nel contesto patologico. Nel 2004 è stato dimostrato che il 50% delle sequenze codificanti per tali molecole sono localizzate su siti fragili o loci di suscettibilità per i tumori. Si tratta di regioni frequentemente amplificate o soggette a delezioni durante la cancerogenesi e questo giustifica la riduzione dell'espressione dei miRNA nelle medesime condizioni. Inoltre, mutazioni che ne alterano la sequenza di riconoscimento possono disabilitare i miRNA che agiscono come oncosoppressori o permettere un'alterata selezione dei target contribuendo all'oncogenesi. Infine,

anche i geni codificanti per i microRNA subiscono variazioni epigenetiche significative nei tumori, in maniera simile a quanto accade sui geni che codificano per proteine [67].

In funzione del ruolo esercitato dal loro target molecolare durante la tumorigenesi, i microRNA possono agire come oncogeni (oncomiR) o come soppressori tumorali. Gli oncomiR sono generalmente sovraregolati nel contesto tumorale ed esercitano il loro ruolo di oncogeni reprimendo la trascrizione dei geni codificanti per un oncosoppressore. Al contrario, i miRNA oncosoppressori sono sottoregolati nelle patologie neoplastiche e agiscono su mRNA che codificano per oncogeni. È interessante osservare come lo stesso microRNA possa esercitare sia il ruolo di oncogene che di oncosoppressore, sulla base del tipo di tumore e del tessuto considerato [63].

3.12. I miRNA nel PDAC

3.12.1. I miRNA nell'adenocarcinoma del dotto pancreatico

Lo studio del coinvolgimento dei miRNA nel PDAC è stato affrontato su molteplici livelli, dall'influenza dei fattori di rischio sull'espressione di tali molecole fino all'espressione differenziale rapportata ai pathway deregolati in tale patologia. Numerosi studi epidemiologici hanno permesso di constatare come l'esposizione a fattori di rischio sia associata alla deregolazione di determinati miRNA e questo può essere direttamente o indirettamente correlato alla tumorigenesi [68]. I microRNA coinvolti nel PDAC possono agire sulle varie fasi della progressione tumorale.

- ❖ *Coinvolgimento dei miRNA nel ciclo cellulare e nella proliferazione delle cellule cancerose nel PDAC: – miRNA oncogeni e miRNA soppressori tumorali*

I miRNA regolano la proliferazione e il ciclo cellulare modulando l'espressione di oncogeni e oncosoppressori. Questo è il caso di miR-21, iperespresso nei casi di PDAC e negativamente correlato all'espressione di PTEN. Quest'ultimo è un oncosoppressore che ostacola la proliferazione delle cellule tumorali e controlla il numero di divisioni cellulari. Inoltre, nel PDAC è stata rilevata anche l'alterazione dei livelli di miRNA oncosoppressori, che regolano l'espressione di protooncogeni. MiR-124, la cui espressione è ridotta nei pazienti con PDAC, regola negativamente l'espressione di Rac1, oncogene della via MKK4-JNK-C-JUN, risultando nell'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali. Inoltre, la sottoregolazione di miR-124 è associata a prognosi infausta nei pazienti con PDAC. Alcuni miRNA regolano inoltre le chinasi ciclina - dipendenti (CDK) e i complessi ciclina che controllano la progressione del ciclo cellulare: l'iperespressione di miR-221 nel PDAC influenza la traduzione del gene CDKN1B, un inibitore delle CDK. MiR-424-5p è un'altra molecola oncogenica che regola negativamente la sintesi della proteina SOCS9, risultando nell'attivazione del pathway ERK. Le molecole miR-26a e miR-223 agiscono sulla Ciclina E, coinvolta nella transizione tra le fasi G1 ed S del ciclo cellulare. L'espressione aberrante di miR-143, let-7-d e miR-126 è stata correlata ad alterazioni nell'espressione dell'oncogene KRAS e a proliferazione anomala [68,70].

❖ *Coinvolgimento dei miRNA nell'inibizione dell'apoptosi nel PDAC*

L'apoptosi o morte cellulare geneticamente programmata è un meccanismo regolatorio cruciale per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Nelle cellule tumorali pancreatiche la via apoptotica è perturbata e questo conduce all'immortalità e alla resistenza agli agenti antitumorali, soprattutto quando colpiscono tali pathway. Numerosi miRNA sono in grado di indurre o inibire l'apoptosi. MiR-34a regola l'apoptosi agendo sui target Bcl-2 e sui modulatori della via Notch. Nei tessuti dei pazienti colpiti da PDAC, la sua espressione è fortemente ridotta o completamente abrogata, determinando l'iperespressione dei suoi target. L'incremento dei livelli di miR-155 nel PDAC regola negativamente l'espressione del suo target, il gene pro-apoptotico p53 (TP53INP1). L'effetto di tale molecola sul suo target si traduce nell'inibizione dell'apoptosi e nella promozione della crescita cellulare. La sottoregolazione di miR-203 nelle cellule cancerose del pancreas determina un incremento dei livelli di survivina, suo bersaglio, e inibisce l'apoptosi [68,70].

❖ *Coinvolgimento dei miRNA nell'invasione e nella metastasi nel PDAC*

La metastasi è un processo multifase ed è una delle principali cause di aggressività della patologia e di mortalità tra i pazienti colpiti. Ha inizio con il distacco delle cellule cancerose dal sito di origine seguito dall'invasione del circolo sanguigno o del sistema linfatico. L'invasione richiede la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) delle cellule tumorali, le quali infine colonizzano siti a distanza. Numerosi miRNA, soprattutto rappresentanti della famiglia di miR-200, sono coinvolti nella regolazione di tale processo (miR-141, miR-429, miR-200a, miR-200b, and miR-200c, miR-203, miR-208). L'iperespressione di miR-10a induce la metastasi attraverso la sottoregolazione dei fattori di trascrizione Homeobox (HOX B1, HOX B2, and HOX A1), soppressori della metastasi stessa. MiR-194, miR-429, miR-200b e miR-200c sono iperespressi nel PDAC metastatico e regolano negativamente EP300, un gene che inibisce il processo metastatico. L'iperespressione di miR-21 è stata associata a metastasi epatiche e ridotta sopravvivenza nei pazienti con PDAC.

Al contrario, miR-34b è sottoregolato nella metastasi: l'espressione di tale microRNA regola negativamente l'espressione di Smad3. MiR-143, che regola negativamente l'espressione di GEF1,

GEF2, K-RAS, MMP-2 e MMP-1 è sottoespresso nelle cellule tumorali pancreatiche durante l'invasione e la metastasi. La sottoespressione di miR-126 nel PDAC risulta nell'espressione aberrante del suo target, ADAM9. Il ripristino dell'espressione del microRNA esercita un effetto inibitorio del potenziale invasivo delle cellule tumorali e reverte l'EMT. Parallelamente, anche miR-146a che agisce sui target IRAK-1, EGFR e MTA-2, quando ripristinato è in grado di ridurre il potenziale metastatico delle cellule tumorali. Il declino graduale dell'espressione di miR-218 durante la progressione dall'epitelio normale a quello tumorale con metastasi linfonodali, ha suggerito che tale molecola possa esercitare un ruolo nella patologia metastatica. Infine, l'inibizione di miR-4295 risulta nella sovraregolazione del suo target, GPC5 (Glypican 5) e nell'inibizione dell'invasione mediata dalla via Wnt/ β -catenin. Questo suggerisce che la molecola eserciti un ruolo nell'invasione delle cellule cancerose del pancreas [68,70].

3.12.2. I miRNA come marcatori diagnostici e prognostici

Il ruolo centrale che i microRNA esercitano nel PDAC, unitamente alla loro elevata stabilità all'interno delle matrici biologiche può condurre all'elaborazione di un efficace e non-invasivo biomarcatore molecolare per la rilevazione della patologia, il follow-up e il monitoraggio degli effetti del trattamento terapeutico [68]. MiRNA circolanti derivati da tumore sono stati testati come potenziali sostituti o complementi alle biopsie tissutali. Numerosi studi hanno investigato le potenzialità diagnostiche dei miRNA in funzione dell'espressione differenziale tra casi e controlli.

Elevati livelli di miR-210 nel siero dei pazienti con PDAC rispetto ai controlli sani sono stati considerati come marcatore diagnostico. Analogamente, anche i livelli di miR-192 e miR-18a nel siero e nel plasma possono discriminare controlli sani e pazienti PDAC. L'elevata concentrazione di miR-210 e miR-155 nel siero dei casi è stata riportata in differenti studi. In particolare, a causa delle incrementate concentrazioni di miR-155 negli stadi iniziali della patologia, tale microRNA può essere utilizzato per la diagnosi precoce.

Diversamente dagli approcci precedentemente descritti, la combinazione di biomarcatori apporta un considerevole incremento della sensibilità e della specificità. A tal proposito, la combinazione

di CA19-9 con i valori di espressione di miR-16 e miR-196a distingue in modo preciso i casi di PDAC dai controlli. Analogamente, la combinazione di miR-27a-3p con i livelli di CA19-9 permette di distinguere pazienti PDAC e controlli con una sensibilità dell'85,3% e specificità dell'81,61%.

Studi recenti hanno rivelato l'utilità dei microRNA nel predire la prognosi, soprattutto in termini di sopravvivenza. Il profilo di espressione di miR-142-5p può essere utilizzato come biomarcatore della risposta alla gemcitabina: la sottoregolazione è correlata alla resistenza alla gemcitabina mentre la sua sovraregolazione è stata associata a un incremento della sua sopravvivenza [65,68,70].

3.12.3. MiRNA come target terapeutici

Il ruolo che i microRNA esercitano nei processi di tumorigenesi e progressione della patologia neoplastica li rendono candidabili a target terapeutici. E' stato osservato infatti, come tali molecole possano assumere nel contesto tumorale il ruolo di oncogeni o oncosoppressori: se si agisse nell'ottica di bloccare la loro azione di oncogeni, tramite il ricorso a miRNA antagonisti, o restaurare la loro funzione di miRNA oncosoppressori, attraverso molecole che ne mimano l'azione, si potrebbero ottenere dei benefici sul piano della riduzione della crescita tumorale, dell'invasione e della metastasi che si tradurrebbero in un incremento dell'efficacia dei farmaci antitumorali.

MiR-21 è stato estensivamente studiato nel PDAC e considerato un promettente target terapeutico. Infatti, numerosi studi hanno riportato la correlazione tra l'espressione di miR-21 e la resistenza alla gemcitabina, suggerendo le potenzialità della sua inibizione ai fini terapeutici. La somministrazione contemporanea di gemcitabina e soppressori di miR-21 mostra un effetto antitumorale sinergistico e rappresenta una promettente strategia per le nuove terapie antitumorali. Il ricorso ai microRNA come target terapeutici, nell'ottica di ripristinarne o inibirne l'espressione, costituisce una nuova promettente strategia per la terapia rivolta al PDAC. In ogni caso sono necessari studi preclinici e clinici per valutare l'efficacia e la sicurezza di tale approccio [38,68,70].

3.12.4. **Esosomi**

Gli esosomi sono vescicole extracellulari contenenti materiale biologico e giocano un ruolo importante nella comunicazione tra le cellule. Gli esosomi vengono rilasciati nello spazio extracellulare attraverso un processo di fusione con la membrana plasmatica e presentano dimensioni comprese tra 40 e 100 nm. Quasi tutti i tipi cellulari nell'organismo sono in grado di secernere gli esosomi in diversi fluidi biologici, tra cui sangue, urine, saliva, bile, ascite, latte mammario, fluido cerebrospinale. Il tipo di materiale che trasportano dipende dal tipo cellulare che li ha rilasciati e dal contesto fisiopatologico. Poiché i microRNA rappresentano una delle molecole più abbondantemente trasportate dagli esosomi, i miRNA esosomici sono stati sottoposti ad una estensiva profilazione in diversi tumori e hanno dimostrato il loro coinvolgimento nell'inizio e nella progressione della patologia. Nel PDAC è stato osservato come le cellule cancerose secernano miR-155 all'interno di esosomi, con l'obiettivo di attivare i fibroblasti. Inoltre, elevati livelli di esomiR-17-5p e miR-21 sono stati riscontrati nel siero dei pazienti. Differenti studi hanno esplorato l'associazione tra miRNA esosomici e i diversi stadi del PDAC nell'ottica di investigare le loro potenzialità come biomarcatori. Infine, poiché gli esosomi non sono immunogenici e proteggono il carico biologico che trasportano potrebbero esercitare un ruolo molto importante nella terapia genica [65,71].

3.12.5. **MiRNA e Cellule Staminali Tumorali**

Gli effetti della regolazione mediata dai microRNA si manifestano anche al livello della cancerogenesi, della progressione e della dispersione metastatica, eventi correlati alla presenza delle Cellule Staminali Tumorali.

Numerose ricerche hanno valutato il ruolo che i miRNA esercitano sulle cellule staminali tumorali del pancreas, dimostrando come tali molecole possano agire sul fenotipo staminale attraverso la regolazione di differenti pathway ad esse correlati [57,58,62].

I pathway sottesi al fenotipo CSC e la fine regolazione mediata dai miRNA su di essi creano una fitta e complessa rete, il cui funzionamento non è stato ancora del tutto svelato. Per questa ragione

è fondamentale continuare a investigare il ruolo di regolazione che i miRNA esercitano su questa sottopopolazione, nell'ottica di applicare tali conoscenze alla medicina traslazionale, sia ai fini diagnostici che terapeutici

4. SUMMARY OF THE INTRODUCTION

❖ *Epidemiology of PDAC*

Pancreatic cancer (PC) is one of the most aggressive human tumors and is classified as the 3rd leading cause of cancer-related death in the United States.[11] It poses a significant global health burden due to its poor prognosis and aggressive nature. The highest incidence rates are found in North America, and Europe [10]. In 2024, it is estimated that there will be 66,440 PC cases and 51,750 PC-related deaths in the United States [11].

The 5-year overall survival rate in PC patients remains low, despite improvements, increasing from less than 5% in the 1990s and to less than 9% in 2019. This is primarily due to late diagnosis, typically made when the disease has reached an advanced stage and patients are deemed inoperable. Early detection can greatly improve survival rates and treatment outcomes. Patients who undergo surgical resection have a 5-year survival rate of 15-25% [13].

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the predominant form of pancreatic neoplasm, constituting more than 90% of all pancreatic cancer cases. PDAC is so common that it is usually the type of neoplasia being referred to when discussing pancreatic cancer. Less common histological subtypes of PDAC include intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), mucinous cystic neoplasm (MCN), solid pseudopapillary neoplasm (SPN), serous cystadenoma (SCA), acinar cell carcinoma (ACC), squamous cell carcinoma (SCC), and pancreatic neuroendocrine tumor (pNET) [1,4,13].

Although both the exocrine and endocrine components of the pancreas can contribute to cancer development, PDAC predominantly originates from the exocrine cells of the ductal epithelium of the pancreas [53]. Microscopically, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) presents as an invasive epithelial neoplasm that exhibits disordered growth patterns and mucin production in

moderately to well-differentiated tumors. These tumors display glandular and ductal structures, which are characteristic of PDAC. On the other hand, poorly differentiated forms of PDAC are characterized by small, poorly defined glands and single infiltrating cells, as well as a lack of mucin production [4,5].

Approximately 65% of PDAC cases occur in the head of the pancreas, while 15% are found in the body and tail. The remaining cases are characterized by the extensive involvement of the gland. Unfortunately, the disease often spreads beyond the pancreas before diagnosis [5,6].

❖ *PDAC risk factors*

Pancreatic ductal adenocarcinoma is a complex disease with an unclear origin, but it is thought to be influenced by a range of factors including individual characteristics, lifestyle, environment, and clinical conditions. Among these, non-modifiable risk factors include age, gender, blood group, ethnicity, family history of PDAC and genetic susceptibility.

Approximately 10% of all PDAC cases are associated with hereditary syndromes and some genes have been identified as susceptibility factors. PDAC is influenced by a range of modifiable risk factors, including lifestyle and environmental factors, which contribute to the development of the disease through dietary habits, exposure to trace elements and other molecules known to be carcinogenic, cigarette smoking, alcohol consumption, physical activity and obesity. The presence of diseases such as pancreatitis, diabetes and infections contribute to increased risk (Arnold et al., 2020; Cai et al., 2021; Klein, 2021) (Hu et al., 2021).

❖ *Clinical presentation and diagnosis*

Most individuals diagnosed with pancreatic adenocarcinoma typically do not exhibit symptoms until the disease has progressed to a more advanced stage. Pancreatic cancer symptoms are diverse, non-specific, and highly variable, and their occurrence depends on the location of the tumor. The most frequently reported symptoms include anorexia, fatigue, weight loss, malabsorption, jaundice, dyspepsia, nausea, and abdominal or back pain [4,30,32].

Currently, diagnosis relies on histopathological analysis of solid biopsies, complemented by imaging tests such as computed tomography (CT), positron emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI), and endoscopic ultrasound (EUS) [32]. The Food and Drug Administration (FDA) has approved carbohydrate antigen 19–9 (CA 19–9) as the unique serum-based diagnostic biomarker for PDAC, which offers sensitivity and specificity levels of 80-90 %. Other serum biomarkers include carcinoembryonic antigen (CEA), and CA 12-5. However, no serum biomarkers currently provide a reliable early diagnosis [8,72].

❖ *Therapeutic strategies*

Pancreatic cancer is a complex disease with a wide array of molecular, pathological, and clinical features. The treatment response and clinical progression of the disease are influenced by numerous factors, such as the biological characteristics of the tumor, the patient's overall health, and the progression pattern of the tumor [37].

Currently, surgical resection of the pancreas is the sole and potentially curative treatment option available for patients with PDAC. Despite its effectiveness, this approach is only feasible in the early stages of the disease, which limits its application to approximately 20% of patients at the time of diagnosis [25,38]. Patients who undergo surgery have a median survival of 20-23 months, and adjuvant chemotherapy is typically recommended afterwards. Traditionally, adjuvant chemotherapy has involved single therapy with gemcitabine, but recent advancements have led to the combination of cytotoxic compounds, such as nab-paclitaxel with gemcitabine or the FOLFIRINOX regime [73,74,75]. Advances in Next-Generation Sequencing and bioinformatics have enabled a deeper understanding of the altered pathways in the PDAC scenario holding promise for the development of novel targeted therapies [76].

❖ *Natural history of PDAC*

Tumor evolution is a consequence of genomic instability, which arises from somatic mutations, chromosome rearrangements, copy number alterations, and epigenetic changes. These factors lead to a decrease in the expression of tumor suppressors and an increase in the activation of oncogenes, which disrupt the regulated cycles of affected cells. Such molecular events are favoured by natural selection as neoplastic cells have the advantage of competitive growth.

The evolution of PDAC can be understood by the gradual progression model and the punctuated progression model. The former postulates that malignancy arises from a gradual progression of dysplasia, starting from PanIN, IPMN, and MCN lesions that precede cancerous development. On the other hand, in the punctuated model, inactivation of PDAC driver genes may occur simultaneously rather than sequentially, leading to complex chromosomal rearrangements that suggest rapid tumor development and metastasis [43,44].

In PDAC, four driver genes have been detected and they are present in varying percentages of patients. KRAS in the 90% of PDAC patients, TP53 in the 80%, CDKN2A in the 60%, and SMAD4 in the 40%. Their coding sequences are the site of point mutations and small insertions and deletions. [45] Acquisition or loss of copies number concerns some oncogenes such as KRAS, GATA6, MET, NOTCH1, ERBB2, AKT2, MYC, and oncosuppressors including ARID1A, KDM6A, RNF43, TGF- β e TGFBR2, GNAS, MAP3K21, BRAF e SMARCA4, ACVR2A, ACVR1B e NRAS [43].

KRAS mutations occur early in pancreatic carcinogenesis, as they are observed in all grades of PanIN lesions. The proportion of cells with a KRAS mutation gradually increases as the degree of dysplasia increases, probably reflecting clonal expansion over time. This observation is also applicable to the other driver genes such as CDKN2A, TP53 and SMAD4, where the number of cells with alterations increases as we move from high-grade PanIN lesions to invasive carcinoma. Although the critical role of driver genes in pancreatic tumorigenesis is well established, the exact order and rate at which these alterations occur is intensely debated.

The stepwise progression model for pancreatic tumorigenesis has recently been questioned since a single chromothripsis event can lead to the simultaneous loss of several oncosuppressor genes. The pattern of pointing evolution may partially explain the rapid disease progression observed in some PDAC. However, although such catastrophic chromosomal events may drive tumor progression in some patient subgroups, it is not helpful in explaining the typical accumulation of driver mutations found within most precursor lesions [47].

❖ *Cancer Stem Cells*

Stem cells (SCs) possess two crucial characteristics: self-renewal, which is attributed to their limitless capacity for cell division, and differentiation, which enables them to generate various cell types. Due to their differentiation potential, stem cells are categorized as either totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent, or unipotent. As development proceeds, the ability to differentiate becomes less distinct. Adult stem cells, which are either multipotent or unipotent, are found in abundance in various tissues and persist throughout an individual's lifetime. These cells play a crucial role in maintaining tissue homeostasis. While adult stem cells can self-renew, they do not possess an infinite capacity for cell division [50,51].

According to the hierarchical model of carcinogenesis a small subpopulation of cells with stem-like characteristics, known as Cancer Stem Cells (CSCs), is responsible for tumor initiation, progression and metastasis, resistance to chemotherapeutic drugs and tumor recurrence. CSCs can recapitulate the primary tumor following serial passages on immunodeficient mice [52].

Although CSCs share many pathways with normal stem cells (NSCs), they undergo reprogramming that leads to alterations in specific signaling pathways. Consequently, they evade the regulatory mechanisms that govern stemness pathways, leading to an inclination towards unrestricted proliferation and the development of deviant molecular and cellular phenotypes [53,54]. A notable distinction between normal stem cells (NSCs) and cancer stem cells (CSCs) lies in their progeny. While NSCs differentiate into progenitor cells, which then proliferate rapidly, producing a variety of cell types that do not possess long-term proliferative capacity, CSCs give rise to tumor progeny

with virtually unlimited proliferative and survival potential and greater plasticity than cells derived from NSCs [54].

Within the tumour, CSCs reside in a niche characterised by a complex network of intercellular signalling between CSCs and constituents of the microenvironment. This communication modulates the intracellular signalling pathways of CSCs to promote stemness, plasticity, epithelial-mesenchymal transition and metastasis [54,56].

In 2007, Li et al. identified the first subpopulation of pancreatic cancer stem cells (PaCSCs) representing 1% of all cancer cells in PDAC. Specifically, they identified a subpopulation of pancreatic cancer cells that displayed the specific CD44+CD24+ESA+ combination of cell surface markers. Subsequent studies have shown that PaCSCs can be identified by numerous biomarkers including CD44, CD24, CD133, EpCAM, CxCR4, and ALDH1 [57].

Notch, Hedgehog, wnt/ β catenin, Hippo, Jak/Stat, Nodal/activin, OI3K/AKT/mTOR, and MAPK-ERK are the most dysregulated pathways in pancreatic CSCs (PaCSCs).

❖ *MiRNAs*

MicroRNAs, also known as miRNAs, are small non-coding RNAs that are composed of 19-24 nucleotides. They operate as negative post-transcriptional regulators of gene expression.

The process of miRNA biosynthesis starts with the transcription of miRNA genes by RNA polymerase II, resulting in the production of a precursor molecule known as pri-miRNA, which possesses a variable length ranging from 100 to 1000 base pairs. The ribonuclease complex Drosha-DGCR8, which is located within the nucleus, plays a crucial role in processing the primary precursor of miRNA. Specifically, this complex forms a hairpin-shaped intermediate pre-miRNA, which is 70–100 nucleotides in length. Afterwards, the pre-miRNA is transported to the cytoplasm, where it is cleaved by the endonuclease RNase III enzyme DICER to form a mature miRNA. This mature miRNA is double-stranded and consists of 19–24 nucleotides. One strand of the mature miRNA is degraded, and the mature strand is incorporated into the Argonaut protein heteromultimer

of the RISC, the RNA Induced Silencing Complex. Active miRNAs guide the RISC complex to their complementary mRNA targets, negatively affecting their expression by mRNA cleavage or translational repression [69,70].

The role of microRNAs is crucial in numerous cellular functions such as the regulation of proliferation, cell cycle, apoptosis, and the signal transduction of different important pathways. Aberrant microRNA expression has been found in a wide range of malignancies [69].

In cancer they could act as oncogenic miRNAs (oncomiR) or tumor suppressor miRNAs, depending on the role of their target mRNA in the tumor-initiating process. If they negatively regulate the expression of an oncogene, they act as tumor suppressors; if they suppress the expression of an oncosuppressor, they act as oncomiR. In cancer, oncosuppressive miRNAs are commonly downregulated, while oncomiRs exhibit an increased expression [63].

The role of microRNAs (miRNAs) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has been investigated at various levels, encompassing the impact of risk factors on miRNA expression to the differential expression of these molecules related to aberrant pathways in the disease. miRNA expression has been observed to be altered during the development, progression, and metastasis of PDAC.

For their involvement in tumor initiation and progression together with their high stability in biological matrices, they could be first-line biomarkers in the early detection of those diseases which, like pancreatic cancer, owe their poor prognosis to late diagnosis. Furthermore, their crucial function in tumorigenesis and progression of neoplastic disease makes them candidates for therapeutic targets.

❖ *MiRNAs and CSCs*

The effects of microRNA-mediated regulation also occur at the level of carcinogenesis, progression and metastatic dispersion, events related to the presence of CSCs.

Numerous studies have investigated the role of miRNAs in PaCSCs, revealing their ability to regulate various pathways and affect the stem phenotype by targeting specific molecules. This highlights the significant impact that miRNAs can have on PaCSCs [57,58,62].

The CSC phenotype and the intricate network of miRNA-mediated regulation of its underlying pathways remain poorly understood. Therefore, continued investigation into the regulatory role of miRNAs in this subpopulation is essential to advance the field of translational medicine for both diagnostic and therapeutic applications.

5. OBIETTIVO DEL LAVORO

L'adenocarcinoma del dotto pancreatico rappresenta la terza causa di morte correlata a tumore e la sua incidenza cresce di anno in anno. I farmaci attualmente in uso per la patologia possono incrementare la sopravvivenza ma l'unica soluzione è la resezione chirurgica, praticabile solo nelle fasi precoci della patologia stessa. A tal proposito, la ragione dell'elevata letalità della patologia è riconducibile al fatto che la diagnosi viene condotta tardivamente quando ormai il paziente non è candidabile alla resezione chirurgica. Le tecniche diagnostiche utilizzate in questo contesto prevedono il ricorso alla diagnostica per immagini, alle tecniche istologiche su biopsia solida e all'esecuzione di esami da laboratorio come il dosaggio dell'antigene carcinoembrionale CA19-9. Esistono vari marcatori d'ausilio nella diagnosi del PDAC ma la ricerca di biomarker con sensibilità e specificità più elevate può dare un forte contributo al processo diagnostico.

La ricerca condotta ha perseguito un duplice obiettivo:

1. L'identificazione di un pannello di microRNA espressi in maniera aberrante nel PDAC, con un ruolo nella sua tumorigenesi e nelle fasi successive della patologia. L'acquisizione di ulteriori conoscenze relative alla regolazione che tali molecole esercitano nel contesto del PDAC potrebbe condurre all'individuazione di nuovi potenziali biomarcatori diagnostici e prognostici.
2. La caratterizzazione funzionale dei microRNA miR-216a-5p e miR-125a-5p al fine di individuare il loro ruolo potenziale nell'acquisizione o regressione dei tratti caratteristici delle CSC pancreatiche.

I microRNA sono molecole coinvolte nella regolazione negativa dell'espressione genica ed esercitano il loro ruolo su una molteplicità di eventi biologici: crescita cellulare, differenziamento e apoptosi. Inoltre, una deregolazione dell'espressione di tali molecole sembra essere associata a svariate condizioni patologiche, che includono le malattie cardiovascolari, il diabete, il cancro. Per

questa ragione investigarne il ruolo all'interno di tali patologie può contribuire a svelare alcuni meccanismi alla base delle stesse e contribuire in tal senso alla biomarker-discovery e alla drug-discovery. Il ricorso ai microRNA come biomarcatori è forte dell'elevata stabilità di tali molecole all'interno delle matrici biologiche: la loro presenza nel circolo sanguigno unitamente all'espressione aberrante in funzione degli stadi della patologia, potrebbero costituire il punto di partenza per l'adozione di un approccio diagnostico non invasivo.

In funzione del duplice obiettivo, il lavoro di ricerca è stato organizzato in due sezioni distinte:

1. Una fase con approccio investigativo che prende le mosse da una metanalisi dei dati di profilazione dell'RNA non codificante riscontrabili all'indirizzo GeoDataset, nell'ottica di individuare molecole la cui deregolazione su siero e/o biopsie solide sia altamente significativa. Il pannello di microRNA risultato dalla metanalisi è stato validato su siero e biopsie solide dei pazienti arruolati e sui modelli in vitro della patologia.
2. Studio funzionale delle due molecole selezionate durante la fase di discovery, miR-125a-5p e miR-216a-5p. Il ruolo dei due miRNA sull'espressione dei geni e dei marcatori di staminalità e sulla capacità clonogenica è stata valutata attraverso la trasfezione transiente con miRNA mimic e miRNA inhibitor delle linee cellulari tumorali e dei rispettivi modelli CSC-like.

6. AIM OF THE STUDY

Pancreatic ductal adenocarcinoma is the third leading cause of cancer-related death in the USA and its incidence grows year by year. Currently, the treatment options for PDAC offer a limited increase in survival, typically lasting only a few months. However, the most effective solution remains surgical resection, which is only feasible during the early stages of the disease. In this context, the high mortality rate associated with PDAC is directly linked to its late detection, which typically occurs when patients are no longer candidates for surgery. Diagnostic strategies for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) are primarily founded on imaging techniques, histological evaluation from solid biopsies, and the analysis of serum levels of biomarkers such as CA19-9. Various markers exist to aid in the diagnosis of PDAC, but the research of biomarkers that offer superior sensitivity and specificity can significantly enhance the diagnostic process.

This research has a dual aim:

1. The identification of a panel of aberrantly expressed microRNAs in PDAC with a role in its tumourigenesis and later stages of pathology. Gaining further insight into the regulation that these molecules exert in PDAC could lead to the identification of new potential diagnostic and prognostic biomarkers.
2. Functional characterisation of the microRNAs miR-216a-5p and miR-125a-5p in order to identify their potential role in the acquisition or regression of pancreatic CSCs.

MicroRNAs are involved in the negative regulation of gene expression and their role is essential for a large number of biological events: cell growth, differentiation and apoptosis. Moreover, their deregulation is associated with a wide range of pathological conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, and cancer. Exploring the role of these elements in pathologies may shed light on the molecular processes that underlie cancerous growth and facilitate the identification of novel biomarkers and therapeutic agents. The application of microRNAs as biomarkers is supported by

their high stability within biological matrices. It is believed that their presence in the bloodstream, along with their irregular expression during different stages of a disease, could represent the starting point for the identification of a non-invasive diagnostic procedure.

In accordance with its dual purpose, the research project was structured in two distinct sections:

1. A discovery phase started with a meta-analysis of non-coding RNA profiling data found at GeoDatasets, with the aim of identifying molecules whose deregulation in serum and/or solid biopsies is highly indicative. The resulting panel of microRNAs was subsequently verified on serum and solid biopsies from patients enrolled in the study, as well as in vitro models of the disease.
2. Functional study of two molecules selected from the discovery phase, miR-125a-5p and miR-216a-5p. To achieve this, transient transfection was performed using miRNA mimic and miRNA inhibitor, and the effects of the two miRNAs on the expression of genes and stemness markers, as well as their ability to form colonies on representative disease cell lines and respective CSC-like models, were evaluated.

7. EXPERIMENTAL WORKFLOW

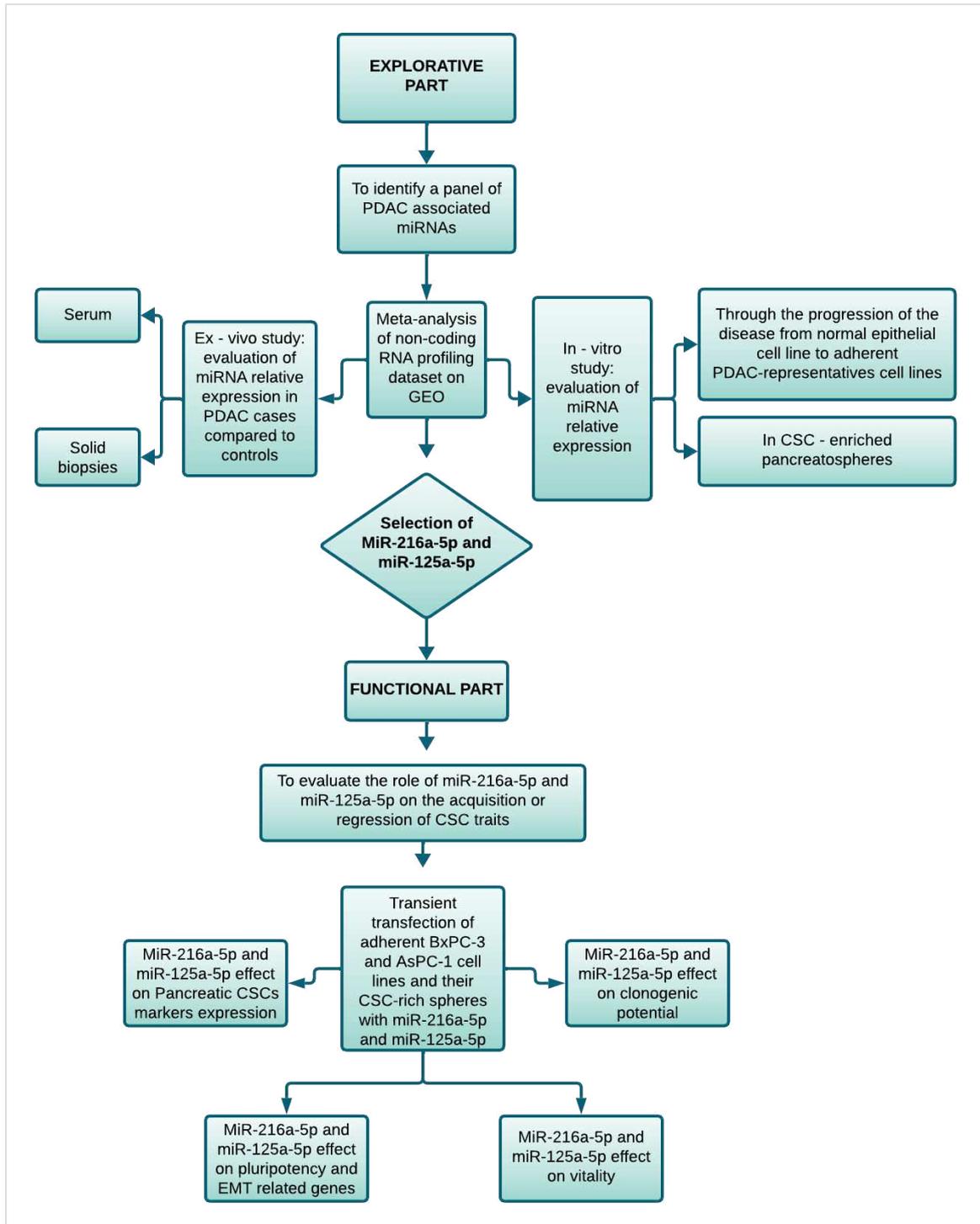


Figure 13: Experimental workflow.

8. MATERIALI E METODI

8.1. PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO

8.1.1. Metanalisi

Nell'ottica di identificare e scegliere i miRNA associati al PDAC, nell'Ottobre 2020 è stata condotta una metanalisi dei dati di profiling dell'RNA non codificante disponibili sulla piattaforma Gene Expression Omnibus Dataset (GeoDataset). Le parole chiave utilizzate per indirizzare la ricerca sono "microRNA in PDAC", "microRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma", "microRNA in pancreatic cancer", "miRNA in PDAC", "miRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma" e "miRNA in pancreatic cancer". Gli studi risultati eleggibili sono stati quindi sottoposti ai seguenti criteri d'inclusione:

1. Organismo: la selezione ha riguardato esclusivamente i lavori condotti su *Homo sapiens*;
2. Tipo di analisi: si è scelto di considerare i dati provenienti da profilazione dell'RNA non codificante tramite arrays;
3. Matrice biologica: poiché la validazione è stata condotta su siero e biopsie solide, sono stati analizzati solo studi condotti sulle medesime matrici.

Le parole chiave utilizzate per la ricerca hanno permesso di identificare nove studi in totale, di cui quattro condotti sul siero e cinque sulle biopsie solide. Le caratteristiche delle serie sono riportate nella Tabella 1. Le serie di dati GSE59856 [77], GSE85589 [78], GSE124158 [79] e GSE140196 [80] sono relative a studi condotti sul siero, derivano da piattaforme simili e hanno tenuto conto di un numero di miRNA e campioni simile. Al contrario, le serie di dati relative a biopsie solide, ovvero GSE140719 [81], GSE24279 [82], GSE41369 [83], GSE60978 [84] e GSE71533 [85], sono risultate molto eterogenee in quanto derivate da differenti piattaforme e con un numero di miRNA e campioni piuttosto vario tra loro. Inoltre, alcuni studi sono stati portati avanti su differenti tumori, non solo relativi al PDAC. Per tutti questi, sono stati selezionati e utilizzati esclusivamente i dati

relativi al PDAC. L'analisi bioinformatica è stata condotta attraverso il software R Studio. Prima di procedere alla metanalisi, i dati sono stati standardizzati. Il confronto tra casi e controlli è stato portato avanti con regressione lineare. Inoltre, l'espressione dei miRNA è stata impostata come variabile dipendente e lo status caso/controllo come predictor, aggiustando per età e sesso, quando disponibili, come covariate. I risultati dei singoli studi sono stati sottoposti a metanalisi utilizzando il metodo Random Effect Maximum Likelihood (REML) e i risultati sono stati espressi come deviazione standard della differenza di espressione dei miRNA tra casi e controlli. È stata applicata la correzione False Discovery Rate per test multipli. A causa dell'eterogeneità dei dati provenienti dalle biopsie solide, questi sono stati analizzati singolarmente. Tutti gli Effect Sizes sono stati standardizzati per poter essere comparabili nonostante le differenti piattaforme utilizzate per valutare l'espressione dei miRNA nei vari studi.

Tabella 1: Caratteristiche dei dataset utilizzati per la metanalisi.

Matrice Biologica	GEO accession	Piattaforma	Titolo
	GSE59856	GPL18941 - 3D-Gene Human miRNA V20_1.0.0	MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary tract cancers [77].
Serum	GSE85589	GPL19117 - Affymetrix Multispecies miRNA-4 Array	Expression data from pancreatic cancers patients and healthy controls [78].
	GSE124158	GPL18941 - 3D-Gene Human miRNA V20_1.0.0	A serum miRNA classifier diagnoses bone and soft Solid Biopsies sarcomas across various histological subtypes [79].
	GSE140196	GPL19117 - Affymetrix Multispecies miRNA-4 Array	MicroRNA expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [80].
Solid Biopsies	GSE140719	GPL19117 - Affymetrix Multispecies miRNA-4 Array	Micro-RNA Expression Patterns Predict Metastatic Spread in Solid Pseudopapillary Neoplasms of the Pancreas [81].
	GSE24279	GPL10944 - febit human miRBase v11	Pancreatic cancer and pancreatitis miRNA profiles [82].

GSE41369	GPL16142 - NanoString nCounter Human miRNA assay (v1)	Combinatorial analysis of miRNA and mRNA expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)_miRNA [83].
GSE60978	GPL15159 - Agilent-031181 Unrestricted Human miRNA V16.0_Microarray 030840 (Probe Name version)	mRNA and miRNA expression profiles for fresh frozen periampullary adenocarcinomas (pancreatobiliary and intestinal type) and adjacent normal Solid Biopsies [miRNA] [84].
GSE71533	GPL18058 - Exiqon miRCURY LNA microRNA array, 7th generation [miRBase v18, condensed Probe_ID version]	Microenvironmental regulation by miRNAs in pancreatic cancer [85].

8.1.2. Selezione dei pazienti

Un totale di 37 pazienti con diagnosi di PDAC, nessuno dei quali si era precedentemente sottoposto a radioterapia o a chemioterapia, sono stati reclutati dalla Clinica Chirurgica dell'Università di Sassari. La raccolta dei campioni è stata approvata e supervisionata dal Comitato Etico Regionale per la Sardegna (Prot. PG/2021/8575) previa approvazione della Direzione Sanitaria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari. Per ogni paziente arruolato nello studio si è proceduto alla raccolta di un prelievo ematico preoperatorio. Inoltre, per i pazienti sottoposti a resezione chirurgica, la Clinica Chirurgica ha fornito, ove possibile, una biopsia patologia e la sua controparte sana. Non si è potuto procedere alla raccolta delle biopsie solide nei casi di inoperabilità, situazione che ha riguardato 14 pazienti, oppure qualora le dimensioni nodulari fossero troppo ridotte e quindi destinate esclusivamente all'Anatomia Patologica.

Le biopsie sono state classificate sulla base del manuale stadivo AJCC/TNM Cancer Staging Manual [86]. Le caratteristiche dei pazienti arruolati sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 2: Caratteristiche dei pazienti reclutati per lo studio.

Characteristics		PDAC Patients
Age	<60	10
	>60	27
Sex	M	16
	F	21
Stage	I	7
	II	10
	III	6
	IV	14
Metastasis	None	7
	Nodal	30
	Distant	14
Localization	Head – Uncinate process	28
	Body - tail	9

8.1.3. Raccolta dei campioni

Un totale di 37 prelievi ematici preoperatori è stato raccolto all'interno di provette da siero della tipologia S-Monovette 9 mL Serum Gel with Clotting Activator (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). I tubi sono stati lasciati in incubazione a Temperatura ambiente (T_{amb}) per un intervallo di tempo compreso tra 10 minuti e un'ora. Il siero è stato separato attraverso due consecutive centrifugate a 4°C: la prima alla velocità di 1900 rcf, la seconda a 16000 rcf. A seguito della separazione, il siero è stato conservato a – 80°C.

Dai pazienti sottoposti a resezione chirurgica sono state raccolte 19 biopsie tumorali e 18 controparti sane. Per stabilizzare e proteggere l'RNA, i tessuti sono stati immediatamente trasferiti all'interno

di provette contenenti RNA later (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), e conservate a 4°C per 24 ore. Successivamente, le biopsie sono state rimosse dalla soluzione di stabilizzazione, asciugate e conservate a – 80°C.

8.1.4. Linee cellulari

Le linee cellulari hTERT-HPNE E6/E7 (ATCC CRL-4036), BxPC-3 (ATCC CRL-1687) e AsPC-1 (ATCC CRL-1682) sono state fornite dall'ATCC e coltivate secondo le loro istruzioni. La linea cellulare hTERT-HPNE E6/E7, rappresentativa dell'epitelio duttale normale, è stata coltivata con un terreno completo così composto: 75% di DMEM privo di glucosio (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) con l'aggiunta di L-glutamina 2mM e sodio bicarbonato (1,5 g/L) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 25% di Medium M3 Base (Incell Corp. San Antonio, USA), siero fetale bovino (5%) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), EGF umano ricombinante alla concentrazione di 10 ng/ml (Cedarlane Lab, Burlington, Canada), D-glucosio 5.5 mM (1g/L) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), puromicina concentrata 750 ng/ml (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany). Le linee cellulari BxPC-3 e le AsPC-1, che rappresentano rispettivamente il PDAC primario e metastatico, sono state coltivate in RPMI 1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) supplementato con 10% FBS. Le cellule sono state mantenute in incubatore sotto condizioni standard di temperatura (37°C) e CO₂ (5%).

Tabella 3: Caratteristiche delle linee cellulari utilizzate per lo studio.

Cell Line	Hystology	Tumor Source	Mutant genes
hTERT-HPNE E6/E7	Pancreatic normal ductal epithelium		
BxPC-3	Adenocarcinoma	Primary	CDKN2A, MAP2K4, SMAD4, TP53
AsPC-1	Adenocarcinoma	Metastasis, ascites	CDKN2A, FBXW7, KRAS, MAP2K4 TP53

8.1.5. Arricchimento in CSC

Per ottenere una sottopopolazione di CSCs pancreatiche, le linee cellulari sono state coltivate su un terreno specifico per le pancreatosfere, secondo il protocollo WO2016020572A1 [87]. La coltura è stata allestita su piastre multiwell a bassa aderenza, Ultra-Low Attachment Six-Well Plates (Corning® Costar®, USA), con DMEM F/12 privo di siero e supplementato con le seguenti componenti:

- Eparina 4ng/mL (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Idrocortisone 1mg/mL (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- p15 10 µL/mL;
- Insulina 10 µg/mL (Insulin–Transferrin–Selenium, Invitrogen, Waltham, USA)
- B27 1X (B-27™ Supplement [50×], Minus)
- Vitamina A; Invitrogen, Carlsbad, USA).

Appena prima di seminare le cellule nel loro supporto, il terreno è stato completato con:

- 10ng/mL di Epidermal Growth Factor (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 10 ng/mL di Hepatocellular Growth Factor (Miltenyi)
- 10 ng/mL di Fibroblast Growth Factor (Sigma-Aldrich).

Dopo 72 ore, le sfere primarie formatesi sono state separate con tripsina o attraverso l'uso di una siringa. Dopo la disgregazione, sono state ritrasferite all'interno del supporto a bassa aderenza e messe in coltura con il terreno condizionato per CSCs per altre 72 ore.

8.1.6. Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione

Salvo differente indicazione, i reagenti e gli strumenti utilizzati per l'estrazione dell'RNA sono stati acquistati dalla ditta Qiagen (Hilden, Germany).

Per estrarre l'RNA dal siero è stato utilizzato il kit miRneasy Serum/Plasma kit e il protocollo seguito è quello indicato dal costruttore. Prima di estrarre l'RNA dalle biopsie solide, si è proceduto

all'omogenazione dei tessuti attraverso 700 μ L di Qiazol, reagente di lisi, e le biglie in acciaio di diametro 5mm. La distruzione dei tessuti è stata condotta utilizzando il Tissue Lyser LT. L'estrazione dell'RNA dai tessuti omogenati è stata condotta utilizzando il kit miRneasy Mini kit e il procedimento seguito è quello indicato dal costruttore. A seguito dell'estrazione, la qualità dell'RNA è stata valutata al Nanodrop (NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) misurando il rapporto tra 260/280nm ed è stata valutata anche la concentrazione dell'RNA.

Prima di procedere alla retrotrascrizione, eseguita con il kit miRCURY LNA RT Kit, tutti i campioni sono stati portati alla concentrazione di 5 ng/ μ L. Il profilo termico utilizzato per la retrotrascrizione prevede 42°C per 60 minuti, seguiti da 95°C per 5 minuti (BioRad MJ Mini 48-well Personal Thermal Cycler, Hercules, California).

8.1.7. **Real – Time PCR**

Nell'ottica di quantificare l'espressione di miR-4486, miR-4741, miR-20b-5p, miR-361-3p, miR-324-5p, miR-125a-5p, miR-320d, miR-216a-5p e miR-216b-5p nel cDNA ottenuto dai campioni di siero sono state utilizzate le piastre customizzate miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panel (GeneGlobe ID - YCA35814 - Qiagen, Hilden). Dal momento che i campioni di siero o plasma sono matrici prive di cellule, l'estrazione dell'RNA riguarda esclusivamente gli RNA circolanti e si traduce in concentrazioni molto basse di RNA estratto. A tal proposito, nell'ottica di ridurre il problema della variabilità tecnica e ottenere elevata riproducibilità anche su campioni con basse concentrazioni di RNA, si è scelto di utilizzare piastre pre-spottate con i primer forward e reverse su ogni pozzetto. Le molecole UniSP6 e UniSP3 sono state utilizzate come calibratori interpiastra mentre il miRNA miR-24-3p è stato scelto, in funzione dei risultati della metanalisi e della ricerca bibliografica, come gene housekeeping. Per la Real-Time su biopsie solide e cellule, si è proceduto con i saggi singoli, attraverso il ricorso ai primer miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen). U6 è stato scelto come gene housekeeping. Le reazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore StepOne Plus (Applied Biosystems) impostato secondo il seguente profilo termico:

95°C per 2 minuti, 95°C per 10 secondi, 56°C per 60 secondi, ripetuti per 40 cicli. I dati sono stati analizzati attraverso il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e l'analisi statistica è stata condotta mediante un test T di Student a due code per dati non appaiati. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Tabella 4: Sequenze dei primer utilizzati per la prima parte dello studio.

miRNA	miRbase ID	Sequence
miR-4486	MIMAT0019020	5'GCUGGGCGAGGCUGGCA
miR-4741	MIMAT0019871	5'CGGGCUGUCCGGAGGGGUCGGCU
miR-20b-5p	MIMAT0001413	5'CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
miR-361-3p	MIMAT0004682	5'UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU
miR-324-5p	MIMAT0000761	5'CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUG
miR-125a-5p	MIMAT0000443	5'UCCUGAGACCCUUUAACCGUGA
miR-320d	MIMAT0006764	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGA
miR-216a-5p	MIMAT0000273	5'UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
miR-216b-5p	MIMAT0004959	5'AAAUCUCUGCAGGCAAUGUGA

8.2. PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE

8.2.1. Trasfezione transiente con miR-216a-5p e miR-125a-5p

La trasfezione delle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 e dei loro modelli CSC – like, è stata portata avanti ricorrendo al reagente TransIT-X2® Dynamic Delivery System (Mirus Bio - Madison, USA) utilizzato con il terreno Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Gibco™, New York, USA). Nell’ottica di potenziare o ridurre le due molecole, miR-216a-5p miRCURY LNA miRNA Mimic, miR-125a-5p miRCURY LNA miRNA Mimic, miR-216a-5p miRCURY LNA miRNA Inhibitor and miR-216a-5p miRCURY LNA miRNA Inhibitor sono stati acquistati dalla Qiagen (Hilden, Germany) e utilizzati seguendo le indicazioni del costruttore.

Le linee BxPC-3 e AsPC-1 coltivate in aderenza sono state seminate 18-24 ore prima della trasfezione. Per allestire la trasfezione sui modelli CSC – like, si è proceduto alla semina delle sfere secondarie.

Immediatamente prima della trasfezione, si è proceduto alla formazione dei complessi TransIT-X2:miRNA attraverso la preparazione della mimic mix contenente Opti-MEM e miRNA mimic (concentrazione finale per pozzetto 5nM) e inhibitor mix contenente Opti-MEM e miRNA inhibitor (concentrazione finale per pozzetto 50 nM). Quindi, 1.5µL e 1µL di TransIT-X2 sono stati aggiunti rispettivamente alla Mimic mix e all’Inhibitor mix. Dopo un periodo di incubazione di 15 – 30 minuti a 37°C, i complessi formati sono stati distribuiti alle cellule piastrate nei pozzetti, avendo cura di realizzare una distribuzione omogenea. Dopo 72h le cellule aderenti sono state staccate e analizzate. Le pancreatosfere sono state ugualmente raccolte e analizzate. L’efficienza di trasfezione è stata valutata facendo ricorso al controllo negativo Negative Control miRCURY LNA miRNA Mimic – 5’ FAM (Qiagen, Hilden, Germany) per il trattamento con mimic e al Negative control A – 5’ FAM (Qiagen, Hilden, Germany) per l’inhibitor.

Per la trasfezione sui modelli arricchiti con CSC si è seguita la medesima procedura, variando il numero di cellule per pozzetto ($2.5-5.0 \times 10^5$) e il volume di reagente di trasfezione, uguale per ogni condizione e pari a $2\mu\text{L}$.

8.2.2. Razionale per le analisi funzionali:

L'effetto di miR-216a-5p e miR-125a-5p è stato valutato sulle seguenti condizioni:

- BxPC-3 e AsPC-1 aderenti non trattate
- Modelli CSC – like di BxPC-3 e AsPC-1 non trattate
- BxPC-3 e AsPC-1 aderenti trattate con miR-216a-5p mimic
- BxPC-3 e AsPC-1 aderenti trattate con miR-216a-5p inhibitor
- Modelli CSC – like di BxPC-3 e AsPC-1 trattate con miR-216a-5p mimic
- Modelli CSC – like di BxPC-3 e AsPC-1 trattate con miR-216a-5p inhibitor
- BxPC-3 e AsPC-1 aderenti trattate con miR-125a-5p mimic
- BxPC-3 e AsPC-1 aderenti trattate con miR-125a-5p inhibitor
- Modelli CSC – like di BxPC-3 e AsPC-1 trattate con miR-125a-5p mimic
- Modelli CSC – like di BxPC-3 e AsPC-1 trattate con miR-125a-5p inhibitor

Per comprendere il ruolo potenziale dei due miRNA sul fenotipo CSC l'espressione dei marcatori CD24, CD44, CxCR4 e ALDH1 è stata valutata attraverso saggi citofluorimetrici. Inoltre, al fine di indagare l'effetto delle due molecole sull'espressione dei geni della staminalità (OCT-4, Sox2) e di EMT (Vimentina, c-Myc e Snail) sono state allestite delle Real-Time PCR. Un saggio all'Alamar Blue è stato portato avanti per valutare le potenziali variazioni di proliferazione e vitalità in funzione dei trattamenti ed infine, nell'ottica di monitorare il potenziale ruolo delle molecole in studio sulla proprietà clonogenica delle CSC, si è proceduto all'allestimento di un saggio di formazione delle colonie sui modelli arricchiti in CSC.

8.2.3. Saggi citofluorimetrici per valutare l'espressione dei marcatori di CSC pancreatiche

Il kit ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) è stato utilizzato per identificare le cellule che, come le CSC, presentano elevati livelli di enzima ALDH. Il reagente ALDEFLUOR™ attivato costituisce substrato non tossico e fluorescente per l'ALDH e diffonde liberamente all'interno delle cellule vitali. In presenza di ALDH, il substrato viene trattenuto dalle cellule e la quantità di prodotto fluorescente è direttamente proporzionale all'attività dell'enzima ALDH. I livelli superficiali dei marcatori CD24, CD44, CxCR4 sono stati valutati ricorrendo all'anticorpo anti-CD24 umano coniugato con ficoeritrina (PE), anticorpo anti-CD44 umano coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) e anticorpo anti-CxCR4 umano coniugato con allofocianina (APC). Gli anticorpi sono stati forniti dalla Miltenyi Biotec e utilizzati seguendo le loro istruzioni. In breve, le cellule sono state lavate e il pellet risospeso in 98 µL di buffer PBS/BSA/EDTA, con l'aggiunta, per ogni marcatura, di 2µL del rispettivo anticorpo. Il buffer PBS/BSA/EDTA è stato ottenuto attraverso la diluizione 1:20 della soluzione stock MACS® BSA (Miltenyi Biotec) con autoMACS® Rinsing Solution (Miltenyi Biotec). La diluizione raccomandata per l'anticorpo è 1:50 per 10⁶ cellule in un volume finale di 100 µL. A questo punto, la soluzione è stata incubata per 10 minuti a 2-8°C, al buio. A seguito del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate e risospese nel buffer utilizzato per l'analisi.

In merito al saggio ALDEFLUOR, per ogni condizione è stato allestito un tubo "test" e un tubo di controllo e 5 µL di reagente ALDEFLUOR™ DEAB sono stati aggiunti al tubo di controllo. Un volume di 5 µL di reagente ALDEFLUOR™ sono stati aggiunti a ogni condizione. Dalla mix formatasi, 0,5 mL sono stati trasferiti al tubo di controllo. Il periodo di incubazione a 37°C dura dai 30 ai 60 minuti. La rilevazione è stata condotta utilizzando il citofluorimetro FACSCanto™ II (BD Biosciences) utilizzando il software FACSDiva™. Le fluorescenze del PE, APC e FITC sono state rilevate sui canali del rosso (564-606 nm), del blu (650- 670 nm) e del verde (520-540 nm) rispettivamente.

8.2.4. Estrazione dell'RNA

Le cellule sono state omogenate utilizzando 1000 μL del reagente di lisi TRIZOL (Invitrogen, Waltham, USA), utilizzato secondo le istruzioni della casa produttrice. A seguito di un periodo di incubazione di 15 minuti e all'aggiunta di 200 μL di cloroformio, il tubo è stato agitato energicamente e posto a incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Al termine dell'incubazione, si procede con la centrifuga a 4°C e $12000 \times G$ per 15 minuti. Al termine, è possibile visualizzare una separazione di fase costituita da una fase acquosa superiore e incolore contenente l'RNA, un'interfase bianca e una fase inferiore contenete proteine e altre molecole organiche. Si è proceduto quindi al trasferimento della fase acquosa all'interno di un nuovo tubo. A seguito dell'aggiunta di 500 μL di Isopropanolo, il tubo è stato agitato e lasciato a incubare a T_{amb} per 10 minuti. È stato quindi centrifugato a $12000 \times G$ a 4°C per 10 minuti. Al termine, si è proceduto all'eliminazione del surnatante e all'aggiunta di 1000 μL di etanolo 75%. Il tubo è stato quindi agitato energicamente e centrifugato a $17000 \times G$ a 4°C per 5 minuti. Infine, il surnatante è stato scartato e il pellet, una volta asciugato, è stato risospeso con 20 μL di acqua RNase-free.

La quantità dell'RNA estratto è stata valutata al Nanodrop (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Scientific™) impostato alla lunghezza d'onda (λ) di 260 nm. Per valutare la qualità dell'RNA estratto sono stati considerati i seguenti rapporti:

- A260A/280: per rilevare eventuali contaminazioni derivanti da proteine e altre molecole organiche;
- A260/A230: per rilevare contaminazione da DNA.

8.2.5. Retrotrascrizione

Per procedere con la retrotrascrizione, si è fatto ricorso al kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) utilizzati secondo le indicazioni della ditta. In primo luogo, l'RNA estratto è stato diluito a $5\text{ng}/\mu\text{L}$ e sottoposto a un primo ciclo di retrotrascrizione a 70°C per 10 minuti. A questo punto, all'RNA sono stati aggiunti 10 μL di mix di retrotrascrizione

contenente MgCl₂, buffer di reazione, dNTPs, Primers, Enzima (AMV), inibitori della ribonucleasi. Infine, è stato portato avanti un secondo ciclo di retrotrascrizione per 30 minuti.

8.2.6. **Real – Time PCR**

Il cDNA ottenuto dall'RNA isolato dai modelli cellulari trasfettati è stato diluito per ottenere la concentrazione finale di 5ng/μL. L'influenza delle molecole miR-216a-5p e miR-125a-5p sull'espressione dei geni della staminalità viene valutata attraverso primer commerciali per i geni Sox2, OCT-4 mentre l'effetto dei microRNA sull'EMT viene investigata attraverso i primers per c-Myc, Vimentina e Snail. Le reazioni sono state preparate utilizzando SYBR Green PCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e il gene GADPH è stato utilizzato come housekeeping. Ogni reazione è stata allestita in triplicati. Le reazioni sono state portate avanti attraverso lo strumento StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham) e seguendo il seguente profilo termico: 95°C per 2 minuti, 95°C per 10 secondi e 56°C per 60 secondi, ripetuto 40 cicli.

I dati sono stati analizzati ricorrendo al metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e l'analisi statistica è stata condotta applicando un test T di Student a due code per dati non appaiati. Sono stati considerati statisticamente significativi i risultati con valori di $p < 0.05$.

8.2.7. **Saggio di formazione delle colonie**

Per studiare l'attività clonigenica, 20000 sfere secondarie sono state disgregate e seminate in una piastra a 24 pozzetti contenente uno strato basale di agar 0,4% con DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e uno strato superficiale con agar 0,8%. Il terreno è stato sostituito ogni cinque giorni. Le cellule sono state tenute in incubazione per 21 giorni a 37°C e 5% di CO₂. La formazione dei cloni è stata contata sotto microscopio ottico previa colorazione con 1mg/mL di cloruro di iodonitrotetrazolio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) overnight at 37 °C. Le immagini sono state analizzate attraverso il software per l'elaborazione digitale ImageJ.

8.2.8. Alamar Blue Assay

Per investigare i cambiamenti nella vitalità cellulare sui modelli trasfettati con miR-216a-5p e miR-125a-5p mimic e inhibitor, è stato eseguito un saggio di vitalità all'Alamar Blue.

L'Alamar Blu è un indicatore di vitalità che sfrutta il potere riducente delle cellule vitali per misurare quantitativamente la proliferazione delle cellule: è basato sul reagente resazurina, composto non tossico, non fluorescente, di colore blu e in grado di attraversare la membrana cellulare. Quando la resazurina entra nelle cellule viene ridotto a resofurina, di colore rosso e altamente fluorescente: le cellule vitali riducono in maniera continuativa la resazurina e resofurina inducendo cambiamenti di colore e fluorescenza complessiva. Brevemente, le cellule precedentemente trasfettate e destinate al saggio di vitalità sono state trattate con il reagente AlamarBlue (Invitrogen, Waltham, USA) con un volume pari a 1/10 del volume costituito dalla sospensione cellulare. Il periodo di incubazione, condotto a 37°C e al buio, dura da 1 a 4 ore e avviene all'interno di un incubatore. I risultati vengono visualizzati su un lettore di piastra attraverso il monitoraggio dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 nm ma normalizzando su una λ di 600 nm. Se i risultati vengono visualizzati considerando la fluorescenza, la lunghezza d'onda di eccitazione è compresa fra 540–570 nm (con picchi di eccitazione a 570nm) mentre la λ di emissione viene impostata a 580–610 nm (con picco di emissione a 585 nm).

9. RISULTATI

9.1. PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO

9.1.1. Risultati della metanalisi

Attraverso una metanalisi dei dataset disponibili su GeoDataset sono state valutate le differenze di espressione tra casi di PDAC e controlli di 2526 miRNA. Nel siero è stata riscontrata un'associazione significativa con le molecole miR-6729-5p, miR-6125, miR-4734, miR-4486, miR-6075, and miR-4741, iperespresse (FDR adjusted $p < 0.05$) mentre miR-6799-5p e miR-20b-5p sono risultate sottoesprese (FDR adjusted $p < 0.05$).

L'analisi bioinformatica portata avanti sulle biopsie solide ha permesso di identificare un significativo incremento (FDR adjusted $p < 0.05$) nell'espressione di let-7i, miR-361-3p, miR-324-5p, miR-221, miR-125a-5p, miR-484, miR-320d. Al contrario, sugli stessi è stata osservata una significativa riduzione dell'espressione di miR-216b, miR-217, miR-216a, miR-375 (FDR adjusted $p < 0.05$). Per valutare la variazione relativa dei miRNA tra siero e biopsie solide, si è proceduto al confronto dei risultati ottenuti dalle due matrici. Le molecole miR-4486 e miR-4741 hanno mostrato un'incrementata espressione nei casi rispetto ai controlli sia sul siero che sulle biopsie solide e il risultato era statisticamente significativo su entrambe le matrici. I microRNA miR-361-3p, miR-324-5p, miR-125a-5p e miR-320d sono risultati iperespressi sia sul siero che sulle biopsie solide ma senza significatività statistica. Una differenza significativa tra siero e biopsie solide è stata riscontrata per la molecola miR-20b-5p, sottoespressa nel siero ($p < 0.001$) e iperespressa nelle biopsie solide ($p < 0.05$) dei casi rispetto ai controlli. Le molecole miR-216a-5p and miR-216b-5p hanno mostrato entrambe una riduzione dei livelli di espressione nelle biopsie solide dei casi ($p < 0.001$) e un incremento nel siero dei casi rispetto ai controlli ma il dato non presentava significatività statistica in nessuna delle due molecole.

I seguenti microRNA sono stati selezionati per le fasi successive dello studio: miR-4486, miR-4741, miR-361-3p, miR-324-5p, miR-125a-5p, miR-320d, miR-20b-5p, miR-216a-5p and miR-216b-5p.

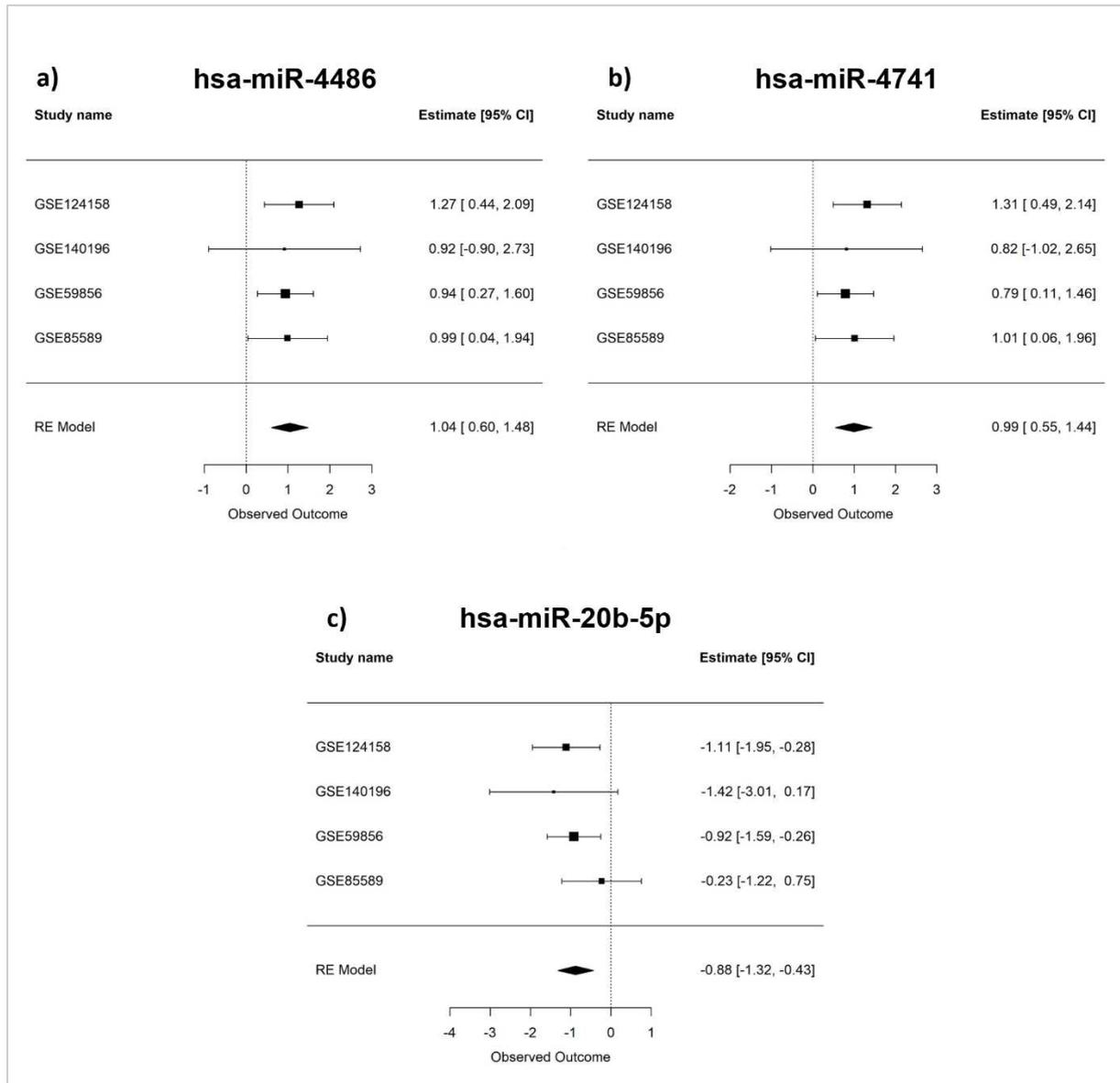


Figura 14: Forest plot delle differenze medie standardizzate (SMD) tra i livelli di espressione nei casi di PDAC e nei controlli di (a) miR-4486, (b) miR-4741, (c) miR-20b-5p, su 4 studi indipendenti e relativi al siero.

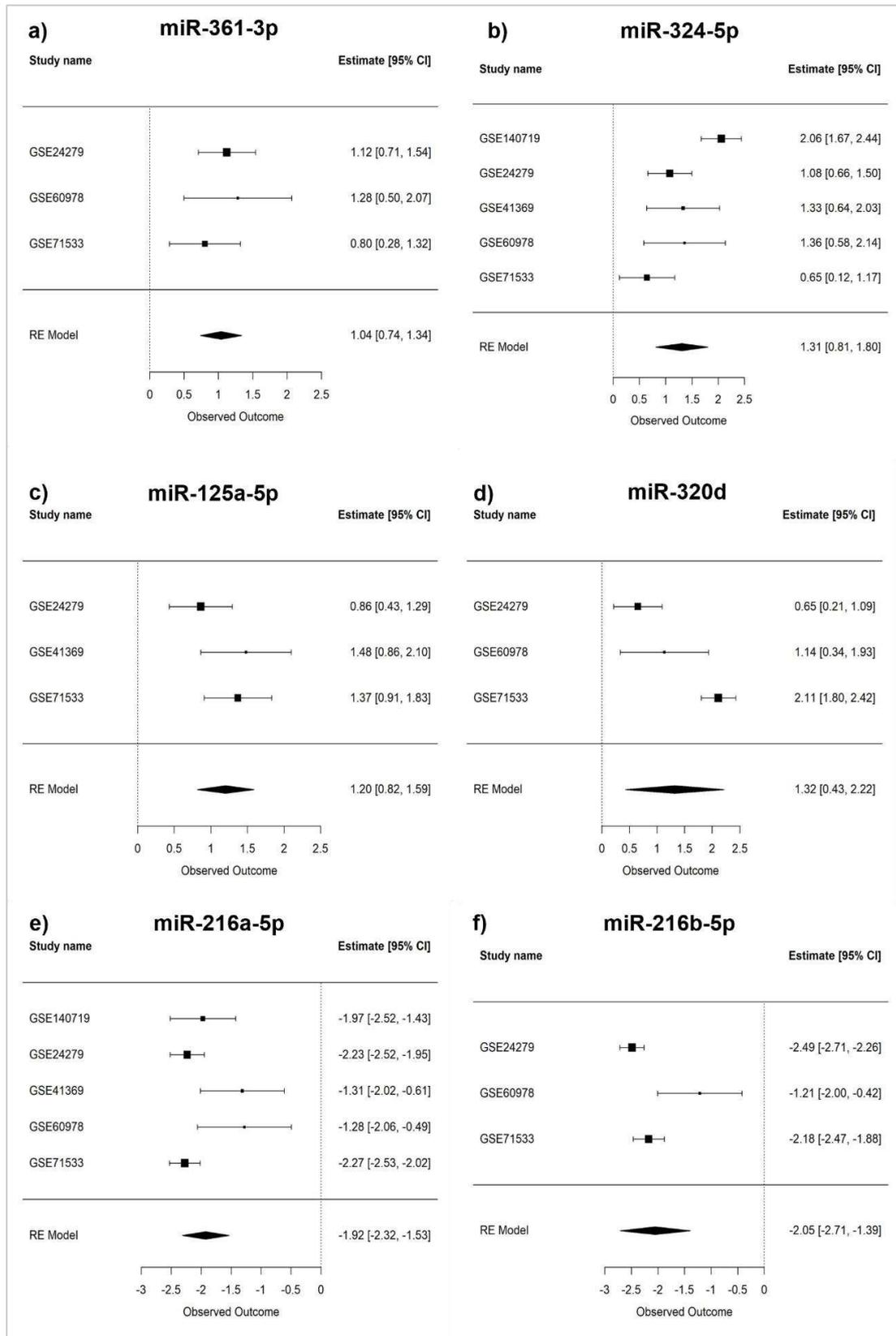


Figura 15: Forest plot delle differenze medie standardizzate (SMD) nell'espressione di (a) miR-361-3p da 3 studi indipendenti, (b) miR-324-5p da 5 studi indipendenti, (c) miR-125a-5p da 3 studi indipendenti, (d) miR-320d da 3 studi indipendenti, (e) miR-216a-5p da 5 studi indipendenti, (f) miR-216b-5p da 3 studi indipendenti. Studi condotti su biopsie solide.

9.1.2. Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA sul siero

I risultati della metanalisi sono stati analizzati sul siero di 37 pazienti arruolati e di 20 controlli sani attraverso Real – Time PCR. L’analisi statistica dei risultati è stata condotta attraverso il test T di Student per dati non appaiati. I pazienti sono stati divisi in quattro gruppi sulla base del sistema di stadiazione TNM e l’espressione relativa dei microRNA è stata comparata tra i vari stadi. Inoltre, la popolazione è stata suddivisa in PDAC low-grade (che include gli stadi I – II) e PDAC high-grade (che include gli stadi III e IV). Le molecole miR-4486, miR-20b-5p, miR-361-3p, miR-320d, miR-216a-5p and miR-216b-5p sono risultate significativamente iperespresse nel siero dei casi rispetto ai controlli ($p < 0.05$). Allo stesso modo, i microRNA miR-125a-5p and miR-324-5p sono risultati iperespressi ma la differenza riscontrata non era statisticamente significativa. alcuna differenza statisticamente significativa è stata inoltre riscontrata nel confronto fra i campioni di siero dei pazienti di stadio I e di stadio II. MiR-125a-5p è risultato iperespresso ($p < 0.05$) nel siero dei pazienti di stadio III e IV rispetto a quelli di stadio I mentre le molecole miR-324-5p e miR-216b-5p erano entrambe sottoesprese ($p < 0.001$) nei pazienti di stadio III quando comparati con quelli di stadio I. Nel siero dei pazienti di stadio IV è stata rilevata la sottoespressione ($p < 0.001$) di miR-216a-5p e di miR-216b-5p rispetto al siero dei pazienti di stadio I. Se si prende in considerazione la stratificazione della popolazione nei due gruppi low-grade e high-grade, le molecole miR-4486 ($p < 0.05$), miR-20b-5p ($p < 0.001$), miR-320d ($p < 0.001$), miR-216a-5p ($p < 0.05$), miR-216b-5p ($p < 0.05$), miR-324-5p e miR-125a-5p sono risultate iperesprese mentre miR-361-3p era sottoespresso ($p < 0.001$) nei pazienti con patologia di basso grado rispetto ai controlli. Nei pazienti appartenenti al gruppo high-grade miR-4486 ($p < 0.05$), miR-20b-5p ($p < 0.05$), miR-361-3p ($p < 0.001$), miR-125a-5p ($p < 0.001$), miR-320d ($p < 0.001$) e miR-216b-5p erano iperespressi mentre miR-324-5p ($p < 0.001$) e miR-216a-5p ($p < 0.001$) erano sottoespressi quando confrontati con i controlli. Il confronto diretto dell’espressione dei microRNA fra il siero dei pazienti di basso grado e quelli di alto grado è risultato nell’iperespressione di miR-4486, miR-20b-5p ($p < 0.05$), miR-361-3p ($p < 0.05$), miR-324-5p, miR-125a-5p ($p < 0.001$) e miR-320d ($p < 0.001$)

nei pazienti di alto grado e la sottoespressione di miR-216a-5p ($p < 0.001$) e miR-216b-5p ($p < 0.05$) negli stessi pazienti.

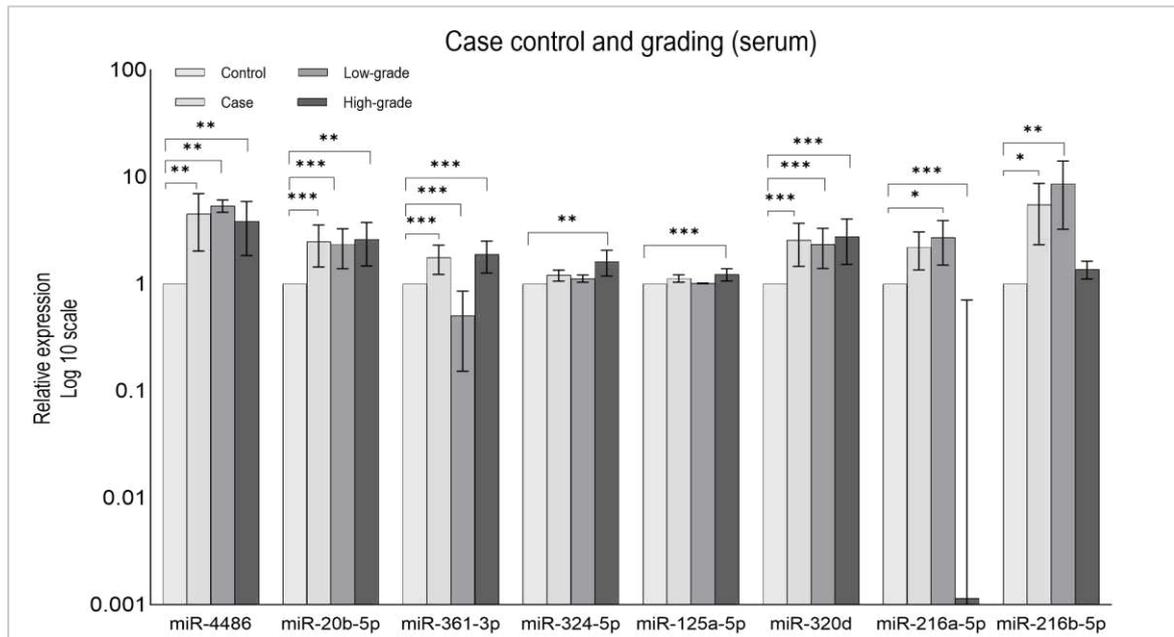


Figura 16: Espressione relativa dei microRNA nel siero tra casi e controlli. I dati sono stati ottenuti anche previa stratificazione della popolazione in low-grade e high-grade patients; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

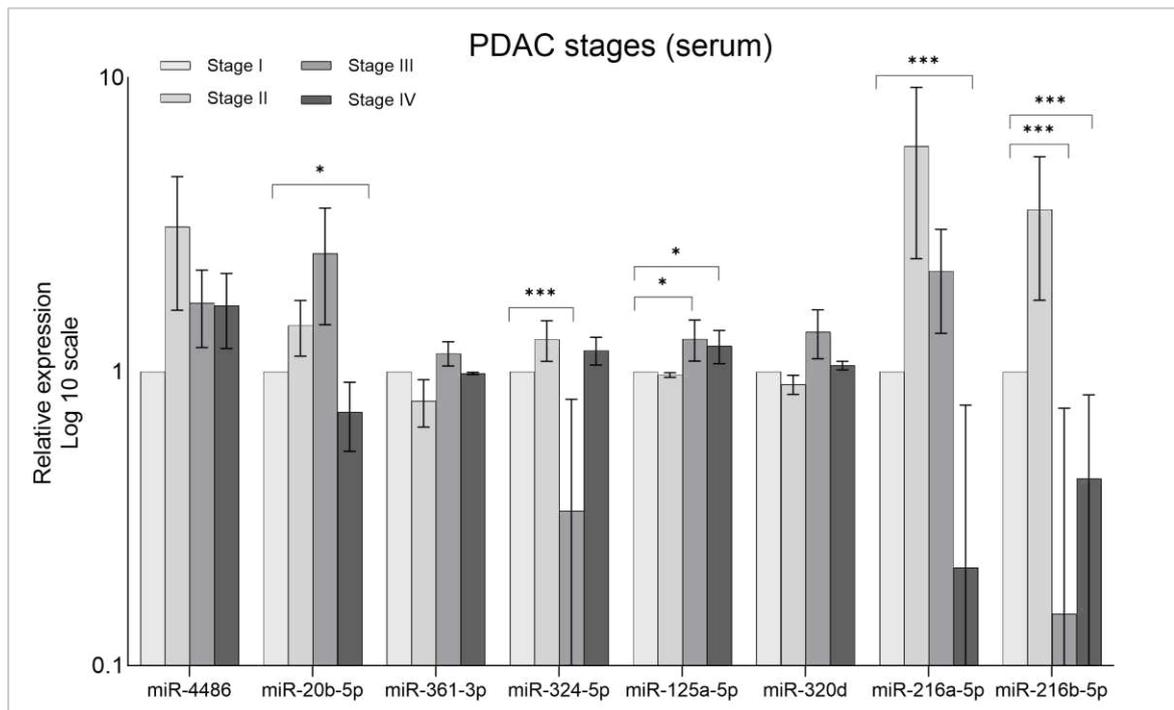


Figura 17: Espressione relativa dei microRNA nel siero al progredire della patologia, dai pazienti di stadio I a quelli di stadio IV; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

9.1.3. Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA su biopsie solide patologiche e loro controparti sane

I livelli di espressione dei nove microRNA sono stati valutati sulle biopsie solide tumorali e le loro controparti sane. Poiché un gran numero di pazienti reclutati per lo studio non era operabile, sono state raccolte meno biopsie solide rispetto al numero di campioni di siero. Per questa ragione, non è stato possibile fare il confronto fra i differenti stadi tumorali e stratificare la popolazione. Il confronto fra biopsie patologiche e non tumorali ha permesso di osservare la sottoespressione ($p < 0.001$) di miR-4486 nei tessuti tumorali. Alcune differenze statisticamente significative è stata riscontrata per miR-20b-5p, miR-361-3p, miR-125a-5p, miR-320d, miR-216a-5p e miR-216b-5p risultati iperespressi, e per miR-324-5p risultato sottoespresso.

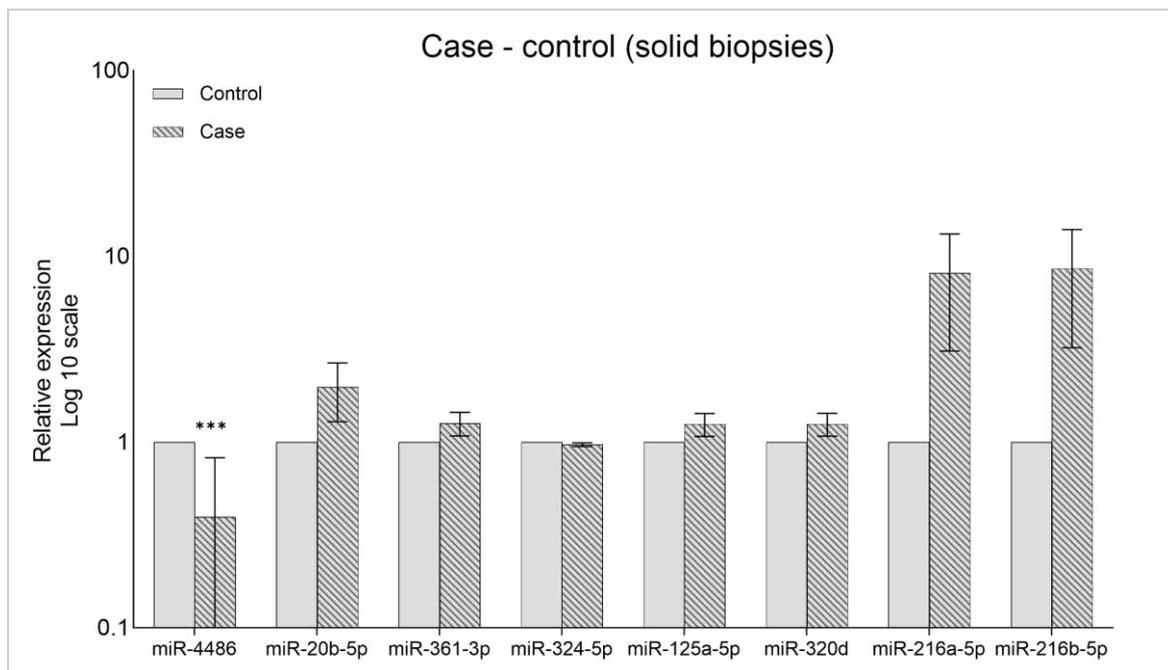


Figura 18: Espressione relativa dei microRNA nelle biopsie patologiche dei pazienti PDAC e delle rispettive controparti sane; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

9.1.4. Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA su modelli in-vitro della patologia

L'espressione dei nove microRNA individuati attraverso la metanalisi è stata valutata sulle linee cellulari hTERT-HPNE E6/E7, BxPC-3, and AsPC-1 nell'ottica di investigare le variazioni di espressione riscontrabili durante la transizione dall'epitelio duttale normale al tumore primario e a quello metastatico. L'espressione relativa dei microRNA sulla linea cellulare BxPC-3,

rappresentativa del tumore primario, è stata confrontata con quella della linea rappresentativa dell'epitelio normale. I microRNA miR-4486, miR-361-3p, miR-324-5p, miR-125a-5p, miR-320d, miR-216a-5p, and miR-216b-5p sono risultati sovraespressi nella linea BxPC-3 ma tali differenze non erano statisticamente significative. miR-20b-5p non si è espresso sulla linea hTERT-HPNE E6/E7 ma solo su quella rappresentativa di tumore primario. Tuttavia, passando dalla linea hTERT-HPNE E6/E7 a quella rappresentativa del tumore metastatico, l'espressione di miR-361-3p ($p<0,001$), miR-324-5p ($p<0,05$), miR-125a-5p ($p<0,05$), miR-320d ($p<0,05$), miR-216a-5p ($p<0,05$) aumenta significativamente nella linea AsPC-1. Il microRNA miR-4486 è risultato sottoregolato nella linea rappresentativa di tumore metastatico mentre miR-216b-5p è risultato iperespresso ma senza alcuna significatività statistica. Se si considera il passaggio dal fenotipo tumorale a quello metastatico, miR-4486 ($p<0,001$), miR-324-5p ($p<0,001$), miR-125a-5p ($p<0,001$), miR-320d ($p<0,01$), miR-216a-5p ($p<0,001$) e miR-216b-5p sono risultati sottoespressi mentre miR-361-3p ha mostrato un'incrementata espressione.

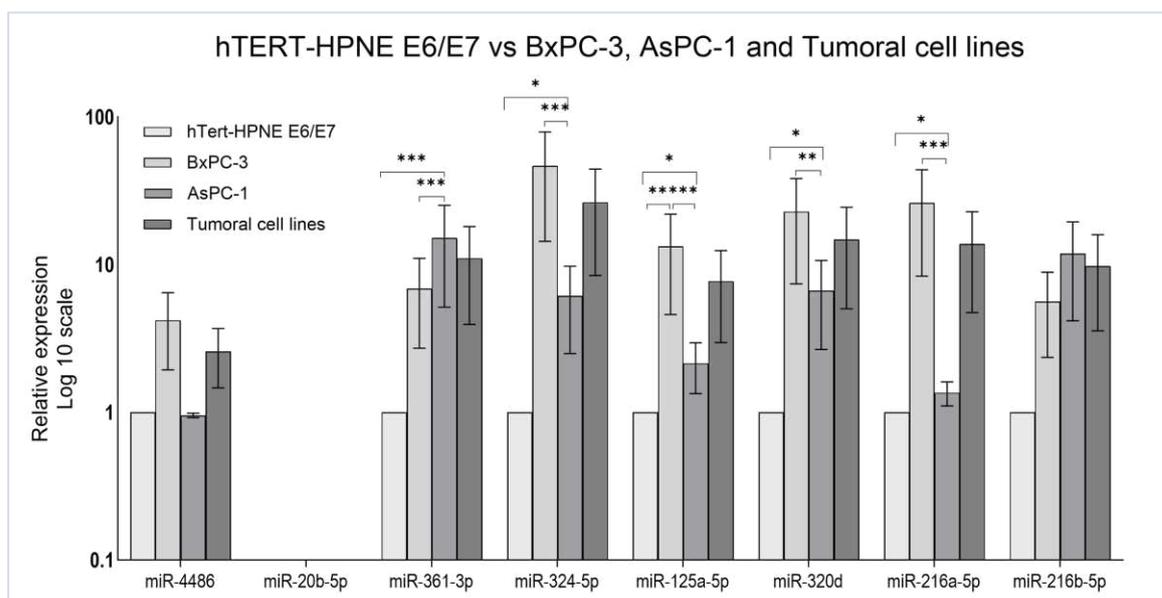


Figura 19: Espressione relativa dei microRNA sulle linee cellulari coltivate in aderenza. Si considerino le variazioni di espressione al passare dalla linea cellulare rappresentativa del normale epitelio duttale (hTERT HPNE E6/E7), alla linea rappresentativa del tumore primario (BxPC-3) e quella rappresentativa del PDAC metastatico (AsPC-1). Con il termine “Tumoral cell lines” si fa riferimento al valore medio dell’espressione della molecola sulle due linee tumorali; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

9.1.5. Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA sui modelli di CSC pancreatiche

Nell’ottica di investigare la deregolazione cui vanno incontro le molecole candidate nel fenotipo CSC, i livelli di espressione sono stati valutati sui modelli CSC-like allestiti sulle due linee cellulari

tumorali BxPC-3 e AsPC-1. Rispetto alle cellule coltivate in aderenza, miR-4486, miR-216a-5p e miR-216b-5p sono risultati iperespressi nelle BxPC-3 CSC-like, anche se la differenza non è significativa. MiR-20b-5p, miR-361-3p ($p<0.05$) e miR-125a-5p ($p<0.001$) erano sottoespressi. MiR-4741, miR-324-5p, and miR-320d non sono stati rilevati nelle CSC. Sui modelli CSC-like ottenuti a partire dalla linea AsPC-1, le molecole miR-361-3p e miR-320d erano significativamente sottoregolate ($p<0.001$) mentre miR-4486 ($p<0.05$), miR-216a-5p e miR-216b-5p erano sovraespressi. Le molecole miR-4741, miR-20b-5p, miR-324-5p, miR-125a-5p non sono state rilevate su questo modello.

Tabella 5: Valori di espressione relativa dei miRNA tra le cellule coltivate in aderenza e le pancreatofere arricchite in CSC (BxPC-3 spheres e AsPC-1 spheres). Per “Avg. spheres” si intende il valore medio ottenuto dall’ espressione relativa dei due modelli CSC-like. ND significa non rilevato.

miRNA	Monolayers	Avg. spheres	BxPC-3 spheres	AsPC-1 spheres
miR-4486	1	13.423	4.373	22.472
miR-20b-5p	1	0.148	0.296	ND
miR-361-3p	1	0.0498	0.0688	0.0308
miR-324-5p	1	ND	ND	ND
miR-125a-5p	1	0.00275	0.00551	ND
miR-320d	1	0.0113	ND	0.0226
miR-216a-5p	1	27.573	3.804	51.342
miR-216b-5p	1	25.532	42.876	8.189

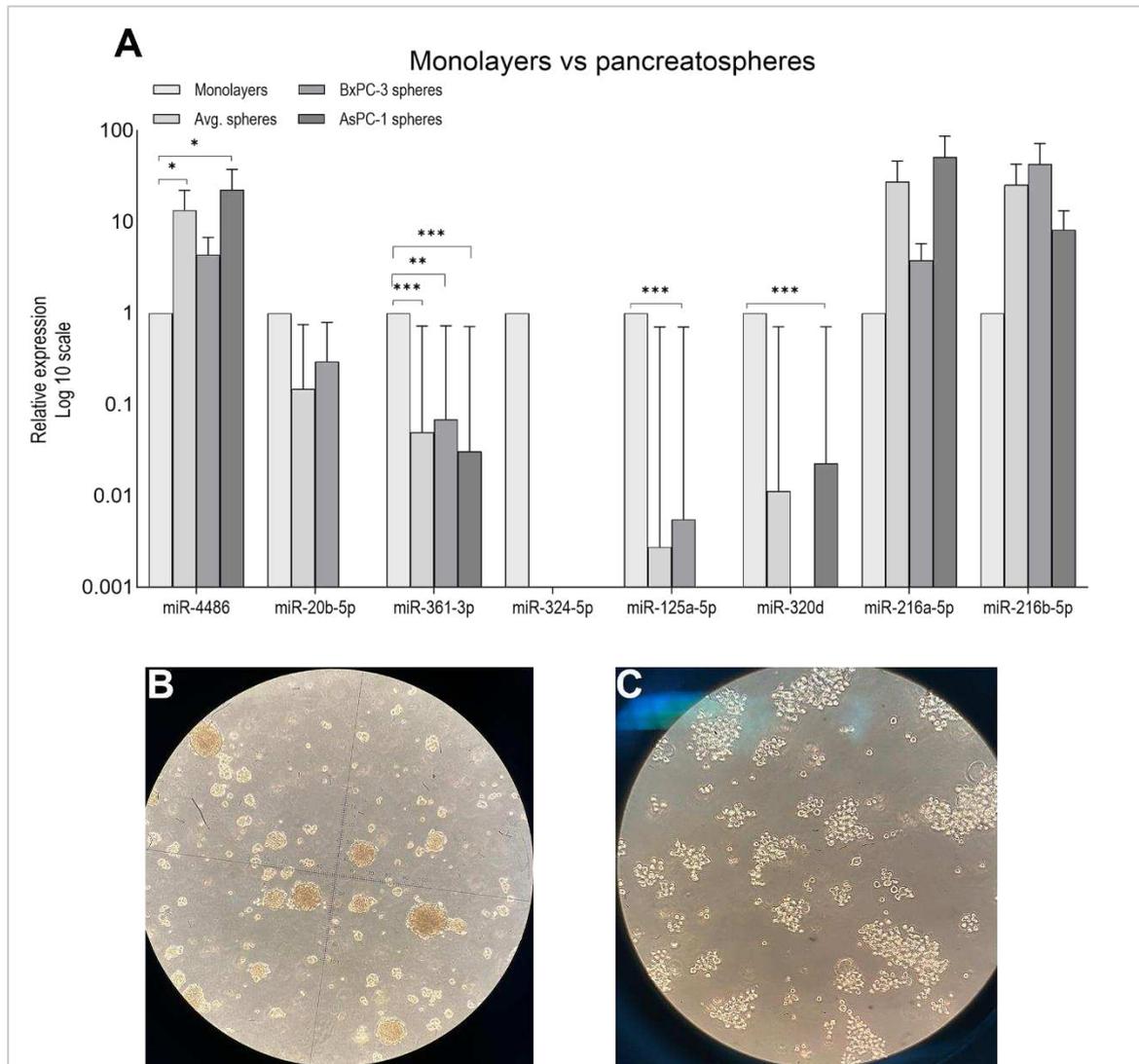


Figura 20: A) Espressione relativa dei miRNA tra le linee cellulari coltivate in aderenza e i rispettivi modelli CSC-like (BxPC-3 spheres and AsPC-1-spheres). Con il termine “Avg. spheres” si fa riferimento al valore medio dei livelli di espressione nei due modelli CSC-like; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; B) Sfere secondarie ottenute dalla linea BxPC-3; C) sfere secondarie ottenute dalla linea AsPC-1.

9.2. PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE

9.2.1. Analisi citofluorimetriche

- ❖ *Influenza di miR-216a-5p sull'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 e sui modelli di CSC pancreatiche*

Per studiare l'effetto di miR-216a-5p e miR-125a-5p sui marcatori delle CSC pancreatiche, le linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 sono state trattate con miRNA mimic e inhibitor per le due molecole in studio ed è stata valutata l'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 mediante saggi citofluorimetrici. Mimando l'effetto di miR-216a-5p, sulle due linee cellulari coltivate in aderenza non è stato possibile appurare una differenza statisticamente significativa. Al contrario, a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p, l'espressione dei marcatori appare ridotta sulle BxPC-3 ($p < 0.01$) e sulle AsPC-1, sia rispetto ai controlli che rispetto alle due condizioni trasfettate con miRNA mimic. Nell'ottica di investigare il ruolo che le due molecole esercitano sulle CSC pancreatiche, è stato osservato come il trattamento con miR-216a-5p mimic induca un incremento dell'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 mentre l'inibizione ne riduca l'espressione (n.s). Sui modelli di CSC allestiti sulla linea cellulare AsPC-1 e trattati con miRNA mimic, l'espressione dei marcatori di staminalità si riduce (n.s) mentre aumenta a seguito dell'inibizione del miR-216a-5p ($p < 0.01$).

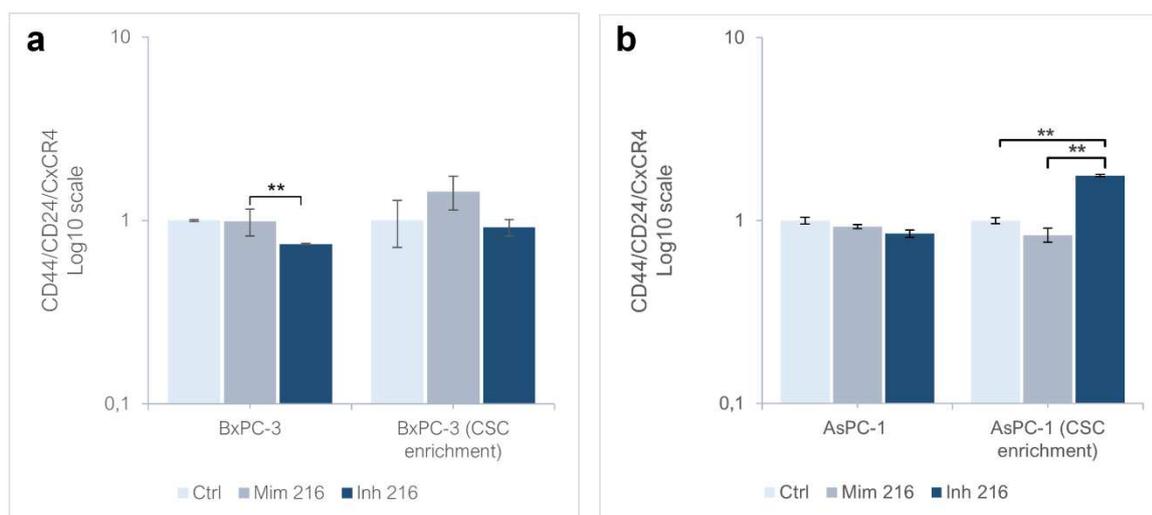


Figura 21: effetto di miR-216a-5p e miR-216b-5p sull'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) e relativi modelli CSC-like; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Influenza di miR-125a-5p sull'espressione dei marcatori CD24/CD44/CxCR4 sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 e sui modelli di CSC pancreatiche*

A seguito della trasfezione delle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 con miR-125a-5p mimic, l'espressione dei marcatori in studio è risultata incrementata in maniera statisticamente significativa sia sulla linea cellulare BxPC-3 ($p < 0.001$) sia sulla linea AsPC-1 ($p < 0.01$). L'inibizione del microRNA determina una riduzione dell'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 sulle linee BxPC-3 (n.s) e AsPC-1 ($p < 0.05$). Sui modelli di CSC allestiti sulla linea cellulare BxPC-3, l'effetto di miR-125a-5p risulta nell'aumentata espressione dei marcatori valutati ($p < 0.05$) e la stessa tendenza è stata osservata trattando il modello con il miR-125a-5p inhibitor. Tuttavia, tale differenza non è statisticamente significativa ed inoltre l'espressione di CD44/CD24/CxCR4 è comunque ridotta rispetto a quella riscontrata sulla condizione trattata con il mimic. Quando il modello CSC allestito sulla linea AsPC-1 viene trattato con miR-125a-5p mimic, si assiste a una riduzione dell'espressione dei marcatori di staminalità (n.s) mentre l'inibizione della molecola in studio si traduce nell'aumentata espressione di CD44/CD24/CxCR4 ($p < 0.05$).

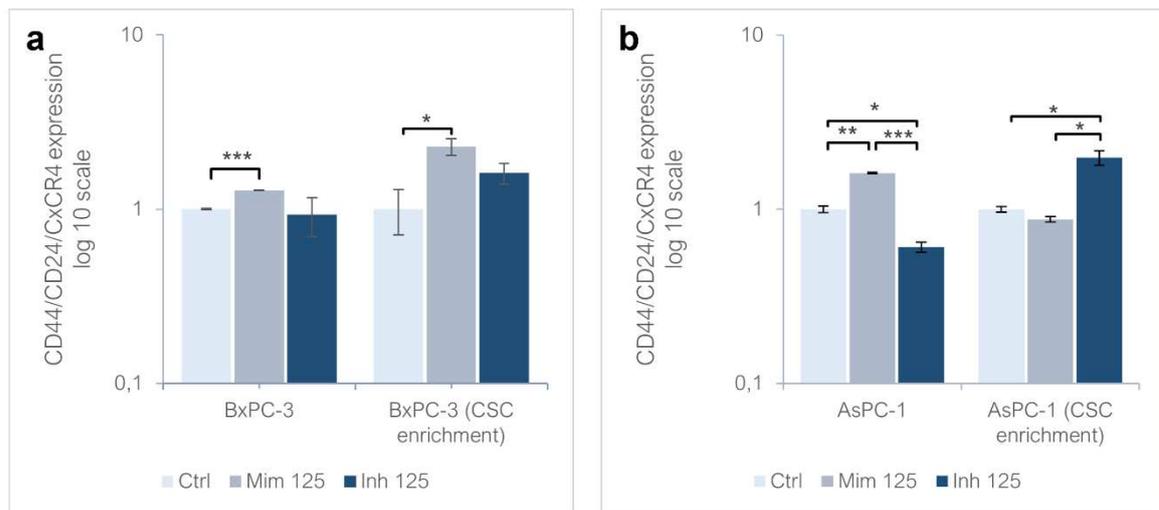


Figura 22: Effetto di miR-125a-5p sull'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) e i rispettivi modelli CSC-like; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Influenza di miR-216a-5p sull'espressione del marcatore ALDH1 sulle linee cellulari BxPC-3-3 e AsPC-1 e sui modelli di CSC pancreatiche*

Il trattamento della linea BxPC-3 con il miR-216a-5p mimic induce una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.01$) dell'espressione di ALDH1. Tuttavia, lo stesso comportamento è stato associato anche al trattamento con l'inhibitor, sebbene la differenza sia priva di significatività statistica e l'espressione del marcatore in studio sia comunque più alta nella condizione trattata con inhibitor rispetto alla prima. Sulla linea AsPC-1 trattata con miR-216a-5p mimic, l'espressione di ALDH1 si riduce in maniera statisticamente significativa ($p < 0.01$) mentre a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p l'espressione del marcatore aumenta (n.s). Il trattamento del modello CSC-like allestito sulle BxPC-3 con miR-216a-5p mimic risulta nella ridotta espressione di ALDH1 ($p < 0.05$) ma tale comportamento è stato rilevato anche a seguito del trattamento con inhibitor: bloccando l'effetto di miR-216a-5p, l'espressione di ALDH1 si riduce rispetto al controllo ($p < 0.001$) e appare ridotta anche rispetto a quella osservata nella condizione trattata con il miRNA mimic. Sul modello CSC allestito a partire dalla linea AsPC-1, l'espressione di ALDH1 si riduce a seguito del trattamento con miR-216a-5p mimic ($p < 0.001$) e inhibitor ($p < 0.05$) ma in quest'ultimo l'espressione è aumentata rispetto a quella osservata nella condizione trattata con mimic.

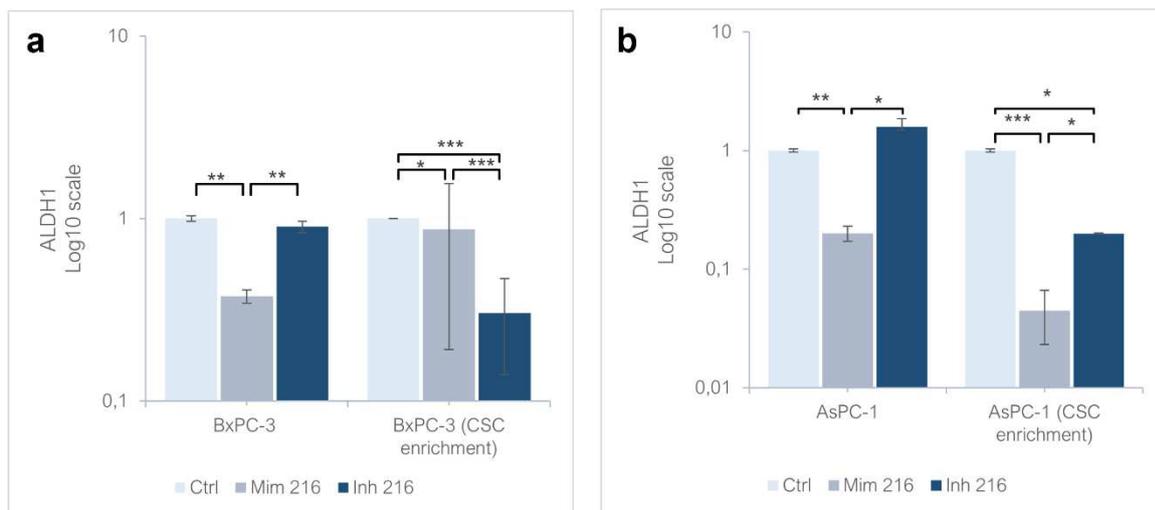


Figura 23: Effetto di miR-216a-5p sull'espressione di ALDH1 sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) coltivate in aderenza e sui rispettivi modelli CSC-like; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Influenza di miR-125a-5p sull'espressione del marcatore ALDH1 sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 e sui modelli di CSC pancreatiche*

L'espressione di ALDH1 risulta ridotta nelle BxPC-3 trattate con miR-125a-5p confrontate con i controlli ($p < 0.001$). A seguito del trattamento con miRNA inhibitor, l'espressione dell'ALDH1 aumenta rispetto alla condizione trattata con mimic ma è comunque più bassa rispetto a quella dei controlli ($p < 0.01$). Nella linea AsPC-1, il trattamento con miR-125a-5p mimic determina un incremento dell'espressione di ALDH1 ($p < 0.01$) mentre la sua inibizione risulta in una riduzione dell'espressione del biomarcatore ($p < 0.001$). Sul modello CSC-like allestito sulla linea BxPC-3 si osserva come, il potenziamento dell'effetto del miR-125a-5p si traduca in una riduzione dell'espressione di ALDH1 rispetto ai controlli ($p < 0.001$). L'inibizione del microRNA produce la riduzione dell'espressione del biomarcatore rispetto ai controlli ($p < 0.05$). La sua espressione risulta comunque più elevata rispetto a quella osservata a seguito del trattamento con mimic. Sul modello AsPC-1 CSC-like, l'espressione di ALDH1 in risposta ai differenti trattamenti riflette quanto osservato sulle pancreatosfere allestite sulla linea BxPC-3.

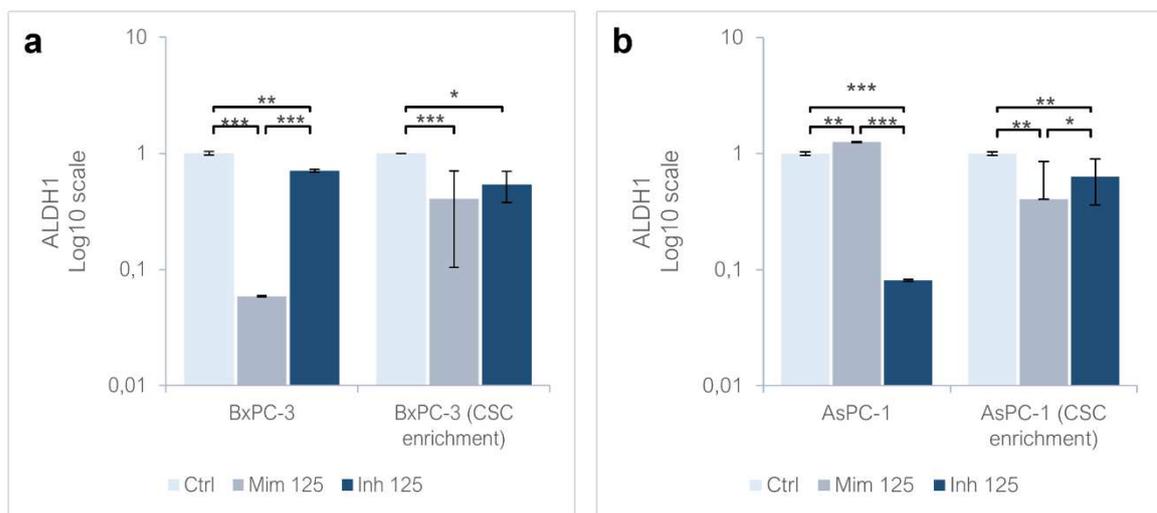


Figura 24: Effetto di miR-125a-5p sull'espressione di ALDH1 sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) coltivate in aderenza e sui rispettivi modelli CSC-like; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

9.2.2. Saggio di formazione delle colonie

❖ *Il ruolo di miR-216a-5p sull'attività clonogenica delle CSC pancreatiche*

Sui modelli CSC allestiti a partire dalle linee BxPC-3 e AsPC-1 e trattati con miRNA mimic e inhibitor è stato condotto un saggio di formazione delle colonie volto a investigare l'effetto di miR-216a-5p e di miR-125a-5p sulla proprietà clonogenica delle CSC pancreatiche. Il trattamento del modello BxPC-3 CSC-like con miR-216a-5p mimic ha indotto un incremento del numero di colonie rispetto al controllo non trattato ($p < 0.01$). A seguito dell'inibizione di miR-216a-5p, il numero di colonie osservate era maggiore rispetto ai controlli ($p < 0.05$) ma comunque inferiore rispetto a quello osservato nella condizione trattata con mimic (n.s). Una simile tendenza è stata osservata anche in merito all'area delle colonie: dimensioni maggiori rispetto al controllo sono state riportate a seguito del trattamento con mimic. Anche l'inibizione di miR-216a-5p si traduce nell'incremento delle dimensioni delle colonie rispetto ai controlli ma l'area è comunque inferiore rispetto al mimic. I modelli CSC-like ottenuti sulle AsPC-1 hanno mostrato un numero ridotto di colonie sia a seguito del trattamento con mimic (n.s) che con l'inhibitor ($p < 0.05$): il numero di colonie rilevato a seguito del potenziamento di miR-216a-5p è superiore rispetto a quello osservato a seguito dell'inibizione della molecola ma la differenza non è statisticamente significativa. In merito all'area delle colonie, a seguito del trattamento con il mimic, sono state osservate colonie di dimensioni inferiori rispetto ai controlli. L'effetto dell'inibizione di miR-216a-5p sull'area delle colonie risulta in una riduzione delle dimensioni stesse (n.s).

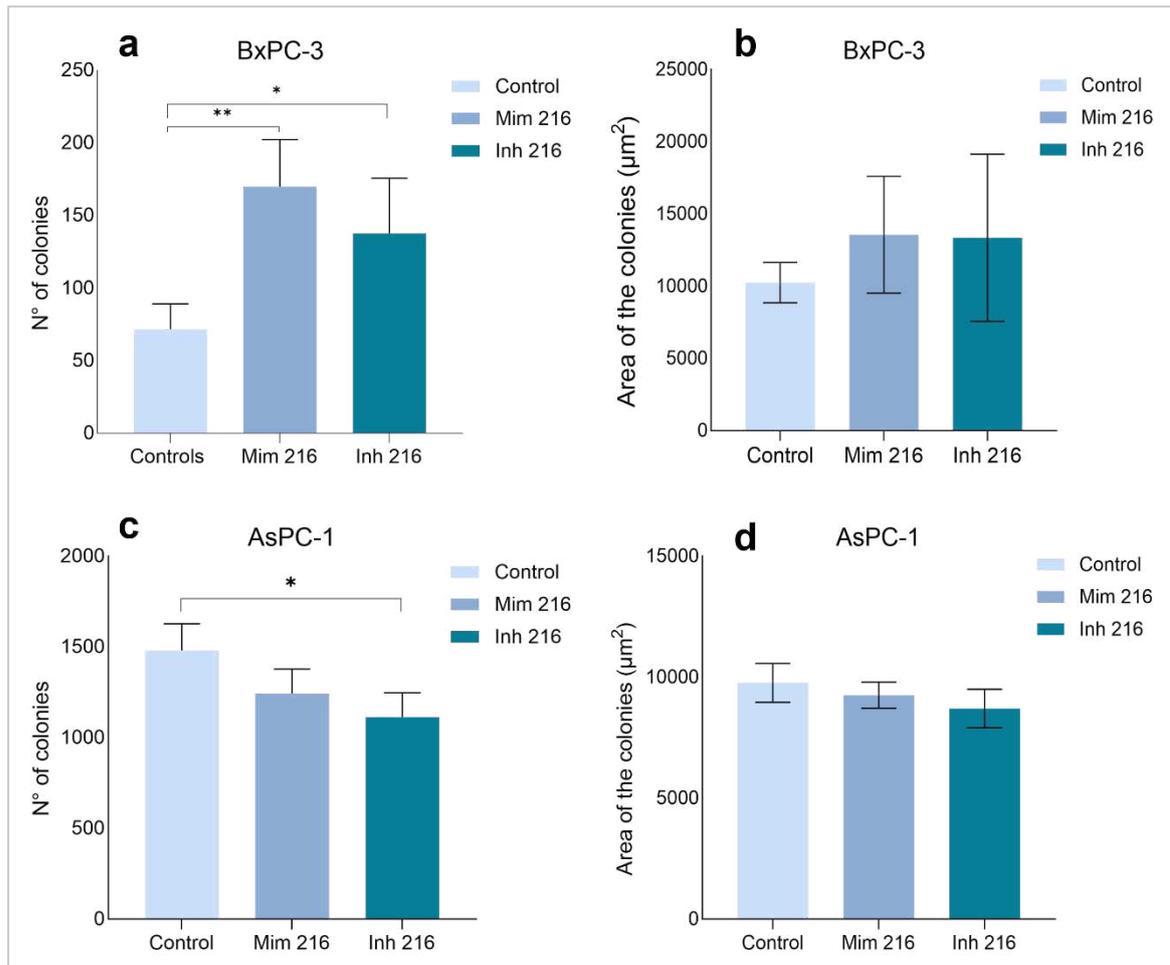


Figura 25: Effetto di miR-216a-5p sul numero e sull'area delle colonie ottenute a partire dalla linea cellulare BxPC-3 (a,b); effetto di miR-216a-5p sul numero e sull'area delle colonie ottenute a partire dalla linea cellulare AsPC-1 (c, d); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Il ruolo di miR-125a-5p sull'attività clonogica delle CSC pancreatiche*

Potenziando l'effetto di miR-125a-5p sulle CSC ottenute dalle BxPC-3, il numero di colonie si riduce rispetto ai controlli (n.s) mentre incrementa a seguito dell'inibizione della molecola (n.s). L'area delle colonie aumenta in entrambe le condizioni ma l'inibizione di miR-125a-5p determina un incremento delle dimensioni delle colonie, sia rispetto al controllo che al mimic (n.s).

Il trattamento del modello AsPC-1 CSC-like con il mimic di miR-125a-5p determina una riduzione del numero di colonie ($p < 0.001$). Lo stesso comportamento è stato osservato anche a seguito del trattamento con inhibitor ($p < 0.001$) e in questa condizione il numero di colonie è inferiore rispetto al trattamento con mimic (n.s). L'area delle colonie aumenta a seguito del trattamento con miRNA mimic e si riduce a seguito dell'inibizione della molecola.

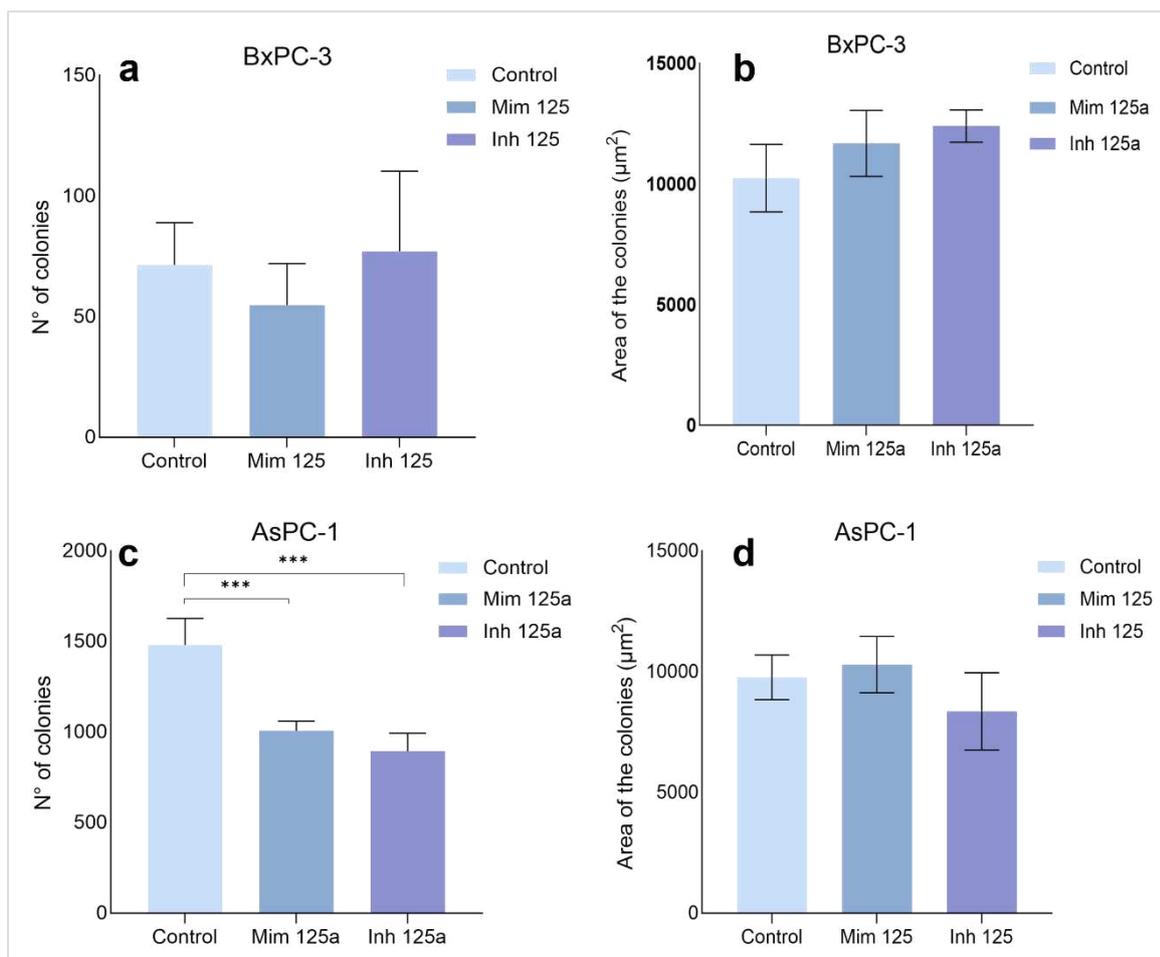


Figura 26: Effetto di miR-125a-5p sul numero e sull'area delle colonie ottenute a partire dalla linea cellulare BxPC-3 (a, b); effetto di miR-125a-5p sul numero e sull'area delle colonie ottenute a partire dalla linea cellulare AsPC-1 (c, d); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

9.2.3. Real – time PCR per i geni della staminalità e dell'EMT

❖ *Effetto di miR-216a-5p sull'espressione di OCT4 e Sox2*

A seguito del trattamento con miR-216a-5p mimic sulla linea cellulare BxPC-3 coltivata in aderenza l'espressione di Oct4 aumenta rispetto al controllo non trattato ($p < 0.05$) mentre la sua inibizione induce una forte riduzione dell'espressione del gene ($p < 0.01$). Nella linea cellulare AsPC-1, l'espressione di OCT4 aumenta timidamente previo potenziamento di miR-216a-5p (n.s) ma la sua espressione aumenta in maniera statisticamente significativa a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p ($p < 0.001$).

Nelle BxPC-3 arricchite di CSC, l'espressione di Oct4 si riduce fortemente a seguito di entrambi i trattamenti ($p < 0.001$) e l'entità del decremento è maggiore nella condizione trattata con miR-216a-5p mimic ($p < 0.001$). Nel modello AsPC-1 CSC – like, il potenziamento del miRNA influenza considerevolmente l'espressione di Oct4, che risulta sottoespresso rispetto ai controlli (n.s). Tuttavia, a seguito dell'inibizione del miRNA, l'espressione di Oct4 aumenta rispetto a quella osservata nei controlli (n.s).

Il trattamento con miR-216a-5p mimic sulla linea cellulare BxPC-3 in aderenza ha provocato una leggera iperespressione di Sox2 (n.s) mentre l'inibizione del miRNA ha indotto una forte ma non significativa sottoespressione di Sox2 rispetto ai controlli. Nella linea AsPC-1 l'espressione di Sox2 si riduce rispetto ai controlli a seguito del trattamento con mimic ($p < 0.001$) e inhibitor (n.s) ma comparando l'espressione di Sox2 tra le due condizioni, risulta incrementata a seguito del trattamento con inhibitor ($p < 0.01$).

Sui modelli CSC – like della linea BxPC-3, sia il trattamento con mimic che con inhibitor si traduce nella riduzione dei livelli di Sox2 rispetto ai controlli ($p < 0.001$). Comparando le due condizioni, l'espressione di Sox2 è maggiore nel modello che ha ricevuto il trattamento con mimic ($p < 0.001$). Sulle CSC allestite sulla linea AsPC-1, entrambi i trattamenti hanno determinato l'iperespressione di Sox-2 (n.s). L'entità dell'incremento è maggiore a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p (n.s).

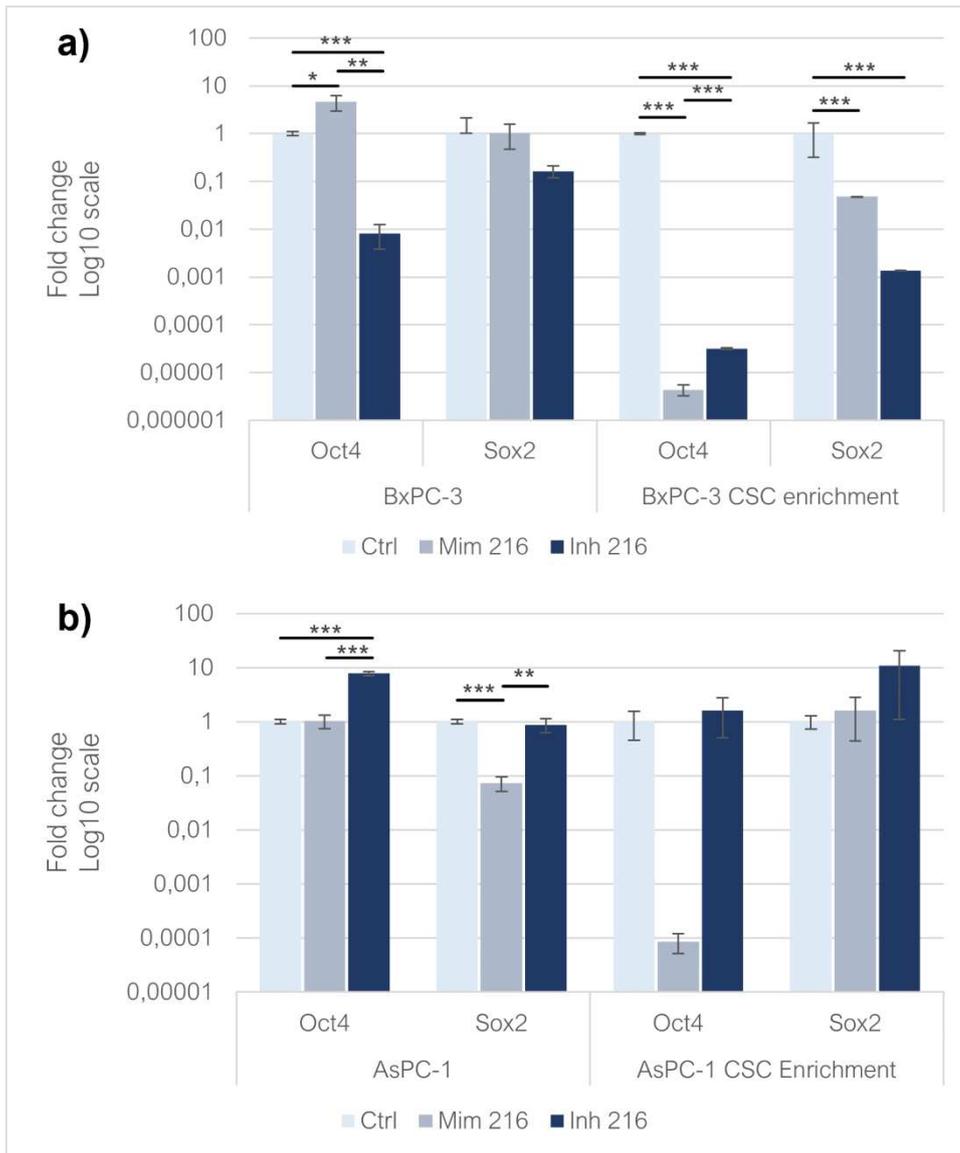


Figura 27: Espressione dei geni della staminalità a seguito del trattamento con miR-216a-5p mimic e inhibitor sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) coltivate in monolayer e sui rispettivi modelli CSC-like; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

❖ *Effetto di miR-216a-5p sui geni associati a EMT: c-Myc, Vimentina e Snail*

L'espressione di c-Myc è risultata ridotta a seguito di entrambi i trattamenti sulla linea cellulare BxPC-3 (n.s) e tra le due condizioni, l'espressione del gene è maggiore a seguito del trattamento con mimic (n.s). Nelle AsPC-1 aderenti trattate con miR-216a-5p mimic, l'espressione di c-Myc si riduce in maniera significativa ($p < 0.05$) mentre risulta iperespressa a seguito dell'inibizione del miRNA (n.s). Nel modello di CSC allestito sulla linea BxPC-3, il comportamento di c-Myc è in linea con quanto osservato nelle cellule aderenti: entrambi i trattamenti inducono una significativa riduzione dell'espressione di c – Myc ($p < 0.001$) e, tra le due condizioni, l'espressione è maggiore a seguito del trattamento con mimic ($p < 0.001$). Sui modelli CSC – like allestiti sulla linea AsPC-1, sia il trattamento con mimic ($p < 0.05$) che il trattamento con inhibitor ($p < 0.001$) ha indotto l'iperespressione di c – Myc e tale incremento è maggiore nel modello trattato con inhibitor ($p < 0.001$).

L'espressione della vimentina subisce un decremento a seguito di entrambi i trattamenti, sia sulle BxPC-3 aderenti ($p < 0.01$) che sui modelli arricchiti in CSC ($p < 0.001$). Dal confronto delle due condizioni, l'espressione della Vimentina è maggiore a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p (n.s) mentre nel modello con arricchimento di CSC, è incrementata a seguito del trattamento con mimic (n.s). Sulle AsPC-1 aderenti, entrambi i trattamenti sono risultati nella sottoespressione della Vimentina (n.s) ma confrontando le due condizioni, l'espressione è maggiore a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p ($p < 0.001$). Nel modello CSC-like della linea AsPC-1, il trattamento con miR-216a-5p mimic è risultato in una significativa riduzione dei livelli di Vimentina ($p < 0.05$) mentre a seguito dell'inibizione del miRNA, il gene è risultato sovraespresso ($p < 0.05$).

Sulla linea BxPC-3 coltivata in aderenza, sia il trattamento con mimic ($p < 0.001$) che con inhibitor ($p < 0.01$) hanno prodotto la sottoregolazione del gene Snail. Lo stesso comportamento è stato osservato nel modello CSC – like allestito sulla stessa linea cellulare ($p < 0.001$). Su entrambi i modelli, l'espressione di Snail è risultata iperespressa a seguito del trattamento con mimic rispetto

all'inhibitor (n.s). Sulla linea cellulare AsPC-1, il trattamento con miR-216a-5p mimic ha indotto la sottoregolazione del gene Snail (n.s) rispetto ai controlli, mentre l'inibizione del miRNA è risultata nell'iperespressione del gene (n.s). La medesima tendenza è stata osservata anche sui modelli CSC – like allestiti sulla linea AsPC-1, in cui potenziando l'effetto del miRNA, l'espressione di Snail si riduce rispetto ai controlli (n.s) mentre inibendo la molecola, l'espressione del gene aumenta in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$).

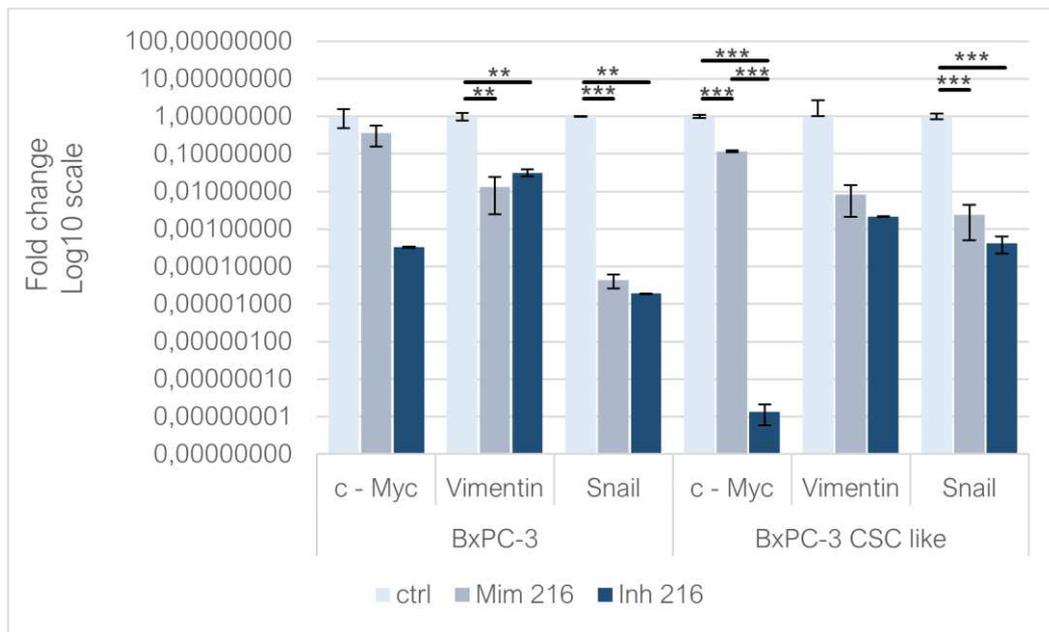


Figura 28: Espressione dei geni associate a EMT a seguito del trattamento con miR-216a-6p mimic and inhibitor sulla linea cellulare BxPC-3 coltivata in aderenza e sulle sue pancreatosfere arricchite in CSC; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

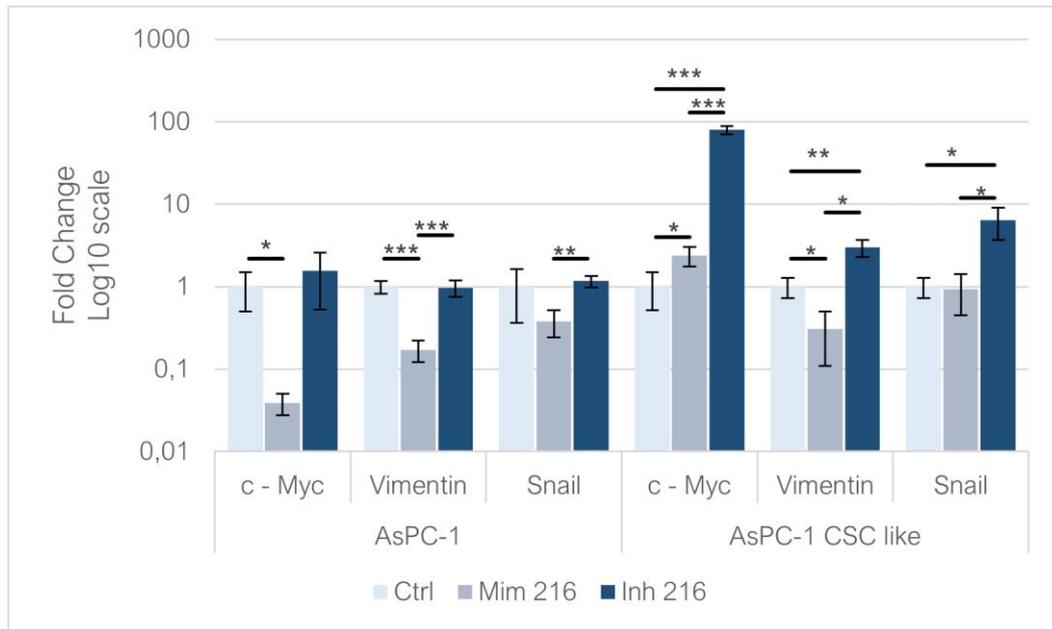


Figura 29: Espressione dei geni associate a EMT a seguito del trattamento con miR-216a-6p mimic and inhibitor sulla linea cellulare AsPC-1 coltivata in aderenza e sulle sue pancreatosfere arricchite in CSC; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Effetto di miR-125a-5p sull'espressione dei geni associati a pluripotenza: OCT4 e Sox-2*

Sulle BxPC-3 aderenti, a seguito della trasfezione con miR-125a-5p mimic, l'espressione di Oct4 aumenta ($p < 0.01$) rispetto ai controlli non trattati mentre, a seguito dell'inibizione del miRNA, il gene è risultato sottoespresso (n.s). Nei modelli CSC – like allestiti sulla linea BxPC-3, entrambi i trattamenti hanno determinato l'iperespressione di Oct4 ($p < 0.01$): l'iperespressione è maggiore nel trattamento con mimic ($p < 0.05$). Nelle AsPC-1 aderenti, il trattamento con miR-125a-5p mimic è risultato nell'iperespressione di OCT4 (n.s) mentre l'inibizione ne ha indotto la sottoregolazione ($p < 0.05$). Nei modelli CSC – like allestiti sulla stessa linea, è stata osservata la stessa tendenza: promuovendo l'effetto di miR-125a-5p, l'espressione di OCT-4 aumenta ($p < 0.05$) mentre inibendo il miRNA, l'espressione del gene si riduce in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$).

In merito all'espressione di Sox-2, la sua espressione appare influenzata negativamente dal trattamento con miR-125a-5p mimic (n.s) e inhibitor ($p < 0.05$) sulle BxPC-3 coltivate in aderenza: tra i due trattamenti, quello con miRNA determina un decremento maggiore (n.s). Nei modelli CSC – like della linea BxPC-3, entrambi i trattamenti risultano nell'iperespressione statisticamente significativa di Sox2 ($p < 0.01$) e tale comportamento è più pronunciato a seguito del trattamento con

mimic. Nelle AsPC-1 aderenti, l'espressione di Sox2 si riduce significativamente rispetto ai controlli, sia nel mimic che nell'inhibitor ($p < 0.05$). Dal confronto dei due trattamenti emerge che potenziando miR-125a-5p l'espressione di Sox-2 risulta più elevata che inibendolo (n.s). Nel modello CSC – like della stessa linea, potenziando l'effetto di miR-125a-5p si ottiene l'iperespressione di Sox-2 ($p < 0.05$) mentre l'inibizione del miRNA risulta nella sottoespressione di Sox-2 ($p < 0.05$).

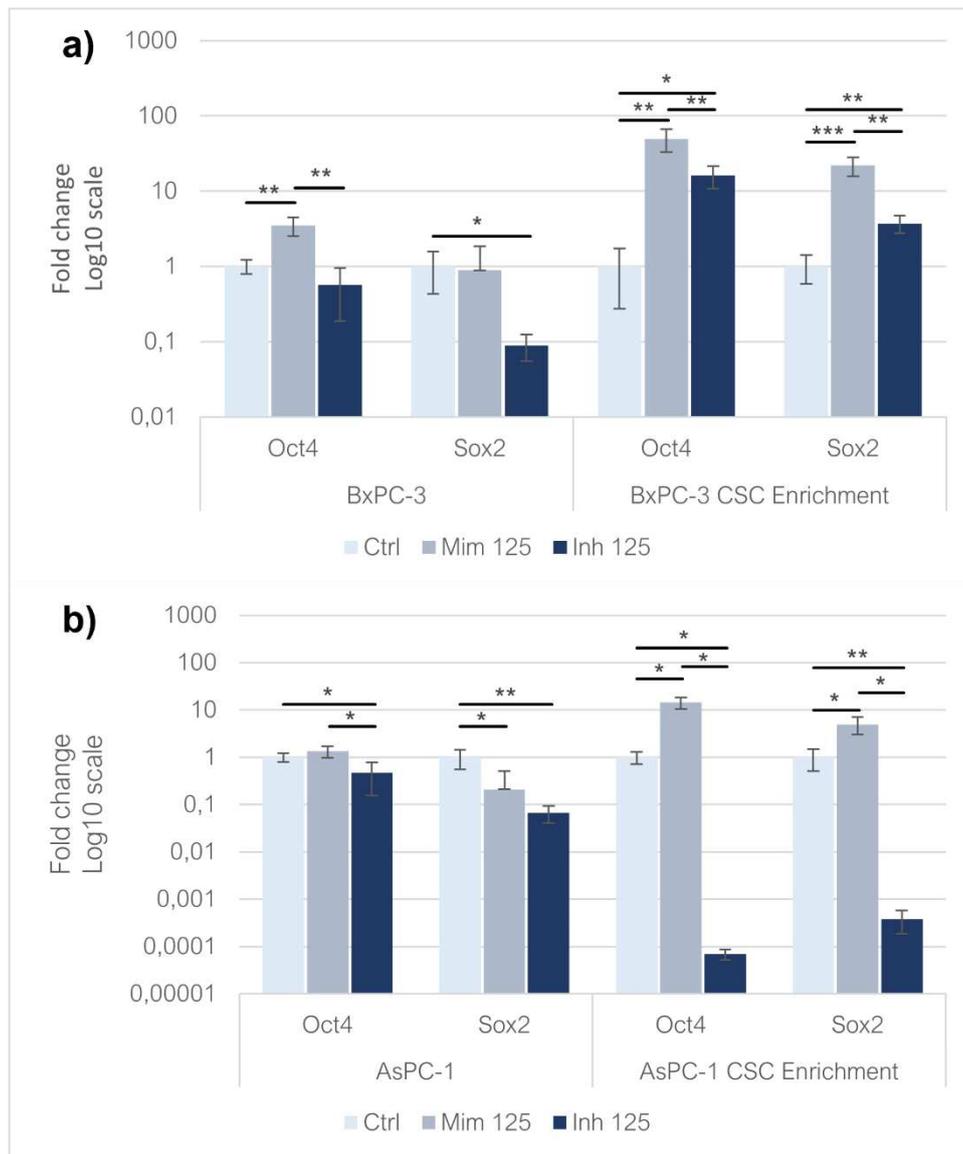


Figura 30: Espressione dei geni della staminalità a seguito della trasfezione con miR-125a-5p mimic e inhibitor sulle linee cellulari BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) coltivate in aderenza e sui rispettivi modelli CSC-like; $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

❖ *Effetto di miR-125a-5p sull'espressione dei geni associati a EMT: c-Myc, Vimentina e Snail*

Nelle BxPC-3 coltivate in aderenza, entrambi i trattamenti con miR-125a-5p mimic e inhibitor influenzano negativamente l'espressione del gene c-Myc (n.s) e, dal confronto delle due condizioni, a seguito dell'inibizione del miRNA i livelli del gene sono incrementati rispetto al trattamento con mimic (n.s). Nei modelli CSC – like il comportamento osservato è esattamente l'opposto: i due trattamenti inducono l'iperespressione di Sox-2 e la differenza è statisticamente significativa nella condizione trattata con inhibitor ($p < 0.05$). Dal confronto tra mimic e inhibitor, i livelli di Sox-2 risultano incrementati a seguito del trattamento con mimic piuttosto che con l'inhibitor (n.s). Nei modelli allestiti sulla linea cellulare AsPC-1, come nella BxPC-3, i due trattamenti inducono una riduzione nei livelli di Sox-2 ($p < 0.05$) ma a seguito del trattamento con mimic, i livelli del gene sono aumentati rispetto a quelli che si osservano nell'inhibitor (n.s). La stessa tendenza è stata osservata nei modelli CSC – like allestiti sulla linea AsPC-1 (n.s).

A seguito della trasfezione con miR-125a-5p mimic sulla linea BxPC-3, i livelli di Vimentina sono risultati incrementati (n.s) rispetto a quelli dei controlli non trattati; si riducono significativamente a seguito dell'inibizione del miRNA ($p < 0.01$). Sul modello CSC – like, i livelli di Vimentina aumentano a prescindere dal trattamento (n.s) e tale tendenza è più pronunciata nella condizione trattata con inhibitor rispetto a quella trattata con mimic (n.s). Sulla linea cellulare AsPC-1, i trattamenti con miRNA mimic ($p < 0.05$) e miRNA inhibitor ($p < 0.01$) hanno determinato una riduzione dei livelli di Vimentina rispetto ai controlli. Dal confronto dei livelli del gene tra mimic e inhibitor, i livelli sono maggiori a seguito del primo trattamento (n.s). Sui modelli CSC – like, i livelli di Vimentina si riducono a seguito del trattamento con miRNA mimic mentre aumentano a seguito dell'inibizione del miRNA (n.s).

L'espressione di Snail è risultata aumentata sulle BxPC-3 coltivate in aderenza, a seguito sia del trattamento con miRNA mimic (n.s) che con inhibitor ($p < 0.05$); tale espressione è più pronunciata a seguito del potenziamento della molecola piuttosto che della sua inibizione ($p < 0.05$). Nel modello CSC – like ottenuto dalla linea BxPC-3 è stato osservato lo stesso comportamento (n.s) ma

considerando il confronto tra mimic e inhibitor i livelli di Snail sono risultati più elevati a seguito dell'ultimo (n.s). Nelle AsPC-1 coltivate in aderenza, i livelli di Snail sono risultati incrementati a seguito dei due trattamenti (n.s) e fra i due, l'espressione del gene è maggiore nella condizione trattata con mimic (n.s). Nei modelli CSC – like allestiti su questa linea cellulare, il comportamento è lo stesso precedentemente descritto: a seguito del trattamento con mimic ($p<0.01$) e inhibitor ($p<0.05$) i livelli incrementano rispetto ai controlli e, dal confronto delle due condizioni, sono più elevati a seguito del trattamento con mimic ($p<0.05$)

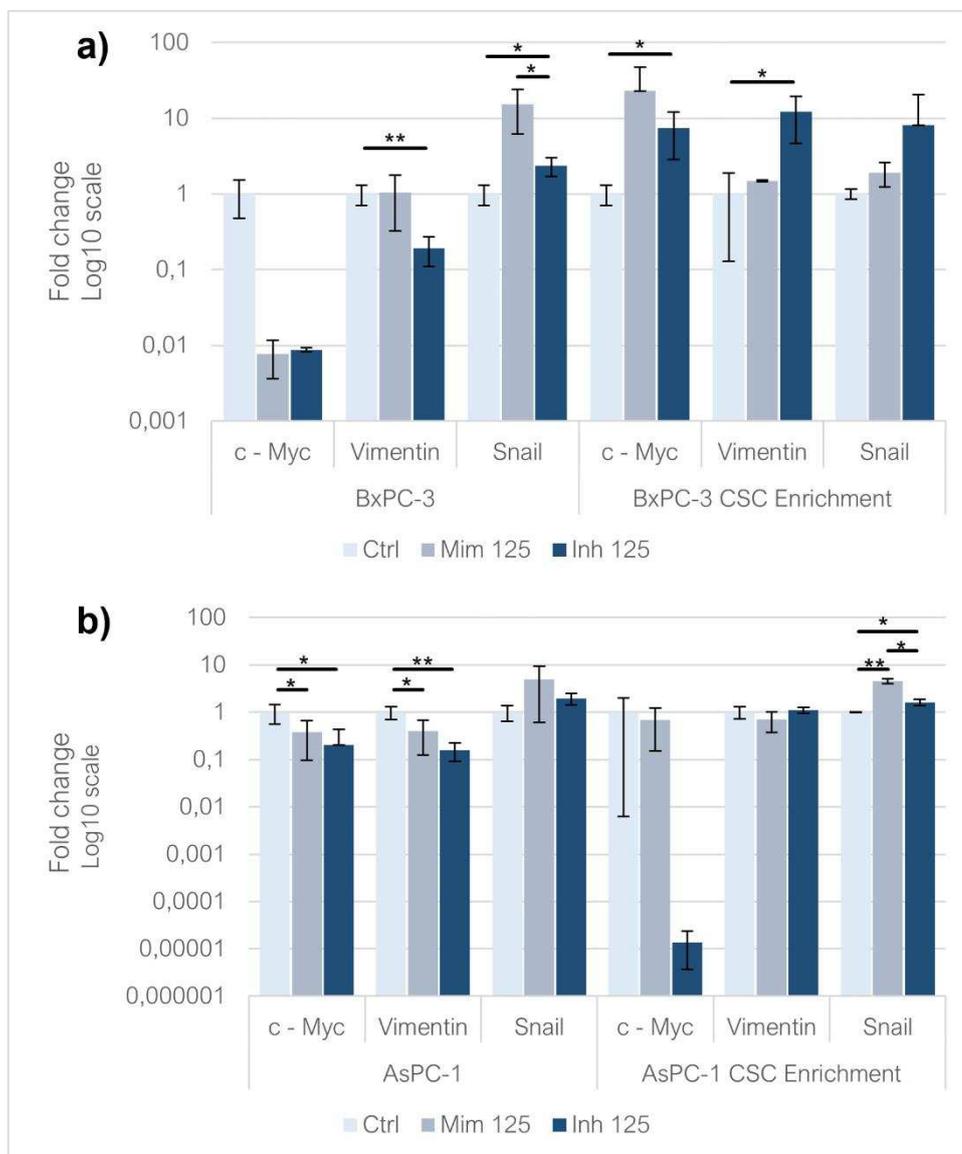


Figura 31: Espressione dei geni associati a EMT a seguito del trattamento con miR-125a-5p mimic e inhibitor sulle linee BxPC-3 (a) e AsPC-1 (b) coltivate in aderenza e sui loro modelli CSC-like; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

9.2.4. Effetti di miR-216a-5p e miR-125a-5p sulla vitalità dei modelli in vitro

Per valutare l'influenza dei microRNA miR-216a-5p e miR-125a-5p sulla vitalità cellulare è stato condotto il saggio Alamar Blue sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 trasfettate con miRNA mimic e inhibitor.

A seguito del trattamento con miR-216a-5p mimic e inhibitor su entrambe le linee cellulari è stata riportata una riduzione della vitalità ($p < 0.001$). In ogni caso, la vitalità osservata sulle due linee cellulari a seguito dell'inibizione di miR-216a-5p è risultata superiore a quella osservata nella condizione trattata con mimic. Tale differenza è statisticamente significativa nella linea cellulare AsPC-1 ($p < 0.001$). Se si prende in considerazione il trattamento con miR-125a-5p sulle due linee cellulari è stata osservata la medesima tendenza illustrata precedentemente: a seguito dei due trattamenti la vitalità si riduce rispetto ai controlli e la differenza è significativa per entrambi i trattamenti sulla linea BxPC-3 ($p < 0.001$) e a seguito del trattamento con mimic sulla linea cellulare AsPC-1 ($p < 0.001$). La vitalità a seguito dell'inibizione di miR-125a-5p risulta incrementata rispetto a quella osservata a seguito del potenziamento della molecola su entrambe le linee cellulari, ma il dato è significativo sulle AsPC-1 ($p < 0.001$).

Sul modello CSC-like allestito sulla linea cellulare BxPC-3, il trattamento con miR-216a-5p è risultato in una incrementata vitalità rispetto ai controlli (n.s). La stessa tendenza è stata osservata a seguito dell'inibizione della molecola (n.s) ma tale valore è più elevato di quello ottenuto potenziando l'effetto di miR-216a-5p (n.s). Sulla linea cellulare AsPC-1, a seguito del trattamento con miR-216a-5p mimic e inhibitor, la vitalità si riduce rispetto ai controlli (n.s). L'inibizione di miR-216a-5p determina un incremento della vitalità rispetto alla condizione trattata con mimic (n.s).

Il trattamento del modello BxPC-3 CSC-like con miR-125a-5p mimic e inhibitor determina una riduzione della vitalità (n.s) e nel mimic il valore riportato per la vitalità è superiore rispetto a quello osservato a seguito dell'inibizione della molecola in studio (n.s). Nel modello CSC-like allestito sulla linea AsPC-1, si assiste alla stessa tendenza osservata sulla linea BxPC-3; tuttavia, la riduzione

della vitalità cui si assiste a seguito dell'inibizione di miR-125a-5p è statisticamente significativa ($p < 0.001$). Inoltre, l'inibizione di miR-125a-5p sul modello AsPC-1 CSC-like determina una significativa riduzione della vitalità se comparata alla condizione trattata con mimic ($p < 0.01$).

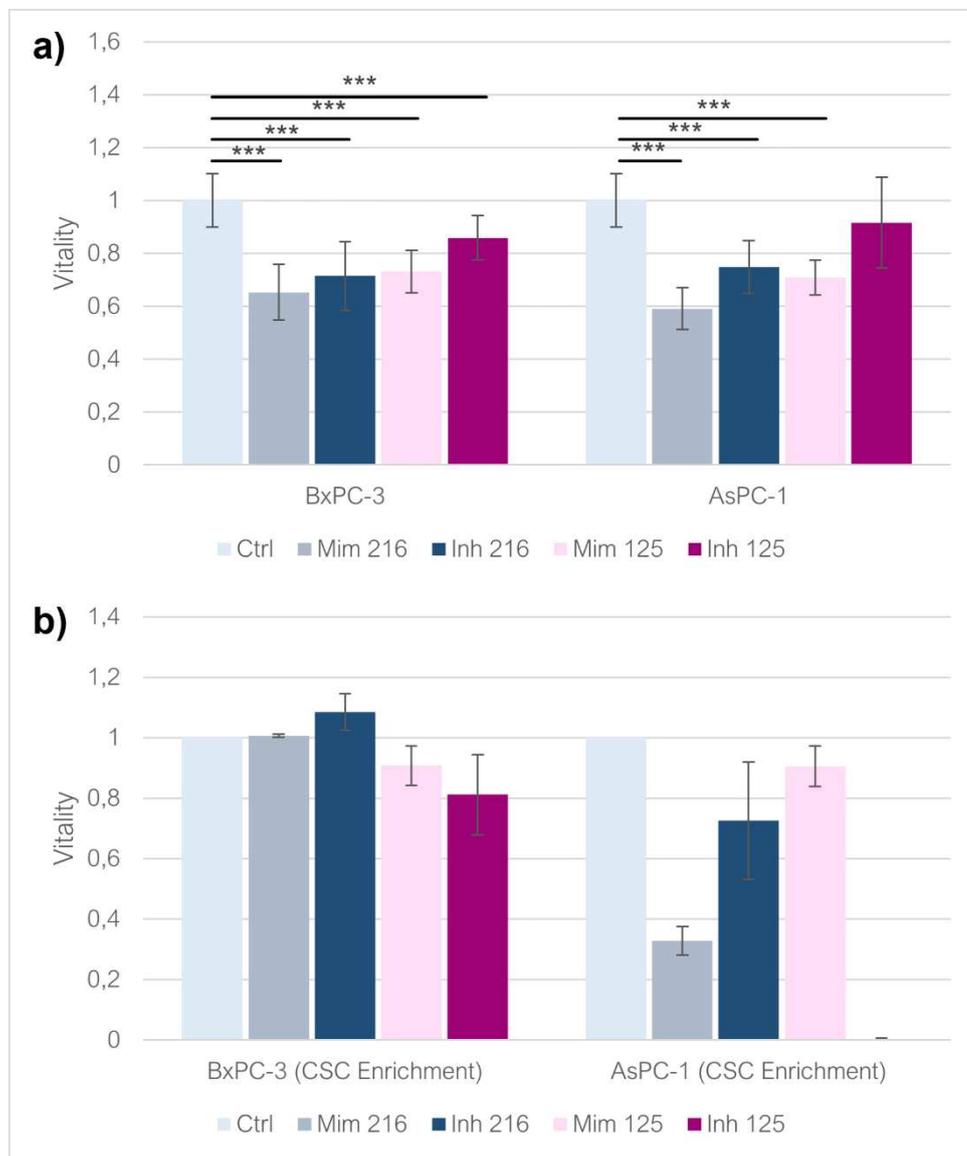


Figura 32: Effetto sulla vitalità dei trattamenti con miR-216a-5p/miR-125a-5p mimic e inhibitor sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 coltivate in aderenza (a) e sui rispettivi modelli CSC (b); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

10. DISCUSSIONE

Il fine ultimo della ricerca presentata è quello di contribuire a chiarire i meccanismi molecolari che guidano i processi di tumorigenesi, progressione e metastasi nell'adenocarcinoma del dotto pancreatico. Si tratta di una patologia caratterizzata da un'elevata letalità, strettamente associata all'alto tasso di metastatizzazione e alla diagnosi tardiva per la quale l'unica strategia terapeutica rimane la resezione chirurgica, di rado praticabile.

A tal proposito, si è scelto di investigare il ruolo regolatorio che i microRNA possono esercitare sugli eventi cruciali della patologia, in quanto numerose evidenze scientifiche ne dimostrano il coinvolgimento nel PDAC, e la potenziale utilità come biomarcatori o bersagli terapeutici.

Lo studio è articolato in una prima parte, a carattere di discovery, volta a identificare un pannello di miRNA deregolati nella patologia di interesse, e nello studio funzionale di miR-216a-5p e miR-125a-5p. Le due molecole sono state selezionate per la forte deregolazione esibita nei modelli di CSC pancreatiche e le analisi sono state condotte nell'ottica di approfondire il loro potenziale coinvolgimento nell'acquisizione o regressione dei tratti di staminalità. .

10.1. PARTE PRIMA: APPROCCIO INVESTIGATIVO

Questa sezione si pone l'obiettivo di identificare un pannello di microRNA deregolati nel PDAC e con un ruolo nella sua patogenesi, nell'ottica di migliorare la conoscenza in materia di regolazione dei miRNA nella patologia d'interesse e introdurre nuovi potenziali biomarcatori diagnostici e prognostici.

La parte a carattere investigativo ha preso le mosse da una metanalisi che ha permesso di selezionare miR-4486, miR-4741, miR-20b-5p, miR-361-3p, miR-125a-5p, miR-320d, miR-216a-5p e miR-216b-5p in qualità di miRNA associati al PDAC. I livelli di espressione delle molecole sono stati valutati tramite Real Time PCR su siero e biopsie solide di 37 pazienti reclutati per lo studio. Una perfetta corrispondenza tra i risultati della metanalisi e delle RT-PCR condotte sulle matrici biologiche è stata rilevata su miR-125a-5p, miR-320d e miR-361-3p, sempre iperespressi nei casi di PDAC. Una corrispondenza parziale tra i dati della metanalisi e una delle matrici considerate è stata rilevata per miR-4486, miR-324-5p, miR-216a-5p e miR-216b-5p. MiR-4741 non è mai stato rilevato sui modelli considerati.

In vitro, considerando la transizione dal fenotipo normale a quello di tumore primario, tutti i miRNA sono risultati iperespressi. La stessa tendenza è stata osservata nel fenotipo metastatico, con la sola eccezione di miR-4486. L'espressione di miR-20b-5p non è stata rilevata sulle linee cellulari coltivate in aderenza.

Il ricorso ai modelli CSC-like ha permesso di osservare come l'espressione dei miRNA possa variare maggiormente rispetto a quanto precedentemente osservato nei modelli coltivati in aderenza e le differenze di espressione non sono sempre coerenti con il tipo di deregolazione osservata negli altri modelli. Questo è il caso di miR-361-3p e di miR-324-5p la cui espressione, incrementata nelle condizioni tumorali, nei modelli CSC-like risulta rispettivamente fortemente ridotta o assente. Al

contrario, le molecole miR-216a-5p e miR-216b-5p sono risultate ampiamente iperespresse nelle CSC rispetto ai modelli tumorali.

Numerosi studi hanno posto l'accento sulla relazione tra miRNA e PDAC e spesso sono stati rilevati risultati contrastanti. Di seguito trova spazio la discussione dei principali risultati ottenuti nel presente studio, e correlati a quanto finora scoperto in merito a ogni miRNA in studio.

MiR-216a-5p appartiene al cluster microRNA-216 localizzato sul cromosoma umano 2p16.1 e include le molecole miR-216a-3p, miR-216b-5p e miR-216b-3p [88]. Numerosi studi hanno riportato come la sua espressione nei casi di PDAC sia frequentemente ridotta nel siero e nelle biopsie solide e hanno proposto differenti meccanismi molecolari per spiegare il suo potenziale ruolo di oncosoppressore [89,90]. Nel presente studio, valutando i livelli di espressione della molecola nelle differenti matrici biologiche dei pazienti colpiti da PDAC, è emerso come i suoi livelli siano incrementati nei casi rispetto ai controlli. Nel siero appare sovraregolato negli stadi precoci della patologia ma la sua espressione gradualmente si riduce, al progredire della patologia stessa: risulta infatti iperespresso negli stadi II e III comparati allo stadio I mentre nello stadio IV la sua espressione si riduce drammaticamente ($p < 0.001$). In accordo con questi risultati, l'espressione di miR-216a-5p è incrementata nei pazienti low-grade ($p < 0.05$) e ridotta in quelli high-grade ($p < 0.001$).

Tale osservazione è coerente con quanto riportato da Zhang et al. i quali hanno dimostrato che l'espressione di miR-216a-5p nelle biopsie solide è inversamente associata con l'invasione linfatica peripancreatica, l'invasione perineurale e lo stadio TNM avanzato [91].

Nell'ottica di investigare in che modo l'espressione dei miRNA possa modificarsi nella transizione tra il fenotipo epiteliale duttale normale, a quello tumorale e metastatico, si è proceduto alla valutazione dei livelli di espressione su tre linee cellulari rappresentative dei modelli descritti: hTERT/HPNE E6/E7, BxPC-3 e AsPC-1. Inoltre, per valutare il potenziale ruolo dei microRNA nell'acquisizione dei tratti di staminalità, la potenziale deregolazione è stata analizzata anche sui modelli arricchiti in CSC e allestiti sulle due linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1.

Come osservato nei pazienti, l'espressione di miR-216a-5p si riduce ($p < 0.001$) con la progressione dalla linea rappresentativa del tumore primario (BxPC-3) a quella rappresentativa del tumore metastatico (AsPC-1). Tuttavia, nei modelli CSC-like, miR-216a-5p è risultato iperespresso rispetto alle linee cellulari coltivate in aderenza, seppure non in maniera statisticamente significativa.

Nel presente studio, il comportamento di miR-216a-5p suggerisce che possa esercitare un duplice ruolo nel PDAC: negli stadi precoci sembra agire come oncomiR e promuovere la patologia; assume un comportamento di oncosoppressione durante quelli più avanzati. Inoltre, la sottoregolazione cui va incontro nelle fasi tardive può risultare da un meccanismo di feedback volto alla sua inibizione [91]. Tra i meccanismi proposti per spiegare il suo ruolo, è stato suggerito che possa esercitare una funzione di oncosoppressione agendo sul target TPT1, associato alla via di segnalazione mTORC. Inoltre, la ridotta espressione della molecola è stata correlata al LINC01133 il quale, agendo sul bersaglio miR-216a-5p, promuove la proliferazione delle cellule tumorali e le metastasi [88,91]. Questo supporta l'idea per cui a differenti stadi del PDAC, l'espressione di miR-216a-5p possa risentire dell'influenza di altri mediatori.

Anche nel contesto di miR-216b-5p è stata rilevata una duplice deregolazione. La molecola è risultata iperespressa sia nel siero ($p < 0.05$) che nelle biopsie solide dei casi. La stessa tendenza è stata riscontrata in-vitro, dove miR-216b-5p ha mostrato una sovraregolazione non-significativa sia sui modelli in aderenza che sulle pancreatosfere arricchite in CSC. Tuttavia, i confronti realizzati nel contesto del siero, hanno fornito uno scenario interessante: l'espressione di miR-216b-5p si riduce gradualmente al progredire della patologia, acquisendo una consistente e drammatica sottoregolazione negli stadi III e IV rispetto allo stadio I ($p < 0.001$). Analogamente, l'espressione della molecola si riduce ($p < 0.01$) durante la transizione dai pazienti low-grade a quelli high-grade, sebbene su entrambi i livelli di espressione siano superiori rispetto ai controlli sani. Numerosi studi hanno riportato la ridotta espressione di miR-216b-5p nel PDAC [92,93]. You et al. hanno correlato la sua sottoregolazione allo stadio TNM e alle dimensioni tumorali. Gli stessi hanno inoltre suggerito che la molecola possa agire sul bersaglio TPT1, un regolatore chiave in grado di

sopprimere la proliferazione cellulare e indurre l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi attraverso l'asse TPT1/Pim-3. Le evidenze acquisite durante il presente studio suggeriscono che miR-216b-5p possa esercitare un duplice ruolo durante la progressione della patologia.

Il ruolo di miR-125a-5p nel contesto tumorale è stato investigato e discusso ampiamente nel carcinoma epatocellulare (HCC), nel tumore ai polmoni e nel glioblastoma. In queste patologie il comportamento del miRNA è riconducibile a quello di un oncosoppressore. Tuttavia, numerose evidenze scientifiche suggeriscono che la sua funzione di promozione o soppressione tumorale possa essere tessuto-specifica: a supporto di questo, è stato osservato come la stessa molecola nel medesimo contesto tumorale ma su tessuti differenti possa agire come oncogene o oncosoppressore [94]. Dalle analisi condotte in questo studio è emersa la sua sovraregolazione in tutte le matrici dei pazienti reclutati, con una corrispondenza perfetta dei dati provenienti dalla metanalisi. Nel siero, al progredire della patologia, l'espressione di miR-125a-5p aumenta soprattutto negli stadi III e IV comparati allo stadio I ($p < 0.05$) e nei pazienti high-grade rispetto ai controlli ($p < 0.001$). In-vitro, è risultata significativamente sovraregolata nelle linee cellulari tumorali aderenti rispetto alla linea rappresentativa del dotto normale, ma l'espressione si riduce al passare dal fenotipo di tumore primario a quello di tumore metastatico ($p < 0.001$). È degno di nota il fatto che nel modello CSC-like allestito sulla linea BxPC-3 l'espressione sia ridotta rispetto a quella della linea coltivata in aderenza, mentre non è stato rilevato sulle pancreatosfere della linea AsPC-1. La deregolazione di miR-125a-5p nelle CSC suggerisce che tale molecola possa esercitare un ruolo unico all'interno di questa sottopopolazione, differente dalle altre cellule cancerose. Sebbene l'espressione aberrante di questo miRNA sia stata estensivamente descritta nel contesto tumorale, non sono numerosi gli studi che ne investigano il ruolo in merito al PDAC [95]. Chen et al. hanno suggerito che miR-125a-5p possa promuovere l'invasione, la migrazione e la proliferazione delle cellule tumorali nel PDAC e la sua attività subisca la regolazione di MIR600HG, un lncRNA la cui iperespressione sopprime i tratti di malignità delle cellule tumorali. Lo stesso studio riporta che miR-125a-5p incoraggia la progressione del PDAC attraverso l'inibizione di MTUS1, suo target diretto, e la conseguente attivazione della via ERK/EMT [96].

Hu et al. hanno dimostrato che miR-361-3p è in grado di regolare l'EMT indotta da ERK agendo sul suo bersaglio diretto DUSP2 e promuovendo la metastasi nel PDAC. Gli autori hanno osservato come l'incremento dei livelli di espressione di miR-361-3p possa essere associato agli stadi avanzati della patologia e ad una prognosi infausta [97]. In accordo con tali evidenze, i risultati del presente studio mostrano un aumentata espressione del microRNA sul siero e sulle biopsie solide dei casi di PDAC e tali evidenze corroborano i riscontri della metanalisi. Inoltre, nella coorte in studio, la molecola manifesta un incremento della sua espressione che progredisce con la patologia stessa. Tale comportamento è riscontrabile anche sui modelli in-vitro, in cui si osserva un incremento dell'espressione ($p < 0.001$) nella transizione fra il fenotipo normale della linea hTERT-HPNE E6/E7 e quello di tumore primario (BxPC-3) e metastatico (AsPC-1). Tale iperespressione si osserva anche sulla linea cellulare rappresentativa del tumore metastatico quando rapportata a quella di tumore primario ($p < 0.001$). Nei modelli arricchiti di CSC, miR-361-3p è significativamente sottoespresso. Sulla base dei dati ottenuti e delle evidenze riportate in letteratura si può ipotizzare che tale molecola eserciti un ruolo di promozione dell'inizio e della progressione del PDAC. Evidenze suggeriscono che miR-361-3p possa esercitare nel PDAC un ruolo oncogenico agendo sull'oncosoppressore BTG2, suo target, e a sua volta il miRNA venga regolato da CircRNA_000864. L'iperespressione di tale RNA circolare migliora la sottoregolazione di BTG2 indotta da miR-361-3p e risulta nell'inibizione del ciclo cellulare, della proliferazione, della migrazione, dell'invasione e nella promozione dell'apoptosi nelle cellule di PDAC [98].

I risultati del presente studio mostrano l'iperespressione di miR-4486 nel siero dei casi PDAC ($p < 0.01$) e la sua sottoregolazione nel siero delle biopsie patologiche ($p < 0.001$). I livelli sierici del microRNA seguono una tendenza crescente durante la progressione della patologia. Tale comportamento si riflette in-vitro, dove l'espressione di miR-4486 aumenta nella transizione dalla linea cellulare rappresentativa dell'epitelio normale alle linee tumorali e nei modelli CSC-like. L'espressione aberrante di miR-4486, significativamente aumentata negli stadi precoci della patologia, può presupporre un ruolo di promozione del PDAC stesso. La deregolazione dello stesso microRNA è stata riportata da Lee et al., i quali hanno ipotizzato per miR-4486 e altri miRNA

potenziali applicazioni come biomarcatori, nell'ottica di incrementare la velocità della diagnosi di PDAC [78]. I risultati del presente studio suggeriscono la sua utilità come biomarcatore per la diagnosi precoce del PDAC, ma sono necessarie ulteriori investigazioni.

Numerosi studi hanno discusso il coinvolgimento di miR-324-5p su disparate patologie tumorali, senza chiarirne la funzione. Wan et al. hanno riportato la sua sovraespressione nelle biopsie solide e nei modelli cellulari di PDAC rispetto alle controparti sane e al modello rappresentativo dell'epitelio normale. Gli stessi autori hanno dimostrato che tale molecola esercita un ruolo cruciale nella progressione del PDAC agendo sul bersaglio KLF3 e regolando in questo modo la proliferazione e l'apoptosi delle cellule tumorali del pancreas [99]. Al contrario, nel contesto dell'HCC, Wang et al. hanno dimostrato che miR-324-5p presenta una ridotta espressione nei tessuti di tumore epatico rispetto alle controparti sane. Inoltre, hanno suggerito che LINC00491 possa regolare negativamente l'espressione di miR-324-5p nelle cellule cancerose e che il miRNA possa agire sul bersaglio ROCK1, coinvolto nella proliferazione cellulare. Hanno infine suggerito che LINC00491 possa promuovere la metastatizzazione del tumore epatico attraverso l'asse miR-324-5p/ ROCK1 [100]. Nel presente studio l'espressione di miR-324-5p è risultata incrementata nel siero dei pazienti diagnosticati con PDAC, confermando i risultati della metanalisi. È risultata ridotta nelle biopsie solide patologiche. Nei campioni di siero, stratificati sulla base dello stadio, è stata osservata una deregolazione tanto profonda da non poter essere correlata in alcun modo alla progressione della patologia. In-vitro, miR-324-5p è risultato sovraregolato nei modelli di tumore primario e metastatico, riflettendo quanto rilevato a livello sierico. Inoltre, la sua espressione si riduce al passare dalla linea cellulare rappresentativa del tumore primario a quella di tumore metastatico ($p < 0.001$) fino a non essere più rilevabile nei modelli CSC-like. La sua sovraregolazione durante le fasi precoci della malattia e la riduzione dell'espressione in quelle avanzate suggeriscono che possa esercitare un ruolo di promozione durante la tumorigenesi e che questo possa venir meno negli stadi più avanzati, o che venga inibito.

Mentre il ruolo di miR-320d nel PDAC non è stato ancora discusso, numerosi studi hanno riportato la sua deregolazione nel contesto di differenti patologie tumorali, tra cui glioma, linfoma a grandi cellule B, tumore del colon-retto, carcinoma renale, adenocarcinoma del cardias. Seppure le discrepanze relative alla sua espressione e al suo ruolo potenziale siano molteplici, numerose evidenze scientifiche testimoniano come la sua espressione sia fortemente ridotta nei pazienti tumorali. MiR-320d è un membro del cluster miR-320 e la sua ridotta espressione a livello sierico o tissutale è stata spesso correlata alle neoplasie rettali e colon-rettali. Yufeng et al. hanno dimostrato che la molecola può agire come oncosoppressore, sopprimendo i tratti di malignità dei modelli cellulari di CRC EGFR+ attraverso l'inibizione del pathway PI3K/Akt/mTOR [101]. In virtù della complessa deregolazione cui va incontro nelle neoplasie colon-rettali, le sue potenzialità come biomarcatore sono state spesso discusse [101- 104]. I risultati del presente lavoro, riportano la consistente sovraregolazione cui va incontro miR-320d, che si manifesta sia al livello del siero ($p < 0.001$) che delle biopsie solide dei pazienti con diagnosi di PDAC in modo coerente con i dati della metanalisi. Considerando la stadiazione, l'espressione sierica di miR-320d mostra una tendenza crescente negli stadi III e IV rispetto allo stadio I. Elevati livelli di miR-320d sono stati rilevati sia nei gruppi low-grade che high-grade rispetto ai controlli ($p < 0.001$) con un incremento più pronunciato nei pazienti high-grade rispetto a quelli low-grade ($p < 0.001$). Tali riscontri si riflettono anche su alcune condizioni dei modelli in-vitro, rinforzando l'ipotesi del potenziale ruolo di miR-320d nella promozione della cancerogenesi e progressione del PDAC.

In accordo con queste osservazioni, Tang et al. hanno dimostrato che i livelli esosomici di miR-320d sono più elevati nei pazienti CRC metastatici e hanno designato tale molecola come potenziale biomarcatore blood-based per distinguere la presenza di metastasi nei pazienti con tumore colon-rettale [105].

Un gran numero di studi ha riportato che miR-20b-5p sia iperespresso in numerose patologie tumorali e sembra agire come oncomiR per promuovere la progressione tumorale. Tavano et al. hanno discusso il potenziale del microRNA nell'identificare il diabete di nuova insorgenza nei

pazienti con PDAC, sebbene non si tratti di un marcatore per la diagnosi precoce del tumore [106]. Nel carcinoma epatocellulare, miR-20b-5p è iperespresso ed è stato dimostrato come possa promuovere la proliferazione delle cellule tumorali, la loro migrazione e invasione attraverso il suo bersaglio CPEB3 [107]. I risultati della presente ricerca hanno mostrato che miR-20b-5p si iperesprime nel siero e nelle biopsie solide dei casi di PDAC. Nei campioni di siero è iperespresso nei gruppi low-grade ($p < 0.001$) e high-grade ($p < 0.05$) rispetto ai controlli e negli stadi II e III rispetto allo stadio I. Tuttavia, negli stadi precoci e in quelli più avanzati, mostra una ridotta espressione: è sottoregolato nello stadio I ($p < 0.001$) rispetto ai controlli e nello stadio IV ($p < 0.05$) rispetto allo stadio I. È scarsamente rappresentato nei modelli cellulari della patologia. La sovraregolazione di miR-20b-5p nei pazienti PDAC rispetto ai controlli suggerisce un potenziale ruolo di regolazione durante la progressione della patologia ma sono necessarie ulteriori investigazioni.

10.2. PARTE SECONDA: STUDIO FUNZIONALE

La sezione di discovery dello studio ha permesso di identificare nove miRNA deregolati nel PDAC e investigarne i livelli nei differenti modelli adottati. Sulla base del comportamento osservato nel PDAC e delle evidenze scientifiche relative al loro potenziale ruolo nelle patologie tumorali, le molecole miR-216a-5p e miR-125a-5p sono state selezionate per la parte funzionale dello studio. I livelli di miR-216a-5p sono risultati più elevati nei modelli arricchiti in CSC rispetto alle cellule coltivate in aderenza. Inoltre, i nostri dati suggeriscono che il ruolo del miRNA nel PDAC possa variare con la transizione dagli stadi precoci a quelli avanzati. L'espressione di miR-125a-5p incrementa nel siero e nelle biopsie solide dei pazienti con malattia avanzata rispetto ai controlli non tumorali. Un comportamento simile è stato riportato anche sui modelli in-vitro ma non in quelli CSC-like, in cui i livelli della molecola si riducono fortemente rispetto alle cellule aderenti. Considerando il coinvolgimento delle CSC nelle fasi di tumorigenesi, progressione tumorale e metastasi è stato valutato il ruolo di miR-216a-5p e miR-125a-5p sull'acquisizione o regressione dei tratti di staminalità.

In particolare, lo studio funzionale è stato condotto sulle linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1 coltivate in aderenza e sui modelli CSC-like allestiti sulle stesse. Per investigare l'effetto delle molecole di interesse, i modelli in-vitro sono stati trattati con miRNA mimic e miRNA inhibitor e si è proceduto successivamente alla valutazione dell'espressione dei marcatori di staminalità, dei geni associati a pluripotenza e all' EMT, alla rilevazione della vitalità e dell'attività clonogenica.

Nella loro review, Heiler et al. sottolineano l'esistenza di una mutua relazione tra i marcatori delle CSC pancreatiche e i microRNA [108]. È stato dimostrato che CD44, un biomarcatore di PaCSC, lega Nanog ed insieme a Stat3 traslocano nel nucleo e attivano la trascrizione di miR-21, che agisce come oncogene nella sottoregolazione della proteina oncosoppressore PDCD4 [109]. Al contrario, miR-34 induce la Transizione Mesenchimo-Epiteliale (MET) attraverso la sottoregolazione dei livelli di Snail, suo bersaglio, e questo evento è seguito dalla riduzione dei livelli di Bmi1, CD44, CD133, olfactomedina e c-Myc [110]. Inoltre, Zhou et al hanno dimostrato come la molecola miR-135b, attraverso il suo target JADE-1, sia associata a invasione, migrazione e staminalità delle CSC pancreatiche CD44⁺CD24⁺ [111]. Sebbene il ruolo di miR-216a-5p sia stato discusso nel contesto del PDAC e di altre patologie tumorali, la sua potenziale correlazione con le PaCSC e con i loro marcatori CD44/CD24/CxCR4 e ALDH1 non è stata ancora chiarita. Mir-216a-5p promuove l'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 sulle cellule aderenti e arricchite in CSC della linea cellulare BxPC-3. Si ipotizza una potenziale influenza positiva sulle CSC delle AsPC-1 ma non si osserva alcun effetto degno di interesse sulle stesse cellule con fenotipo tumorale. L'espressione dell'enzima ALDH1, marcatore di CSC, risente negativamente dell'effetto del microRNA, che sembra esercitare un ruolo inibitorio su tutti i modelli considerati.

È stato riportato come i livelli di espressione di miR-125a-5p fossero incrementati nelle cellule CD133⁺ del carcinoma epatocellulare. Inoltre, si è visto che tale molecola esercita una regolazione positiva sul numero di cellule staminali ematopoietiche, attraverso la riduzione dell'apoptosi che si ottiene inibendo la proteina pro-apoptica bak-1, suo target [112,113]. I risultati dello studio funzionale hanno suggerito che, su entrambe le linee cellulari, miR-125a-5p possa promuovere

l'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 e la sola eccezione è rappresentata dal modello AsPC-1 CSC-like, nel quale è stata osservata una tendenza inibitoria del miRNA. L'espressione di ALDH1, un altro marcatore di CSC, è stata inibita dal miRNA sia sui due modelli di BxPC-3 che sulle AsPC-1 CSC – like. MiR-125a-5p promuove invece l'espressione di ALDH1 sulle AsPC-1 coltivate in aderenza.

Il processo EMT rappresenta la transizione delle cellule cancerose da un fenotipo epiteliale a quello mesenchimale ed è un evento strettamente associato all'acquisizione e al potenziamento delle abilità migratorie e invasive, caratteristiche distintive della malattia metastatica. Evidenze crescenti suggeriscono che i miRNA possano esercitare ruoli cruciali nell'acquisizione di tratti di malignità da parte delle cellule cancerose, inclusi quelli tipici delle metastasi associate a EMT [114,115]. Nel presente lavoro, il potenziale coinvolgimento dei miRNA nell'EMT è stato investigato attraverso la valutazione delle fluttuazioni nell'espressione dei geni c-Myc, Vimentina e Snail indotte dal potenziamento o dall'inibizione dell'effetto di miR-216a-5p e di miR-125a-5p.

Il ruolo di miR-216a-5p sull'espressione dei geni c-Myc e Snail non è chiaro nella linea BxPC-3, in quanto i risultati che si osservano a seguito del potenziamento del microRNA e del suo silenziamento suggeriscono rispettivamente un effetto di inibizione e di promozione dell'espressione dei due geni. Lo studio condotto sulla linea AsPC-1, ha dimostrato che miR-216a-5p inibisce l'espressione di c-Myc, Snail e Vimentina. In merito all'espressione della Vimentina, miR-216a-5p ne inibisce l'espressione sulle BxPC-3 in aderenza. L'effetto negativo di miR-216a-5p sull'EMT è stato precedentemente descritto nel contesto del tumore prostatico, in cui l'iperespressione del miRNA è stata associata alla riduzione dei livelli di N-caderina, Vimentina e Snail. A tal proposito, gli autori hanno ipotizzato per la molecola un effetto anti-metastatico, supportato dalla deregolazione delle vie di segnalazione correlate all'EMT [114].

Pan et al. hanno riportato come nel carcinoma a cellule squamose dell'esofago, miR-125a-5p inibisce l'EMT agendo sul bersaglio Stat3. Questo risulta nell'incrementata sensibilità delle cellule all'effetto citotossico del cisplatino [115]. Tuttavia, nel tumore colon-rettale, Zhu et al. hanno

dimostrato che miR-125a-5p attiva l'EMT attraverso il target DDB2, un soppressore chiave del processo di EMT stesso [116]. Dallo studio funzionale è emerso che l'effetto di miR-125a-5p sull'espressione di c-Myc risente della linea cellulare e del fenotipo considerato: nelle BxPC-3 coltivate in aderenza sopprime l'espressione del gene mentre nel fenotipo staminale la promuove; non è stato rilevato un effetto chiaro sulla linea AsPC-1. Dai risultati ottenuti si manifesta, su entrambe le linee cellulari, la tendenza del miRNA a inibire l'espressione della Vimentina sul fenotipo staminale e favorire quella di Snail su entrambi i modelli, in aderenza e 3D.

Numerose evidenze hanno riportato che i miRNA possono regolare l'espressione di alcuni fattori associati al mantenimento della pluripotenza nelle CSC (Nanog, OCT4, Sox2, Klf4) [115]. A tal proposito, miR-145 induce il differenziamento delle cellule staminali embrionali umane (hESC) e controlla la pluripotenza agendo sui target Oct4, Sox2 e KLF4 [117]. Nelle PaCSCs, Ma et al. hanno dimostrato che l'iperespressione di miR-200c riduce l'invasività, la proprietà clonogenica e la chemioresistenza [118,119,120].

MiR-216a-5p è negativamente associato a OCT4 e la sua tendenza inibitoria si osserva sulle AsPC-1, e sul modello BxPC-3 CSC. Sembra invece promuovere l'espressione di OCT-4 nelle BxPC-3 cresciute in monostrato. In merito all'espressione di Sox2 sulla linea cellulare BxPC-3, i risultati successivi la trasfezione con mimic o inhibitor non restituiscono un dato univoco: non è possibile definire il suo come un ruolo di promozione o di inibizione. Al contrario, sulla linea cellulare AsPC-1, il ruolo di miR-216a-5p varia in funzione del fenotipo considerato: inibisce l'espressione del gene sulle cellule aderenti mentre la promuove nelle CSC. I risultati dello studio funzionale suggeriscono che miR-125a-5p influisce positivamente sull'espressione di OCT4 e Sox2.

Infine, sono state analizzate la vitalità e la capacità di formare colonie nell'ottica di comprendere se miR-216a-5p e miR-125a-5p possano esercitare un ruolo nella loro regolazione. Da questo punto di vista, si può concludere che miR-216a-5p non influisce sul numero di colonie di BxPC-3 e AsPC-1. L'unica differenza associata al miRNA è un incremento non significativo delle dimensioni delle colonie sulla linea cellulare BxPC-3. Inoltre, miR-216a-5p inibisce la vitalità su tutti i modelli

considerati. Dalle analisi effettuate, è stato osservato che miR-125a-5p influisce negativamente sul numero e sulle dimensioni delle colonie, suggerendo un potenziale ruolo inibitorio. Sulla linea cellulare AsPC-1, i risultati non permettono di ipotizzare un ruolo della molecola nell'attività clonogenica. Non è stata infine riscontrata alcuna influenza del microRNA sulla vitalità delle cellule.

11. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca è stato suddiviso in due sezioni distinte e complementari. La prima, con approccio investigativo, è volta a identificare un pannello di miRNA associati all'adenocarcinoma del dotto pancreatico e coinvolti nelle fasi di inizio e progressione della patologia. La seconda parte, di tipo funzionale, mira a individuare il potenziale ruolo di miR-216a-5p e miR-125a-5p nell'acquisizione o regressione dei tratti di staminalità.

1. Per condurre la fase di discovery è stato adottato un approccio comprensivo, basato sull'integrazione dei risultati provenienti da una metanalisi con la validazione delle molecole sui pazienti arruolati e sui modelli in-vitro della patologia. L'integrazione di differenti procedure ha permesso di evidenziare la sottile regolazione che i miRNA subiscono sulla base dello stadio della patologia, del tessuto considerato, del modello e del fenotipo. Globalmente, i risultati ottenuti suggeriscono un ruolo di promozione del PDAC per miR-4486, miR-361-3p, miR-324-5p e miR-125a-5p. Talvolta, il comportamento delle molecole in studio ha suggerito che le stesse possano esercitare un duplice e opposto ruolo durante i differenti stadi della patologia. Ne sono un esempio miR-216a-5p e miR-216b-5p che sembrano promuovere l'inizio e la progressione del PDAC negli stadi precoci e sopprimerla in quelli più avanzati. La deregolazione consistente che si osserva nei modelli di CSC pancreatiche suggerisce che i miRNA possano esercitare un ruolo prominente nell'acquisizione o regressione dei tratti di staminalità, strettamente associati alla cancerogenesi e all'aggressività tumorale.
2. Dai risultati dello studio funzionale emerge che miR-216a-5p esercita un ruolo strettamente dipendente dal modello considerato. Promuove l'espressione dei marcatori di PaCSCs CD44/CD24/CxCR4 e inibisce quella dell'ALDH1. Nel contesto della transizione EMT, inibisce l'espressione di c-Myc, Vimentina e Snail sulla linea AsPC-1 ed esercita un effetto

inibitorio sul gene OCT4 associato a pluripotenza. Infine, influisce negativamente sulla vitalità dei modelli considerati. Rispetto all'ipotesi di partenza, i risultati osservati indicano come la molecola in studio possa avere un ruolo duplice durante la progressione del PDAC ma ulteriori studi sono necessari per caratterizzarlo. Come per miR-216a-5p, anche miR-125a-5p promuove l'espressione dei marcatori CD44/CD24/CxCR4 ma inibisce l'espressione di ALDH1. La molecola influisce positivamente sull'espressione dei geni OCT4, Sox2 e Snail mentre inibisce l'espressione della Vimentina. Lo studio funzionale evidenzia il ruolo di miR-125a-5p nella progressione della patologia, attraverso la promozione del fenotipo staminale.

Il ricorso all'approccio integrato per la sezione di discovery ha permesso di acquisire un'immagine dettagliata del comportamento delle molecole in studio nei differenti modelli considerati. Tuttavia, l'intricata regolazione cui i miRNA possono andare incontro in varie condizioni può condurre a risultati contrastanti. Un'ulteriore limitazione è il numero relativamente basso di pazienti arruolati e la difficoltà di ottenimento delle biopsie solide, che risulta in discrepanze tra il numero dei campioni di siero e di quelli bioptici. Inoltre, lo studio funzionale riporta gli effetti di miR-216a-5p e miR-125a-5p sulle due linee cellulari BxPC-3 e AsPC-1, e sui loro modelli tumorali e arricchiti in CSCs. È degno di nota il fatto che i risultati ottenuti per ogni molecola non rispondano esclusivamente al trattamento con miRNA mimic e miRNA inhibitor ma risentano anche del differente corredo mutazionale delle due linee cellulari utilizzate. Per questa ragione, in alcune condizioni sperimentali, non è stato possibile chiarire il ruolo del microRNA.

La ricerca condotta ha posto l'accento sui miRNA associati al PDAC attraverso l'integrazione dell'approccio in silico, ex-vivo, in vitro e lo studio funzionale. Le evidenze riportate implementano la comprensione relativa al fine meccanismo regolatorio mediato dai miRNA e alla funzione esercitata da tali molecole nel contesto tumorale.

Nel panorama clinico della patologia in esame, caratterizzata da diagnosi tardiva e prognosi infausta, i risultati ottenuti supportano fortemente il potenziale dei miRNA circolanti come

dispositivi non invasivi per la diagnosi precoce del PDAC. Inoltre, l'esplorazione del coinvolgimento dei miRNA nei pathway correlati al fenotipo CSC potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche dirette contro tale sottopopolazione e i relativi processi, come le metastasi e le recidive tumorali.

12. CONCLUSIONS

This study was divided into two distinct and complementary sections. The first, a discovery study, aims to identify a panel of miRNAs associated with pancreatic ductal adenocarcinoma that are involved in the initiation and progression phases of the disease. The second aim of this study was to identify the potential roles of miR-216a-5p and miR-125a-5p in the acquisition or regression of stemness traits.

1. The discovery part is based on a comprehensive approach that merges meta-analysis, patients' biological matrices and in vitro models of PDAC. The integration of different methods allowed us to highlight the thick deregulation that the molecules undergo depending on the disease stage, the tissue considered, the model and the phenotype. Globally, our results suggest a PDAC-promoting role for miR-4486, miR-361-3p, miR-324-5p, and miR-125a-5p. Occasionally, the miRNA behaviour supported the hypothesis of a dual role in different tumoral stages. This is the case of miR-216a-5p and miR-216b-5p, which seem to promote tumor initiation and progression in the early stages and suppress it during the advanced ones. The consistent deregulation that occurred in Pa-CSCs models suggests that miRNAs could exert a prominent role in the acquisition or regression of stemness traits, closely associated with carcinogenesis and tumour aggressiveness. Further studies are needed to functionally characterize this potential role.
2. The results of the functional study showed that miR-216a-5p exerts a model-dependent role. It promotes the expression of PaCSCs markers CD44/CD24/CxCR4 and inhibits that of ALDH1. In the context of EMT, it inhibits the expression of c-myc, Vimentin and Snail on the AsPC-1 cell line and exerts an inhibitory effect on the pluripotency-associated OCT4 gene. Finally, it negatively affects the viability of the considered models. Compared to the starting hypothesis, the observed results indicate that miR-216a-5p may have a dual role

during PDAC progression, but further studies are needed to characterize it. Like miR-216a-5p, miR-125a-5p also promotes the expression of CD44/CD24/CxCR4 markers but inhibits the expression of ALDH1. The molecule positively affects the expression of OCT4, Sox2 and Snail genes while inhibiting the expression of Vimentin. The functional study highlights the role of miR-125a-5p in disease progression through the promotion of the stem phenotype.

The integrated approach allowed the discovery of connections between data obtained from the multiple models considered. Nonetheless, the intricate regulation to which microRNAs are subjected can lead to conflicting data under certain conditions. Another noteworthy limitation is the relatively small number of enrolled patients and challenges in obtaining solid biopsies, resulting in discrepancies between serum and solid biopsies.

Furthermore, the findings of the functional study unveiled the impact of miR-216a-5p and miR-125a-5p on the adherent cell lines BxPC-3 and AsPC-1, as well as their CSCs-enriched models. It is noteworthy that the outcomes obtained for the two miRNAs are affected not only by miRNA mimic and miRNA inhibitor treatment, but also by the unique mutational composition of the two cell lines employed. As a result, the function of microRNA could not be determined in certain experimental settings.

The research conducted has focused on the miRNAs associated with PDAC by integrating *in silico*, *ex vivo*, *in vitro*, and functional study approaches. The evidence reported have contributed to understanding the regulatory mechanism mediated by miRNAs and the function exercised by these molecules in the tumoral scenario.

In the clinical context of PDAC, which is characterized by late diagnosis and poor prognosis, the results obtained strongly support the potential of circulating miRNAs as non-invasive tools for early diagnosis of PDAC. Furthermore, exploring the involvement of miRNAs in pathways related to the CSC phenotype may pave the way for the development of new therapeutic strategies targeting this subset of cells and their associated processes, such as metastasis and tumor recurrence.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Luo G, Fan Z, Gong Y *et al.* Characteristics and Outcomes of Pancreatic Cancer by Histological Subtypes. *Pancreas* 2019; 48: 817–822.
2. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). Linee guida CARCINOMA DEL PANCREAS ESOCRINO. Ed. 2016.
3. Guillén-Ponce C, Blázquez J, González I, de-Madaria E, Montáns J, Carrato A. Diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical and Translational Oncology* 19 2017 1205–1216.
4. Wood LD, Hruban RH. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer Journal (United States)* 18 2012 492–501.
5. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surgical Pathology Clinics* 9 2016 547–560.
6. Artinyan A, Soriano PA, Prendergast C, Low T, Ellenhorn JDI, Kim J. The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival. *HPB (Oxford)* 2008; 10: 371.
7. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73: 17–48.
8. Cai J, Chen H, Lu M *et al.* Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Letters* 520 2021 1–11.
9. Arnold M, Abnet CC, Neale RE *et al.* Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* 2020; 159: 335-349.e15.
10. Huang J, Lok V, Ngai CH *et al.* Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2021; 160: 744–754.
11. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 2024.
12. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). Linee guida CARCINOMA DEL PANCREAS ESOCRINO. Ed. 2021.
13. Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 18 2021 493–502.
14. Hu J-X, Zhao C-F, Chen W-B *et al.* World Journal of Gastroenterology Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol* 2021; 27: 4298–4321.
15. Yuan C, Morales-Oyarvide V, Babic A *et al.* JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Survival. *J Clin Oncol* 2017; 35: 1822–1828.

16. Barone E, Corrado A, Gemignani F, Landi S. Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update. *Arch Toxicol* 2016; 90: 2617–2642.
17. Buha A, Wallace D, Matovic V *et al.* Cadmium Exposure as a Putative Risk Factor for the Development of Pancreatic Cancer: Three Different Lines of Evidence. *Biomed Res Int*; 2017.
18. Tsai H-J, Chang JS. *Clinical Medicine Environmental Risk Factors of Pancreatic Cancer*. 2019.
19. Klein AP. Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 2012; 51: 14–24.
20. Klatte DCF, Wallace MB, Löhr M, Bruno MJ, van Leerdam ME. Hereditary pancreatic cancer. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 58–59, 2022.
21. Badheeb M, Abdelrahim A, Esmail A *et al.* Pancreatic Tumorigenesis: Precursors, Genetic Risk Factors and Screening. *Current oncology (Toronto, Ont.)* 29 2022 8693–8719.
22. Chen F, Roberts NJ, Klein AP. Inherited pancreatic cancer. *Chinese Clinical Oncology* 6 2017.
23. Abe K, Kitago M, Kitagawa Y, Hirasawa A. Hereditary pancreatic cancer. *International Journal of Clinical Oncology* 26 2021 1784–1792.
24. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*; 2014.
25. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 4846–4861.
26. Noë M, Brosens LAA. Pathology of Pancreatic Cancer Precursor Lesions. *Surg Pathol Clin* 2016; 9: 561–580.
27. Kim JY, Hong SM. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncol Res Treat* 2018; 41: 603–610.
28. Matthaei H, Semaan A, Hruban RH. The genetic classification of pancreatic neoplasia. *J Gastroenterol* 2015; 50: 520–532.
29. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* 163 2022 386-402.
30. Zhang CY, Liu S, Yang M. Clinical diagnosis and management of pancreatic cancer: Markers, molecular mechanisms, and treatment options. *World Journal of Gastroenterology* 28 2022 6827–6845.
31. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 326 2021 851–862.
32. Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 24 2018 2047–2060.

33. Badheeb M, Abdelrahim A, Esmail A *et al.* Pancreatic Tumorigenesis: Precursors, Genetic Risk Factors and Screening. *Current oncology (Toronto, Ont.)* 29 2022 8693–8719.
34. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid biopsy in pancreatic cancer: Are we ready to apply it in the clinical practice? *Cancers* 13 2021.
35. Giannis D, Moris D, Barbas AS. Diagnostic, predictive and prognostic molecular biomarkers in pancreatic cancer: An overview for clinicians. *Cancers* 13 2021 1–17.
36. Linee guida CARCINOMA DEL PANCREAS ESOCRINO Edizione 2021.
37. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378: 607–620.
38. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. *International Journal of Molecular Sciences* 18 2017.
39. Mohammed S, Van Buren G, Fisher WE. Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9354–9360.
40. Gupta R, Amanam I, Chung V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology* 116 2017 25–34.
41. Timmer FEF, Geboers B, Nieuwenhuizen S *et al.* Pancreatic Cancer and Immunotherapy: A Clinical Overview. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
42. Pokorny AMJ, Chin VT, Nagrial AM, Yip D, Chantrill LA. Metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: diagnosis and treatment with a view to the future. *Intern Med J* 2018; 48: 637–644.
43. Connor AA, Gallinger S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nature Reviews Cancer* 22 2022 131–142.
44. Reiter JG, Iacobuzio-Donahue CA. Pancreatic cancer: Pancreatic carcinogenesis—several small steps or one giant leap? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14 2017 7–8.
45. Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell* 186 2023 1729–1754.
46. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* 2016; 538: 378–382.
47. Felsenstein M, Hruban RH, Wood LD. New Developments in the Molecular Mechanisms of Pancreatic Tumorigenesis. *Advances in Anatomic Pathology* 25 2018 131–142.
48. Javadrashid D, Baghbanzadeh A, Derakhshani A *et al.* Pancreatic cancer signaling pathways, genetic alterations, and tumor microenvironment: The barriers affecting the method of treatment. *Biomedicines* 9 2021.
49. Lai X, Li Q, Wu F *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 2020.

50. Bozdağ SC, Yüksel MK, Demirer T. Adult stem cells and medicine. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 2018: 17–36.
51. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy* 10 2019.
52. Sancho P, Alcalá S, Usachov V, Hermann PC, Sainz B. The ever-changing landscape of pancreatic cancer stem cells. *Pancreatology* 16 2016 489–496.
53. Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic cancer stem cells and therapeutic approaches. *Anticancer Research* 37 2017 2761–2775.
54. Rich JN. Cancer stem cells: Understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (United States)* 95 2016 S2–S7.
55. Correnti M, Binatti E, Gammella E, Invernizzi P, Recalcati S. The Emerging Role of Tumor Microenvironmental Stimuli in Regulating Metabolic Rewiring of Liver Cancer Stem Cells. *Cancers* 15 2023.
56. Galindo-Vega A, Maldonado-Lagunas V, Mitre-Aguilar IB, Melendez-Zajgla J. Tumor Microenvironment Role in Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cells* 2023; 12: 1560.
57. Barman S, Fatima I, Singh AB, Dhawan P. Pancreatic cancer and therapy: Role and regulation of cancer stem cells. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
58. Bubin R, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 24 2023.
59. Gzil A, Zarębska I, Bursiewicz W, Antosik P, Grzanka D, Szyłberg Ł. Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Molecular Biology Reports* 46 2019 6629–6645.
60. Patil K, Khan FB, Akhtar S, Ahmad A, Uddin S. The plasticity of pancreatic cancer stem cells: implications in therapeutic resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 40 2021 691–720.
61. Manni W, Min W. Signaling pathways in the regulation of cancer stem cells and associated targeted therapy. *MedComm* 3 2022.
62. Zhan H xiang, Xu J wei, Wu D, Zhang T ping, Hu S yuan. Pancreatic cancer stem cells: New insight into a stubborn disease. *Cancer Letters* 357 2015 429–437.
63. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology* 234 2019 5451–5465.
64. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* 11 2010 597–610.
65. Daoud AZ, Mulholland EJ, Cole G, McCarthy HO. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer* 19 2019.
66. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21 2020.

67. Budakoti M, Panwar AS, Molpa D *et al.* Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cell Signal* 2021; 83.
68. Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Hogendorf P. The role of microrna in pancreatic cancer. *Biomedicines* 9 2021.
69. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173 2018 20–51.
70. Rawat M, Kadian K, Gupta Y *et al.* MicroRNA in pancreatic cancer: From biology to therapeutic potential. *Genes* 10 2019.
71. Uddin MH, Al-Hallak MN, Philip PA *et al.* Exosomal microrna in pancreatic cancer diagnosis, prognosis, and treatment: From bench to bedside. *Cancers* 13 2021.
72. Wu E, Zhou S, Bhat K, Ma Q. CA 19-9 and Pancreatic Cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2013; 11(1): 53–55.
73. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* 163 2022 386-402.
74. Ishiwata T, Matsuda Y, Yoshimura H *et al.* Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods. *Pathology and Oncology Research* 24 2018 797–805.
75. Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: Surgery is not enough. *World Journal of Gastroenterology* 21 2015 3157–3165.
76. Kolbeinsson HM, Chandana S, Wright GP, Chung M. Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of Investigative Surgery* 36 2023.
77. Kojima M, Sudo H, Kawauchi J *et al.* MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers. *PLoS One* 2015; 10.
78. Lee J, Lee HS, Been Park S *et al.* Identification of Circulating Serum miRNAs as Novel Biomarkers in Pancreatic Cancer Using a Penalized Algorithm. *International Journal of Molecular Sciences Article J Mol Sci* 2021; 22: 1007.
79. Asano N, Matsuzaki J, Ichikawa M *et al.* A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes. *Nat Commun* 2019.
80. Chhatriya B, Mukherjee M, Ray S *et al.* Comparison of tumour and serum specific microRNA changes dissecting their role in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *BMC Cancer* 2019.
81. Cohen SJ, Papoulas M, Graubardt N *et al.* Micro-RNA Expression Patterns Predict Metastatic Spread in Solid Pseudopapillary Neoplasms of the Pancreas. *Front Oncol* 2020.
82. Bauer AS, Keller A, Costello E *et al.* Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. *PLoS One* 2012.
83. Frampton AE, Castellano L, Colombo T *et al.* MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology* 2014.

84. Sandhu V, Bowitz Lothe IM, Labori KJ *et al.* Molecular signatures of mRNAs and miRNAs as prognostic biomarkers in pancreatobiliary and intestinal types of periampullary adenocarcinomas. *Mol Oncol* 2015; 9: 758–771.
85. Sandhu V, Bowitz Lothe IM, Labori KJ *et al.* Differential expression of miRNAs in pancreatobiliary type of periampullary adenocarcinoma and its associated stroma. *Mol Oncol* 2016; 10: 303–316.
86. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual.*
87. Jiménez G, Hackenberg M, Catalina P *et al.* Mesenchymal stem cell's secretome promotes selective enrichment of cancer stem-like cells with specific cytogenetic profile. *Cancer Lett* 2018; 429: 78–88.
88. Yonemori K, Seki N, Idichi T *et al.* The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the microRNA-216 cluster. 2017.
89. Felix TF, Lopez Lapa RM, De Carvalho M *et al.* MicroRNA modulated networks of adaptive and innate immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 2019.
90. Guz M, Jeleniewicz W, Cybulski M, Kozicka J, Kurzepa J, Mądro A. Serum mir-210-3p can be used to differentiate between patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Biomed Rep* 2020; 14: 1–6.
91. Zhang J, Gao S, Zhang Y *et al.* Mir-216a-5p inhibits tumorigenesis in pancreatic cancer by targeting tpt1/mTORC1 and is mediated by linc01133. *Int J Biol Sci* 2020; 16: 2612–2627.
92. You Y, Tan J, Gong Y *et al.* MicroRNA-216b-5p functions as a tumor-suppressive RNA by targeting TPT1 in pancreatic cancer cells. *J Cancer* 2017; 8: 18931.
93. Khan IA, Rashid S, Singh N *et al.* Panel of serum miRNAs as potential non-invasive biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 2021.
94. Li R, Hu Z, Wang Z *et al.* miR-125a-5p promotes gastric cancer growth and invasion by regulating the Hippo pathway. *J Clin Lab Anal* 2021.
95. Sohrabi E, Rezaie E, Heiat M, Sefidi-Heris Y. An Integrated Data Analysis of mRNA, miRNA and Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Biochem Genet* 2021; 59: 1326–1358.
96. Chen F, Zheng X, Liang W, Jiang C, Su D, Fu B. Long Noncoding RNA MIR600HG Binds to MicroRNA-125a-5p to Prevent Pancreatic Cancer Progression Via Mitochondrial Tumor Suppressor 1-Dependent Suppression of Extracellular Regulated Protein Kinases Signaling Pathway. *Pancreas* 2022; 51: 1434–1443.
97. Hu J, Li L, Chen H *et al.* MiR-361-3p regulates ERK1/2-induced EMT via DUSP2 mRNA degradation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Dis* 2018.
98. Huang L, Han J, Yu H *et al.* CircRNA_000864 Upregulates B-cell Translocation Gene 2 Expression and Represses Migration and Invasion in Pancreatic Cancer Cells by Binding to miR-361-3p. *Front Oncol* 2020.

99. Wan Y, Luo H, Yang M *et al.* miR-324-5p Contributes to Cell Proliferation and Apoptosis in Pancreatic Cancer by Targeting KLF3. *Mol Ther Oncolytics* 2020; 18: 432–442.
100. Wang W, Yang T, Li D, Huang Y, Bai G, Li Q. LINC00491 promotes cell growth and metastasis through miR-324-5p/ROCK1 in liver cancer. *J Transl Med* 2021; 19.
101. Yufeng Z, Ming Q, Dandan W. MiR-320d Inhibits Progression of EGFR-Positive Colorectal Cancer by Targeting TUSC3. *Front Genet* 2021; 12.
102. Chen X, Chen X, Gao S *et al.* MicroRNA-320d regulates tumor growth and invasion by promoting FoxM1 and predicts poor outcome in gastric cardiac adenocarcinoma. *Cell Biosci* 2020; 10.
103. Qin CZ, Lv QL, Yang YT, Zhang JM, Zhang XJ, Zhou HH. Downregulation of MicroRNA-320d predicts poor overall survival and promotes the growth and invasive abilities in glioma. *Chem Biol Drug Des* 2017; 89: 806–814.
104. Liu X, Xu X, Pan B *et al.* Circulating miR-1290 and miR-320d as novel diagnostic biomarkers of human colorectal cancer. *J Cancer* 2019; 10: 43–50.
105. Tang Y, Zhao Y, Song X, Song X, Niu L, Xie L. Tumor-derived exosomal miRNA-320d as a biomarker for metastatic colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* 2019; 33.
106. Tavano F, Fontana A, Mazza T *et al.* Early-Onset Diabetes as Risk Factor for Pancreatic Cancer: miRNA Expression Profiling in Plasma Uncovers a Role for miR-20b-5p, miR-29a, and miR-18a-5p in Diabetes of Recent Diagnosis. *Front Oncol* 2020; 10.
107. Li Z, Wu L, Tan W *et al.* MiR-20b-5p promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion by down-regulating CPEB3. *Ann Hepatol* 2021; 23.
108. Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - The incentive push. *World Journal of Gastroenterology* 22 2016 5971–6007.
109. Bourguignon LYW. Hyaluronan-CD44 interaction promotes microRNA signaling and RhoGTPase activation leading to tumor progression. *Small GTPases* 2012; 3: 53–59.
110. Siemens H, Jackstadt R, Hüntgen S *et al.* miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* 2011; 10: 4256–4271.
111. Zhou J, Wang H, Che J *et al.* Silencing of microRNA-135b inhibits invasion, migration, and stemness of CD24+CD44+ pancreatic cancer stem cells through JADE-1-dependent AKT/mTOR pathway. *Cancer Cell Int* 2020; 20.
112. Zekri ARN, El-Sisi ER, El-Din Youssef AS *et al.* MicroRNA Signatures for circulating CD133-positive cells in hepatocellular carcinoma with HCV infection. *PLoS One* 2018; 13.
113. Guo S, Lu J, Schlanger R *et al.* MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14229–14234.

114. Zeng X, Liu Y, Zhu H, Chen D, Hu W. Downregulation of miR-216a-5p by long noncoding RNA PVT1 suppresses colorectal cancer progression via modulation of YBX1 expression. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 6981–6993.
115. Pan G, Liu Y, Shang L, Zhou F, Yang S. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. *Cancer Communications* 41 2021 199–217.
116. Zhu F, Wei J, He D *et al.* The miRNA125a-5p and miRNA125b-1-5p cluster induces cell invasion by down-regulating DDB2-reduced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2022; 13: 3112–3122.
117. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 2009; 137: 647–658.
118. Ma C, Huang T, Ding Y-C *et al.* microRNA-200c overexpression inhibits chemoresistance, invasion and colony formation of human pancreatic cancer stem cells. 2015.
119. Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies. *Cells* 8 2019.
120. Chakraborty C, Chin KY, Das S. miRNA-regulated cancer stem cells: understanding the property and the role of miRNA in carcinogenesis. *Tumor Biology* 37 2016 13039–13048.

14. RINGRAZIAMENTI

“Credo di poter affermare che nella ricerca scientifica né il grado di intelligenza né la capacità di eseguire e portare a termine con esattezza il compito intrapreso siano fattori essenziali per la riuscita e per la soddisfazione personale.

Nell'uno e nell'altro contano maggiormente la totale dedizione e il chiudere gli occhi davanti alle difficoltà: in tal modo possiamo affrontare i problemi che altri, più critici e più acuti, non affronterebbero.”

Rita Levi-Montalcini,
Elogio dell'imperfezione

Questa tesi è il risultato di quattro anni di studio e ricerca. È stato un percorso unico per complessità, intrapreso in virtù di una scelta compiuta con il cuore, e mi ha donato emozioni ed esperienze che mi accompagneranno sempre.

Un ringraziamento speciale al Professor Madeddu, mio Supervisore, che ha reso concreto questo Progetto di Dottorato. Grazie per la sua disponibilità, il suo entusiasmo, le numerose collaborazioni e opportunità. Farò sempre tesoro dei suoi preziosi insegnamenti.

Ringrazio di cuore tutte le persone che hanno arricchito con il loro contributo questa esperienza professionale e formativa. Andrea è stato sin dall'inizio un punto di riferimento rassicurante, di grande competenza e concretezza. Grazie a Cristiano per i suoi numerosi e brillanti consigli. Con Federica ho attraversato le gioie e i tormenti della vita da PH. D. student, e ho imparato quanto il supporto e lo scambio siano importanti per affrontare le quotidiane sfide della ricerca scientifica. Grazie di cuore alla Prof.ssa Galleri, per il metodo, la passione e gli insegnamenti trasmessi.

When I first entered a foreign laboratory in 2022 at the Centro de Investigacion Biomedica in Granada, I was pleasantly surprised to find such a collaborative and skilled group of individuals. The time I spent abroad, in the magic of Granada, was a rare opportunity for personal and professional growth, and I will always be grateful to Professor Juan Antonio Marchal-Corrales, Carmen, Aitor, and Belen for their work and hospitality. ¡Gracias por todo!

A Emilio, a Lidia, a mia madre e a tutte le persone care esprimo la mia gratitudine per il supporto, la fiducia e la preziosa condivisione nell'altalena di emozioni che questo impegnativo percorso mi ha regalato.

Grazie