



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE APPLICATE E BIOTECNOLOGICHE

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale
Curriculum Medicina sperimentale, clinica ed endocrinologia
XXXV ciclo

Titolo della tesi

Uso di ultrasuoni focalizzati per il rilascio e l'identificazione di biomarcatori
putativi: studio su cellule tumorali pancreatiche.

SSD MED/46

Dottoranda

Alessandra Corrente

Coordinatore del corso

Prof.ssa Mariagrazia Perilli

Tutor

Prof.ssa Alessandra Tessitore

A.A. 2021/2022

Indice

ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE	6
1.1 PANCREAS: NOZIONI ANATOMICHE E FISILOGICHE	6
1.2 CARCINOMA PANCREATICO.....	8
1.2.1 <i>Epidemiologia</i>	9
1.2.2 <i>Patogenesi ed oncogenesi</i>	10
1.2.3 <i>Diagnosi e trattamento</i>	15
1.3 I MICRORNA	18
1.3.1 <i>Biogenesi e funzioni</i>	18
1.3.2 <i>MicroRNA nel cancro e nel carcinoma pancreatico</i>	20
1.3.3 <i>I microRNA circolanti come biomarcatori</i>	24
1.4 PROTEINE CON RUOLO DI BIOMARCATORI NEL CANCRO E NEL CARCINOMA PANCREATICO	27
1.5 GLI ULTRASUONI	30
1.5.1 <i>Effetti biologici degli ultrasuoni</i>	31
1.5.2 <i>Applicazione degli ultrasuoni per il rilascio di biomarcatori putativi</i>	33
1.6 IL SONOWELL®: STRUMENTO PER LA GENERAZIONE DI ULTRASUONI FOCALIZZATI E ANALISI <i>IN VITRO</i>	37
2. SCOPO DEL LAVORO.....	39
3. MATERIALI E METODI.....	40
3.1 LINEE CELLULARI E TRATTAMENTO CON ULTRASUONI	40
3.2 ESTRAZIONE RNA	41
3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI MICRO-RNA.....	42
3.4 ANALISI DEI MIRNA DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI, PATHWAY E GENI TARGET	42
3.5 QUANTIFICAZIONE E ANALISI DELLE PROTEINE.....	42
3.6 ANALISI BIOINFORMATICA	43
4. RISULTATI	44
4.1 GLI ULTRASUONI INDUCONO IL RILASCIO DI MIRNA	44
4.2 IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MIRNA RILASCIATI IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON ULTRASUONI	47
4.2.1 <i>Analisi bioinformatica: identificazione di pathway d'interesse e geni target</i>	49
4.2.2 <i>Analisi dei livelli di espressione dei miRNA identificati a seguito di trattamento con ultrasuoni: utilizzo di dataset pubblici per una preliminare validazione</i>	53
4.3 FATTORI PROTEICI RILASCIATI A SEGUITO DI TRATTAMENTO CON ULTRASUONI	57
4.3.1 <i>Analisi bioinformatica delle proteine identificate come potenziali biomarcatori</i>	60
5. DISCUSSIONE	61
6. CONCLUSIONI	65
BIBLIOGRAFIA	66
ALLEGATI.....	79

ABSTRACT

Il tumore pancreatico (PC) ad oggi è una delle principali cause di morte per cancro. L'alta incidenza e mortalità si devono alla diagnosi tardiva attribuibile all'assenza di sintomi, presenti solo nelle fasi più avanzate della malattia, e all'indisponibilità di test diagnostici specifici e sensibili. È di grande importanza perciò identificare nuovi biomarcatori non invasivi, per una diagnosi più precoce. Negli ultimi anni, i microRNA, per le loro caratteristiche, sono stati considerati come candidati biomarcatori nel cancro, in quanto possono essere rilasciati dal microambiente tumorale nel torrente circolatorio, dove risultano stabili nei confronti delle RNasi endogene, attraverso meccanismi attivi e passivi. Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di applicare metodi basati sugli ultrasuoni (US) per promuovere il rilascio di molecole da modelli *in vitro/in vivo*, potenziando quindi quello che è il meccanismo fisiologico di secrezione. A questo scopo, è stata utilizzata un'innovativa tecnologia basata sull'uso di ultrasuoni generati da un prototipo strumentale (SonoWell®), al fine di amplificare il rilascio di molecole (ad esempio acidi nucleici o proteine/peptidi) da modelli cellulari di PC per identificare nuovi potenziali biomarcatori. Tre linee cellulari di PC, T3M-4, Panc-2 e Paca-44, sono state coltivate in piastre multiwell e sottoposte a trattamento con ultrasuoni. In seguito a estrazione dai surnatanti di coltura dell'RNA totale, inclusa la frazione a basso peso, è stato effettuato un profiling dei microRNA. Sono stati identificati 11 microRNA, rilasciati nei surnatanti e con valore statisticamente significativo, su cui si è prioritariamente concentrata l'analisi. Inoltre, 30 miRNA rilevati nel terreno di coltura, seppur statisticamente non significativi, sono risultati in comune a tutte le linee cellulari tumorali analizzate, e sono stati pertanto considerati anche essi potenziali biomarcatori. A completamento dell'analisi, per approfondire il ruolo biologico dei microRNA identificati, sono state effettuate indagini bioinformatiche *in silico* per evidenziare i geni target e le pathway in cui essi risultavano coinvolti. Tramite l'utilizzo di dataset da campioni da pazienti affetti da carcinoma pancreatico disponibili on-line, è stata effettuata una prima validazione dei microRNA più interessanti, che ha mostrato coerenza con i risultati ottenuti. Oltre ai microRNA, sono state analizzate anche le proteine rilasciate in seguito a stimolo ultrasonico. L'esame ha messo in luce circa 30 fattori proteici di interesse, considerabili come biomarcatori candidati. Le stesse analisi, estese ad una linea cellulare normale epiteliale pancreatico (HPanEpic), hanno mostrato profili di microRNA e proteine caratteristici per essa, suggerendo così una specificità delle molecole rilasciate e

identificate nei modelli tumorali per il cancro del pancreas.

In conclusione, questo lavoro, basato sull'uso di una tecnologia innovativa di sonoporazione, ha permesso l'identificazione di nuove molecole (microRNA e proteine) su cui orientare nuovi studi, al fine di comprenderne il ruolo biologico e le possibili applicazioni in ambito clinico, in particolare relativamente alla loro utilizzazione come biomarcatori non invasivi di malattia.

1. INTRODUZIONE

1.1 Pancreas: nozioni anatomiche e fisiologiche

Il pancreas è una ghiandola extramurale, impari e parenchimatosa, annessa all'apparato digerente. È una ghiandola mista in cui coesistono due diverse formazioni: una porzione esocrina e una porzione endocrina. È situata retroperitonealmente tra la prima (L1) e seconda (L2) vertebra lombare ed è connessa a diversi organi addominali inclusa la milza, lo stomaco, il duodeno e il colon (Leung PS, 2010). Proprio a causa della localizzazione, le patologie che interessano il pancreas si manifestano con sintomi molto vaghi. Il risultato è una diagnosi, nella maggior parte dei casi, tardiva. Il suo sviluppo inizia intorno alla quinta settimana di gestazione con la comparsa dell'annesso pancreatobiliare e si completa nel periodo post-natale. L'organo completamente sviluppato si presenta con una forma uncinata e strutturalmente suddiviso in testa, corpo e coda: la testa si posiziona nella C duodenale, dopo un breve restringimento (istmo o collo), assume forma rettangolare prolungandosi verso sinistra (corpo) e termina assottigliandosi con la coda, che si dirige verso la milza.

La porzione endocrina del pancreas rappresenta l'1-2% della massa totale dell'organo. Le cellule che la compongono svolgono però importanti funzioni nell'omeostasi del glucosio. La componente cellulare è organizzata in cluster, intorno ai capillari, di diverse dimensioni e composizione. Questa organizzazione prende il nome di isole di Langherans costituite principalmente da quattro tipologie cellulari:

- le cellule- α : situate in genere alla periferia delle isole, preposte alla produzione di glucagone,
- le cellule- β : localizzate al centro delle isole, producono insulina,
- le cellule- δ : come le cellule- α , sono situate perifericamente e producono somatostatina,
- le cellule PP o cellule-F: il loro prodotto è il polipeptide pancreatico,

i diversi ormoni prodotti sono poi riversati direttamente nel flusso sanguigno (Monesi et al.; 2018).

La porzione esocrina del pancreas, invece, costituisce la maggior parte del volume della ghiandola, circa il 95%, ed è composta da cellule acinari e duttali, associate a tessuto connettivo, vasi sanguigni e nervi (Longnecker, 2021). La funzione principale è la produzione e la secrezione nel duodeno di enzimi digestivi e bicarbonato per la normale

digestione e assorbimento dei nutrienti. Strutturalmente, le cellule acinari e duttali sono organizzate in strutture ghiandolari tubulo-acinose (acini).

Tra le due porzioni è presente tessuto interstiziale composto da cellule pancreatiche stellate (PSCs), un tessuto connettivo specializzato. Le PSCs producono componenti della matrice extracellulare e sono attivate da una moltitudine di fattori, inclusi mediatori infiammatori, alcool e suoi metaboliti, endotossine e fattori derivanti da cellule cancerose. Le PSCs attivate assumono funzioni simili ai fibroblasti contribuendo quindi alla fibrosi associata a pancreatiti croniche e adenocarcinoma pancreatico (Longnecker, 2021).

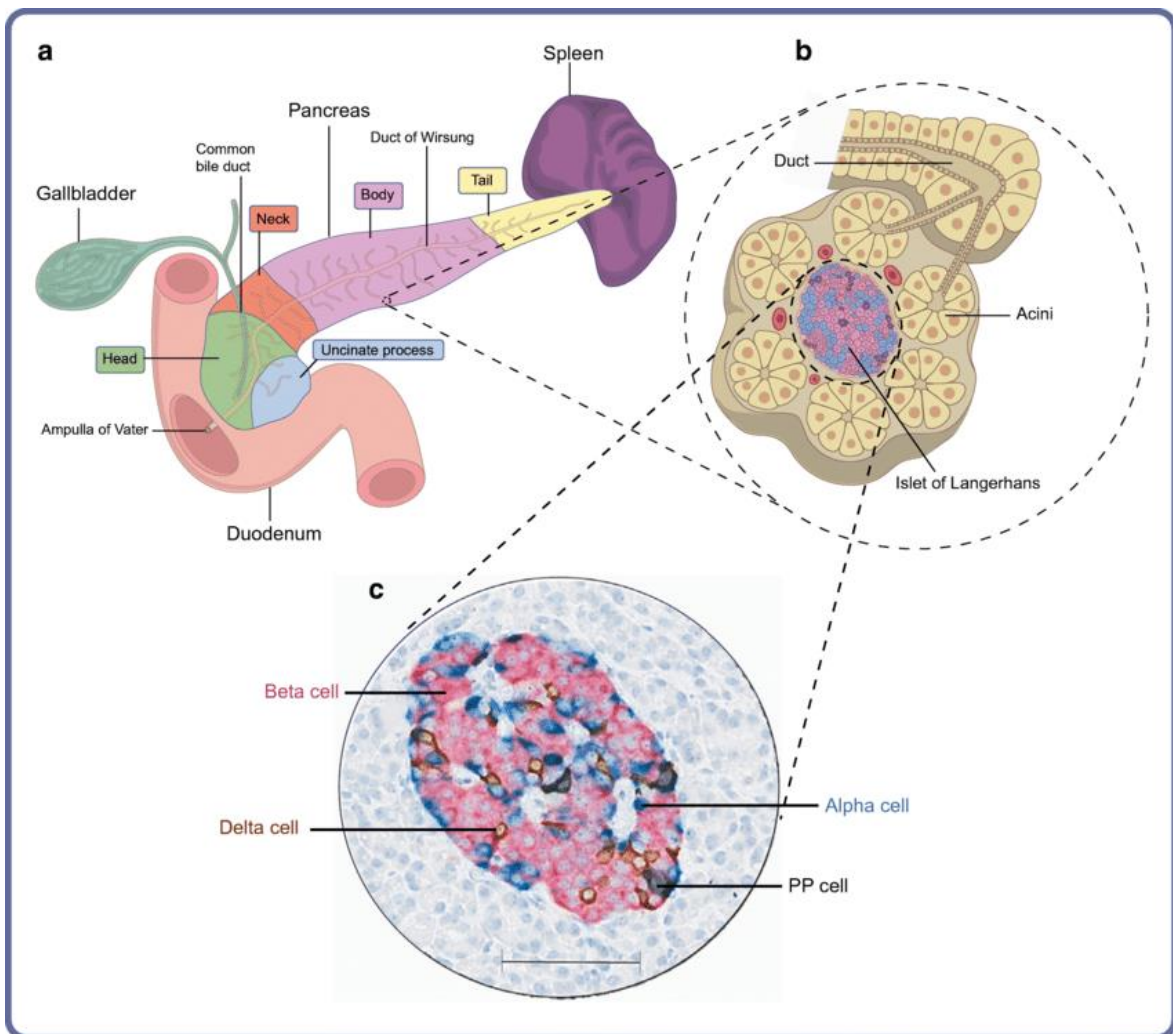


Fig.1: a) schema rappresentativo dell'anatomia del pancreas e dei principali organi circostanti; b) schema rappresentativo delle porzioni esocrine ed endocrine; c) isola di Langherans con le principali cellule in evidenza (Atkinson MA. et al. 2020).

1.2 Carcinoma pancreatico

Le neoplasie pancreatiche si identificano in un ampio spettro di neo-formazioni classificate in base al differenziamento istologico e al loro comportamento biologico (benigno, pre-maligno o maligno) (Haeberle L., Eposito I. 2019).

Group	Entity	Further subdivision
Exocrine neoplasms		
Benign	Acinar cell cystadenoma	-
	Serous cystadenoma	
	Pyloric gland adenoma	
Pre-malignant	Pancreatic intraepithelial neoplasia, high grade	-
	Intraductal papillary mucinous neoplasm	With low-grade dysplasia
	-	With high-grade dysplasia
	Intraductal tubulopapillary neoplasm	-
	Mucinous cystic neoplasm	With low-grade dysplasia
Malignant	-	With high-grade dysplasia
	Acinar cell carcinoma	-
	Acinar cell cystadenocarcinoma	-
	Ductal adenocarcinoma	Adenosquamous carcinoma
	-	Colloid carcinoma
	-	Hepatoid carcinoma
	-	Medullary carcinoma
	-	Signet ring cell carcinoma
	-	Undifferentiated carcinoma
	-	Undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells
	-	Intraductal papillary mucinous neoplasm with an associated invasive carcinoma
	-	Intraductal tubulopapillary neoplasm with associated invasive carcinoma
	-	Mixed acinar/ductal/neuroendocrine carcinoma
	-	Pancreatoblastoma
	-	Serous cystadenocarcinoma
	-	Solid-pseudopapillary neoplasm
	Neuroendocrine neoplasms	Pancreatic neuroendocrine microadenoma
Neuroendocrine tumor		Nonfunctional pancreatic NET
-		NET G1
-		NET G2
-		NET G3
Neuroendocrine carcinoma (NEC)		Small cell NEC
-		Large cell NEC
EC-cell, serotonin producing NET (carcinoid)		-
Gastrinoma		-
Glucagonoma		-
Insulinoma	-	
Somatostatinoma	-	
VIPoma	-	

Tab. 1: Panoramica delle neoformazioni pancreatiche (Haeberle L., Eposito I. 2019).

1.2.1 Epidemiologia

Con carcinoma pancreatico (PC), clinicamente, ci si riferisce a diverse neoplasie maligne altamente aggressive, tanto che l'incidenza coincide frequentemente con il tasso di mortalità. La Global Cancer Statistics nel 2020, ha riportato un totale di 495.773 nuovi casi e 466.003 relative morti (Hu J. et al.; 2021) e si stima che il carcinoma pancreatico, attualmente settima causa di morte, possa diventare la seconda causa di morte cancro-correlata nel 2030 (Haeberle L., Esposito I. 2019; Wood et al. 2022).

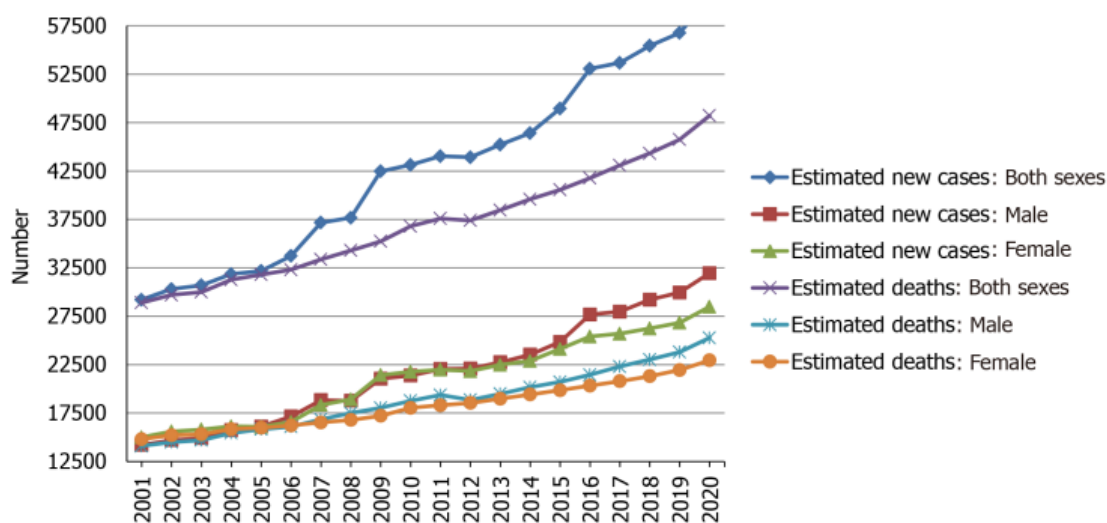


Fig.2: Stime dei nuovi casi e delle morti dal 2001 al 2020 solo negli USA (dati American Cancer Society) (Hu J. et al.; 2021).

Il 90% dei tumori viene diagnosticato in uno stadio tardivo con metastasi sistemiche in più dell'80% dei pazienti, a causa della localizzazione del pancreas e per l'assenza di sintomi specifici nelle fasi precoci. Nella maggior parte dei casi (85%-90%) si tratta di adenocarcinoma pancreatico duttale o PDAC, tanto che "carcinoma pancreatico" e "adenocarcinoma pancreatico duttale" sono considerati sinonimi. (Haeberle L., Esposito I., 2019). Negli ultimi decenni si è assistito ad un drammatico incremento dei casi di PC, 441.000 casi nel 2017 contro i 196.000 casi del 1990 (REFS), dovuto in parte all'aumento dell'età di invecchiamento della popolazione, soprattutto in America, Europa e Australia. L'età media alla diagnosi è di circa 71 anni, e raramente tale forma si manifesta prima dei 40 anni (Ryan et al. 2014; Klein et al. 2012). La prognosi è infausta, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni pari al 9% nel 2019 in USA ed Europa, percentuale che arriva al 15-20% nel caso in cui il paziente subisce resezione chirurgica.

Le cause e i meccanismi esatti dello sviluppo del tumore al pancreas non sono chiari, ma sono stati identificati diversi fattori di rischio suddivisibili in due macro-categorie: i fattori di rischio modificabili e non modificabili.

Tra i fattori di rischio modificabili si annoverano il fumo di sigaretta, l'alcool, obesità, il diabete mellito e le pancreatiti. Il fumo di sigaretta attribuisce allo sviluppo del tumore un odd ratio dell'1,74 per i fumatori rispetto ai non fumatori e una percentuale di rischio di sviluppare la malattia tra l'11% e il 32%, con un meccanismo multifattoriale che include danno al DNA, infiammazione e fibrosi, così come accade con un consumo eccessivo di alcool. Quest'ultimo può essere associato allo sviluppo delle pancreatiti, altro fattore di rischio, caratterizzato da infiammazione e danno tissutale. I pazienti con diabete mellito diagnosticato da almeno tre anni, invece, presentano un incremento del rischio da due a tre volte. Allo stesso tempo, però, il diabete mellito può essere considerato, non solo causa, ma anche effetto. In pazienti in cui il diabete è stato diagnosticato nei mesi precedenti alla diagnosi di PC, sottoposti a resezione chirurgica per la rimozione del tumore, si è notata la risoluzione della patologia associata (Klein et al., 2021).

I fattori di rischio non modificabili sono l'età, il genere (l'incidenza e la mortalità a livello mondiale è maggiore per gli uomini rispetto alle donne), l'etnia, la storia familiare e la suscettibilità genetica (i casi di carcinoma pancreatico familiare sono pari al 10% e sono associati a sindromi tumorali ereditarie con mutazioni nella linea germinale note) (Hu J. et al., 2021).

1.2.2 Patogenesi ed oncogenesi

L'adenocarcinoma pancreatico duttale o PDAC, comunemente è localizzato nella testa del pancreas (60-70% dei casi), nel 5-10% dei casi nel corpo e nel 10-15% nella coda della ghiandola. Alla diagnosi ha solitamente dimensioni approssimativamente comprese tra i 3 e i 6 centimetri, con infiltrazioni metastatiche nei tessuti circostanti quali tessuto linfatico, milza, cavità peritoneali, stomaco e fegato. È caratterizzato da desmoplasia (abbondante tessuto connettivo e/o fibroso) con infiltrati di cellule infiammatorie e cellule pancreatiche stellate attive che, conseguentemente al danno pancreatico, acquisiscono funzionalità simili ai fibroblasti, contribuendo alla risposta desmoplastica (Hazel et al.; 2006).

La trasformazione cellulare da normale a carcinomatosa avviene con un processo graduale nel quale sono coinvolte diverse componenti molecolari, quali attivazione di oncogeni, inattivazione degli oncosoppressori, mutazioni di geni, fattori di crescita e relativi recettori;

molti meccanismi però non sono ancora ben conosciuti. A livello istopatologico, invece, la progressione da tessuto normale a tumorale è stata ben definita. Sono state identificate diverse lesioni pre-cancerose definite dalle loro dimensioni e coinvolgimento del sistema duttale: neoplasie intraepiteliali (PanIN), neoplasia intraduttale papillare mucinosa (IPMN) e neoplasia cistica mucinosa (MCN). Sulla base delle modificazioni strutturali e citologiche che le caratterizzano, queste vengono classificate in basso ed alto grado: il basso grado presenta nuclei orientati basalmente e un'atipia citologica da media a moderata, l'alto grado invece mostra marcate alterazioni strutturali, polarità cellulare assente e severa atipia citologica (Wood et al. 2022).

Le PanIN sono neoplasie di piccole dimensioni ($\leq 0,5$ cm di diametro), sono le più comuni e coinvolgono il sistema duttale. Sono classificate in PanIN-1, PanIN-2 e PanIN-3 in base ai diversi gradi di crescita displastica. Lo stadio precoce (PanIN-1) presenta cellule epiteliali cuboidali o colonnari con crescente disorganizzazione strutturale mentre nelle PanIN-2 e PanIN-3 sono presenti anche atipie nucleari. Al grado più alto (PanIN-3) sono evidenti aree di invasione a livello della membrana basale.

Le IPMN sono lesioni cistiche (diametro >1 cm) e comunicano con il sistema duttale. L'epitelio di rivestimento è di tipo colonnare mucinoso che spesso forma strutture papillari (raggruppamenti di cellule ghiandolari). Possono svilupparsi ovunque, ma più comunemente a livello della testa del pancreas. L'incidenza aumenta con l'età (60-70 anni). A livello strutturale sono caratterizzate da produzione di mucina, atipia nucleare e presenza di detriti di cisti. L'epitelio di rivestimento può avere diverse origini: gastrofocale, intestinale, oncocitario o pancreatobiliare.

Le MCN sono lesioni cistiche di grandi dimensioni uni- o multiloculari che non comunicano con il sistema duttale. L'epitelio di rivestimento è di tipo mucinoso colonnare con stroma simile allo stroma ovarico. Si sviluppano più comunemente nelle donne a livello del corpo e della coda della ghiandola (Pittman ME et al.; 2017).

A livello molecolare sono state identificate diverse alterazioni geniche e in molti casi è stata notata una correlazione con le fasi istopatologiche. Tuttavia, il meccanismo di come queste alterazioni contribuiscano alla patogenesi non è chiaro.

Le mutazioni più frequenti si riscontrano a livello dei geni KRAS, CDKN2A, TP53 e SMAD4.

Il gene KRAS è localizzato sul cromosoma 12p12.1 e codifica per una proteina legante il GTP. Mutazioni missenso del gene, principalmente a livello del codone 12, causano una perdita dell'attività enzimatica GTPasica della proteina, risultando in una attivazione

costitutiva della cascata del segnale delle MAPK, ciò si traduce in una proliferazione aberrante, soppressione dell'apoptosi e alterazioni del microambiente e sopravvivenza cellulare (Saiki Y. e Horii A. 2014). Le lesioni KRAS sono solitamente riscontrate, nelle fasi precoci della tumorigenesi, già a livello delle lesioni pre-cancerose, e sembrano indurre proprio la progressione da PanIN di basso grado/IPMN a PDAC. La proteina CDKN2A (inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A) o INK4A/p16 è invece inattivata e presenta un'incidenza più alta nelle PanIN-2 (80-95%) o nelle IPMN associate con carcinoma invasivo (alto grado). Mutazioni a livello del gene corrispondente, per delezione omozigotica, mutazioni intra-geniche o ipermetilazione, si manifestano con un'inattivazione della proteina oncosoppressoria, e regolatrice del ciclo cellulare al checkpoint G1/S. Il risultato è un aumento progressivo delle atipie citologiche e strutturali tipiche delle lesioni. TP53 è inattivato nel 75% dei casi di PDAC. È un fattore di trascrizione oncosoppressorio che in risposta a stress arresta il ciclo cellulare e attiva l'apoptosi nelle cellule danneggiate. La perdita di funzione della proteina in seguito a mutazione, facilita l'accumularsi di mutazioni genetiche a livello del DNA e una progressione cellulare incontrollata. Essa è riscontrabile nelle fasi tardive della progressione istopatologica delle lesioni (PanIN-3, IPMN e MCN di alto grado). La mutazione di Smad4 è presente in circa il 55% degli adenocarcinomi pancreatici, anche in questo caso si ha inattivazione del prodotto genico. Smad4 è un mediatore nella via di segnalazione del TGF- β , coinvolta nella trascrizione di geni regolatori della crescita cellulare. La perdita funzionale di Smad4 porta a una proliferazione cellulare incontrollata. Altre mutazioni meno frequenti (10-15% dei casi), identificate da recenti studi di sequenziamento, sono state identificate in componenti del complesso di rimodellamento dei nucleosomi SWI/SNF. Queste alterazioni si traducono in riarrangiamento, delezione e frequente amplificazione cromosomica (Ryan D.P. et al.; 2014).

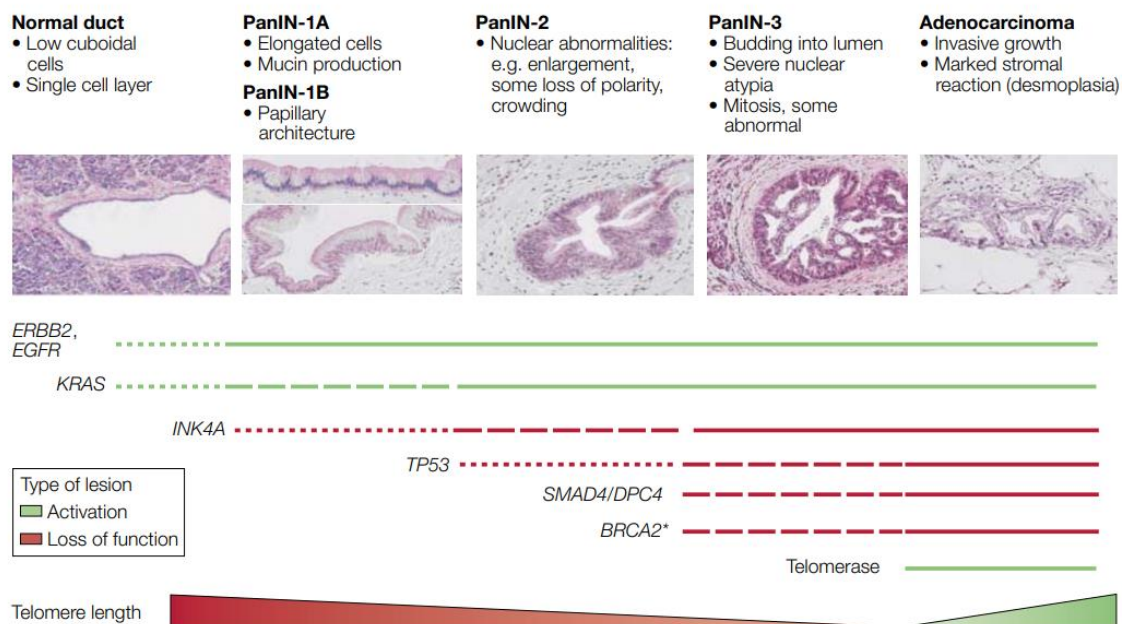


Fig.3: modello della progressione e delle lesioni genetiche nel PDAC (Bardeesy N. & DePinho R.A. 2002).

In circa il 10% dei casi di adenocarcinoma pancreatico, è stata riscontrata anche una storia familiare. In questi casi, oltre alle alterazioni geniche già discusse, sono state riscontrate sindromi tumorali ereditarie causate da mutazioni genetiche note e riconosciute, associate ad un aumento del rischio di tumore pancreatico (Hu et al 2021). Queste mutazioni coinvolgono i seguenti geni:

- STKL11 o LKB1, sindrome di Peutz-Jeghers (PJS). Il gene codifica per una serin-treonina chinasi nucleare oncosoppressoria di cui però non è stato ancora chiarito il meccanismo d'azione. Riscontrata in circa il 4% dei casi di PC,
- CDKN2A, melanoma multiplo atipico familiare (FAMMM), già discusso precedentemente,
- BRCA1/2, sindrome ereditaria della mammella e dell'ovaio. Entrambi sono geni oncosoppressori codificanti proteine coinvolte nella riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA,
- PRSS1/SPINK1, pancreatiti ereditarie. Le mutazioni di questi geni causano l'attivazione della cascata dello zimogeno e la conseguente autodigestione del pancreas e l'instaurarsi di un microambiente infiammatorio,
- CFTR, causa della fibrosi cistica. Da diversi studi è stata osservata un'associazione tra fibrosi cistica e predisposizione allo sviluppo del tumore pancreatico. Il

- meccanismo rimane ancora sconosciuto, ma sembra che coinvolga MUC4, una glicoproteina regolata dall'espressione di CTFR (Gentiluomo M. et al.; 2022),
- MLH1, MSH6, MSH2, PMS2 ed EPCAM sindrome del carcinoma coloretale non poliposico o di Lynch. Geni codificanti proteine coinvolte nel sistema di riparazione del mismatch repair,
 - ATM, atassia-telangiectasia o sindrome di Louis-bar (AT). Codifica per una serin-treonina coinvolta nell'identificazione e nella riparazione del DNA. Alterazioni su questo gene aumentano l'instabilità genomica e le capacità "migratorie" del tumore,
 - PALB2, anemia di Fanconi. Lega e trasporta nel nucleo BRCA2 stabilmente. È coinvolto della riparazione del danno del DNA. Da uno studio effettuato su 524 famiglie portatrici di questa mutazione è stata riscontrata una percentuale di rischio per il tumore al pancreas pari al 3% (Kasuga A. et al.; 2021).

Predisposition syndrome	Gene or genes	Relative risk of PDAC ¹	Associated tumour phenotype ^{43,59}
Hereditary breast and ovarian cancer	<i>BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51C</i>	2–6	Homologous recombination deficiency Mutational signature 3
Lynch syndrome	<i>MLH1, MSH2, MSH6, EPCAM</i>	8–9	Microsatellite instability Mutational signatures 6, 15, 21, 26 and 44 High total mutational burden
Familial adenomatous polyposis	<i>APC</i>	4–5	NR
Peutz–Jeghers syndrome	<i>STK11</i>	130	None
Familial atypical multiple mole melanoma syndrome	<i>CDKN2A</i>	10–65	None
Hereditary pancreatitis	<i>PRSS1, SPINK1</i>	50–70	NR
Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>	1–6	NR
Ataxia–telangectasia	<i>ATM</i>	5	None
Familial pancreatic cancer	NR	1–35	NR

APC, adenomatous polyposis coli; *CDKN2A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; *EPCAM*, epithelial cell adhesion molecule; *MLH1*, mutL homologue 1; *MSH*, mutS homologue; NR, not reported; *PALB2*, partner and localizer of BRCA2; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; *PRSS1*, encoding trypsin-1; *SPINK1*, serine protease inhibitor Kazal-type 1; *STK11*, serine/threonine kinase 11.

Tab. 2: Sindromi familiari di predisposizione associate a PDAC (Connor AA., Gallinger S.; 2022).

1.2.3 Diagnosi e trattamento

Le fasi precoci della tumorigenesi non sono caratterizzate da segni evidenti, motivo per cui la diagnosi risulta difficoltosa e avviene in fase avanzata. I pazienti mostrano i primi sintomi quando il tumore raggiunge già dimensioni considerevoli e/o nel momento in cui va ad ostruire i dotti biliare o duttali.

I sintomi più comuni sono: ittero, soprattutto quando la massa tumorale è localizzata nella testa del pancreas, steatorrea (feci grasse, schiumose e maleodoranti), malassorbimento, perdita di peso eccessiva, malessere e dolore addominale associato spesso a nausea (Vareedayah AA et al.; 2018).

Al manifestarsi dei sintomi, gli unici esami che permettono una diagnosi sono analisi di tipo istopatologico e citologico.

Gli attuali test di laboratorio sono aspecifici: raramente vengono identificate ostruzioni biliari tramite le analisi di routine, anche a causa del fatto che i livelli di amilasi e lipasi sieriche non sempre risultano elevati. Ugualmente accade con i marker tumorali comunemente utilizzati nelle diagnosi tumorali, quali CA19-9, CA242, CEA, CA125. Di maggiore utilità si è dimostrato il CA19-9: in pazienti con tumore al pancreas, mostra livelli elevati fino a due/tre anni prima della diagnosi; tuttavia, è rilevabile solo in una piccola percentuale di casi e allo stesso tempo viene rilasciato in presenza di infezioni, infiammazioni dovute a lesioni benigne o in caso di altri tumori maligni, cosa che lo rende poco specifico e con un valore predittivo positivo minore di 1% (Traub B. et al.; 2021). Studi riportati in letteratura hanno dimostrato un aumento di specificità e sensibilità con la combinazione di due o più marker tumorali e immagini: l'associazione del CA19-9 con MIC-1 (citochina inibitoria dei macrofagi) ha mostrato una migliore accuratezza in quanto MIC-1 nel siero di pazienti con PDAC ha tipicamente livelli elevati; alcuni studi si sono concentrati su singole molecole quali CECAM-1, Span-1, DUPAN-2 e altri in associazione o non con CEA, CA19-9, CA242, tuttavia nessuno di essi ha mostrato una elevata specificità. Più recentemente, grazie alle conoscenze acquisite a livello molecolare, sono emersi pannelli di geni/proteine e microRNA utilizzabili come potenziali strumenti diagnostici, con maggiore sensibilità e specificità (Zhang L. et al.; 2018).

Le immagini per l'identificazione e la localizzazione della massa attualmente vengono acquisite con la risonanza magnetica (MRI), l'endoscopia ultrasonica (EUS) e la tomografia computerizzata (CT). Queste ultime vengono utilizzate anche come guida nelle biopsie in laparoscopia. In casi più complessi si procede con una biopsia esplorativa in laparotomia.

A diagnosi confermata e tramite un'analisi delle immagini diagnostiche si procede alla stadiazione (Tabella 3).

Stage	Definition
<i>Primary Tumor (T)</i>	
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limited to pancreas, ≤ 2 cm
T2	Tumor limited to pancreas, ≥ 2 cm
T3	Extension into peri-pancreatic tissues (excluding arteries)
T4	Tumor involves celiac axis or superior mesenteric artery
<i>Regional lymph nodes (N)</i>	
Nx	Regional lymph nodes not assessed
N0	No metastatic regional lymph nodes
N1	Metastatic regional lymph nodes
<i>Distant metastases (M)</i>	
M0	No distant metastatic disease
M1	Distant metastatic disease

American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system, September 6, 2013. American Cancer Society. Available at <http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-staging>. April 5, 2016; Accessed November 28, 2017.

Tab. 3: stadiazione del tumore pancreatico (American Joint Committee on Cancer) (Vareedayah AA et al.; 2018).

In base allo stadio riscontrato, i pazienti vengono suddivisi in quattro gruppi che determinano il tipo di trattamento a cui dovranno essere sottoposti:

- Gruppo 1: pazienti con tumore circoscritto e totalmente resecabile;
- Gruppo 2: pazienti con tumore “borderline”, hanno maggiore probabilità di trarre beneficio dalla chemioradioterapia neo-adiuvante seguita poi da resezione chirurgica;
- Gruppo 3: tumore localmente avanzato ma assenza di metastasi; i pazienti possono essere sottoposti alla chirurgia in seguito a risposta positiva alla chemioterapia e radioterapia neo-adiuvante con un conseguente “down-staging”
- Gruppo 4: pazienti che presentano tumore in stato avanzato con metastasi. In questo caso si procede con chemioterapia e cure palliative.

Attualmente, la percentuale di casi che vengono sottoposti a chirurgia si aggira intorno al 15-20%, a causa della diagnosi tardiva. Nonostante il tasso di mortalità associato all'intervento chirurgico sia basso, minore del 3%, non rappresenta, comunque, un

trattamento risolutivo. La prognosi, in seguito a resezione, resta infatti infausta con un tasso di sopravvivenza pari al 25%, analogamente a 30 anni fa (Vareedayah AA et al.; 2018).

1.3 I MicroRNA

Nelle ultime decadi, è stata raccolta un'enorme quantità di dati relativi a differenti livelli d'espressione dei microRNA (miRNA) nei tessuti tumorali e nei fluidi biologici di pazienti affetti da cancro.

I microRNA costituiscono una classe di piccole molecole di RNA non codificante (19-25 nucleotidi) che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, interagendo con gli mRNA (RNA messaggeri).

Sono molecole filogeneticamente conservate; il primo miRNA, lin-4, è stato identificato nel 1993 in *Caenorhabditis elegans* da Lee e colleghi; dopo circa 7 anni, nel 2000, nello stesso organismo, è stato identificato da due diversi gruppi di ricerca il microRNA let-7. L'omologo di questo gene è stato successivamente identificato in diverse specie, tra cui *Homo sapiens*. Da quel momento si è attivata un'intensa attività di ricerca volta all'identificazione di nuovi miRNA. I nuovi microRNA sono stati raccolti e classificati in una banca dati denominata miRBase (<https://www.mirbase.org/>): nella versione corrente (v22), sono attualmente presenti sequenze di miRNA da 271 organismi di cui 38.589 sequenze immature e 48.860 mature, delle quali 1.971 immature e 2.654 mature identificate nell'uomo (Kozomara A. et al.; 2019).

1.3.1 Biogenesi e funzioni

I microRNA subiscono un processo di sintesi e maturazione che inizia a livello del nucleo e termina nel citoplasma (Bhaskran M. and Mohan M.; 2014).

I geni codificanti per i miRNA, generalmente localizzati a livello di regioni intergeniche, vengono trascritti da una RNA polimerasi II in pri-miRNA, una struttura contenente un ripiegamento a forcina con un cap di 7-metilguanosa al 5' e una coda poliadenilata all'estremità 3'. Successivamente, il pri-miRNA viene processato da un complesso microprocessore composto da Drosha (ribonucleasi RNasi II) e DGCR8/Pasha (proteina legante l'RNA) in pre-miRNA: DGCR8 lega il pri-miRNA, Drosha effettua due tagli, uno prossimale e uno distale, separando così l'ansa dal resto del precursore. Una volta formato il pre-miRNA, di circa 70 nucleotidi, avviene l'esportazione dal nucleo al citoplasma, mediata dall'esportina 5 (XPO5) e dal cofattore Ran-GTP.

Nel citoplasma, il pre-miRNA viene scisso nelle vicinanze del loop a formare un piccolo RNA a doppio filamento (dsRNA) di circa 22 nucleotidi. Il processamento viene effettuato da un enzima RNasi III, DICER, associato con TRBP (proteina legante RNA).

Successivamente il dsRNA entra in contatto con il complesso ribonucleoproteico RISC, contenente le proteine AGO e GWW, preposto all'interazione del miRNA con l'mRNA bersaglio e alla formazione del miRNA maturo a singolo filamento: la proteina AGO2 lega il filamento 5'→3' del dsRNA (filamento guida) mentre il filamento complementare viene generalmente degradato da un'elicasi interna al complesso. Il filamento guida, miRNA maturo, legato ad AGO2 a questo punto può riconoscere, anche in modo non totalmente complementare, motivi di sequenza su un mRNA bersaglio nelle regioni 3'-UTR (Figura 4). Da evidenze presenti in letteratura, le proteine Ago risultano localizzate in corpi citoplasmatici di elaborazione, i corpi P. Si ritiene che i miRNA esplicino la loro funzione di repressori post-trascrizionali proprio all'interno di questi corpi e che l'effetto della repressione dipenda dal grado di complementarità tra la regione "seed" del miRNA e la regione 3'-UTR del mRNA bersaglio: una complementarità parziale determina un'inibizione della traduzione, mentre una complementarità totale determina tagli nella sequenza dell'mRNA bersaglio con conseguente degradazione dell'intera molecola.

Un singolo microRNA può interagire con più mRNA bersaglio e quindi influenzare l'espressione di più geni, con ripercussioni di natura funzionale che possono esprimersi a livello delle rispettive pathway di segnalazione biochimica.

È noto che i miRNA svolgono ruoli chiave in diversi processi fisiologici, come il differenziamento cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. Lesioni a livello dei geni codificanti miRNA o alterazioni a livello della biogenesi possono determinarne un'espressione aberrante. La deregolazione dell'espressione dei miRNA è stata associata allo sviluppo e alla manifestazione di diverse malattie ad alto impatto, tra cui il cancro (Saliminejad K. et al.; 2019).

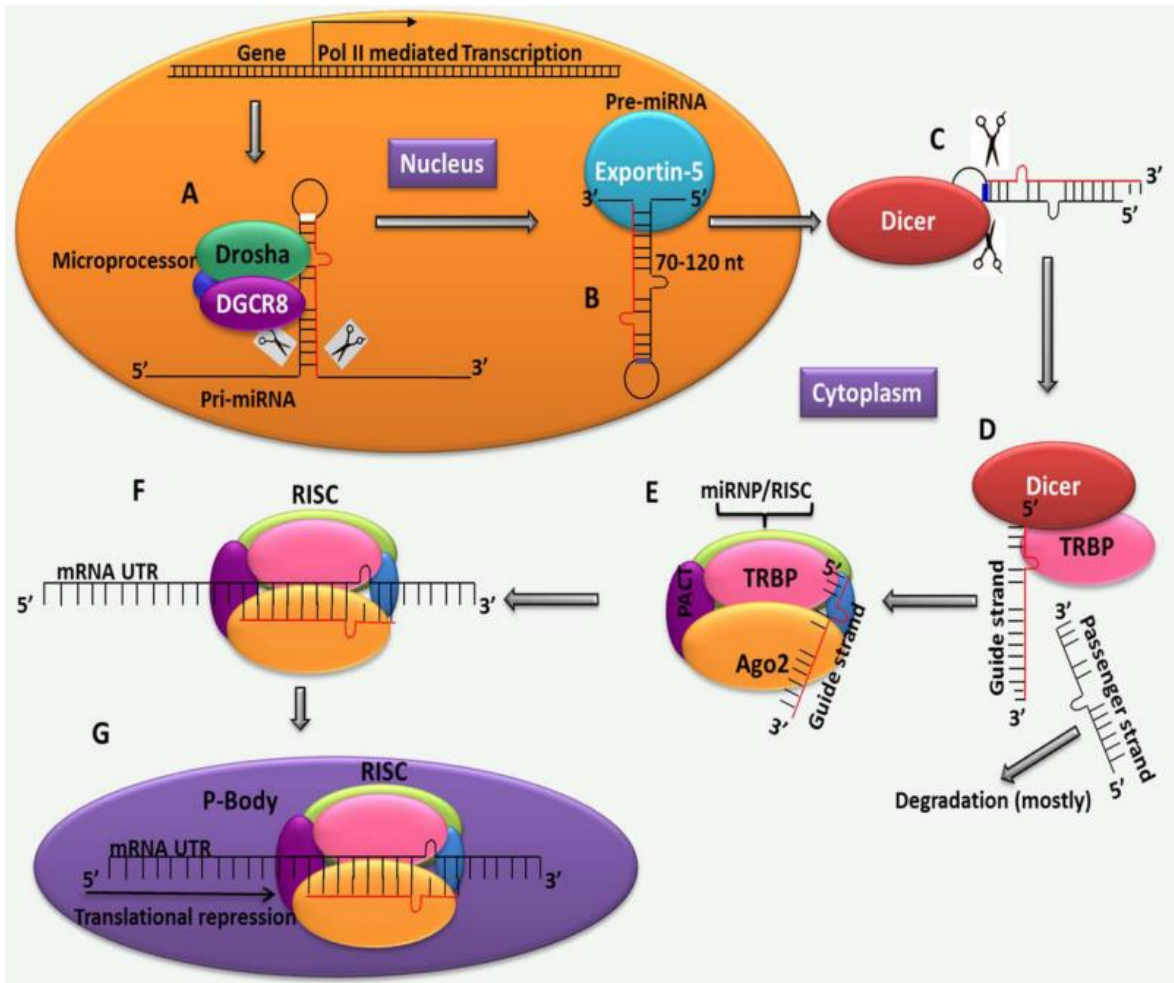


Fig.4: Biogenesi dei microRNA: (A) trascrizione del pri-miRNA e processamento ad opera di Drosha in pre-miRNA; (B) esportazione nel citoplasma del pre-miRNA dall'esportina5; (C) l'RNasi III DICER separa la struttura ad ansa dal resto del precursore a formare il dsRNA; (D) TRBP guida il doppio filamento nel complesso RISC dove il filamento guida (miRNA maturo) lega AGO2; (E) il filamento complementare viene degradato mentre (F) il complesso AGO2-miRNA si lega all'mRNA bersaglio. (G) Da evidenze riportate in letteratura la repressione traslazionale avviene a livello di strutture presenti nel citoplasma denominate strutture P. (Bhaskran M. and Mohan M.; 2014).

1.3.2 MicroRNA nel cancro e nel carcinoma pancreatico

Nel 2002 il gruppo di Croce identificò una piccola regione nel cromosoma 13q14 comunemente deleta nella leucemia linfocitaria cronica (CLL) contenente la sequenza codificante di due miRNA, il miR-15a e miR-16-1. Questa scoperta ha messo in evidenza per la prima volta la correlazione tra deregolazione dei livelli d'espressione dei microRNA e cancro. Da quel momento, tramite tecniche quali microarray, RT-qPCR e sequenziamento NGS, sono stati raccolti molti dati relativi ai differenti profili di espressione dei microRNA

in tessuti tumorali e fluidi biologici di pazienti oncologici, confrontati con tessuti normali e fluidi di individui sani, al fine di chiarire il ruolo dei miRNA nel cancro. I risultati hanno evidenziato una deregolazione dovuta a differenti livelli d'espressione (iperespressione/ipoespressione) e/o alterazioni di fattori coinvolti nella biogenesi dei miRNA, con conseguenti effetti aberranti di natura funzionale.

In base al ruolo dell'mRNA bersaglio, i miRNA vengono suddivisi principalmente in due categorie: miRNA con ruolo di soppressori tumorali o miRNA ad attività oncogena (oncomiR). I miRNA oncosoppressori, se ipoespressi, causano iperespressione e incremento dell'attività dei geni target, con proprietà oncogene. Al contrario, l'iperespressione di oncomiR si traduce nell'ipoespressione e inibizione funzionale di geni bersaglio ad attività oncosoppressoria (Hata A e Lieberman J; 2015). Gli effetti della deregolazione dei livelli d'espressione dei miRNA sono stati caratterizzati funzionalmente tramite l'utilizzo di modelli *in vitro* e *in vivo*, in cui è stata indotta l'iperespressione o l'inibizione di specifici miRNA oggetto di studio, utilizzando molecole sintetiche (miRNA mimics o antagomiR). Il let-7, per esempio, è risultato ipoespresso nel tumore del polmone, della mammella e del colon con conseguente iperespressione di geni target ad attività oncogena (RAS e MYC) e perdita dei meccanismi di controllo di crescita e proliferazione cellulare (Hata A e Lieberman J; 2015). L'iperespressione del miR-331-3p nel carcinoma nasofaringeo si traduce invece nell'inibizione della proliferazione e nella promozione dell'apoptosi (Ali Syeda Z et al.; 2020). Tra gli oncomiR più caratterizzati citiamo inoltre il miR-21, identificato in diversi tumori solidi ed ematologici, e il miR-155. Studi funzionali in cellule di glioblastoma e di epatocarcinoma hanno mostrato un ruolo antiapoptotico del miR-21 con conseguente aumento della proliferazione cellulare e metastatizzazione. Generalmente esso risulta iperespresso in stadi avanzati, nel tumore della mammella una sua iperespressione è stata associata a metastasi e a una prognosi infausta (Feng Y. e Tsao C.; 2016). Il miR-155 è stato riscontrato principalmente in neoplasie ematologiche quali linfoma diffuso a grandi cellule B e leucemia mieloide acuta, ma anche in tumori solidi quali tumore della mammella, polmone e colon. Una sua iperespressione è stata associata a un'ipoespressione sia di proteine coinvolte nella risposta immunitaria (SHIP1) nonché di regolatori del ciclo cellulare e dell'apoptosi (TP53, INP1, TGF- β , FOXO3a) (Faraoni I. et al.; 2009; Wang J. et al.; 2012; Mahesh G. et al.; 2019). Nonostante però il ruolo principalmente oncogenico, il miR-155 in alcuni casi ha mostrato un effetto oncosoppressorio. Levati et al., (2011) hanno dimostrato che il gene *SKI* è frequentemente iperespresso nel melanoma in conseguenza ad una ipoespressione del miR-155, essendo così correlato alla proliferazione aberrante e inibizione

dell'apoptosi. Medesima situazione è stata osservata nel tumore gastrico, ovarico e nella leucemia mieloide acuta: il miR-155 risulta ipoespresso con conseguente iperespressione di proteine coinvolte nella proliferazione e progressione tumorale (Li CL et al.; 2012; Qin W. et al.; 2013; Palma CA et al.; 2014). Altro esempio esplicativo del duplice ruolo che possono assumere i miRNA è il miR-125b. Nei tumori ematologici esso ha ruolo di oncomiR, mentre nei tumori solidi si comporta da soppressore tumorale. Ciò sembra dovuto al fatto che tra i suoi geni bersaglio ce ne siano alcuni coinvolti nel differenziamento ematopoietico i quali, nei tumori solidi, hanno solo un ruolo circostanziale. Questa duplicità di funzione sembra essere dovuta non solo al contesto, ma soprattutto al grande numero di geni bersaglio (Svoronos AA. et al.; 2016). L'espressione anomala dei miRNA nei tumori ha incrementato la curiosità sul loro utilizzo come potenziali biomarcatori diagnostici e/o prognostici, in particolar modo per quelle patologie caratterizzate da un'alta mortalità come il tumore pancreatico.

Blossomston e il suo gruppo (2007) hanno identificato 25 miRNA, di cui 4 down-regolati, con profilo di espressione differenziale nel tessuto tumorale pancreatico confrontato con quello non tumorale adiacente, e 58, di cui 8 down-regolati, nel tumore rispetto a condizioni di pancreatite cronica. È importante tenere in considerazione che alcuni studi sui profili di espressione hanno contribuito alla distinzione non solo tra tessuto sano e tumorale, ma anche a quella tra diverse tipologie di patologie di natura benigna, acute o croniche, e maligne. Yu et al., (2011) hanno identificato 107 miRNA deregolati nei diversi gradi di PanIN confrontati con tessuto normale e 35 con un profilo di espressione aberrante nelle PanIN-3, tra cui il miR-196b che è stato identificato esclusivamente nelle PanIN-3. Alcuni tra i risultati più significativi sono riportati in Figura 5 e nella Tabella 4.

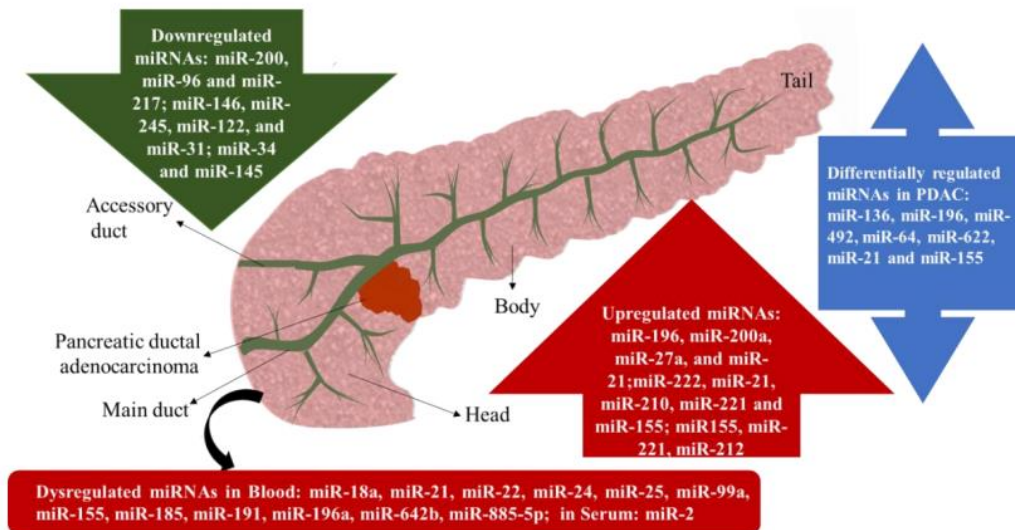


Fig.5: Alcuni miRNA comunemente deregolati nel tumore pancreatico: in verde i miRNA down-regolati, in rosso i miRNA up-regolati e in blu i miRNA differenzialmente regolati (Rawat M. et al.; 2019).

Interessanti sono alcuni studi dei profili di espressione su pazienti affetti da tumore del pancreas che hanno messo in evidenza miRNA up-regolati in campioni da biopsia, come miR-18a, miR-21, miR-22, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-155, miR-185, miR-191, miR-196a, miR-642b e miR-885-5p, i quali mostravano lo stesso profilo di espressione nella circolazione sistemica (Rawat M. et al.; 2019).

miRNA	Material	Results
miRNA-148a, miRNA-217	Histological samples	Downregulated in PanIN II–III and PDAC
miRNA-21	Histological samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-10b	Histological samples	Highly expressed in PanIN II–III
miRNA-122, miRNA-135b, miRNA-135b, miRNA-136, miRNA-186, miRNA-196b, miRNA-198, miRNA-203, miRNA-222, miRNA-23a, miRNA-34c-5p, miRNA-451, miRNA-490-3p, miRNA-492, miRNA-509-5p, miRNA-571, miRNA-614, miRNA-622, miRNA-939	Histological samples	Panel of 19 microRNAs able to discriminate pancreatic and ampullary adenocarcinomas from chronic pancreatitis and normal pancreas with high sensitivity and accuracy.
miRNA24, miRNA130b, miRNA-135b, miRNA-148a, miRNA-196	Histological samples	miRNA classifier able to improve PDAC diagnosis than cytologyanalysis alone
miRNA-21, miRNA-210, miRNA-155, miRNA-196	Blood samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-16, miRNA-21, miRNA-155, miRNA-181a, miRNA-181b, miRNA-196a, miRNA-210	Blood samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-18a	Blood samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-221	Blood samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-223	Blood samples	Overexpressed in PDAC
miRNA-196a, miRNA -216a, miRNA-143, miRNA -155	Fecal samples	Lower levels in fecal samples from patients with PCA compared to controls
miR-181b, miR-210	Fecal samples	Higher expression levels in the stool of the PCa group compared with the normal group
miRNA-221	Cyst fluid samples	Overexpressed in malignant cysts compared with benign or premalignant cysts
miRNA-21	Cyst fluid samples	Overexpressed in malignant cysts compared with benign or premalignant cysts

Tab. 4: lista di alcuni miRNA espressi in PDAC isolati da diverse tipologie di campioni e da lesioni benigne. (Brunetti O. et al.; 2015).

1.3.3 I microRNA circolanti come biomarcatori

La sfida attuale, soprattutto in campo oncologico, è la scoperta di nuovi biomarcatori che offrano maggiore sensibilità, specificità e valore predittivo. Come precedentemente riportato, ad oggi, i biomarcatori utilizzati in fase diagnostica, quali ad esempio CA19-9, CA-125, CEA, forniscono molte informazioni utili, ma presentano comunque delle limitazioni, come ad esempio alterazioni dell'espressione anche in presenza di patologie non neoplastiche, bassa specificità d'organo, bassa sensibilità diagnostica.

Nel 2001 l'U.S. National Institutes of Health (NIH) ha definito un biomarcatore come "una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come indicazione di processi biologici normali, processi patogeni, risposta farmacologica a processi patogeni o risposta a un intervento terapeutico" (Kumar S. et al. 2006; Aronson, J.K., et al. 2017). Una più recente

definizione (Fitzgerald, 2016) considera un biomarcatore come una “variante funzionale o un indice quantitativo di un processo biologico che predice o riflette l’evoluzione o la predisposizione a una malattia o a una risposta alla terapia” (Aronson, J.K., et al. 2017).

Un biomarcatore riflette quindi una qualsiasi alterazione cellulare, biochimica o molecolare che permette di distinguere o monitorare un processo biologico “normale” o “anormale”. Le molecole considerate come biomarcatori possono essere isolate da tessuti, cellule o fluidi biologici quali plasma, siero, urine o saliva, e possono essere costituite da acidi nucleici (DNA o RNA) o proteine. I biomarcatori forniscono non solo informazioni sulla diagnosi e l’approccio terapeutico più opportuno (biomarcatori predittivi), ma anche sui meccanismi responsabili della malattia stessa e il rischio associato (biomarcatori prognostici).

Negli ultimi anni, particolare interesse è stato suscitato dai miRNA circolanti soprattutto per la loro stabilità. Come già descritto, la deregolazione dei miRNA è associata a stati patologici e al cancro, e spesso ogni stato fisiopatologico è caratterizzato da specifici profili d’espressione (Chen et al., 2008; Valihrac L. et al., 2019). Le prime evidenze della presenza dei microRNA in circolo e della loro stabilità risalgono ai primi anni 2000 con gli studi di Mitchell PS. (2008) et al., e Lawrie CH. et al. (2008). I miRNA vengono rilasciati dalle cellule tumorali nella circolazione sistemica o in cellule “recipienti” in risposta a uno specifico segnale, come una risposta immunitaria, principalmente attraverso tre modalità: meccanismi passivi quali apoptosi, necrosi o stati infiammatori cronici; secrezione attiva mediante vescicole (EVs), quali esosomi, microvescicole o corpi apoptotici; secrezione attiva mediata dall’associazione in complessi proteici con lipoproteine ad alta densità (HDL), o proteine leganti RNA come AGO2 e Nucleofosmina 1 (Cui M. et al 2019; Cheng G. 2015) (Figura 6). È proprio l’associazione miRNA-proteine responsabile della stabilità dei miRNA in circolo: le proteine, infatti, li proteggono dall’azione delle RNasi endogene (Mitchell PS et al., 2008; Arroyo et al., 2011). Il “traffico” di queste molecole sembra essere correlato alla tumorigenesi e alla progressione tumorale, cosa che rende i miRNA circolanti interessanti candidati come potenziali biomarcatori, potendo riflettere lo stato patologico del tessuto da cui provengono (Valihrac L. et al., 2019).

Sulla base di queste osservazioni, l’utilizzo dei miRNA circolanti nella diagnostica sta suscitando particolare interesse soprattutto nel caso di tumori la cui diagnosi risulta allo stato attuale molto difficoltosa, come il tumore pancreatico. Ho et al (2010), basandosi su studi di Camps et al (2008) sul tumore della mammella e miR-210, ne hanno mostrato alti livelli nel siero di pazienti affetti da PC rispetto ai controlli sani. Li et al (2013) hanno identificato il miR-1290 nel siero di pazienti con tumore resecabile (I e II stadio). I relativi livelli di

espressione sono stati confrontati con quelli del CA19-9, mostrando per il miR un maggior potere discriminatorio tra malattia e stato fisiologico. Inoltre, lo stesso gruppo di ricerca ha osservato che se gli alti livelli del miR-1290 persistono anche dopo la resezione del tumore pancreatico, la prognosi resta infausta. I risultati hanno quindi evidenziato per il miR non solo un potenziale ruolo come biomarcatore diagnostico, ma anche prognostico/predittivo. Il miR-196a invece è stato identificato nel siero di pazienti con tumore al pancreas ai diversi stadi di progressione della malattia rispetto ai controlli sani. Kong et al. (2011), ne hanno però notato livelli significativamente maggiori negli stadi avanzati (III e IV) rispetto agli stadi iniziali della malattia.

Altri studi hanno evidenziato un coinvolgimento di mir-27a-3p (Wang WS. et al., 2013), miR-99a, mir-24, miR-25, miR-191, miR-20a, miR-185 (Liu R. et al.; 2012), miR-16 (Liu J. Et al.; 2012). Tuttavia sono necessari ulteriori approfondimenti a riguardo.

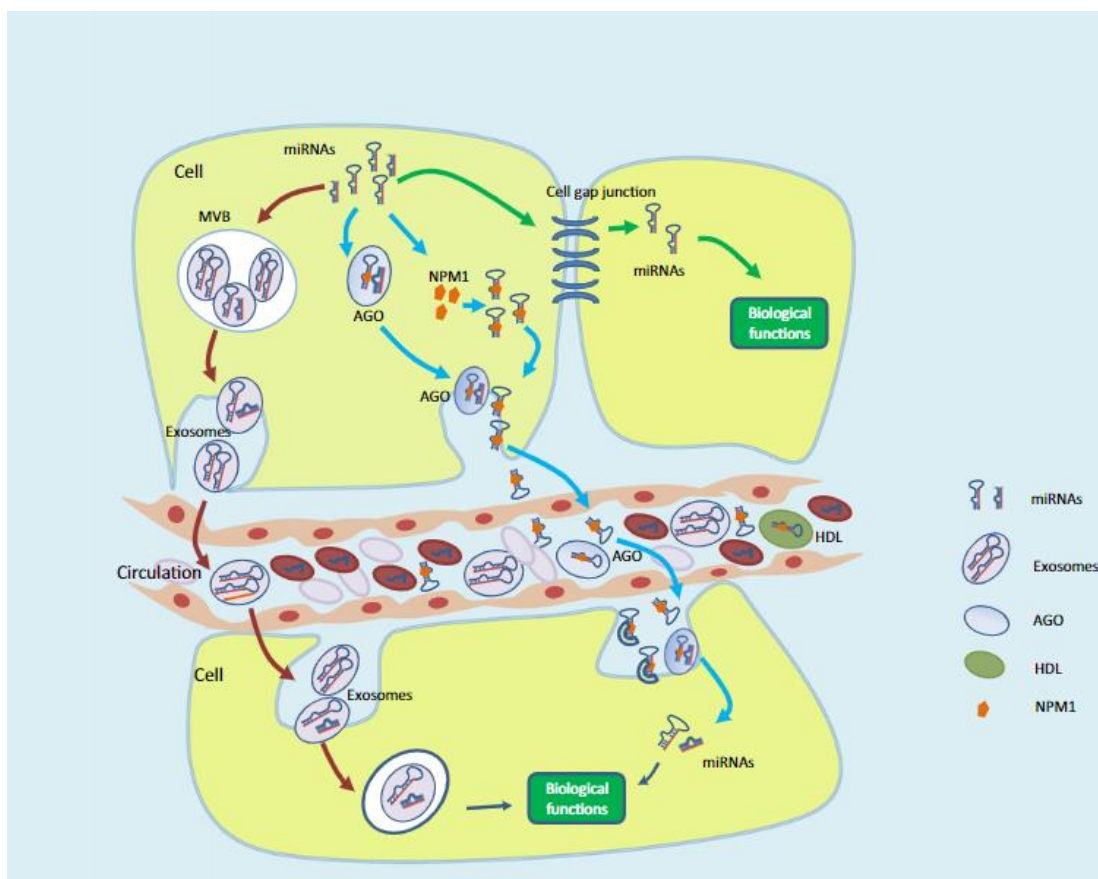


Fig.6: Rappresentazione dei principali meccanismi di rilascio dei miRNA in circolo. (Cheng G. 2015).

1.4 Proteine con ruolo di biomarcatori nel cancro e nel carcinoma pancreatico

Lo studio del proteoma ha suscitato nelle ultime decadi molto interesse in quanto considerato complementare alle analisi genomiche. Con lo sviluppo della proteomica è diventato possibile analizzare l'espressione di profili proteici sia in tessuti che in fluidi biologici, permettendo non solo di indentificare quanto una proteina sia espressa, ma anche caratterizzare le modificazioni post-traslazionali che la interessano e come queste influiscano sui meccanismi cellulari in cui la proteina è coinvolta. È ormai acclarato che la trasformazione neoplastica è caratterizzata da cambiamenti nell'espressione e funzione di molteplici proteine, oltre che dalle interazioni con il microambiente. La loro identificazione si rivela quindi una strategia per caratterizzare non solo il processo patologico, ma anche ottenere informazioni di natura diagnostica, prognostica e predittiva (Tabella 5).

Cancer type	Biomarkers
Breast cancer (Jacquemier et al., 2005; Castronovo et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Montazery-Kordy et al., 2008; Fan et al., 2010; Hooshmand et al., 2013)	Fibrinogen A Fragment; S100A9; 21- protein signature; GCDFP-15 AAG; PARK7; S10A7; GDIR; DDAH1; DDAH2; Versican core protein precursor; AGR2; Ubiquitin; Ferritin light chain; CD13, OSF-2; RS/DJ-1 autoantibody
Esophageal cancer (Fujita et al., 2006; Hatakeyama et al., 2006; Jazii, Najafi et al., 2006; Uemura et al., 2009; Moghanibashi, Jazii et al. 2012; Moghanibashi et al., 2013)	Peroxiredoxin VI autoantibody; Alpha -actinin 4; 67 ku laminin receptor; Rho GDP dissociation inhibitor 2; alpha-enolase ; Lamin A/C; nucleodise-diphosphate kinase A
Gastric cancer (Bai et al., 2011; Kočevr et al., 2012; Sousa et al., 2012; Karimi et al., 2014)	α 1- antitrypsin precursor; Pepsinogen C; Cathepsin B; MAWBP; Vimentin; galectin 1; DEAD-box protein 48 autoantibody; hnRNP A2/B1
Lung cancer (Yanagisawa et al., 2007; Yang et al., 2007; Rahman et al., 2011; Yousefi et al., 2012)	TEF1 α ; A 25-signal Proteomic Signature; Autoantibodies against triosephosphate isomerase and superoxide dismutase (MsSOD); HSP27; Aminopeptidase-P; eIF-5A; 15 distinct MS peaks; PGP 9.5 autoantibody
Liver cancer (Orvisky et al., 2006; Sun et al., 2007; Gray et al., 2009; Resson et al., 2012; Xiao et al., 2012)	HOP, hnRNP C1/C2; eIF1A; Multiplex serum markers; Ferritin-light-unit; Adenylate kinase-3a-like1; biliverdin reductase B; Tissue ferritin light chain; V10 fragment of vitronectin; Brain-derived neurotrophic factor
Colorectal cancer (Pei et al., 2007; Wu et al., 2008; Wang et al., 2012; Coghlin and Murray, 2013)	CCSA-2, CCSA-3, CCSA-4; SELENBP1; HSP-27; GST; Annexin II; L-FABP

Tab. 5: alcuni biomarcatori proteici identificati in diversi tipi tumorali tramite tecniche di proteomica (Karimi P. et al.; 2014).

Con gli strumenti forniti dalla proteomica è stato possibile identificare proteine non solo differenzialmente espresse nelle cellule tumorali stesse, ma anche coinvolte nelle interazioni cellule-microambiente, correlate alla tumorigenesi e alla progressione tumorale. L'applicazione di queste metodologie a campioni di tumore pancreatico ha permesso di approfondire i meccanismi implicati nella tumorigenesi e di identificare potenziali biomarcatori in grado di distinguere le lesioni benigne pre-cancerose e maligne. Pan et al.

(2020) hanno identificato circa 200 proteine iperespresse, validate successivamente tramite immunohistochimica, deregolate in campioni PanIN-2 e -3, coinvolte nella mobilità cellulare, nella risposta infiammatoria e nel ciclo cellulare (e.g. laminina β 1, galectina-1 e actinina4). Ni et al. (2008) hanno comparato il proteoma di campioni tumorali di PDAC con quello di tessuto normale, evidenziando una downregolazione della gelsolina, una proteina legante l'actina che ha un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità del citoscheletro.

Cecconi et al. (2011) hanno identificato diversi biomarcatori potenziali per il tumore pancreatico in diverse tipologie di campioni; nel tessuto tumorale, ad esempio hanno identificato la sinucleina γ , la plastina-1 e l'anchirina-2; nel siero proteina quali ciclina1, TIMP1, IGFBP4, nel succo pancreatico emoglobina, fibrinogeno, tripsina ed altre. Tuttavia però, la valutazione e la validazione di potenziali biomarcatori proteici, risulta ancora particolarmente impegnativa.

Potential biomarkers for pancreatic cancer	Expression	Pancreatic cancer type
Tumour tissue biomarkers		
Plectin-1	↑	PanIN
Laminin β -1, galectin-1, actinin-4	↑	PanIN
Gelsolin	↓	PDAC
Plastin-1, ankyrin-2, microtubule-actin crosslinking proteins, synaptopodin, actins, tropomyosin β -chain, microtubule-associated proteins	↑	PDAC
Cofilin-1, keratin-type I cytoskeletal 10 autoantibodies	↑	PDAC
Hydroquinone NADH oxidase, tNOX	↑	PDAC
Glucose-regulated protein 78, macrophage migration inhibitory factor, annexin A5	↑	PDAC
α -Enolase, GAPDH, triosphosphate isomerase	↑	PDAC
Calgranulin A, calgranulin B	↑	PDAC
Synuclein- γ	↑	PDAC
Radixin, moesin, c14orf166	↑	PDAC \pm LNM
Serum or plasma biomarkers		
Phosphoglycerate kinase 1	↑	PDAC
Phosphoglycerate kinase-1 and histone H4 autoantibodies	↑	PDAC
Fibrinogen- γ	↑	PDAC
Cyclin I, Rab GDP dissociation inhibitor β (GDI2), α -1 antitrypsin precursor, haptoglobin, and serotransferrin	↑	PDAC
C14orf166	↑	PDAC
Platelet factor 4	↓	PDAC
Sialylated plasma protease C1 inhibitor, N83 glycosylation of the α 1-antitrypsin	↓	PDAC
Prolyl 4-hydroxylation of α -fibrinogen	↑	PDAC
Apolipoprotein A1, transthyretin, apolipoprotein E	↑	PDAC
LCN2, REG1A, REG3, TIMP1, IGFBP4	↑	PDAC
Pancreatic juice biomarkers		
Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I	↑	PDAC
Insulin-like growth factor binding protein-2	↑	PDAC
Hemoglobin, fibrinogen, trypsin I, trypsin II, chymotrypsinogen b, Ig- α 1 chain c region, Ig- μ chain c region, ribonuclease, serum albumin	↑	PDAC
Lithostathine I α	↓	PDAC
Matrix metalloproteinase-9, oncogene DJ1, α -1B-glycoprotein precursor	↑	PDAC

Tab. 6: alcuni tra i potenziali biomarcatori proteici identificati per il tumore pancreatico. (Cecconi D. et al.; 2011).

1.5 Gli ultrasuoni

Gli ultrasuoni sono onde sonore con frequenza maggiore di 20 MHz, non udibili dall'orecchio umano, con propagazione sinusoidale e impulsi ripetuti di circa un microsecondo (Aldrich JE; 2007). Fisicamente sono caratterizzati da un moto ondulatorio definito dai seguenti parametri:

- Frequenza: numero di cicli d'onda (successione di massimi e minimi) in un'unità di tempo, viene misurata in Hertz (Hz) pari a un ciclo al secondo
- Lunghezza d'onda (λ): distanza tra due massimi o due minimi
- Intensità (potenza): quantità di energia che attraversa un'unità di superficie in un'unità di tempo, l'unità di misura è il Watt per metro quadro (W/m^2)
- Indice meccanico: rapporto tra pressione negativa di picco e la radice quadrata della frequenza, indica la probabilità di cavitazione (formazione di bolle di gas in un fluido sottoposto a ultrasuoni) che aumenta con l'aumentare dell'intensità
- Duty cycle o Ciclo di lavoro: percentuale di tempo in cui si verifica la trasmissione di ultrasuoni pulsati e dipendono dall'intensità dell'ultrasuoni, cicli di lavoro molto lunghi combinati con alte intensità possono provocare danni termici.

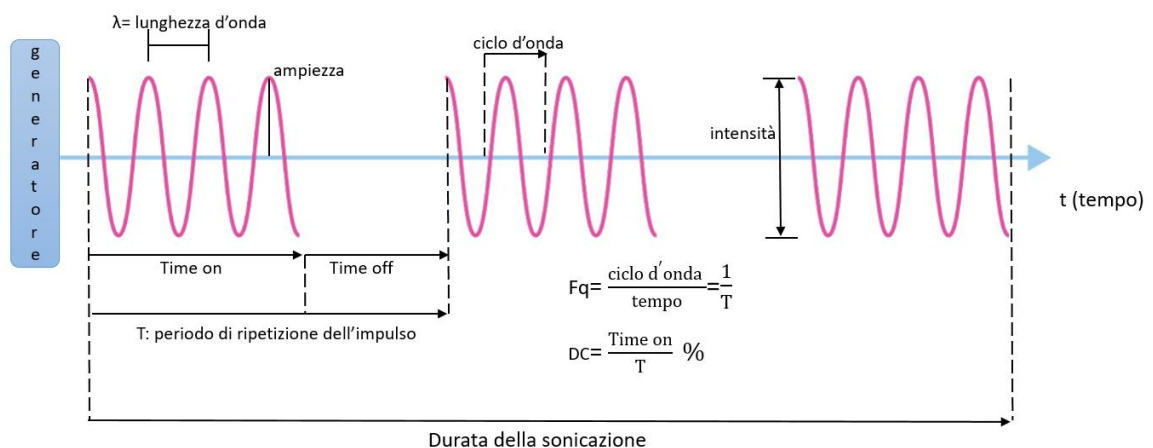


Fig.7 Schema dell'onda ultrasonica, delle sue caratteristiche e i relativi parametri fisici.

Gli ultrasuoni vengono generati tramite un trasduttore piezoelettrico, in grado di trasformare i segnali elettrici, forniti da un generatore, in segnali meccanici. Questo effetto fu scoperto nel 1880 dai fratelli Curie: nel momento in cui si ha passaggio di corrente ad alta frequenza attraverso un materiale cristallino, quest'ultimo tende ad espandersi e a contrarsi in base all'alternanza della corrente che lo attraversa, ciò genera onde ultrasoniche.

Grazie alla scoperta di questo effetto, gli ultrasuoni hanno trovato ampia applicazione in campo clinico per l'ablazione di tessuti, emostasi, trombolisi, imaging diagnostico, somministrazione di farmaci e promozione della rigenerazione dei tessuti. (Lieu D. 2010; Phenix CP. et al.; 2014). Le applicazioni cliniche si devono alla capacità degli ultrasuoni di attraversare un tessuto e all'effetto dell'attenuazione, la lunghezza d'onda diminuisce con la distanza. L'attenuazione è dovuta all'assorbimento e alla dispersione dell'energia dell'ultrasuoni che si traducono in un incremento della temperatura nel punto attraversato dall'onda e una deviazione dell'onda che viene poi rifratta e riflessa (Phenix CP. et al 2014). Il fenomeno della dispersione viene sfruttata nella diagnosi per immagini, come le ecografie, in cui l'onda riflessa viene tradotta in immagine (Aldrich JE.; 2007). L'effetto termico viene sfruttato soprattutto in applicazioni terapeutiche. Esempi sono la sonoforesi o fonoforesi, utilizzate in fisioterapia, o gli HIFU (ultrasuoni focalizzati ad alta intensità). La sonoforesi o fonoforesi consiste nell'applicazione di un fascio non focalizzato, a intensità non troppo alte, con movimenti circolari e interposizione di un secondo mezzo, su di una area lesa o dolorante. Il secondo mezzo può essere o un gel, che ottimizza la propagazione dell'onda, o dei farmaci, come anestetici o antinfiammatori topici. Il fine della terapia è riscaldare la parte e migliorare il flusso sanguigno accelerando così la guarigione (Miller et al 2011). Gli HIFU vengono invece utilizzati per l'ablazione tissutale. L'incremento di temperatura causato dalle alte intensità induce necrosi coagulativa e/o vaporizzazione del tessuto controllata, con conseguente morte cellulare e danno irreversibile a livello dei vasi sanguigni (Phenix CP et al 2014; Miller et al 2011).

Altro meccanismo alla base dell'applicazione clinica degli ultrasuoni è la sonoporazione (illustrata nel prossimo paragrafo), cioè la permeabilizzazione transitoria della membrana cellulare in risposta alla cavitazione. La cavitazione induce la generazione di un numero variabile di pori sulle membrane causati dalla formazione, espansione/contrazione e vibrazione, fino al collasso delle microbolle presenti nel mezzo (Zhang JZ. et al.; 2012).

1.5.1 Effetti biologici degli ultrasuoni

L'esposizione agli ultrasuoni altera lo stato fisiologico della membrana cellulare, causa un aumento localizzato della temperatura ed effetti chimici e meccanici che vanno ad incrementare la permeabilità cellulare. Gli effetti dipendono dall'intensità dell'onda che colpisce il sistema biologico e dal mezzo in cui procede l'ultrasuono.

L'ultrasuono che si propaga in un mezzo (ad esempio un terreno di coltura per cellule)

rilascia energia che in parte viene assorbita dal mezzo stesso e in parte genera un flusso di energia definito “flusso acustico” (Lentacker I. et al.; 2014). Il flusso acustico genera una pressione, acustica, che determina un efflusso e un influsso di gas dalle microbolle che possono essere artificiali (fornite ad esempio come strutture con un core gassoso e un “guscio” di natura lipidica o proteica) o naturalmente presenti nel mezzo. A basse intensità si ha cavitazione stabile, ovvero un’oscillazione simmetrica delle microbolle. L’oscillazione simmetrica genera nel mezzo una microcorrente caratterizzata da una serie di forze di spinta e trazione che nelle vicinanze della membrana cellulare inducono stress meccanico e successivo attraversamento della bolla del doppio strato lipidico. A intensità più elevate, l’espansione della bolla si estende fino a collassare asimmetricamente, generando onde d’urto o getti di liquido che, in prossimità della cellula, producono uno “stress di taglio” che altera in modo irreversibile l’integrità della membrana (Sboros, 2008; VanBavel, 2007). Questo fenomeno è chiamato cavitazione inerziale: in particolare, è stato dimostrato che essa potrebbe migliorare il rilascio intracellulare di farmaci e molecole (Miller et al., 1999). Alcuni studi sugli effetti degli ultrasuoni sulle membrane cellulari hanno messo in evidenza che, alla deformazione della membrana e alla formazione di pori temporanei o non, si può accompagnare anche un riarrangiamento del citoscheletro. Tramite l’utilizzo di meccanosensori, è stato visto che questo riarrangiamento si traduce in cambiamenti dei segnali che influenzano processi quali endocitosi, esocitosi e flusso di ioni (Lentacker I. et al.; 2014) (Figura 8).

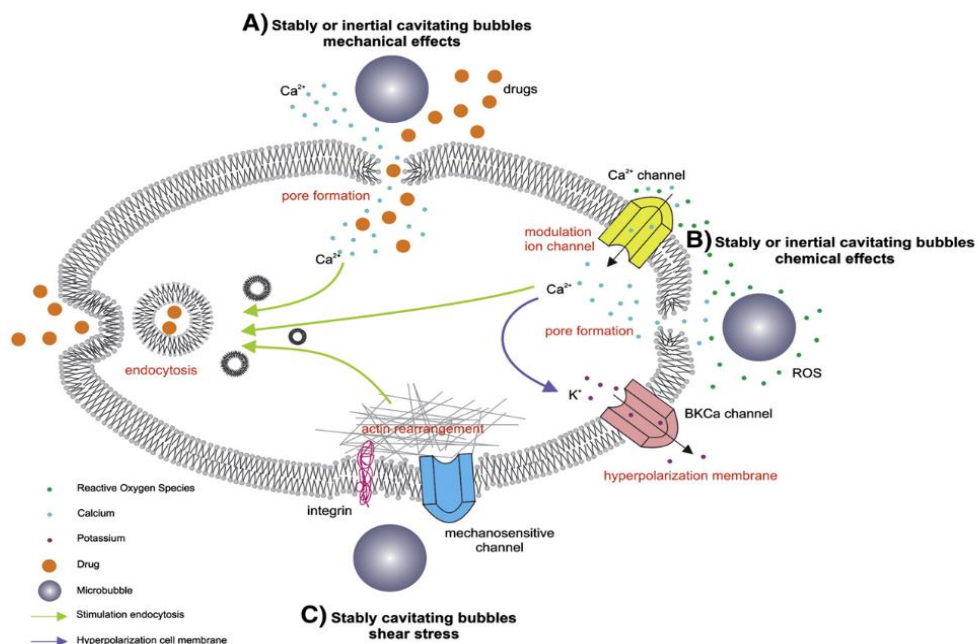


Fig. 8: Effetti biologici della cavitazione (Lentacker I. et al.; 2014).

Zhou et al. (2009) hanno analizzato la formazione, le dimensioni e i tempi di chiusura dei pori, utilizzando la corrente transmembrana (TMC), sottoponendo ad ultrasuoni oociti di *Xenopus laevis* defollicati. Tramite la TMC hanno misurato la variazione del trasporto ionico attraverso i pori. Confrontando i valori negli oociti trattati e in quelli non trattati hanno identificato le dimensioni (50-2500 nm) e il tempo necessario (nell'ordine dei μ s) alla formazione e alla chiusura dei pori. Fan e il suo gruppo di ricerca (2012) invece, hanno provato a spiegare il meccanismo della sonoporazione e dell'uptake dei farmaci utilizzando microbolle combinate con streptavidina e cellule embrionali renali umane HEK 293. Tramite immagini di fluorescenza e la TMC, essi hanno mostrato le modifiche transitorie a cui era sottoposta la membrana. Lo studio ha evidenziato che la risposta cellulare e le dimensioni dei pori sono direttamente proporzionali alle dimensioni delle microbolle e inversamente proporzionali alla pressione acustica: alte pressioni acustiche eccitano bolle di piccole dimensioni.

1.5.2 Applicazione degli ultrasuoni per il rilascio di biomarcatori putativi

Evidenze in letteratura riportano che il fenomeno della cavitazione indotta dagli ultrasuoni crea sulle barriere biologiche dei "canali bidirezionali" tra interno della cellula e microambiente circostante. Ciò è rilevante nel caso di studi su sistemi tumorali, poiché il movimento bidirezionale potrebbe essere sfruttato sia per scopo terapeutico, favorendo l'uptake di farmaci direttamente nel tumore, sia per scopo diagnostico, mediante l'induzione del rilascio di biomarcatori putativi (Figura 9). Quest'ultimo aspetto si rivela particolarmente interessante, in quanto l'uso degli ultrasuoni potrebbe amplificare il fenomeno di rilascio di molecole da parte delle cellule che avviene già fisiologicamente.

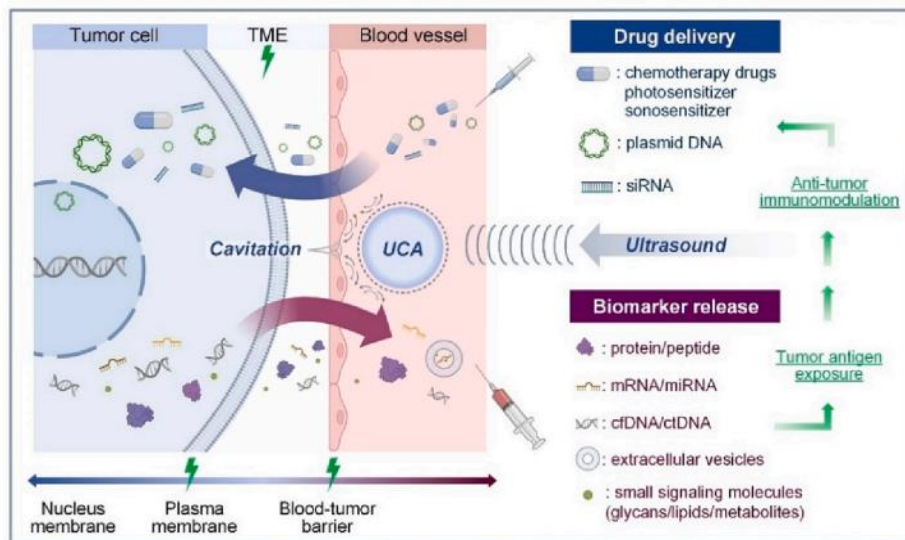


Fig.9: Rappresentazione delle potenziali applicazioni degli ultrasuoni (Hu Y. et al.; 2023).

Sono stati condotti diversi studi sulla possibilità di utilizzare gli ultrasuoni per favorire il rilascio di potenziali biomarcatori di diversa natura (Tabella 7), ponendo l'attenzione sui parametri chiave, come pressione, intensità e tempo di esposizione, da considerare ai fini della modulazione del rilascio stesso (Hu Y. et al.; 2023).

Subjects	Reference	Biomarkers	UCAs	Model	Ultrasound	Results
Cell	Yuana (2017) [76]	Extracellular vesicles (EVs)	Microbubble: SonoVue™ Conc.: $1-5 \times 10^8$ /mL	head-and-neck cancer (FaDu) cells	Freq.: 1.5 MHz; PNP: 845 kPa; PD: 100 μ s; PRF: 1 kHz; Time: 5 s.	Cavitation increased levels of CD9 and CD63 exposing-EVs as well as the total number of EVs nearly 2-fold, 4-fold and 2-fold, respectively. EVs released by cavitation had a heterogeneous size distribution profile (30–1200 nm).
	Khanna (2003) [135]	Protein (HGB)	Microbubble: Optison™ Conc.: 75 μ L/mL	Erythrocyte	Freq.: 1.5 MHz; PNP: 0.83–1.96 MPa; Time: 1–10 min.	Compared to the control group, hemoglobin (HGB) release increased discontinuously with the increase in acoustic pressure from 10.25% to 42.60%.
	D'Souza (2009) [134]	Protein (CEA)	NULL	Colon cancer (LS174T) cells	Freq.: 1 MHz; PD: 20%, 50%; Intensity: 2, 4, 6 W/cm ² ; Time: 6 min.	The cavitation-enhanced release of carcinoembryonic antigen (CEA) from LS174T cells steadily increased with increasing ultrasound treatment time and intensity (3- to 4-fold) compared to controls.
	Hussein (2017) [75]	Protein (GFP, LAMP-1, Tf α)	Microbubble: Definity™ Conc.: 10 μ L/mL	Retinal Pigmented Epithelial (RPE) cells	Freq.: 500 kHz; PNP: 570 kPa; PD: 32 μ s; PRF: 1 kHz; Time: 1.5, 11.5, 21.5 min.	Cavitation increased the release of Green fluorescent protein (GFP), transferrin (Tf α), and lysosomal associated membrane protein-1 (LAMP-1) proteins from viable cells by 19%, 23%, and 50%, respectively.
	Paproski (2014) [136]	mRNA (mammaglobin mRNA) and miRNA (miR-21 miRNA)	Nanodroplets: 430 nm Conc.: 0–10 % V/V	ZR-75-1 breast cancer cell line	Freq.: 1 MHz; PNP: 0.22, 0.76, 1.7 MPa; PRF: 100 Hz; PD: 50%; Time: 1 min.	The release of Mammaglobin mRNA and miR-21 increased with increasing nanodrop concentration, with a 25-fold and 42-fold increase at 2% concentration compared to pre-ultrasound levels, respectively.
Teenan (2022) [137]	miRNA (miR-21, miR-30e, miR-192 and miR-194)	Microbubble: SonoVue™ Conc.: $1-5 \times 10^8$ MBs/mL	renal proximal tubular epithelial (RPTECs) cells	Freq.: 1 MHz; PD: 20%; Intensity: 2 W/cm ² ; Time: 30 s.	Cavitation efficiently released miRNA, miR-21, miR-30e, miR-192 and miR-194 (10.9-fold, 7.17-fold, 5.95-fold and 5.36-fold, respectively) from tumor cells while maintaining cellular health.	
Animal	Paprocki (2017) [143]	Extracellular vesicles (EVs)	Nanodroplets: 156 \pm 5 nm Conc.: $(4.1 \pm 1.0) \times 10^{10}$ /mL	Chicken embryos xenograft model (HT1080-GFP cells)	Freq.: 1.15 MHz; PNP: 10 MPa; PD: 1000 cycles; Time: 30 s	Cavitation significantly enhanced the release of EVs (~100-fold) and miR21-5p (2.3-fold) from tumors into the blood without increasing the number of circulating tumor cells in blood.
	Pham Pacia (2020) [138]	Protein (GFAP and MBP)	Microbubble: Definity™ Conc.: 0.2 mL/kg	BBB of healthy pig brain	Freq.: 0.65 MHz; PNP: 1.5 MPa; PRF: 1 Hz; PD: 10 ms; Time: 3 min	Cavitation increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) and myelin basic protein (MBP) from 0.156 ± 0.068 ng/mL and 0.091 ± 0.034 ng/mL in pre-FUS blood samples to 0.353 ± 0.149 ng/mL and 0.364 ± 0.159 ng/mL in post-FUS blood samples, respectively.
	Chevillet (2017) [139]	miRNA (miR-9, miR-196a, miR-34c, miR-129-5p, miR-100, miR-16)	NULL	Rat prostate cancer model (MatLyLu cells)	Freq.: 1.5 MHz; PNP: 78–90 MPa; PNP: 16–17 MPa; PD: 1–10 ms; PRF: 1 Hz; Time: 30 s.	Cavitation increased plasma miRNA from 3-fold to 32-fold within 15 min after the initiation of pulsed focused ultrasound and the release increases persisted for 3 h.
	Zhu (2020) [140]	mRNA (eGFP)	Microbubble: 4 – 5 μ m, Conc.: 8×10^8 /mL	Mouse glioblastoma model (GL261 cells)	Freq.: 1.44 MHz; PRF: 1 Hz; PD: 10 ms; PNP: 0.59 MPa, 1.29 MPa, 1.58 MPa	Cavitation-induced eGFP mRNA release from tumors into the blood circulation (55-fold, 2000-fold, and 8000-fold) increased with ultrasound pressure (0.59 MPa, 1.29 and 1.58 MPa), respectively.
	Pacia (2021) [141]	ctDNA	Microbubble: Definity™ Conc.: 100 μ L/kg	Mouse and pig glioblastoma model (U87-EGFRvIII cells)	Freq.: 1.5 MHz; PNP: 1.0 MPa; PRF: 5 Hz; PD: 6.7 ms; Time: 3 min	In mice and pigs, cavitation significantly increased plasma levels of EGFRvIII ctDNA (920- and 270-fold, respectively) and TERT C228T ctDNA (10- and 9-fold, respectively).
Zhang (2021) [142]	cfDNA	Microbubble: Lumason™ Conc.: 10 mg/kg	Mouse glioblastoma model (PFB cells)	Freq.: 1 MHz; PNP: 0.3–0.4 MPa; PRF: 1 Hz; PD: 25 ms; Time: 2 min	A noticeable increase in cfDNA emerged at 15-minute post-cavitation. Two sequential sonication significantly elevated cfDNA levels (64.32 ng/mL) compared to other treatment group (single sonication: 22.54 ng/mL, MB only: 7 – 8 ng/mL).	
Human	D'Souza (2018) [144]	Protein (Endothelin-1, CA125, CA15-3) and miRNA (miR-21, miR-363, miR-490)	NULL	Patients with uterine fibroids	Freq.: 1.1 MHz; Power: 100–200 W; Time: 20 s.	MRI-guided cavitation increased release of endothelin-1 (78.8%), CA125 (9.95%) and CA15-3 (2.54%) in all patients. MRg-FUS significantly enhanced the release of miR-21 (2.7-fold), miR-363 (5.4-fold) and miR-490 (5.04-fold) in 1 out of 5 patients.
	Meng (2021) [145]	extracellular vesicles, protein (S100b), and cfDNA	Microbubble: data not shown.	Patients with glioblastoma	Freq.: 220 kHz; Sonication volume: 7.8 ± 6.0 cm ³ ; Time: 111 \pm 39 min.	MRI-guided cavitation acutely enhanced the release of plasma cfDNA (2.6 ± 1.2 -fold), neuron-derived extracellular vesicles (3.2 ± 1.9 -fold) and brain-specific protein S100b (1.4 ± 0.2 -fold).

Tab. 7: Sinossi di alcuni studi sul rilascio di biomarcatori indotto dagli ultrasuoni. (Hu Y. et al.; 2023).

D'Souza et al., nel 2009, applicando ultrasuoni con una frequenza tra i 20 kHz e i 16 MHz e con basse intensità, hanno dimostrato che l'integrità della membrana plasmatica veniva temporaneamente compromessa dall'apertura di pori. Attraverso di essi, molecole sulla superficie o nelle vicinanze, erano in grado di spostarsi nello spazio extracellulare (terreno di coltura o circolazione sistemica/fluidi biologici). Successivamente, in altri studi, sono stati considerati gli effetti degli ultrasuoni con frequenza di 1 Mhz e con intensità e tempo di

esposizione variabile, su campioni provenienti da pazienti con fibromi uterini, su cellule di tumore prostatico (e.g. LNCAP) e modelli *in vivo* di tumore epatico (D'Souza AL et al.; 2018). I risultati hanno confermato che la cavitazione è in grado di incrementare il rilascio di potenziali biomarcatori quali endotelina-1, CA125, miR-21, miR-363 e miR-490 dai campioni di fibromi uterini, miR-16 e miR-141, CEA, CA19-9 e PSA da cellule di tumore prostatico e CEA, CA125, miR-200c, mir-141 e miR-16 dai modelli *in vivo* oggetto di studio, con un incremento proporzionale al variare di intensità e tempo di trattamento. Tali evidenze sono state poi confermate da ulteriori studi. Praposki et al (2017) hanno dimostrato che la cavitazione induce il rilascio della mammoglobina dalle cellule di fibrosarcoma HT1080, mentre Teenan e il suo gruppo di ricerca (2022) hanno evidenziato il rilascio di miRNA da cellule epiteliali tubulari prossimali renali umane in coltura. Gli stessi risultati sono stati ottenuti da studi *in vivo*, in cui è stato mostrato che gli ultrasuoni sono effettivamente in grado di incrementare il rilascio sia di proteine che di miRNA dai tumori: Cheville et al (2017) hanno osservato un incremento dei miRNA, rilasciati dal tumore nel plasma, di circa 4 volte. Pacia et al (2020) hanno invece riscontrato un aumento della concentrazione della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) e della proteina basica mielinica (MBP) rilasciate dal cervello di maiali a seguito di stimolo ultrasonico focalizzato.

Nonostante le diverse evidenze reperibili in letteratura, sono necessarie ulteriori indagini; tuttavia, i risultati raccolti hanno posto l'attenzione sull'alto potenziale degli ultrasuoni come metodologia per incrementare il rilascio di molecole, consentendo l'identificazione di nuovi possibili biomarcatori diagnostici specifici.

1.6 Il Sonowell®: strumento per la generazione di ultrasuoni focalizzati e analisi *in vitro*

Per l'utilizzo degli ultrasuoni focalizzati, è necessaria specifica strumentazione, a seconda del sistema biologico oggetto di esame. Negli ultimi anni è stato messo a punto il sistema integrato a ultrasuoni, denominato Sonowell®, prodotto della Inno-sol srl (Roma), che consente di eseguire esperimenti di sonoporazione su modelli cellulari *in vitro*.

Lo strumento consente di utilizzare piastre multipozzetto (da 6 a 96). Permette di applicare diversi protocolli personalizzati, controllati da un software installato su un terminale di controllo (computer), secondo le necessità sperimentali, nei quali i parametri possono essere modificati per ogni singolo pozzetto. Lo strumento, mostrato in Figura 10, è costituito da diversi moduli: un generatore, un bagnetto termostato, un sistema idraulico per il ricircolo dell'acqua, un sistema di movimentazione 3D, un holder costituito da 4 trasduttori e dal terminale di controllo. La presenza di un bagnetto termostato, che permette di mantenere la temperatura costante intorno ai 37°C, consente una sperimentazione in assenza di condizioni di stress per le cellule.

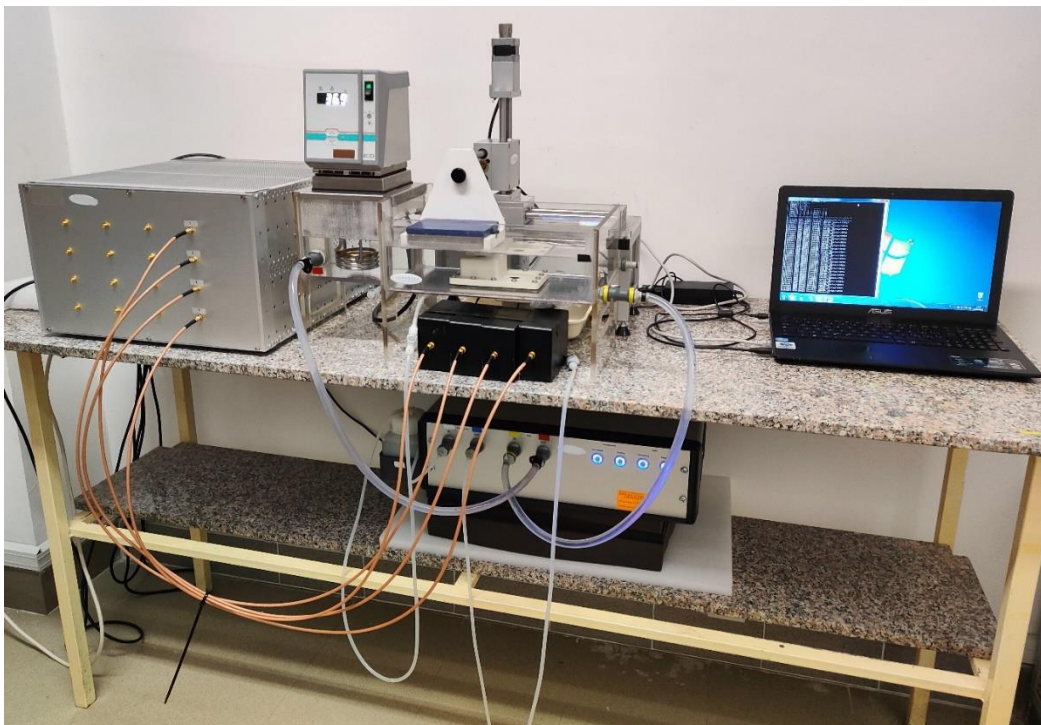


Fig. 10: Lo strumento Sonowell® con i diversi moduli.

Il generatore dispone di quattro canali paralleli totalmente indipendenti, ciascuno in grado di erogare una potenza massima di 20W, una banda di frequenza variabile tra i 0,5 e 5 MHz. Producono un'onda sinusoidale in uscita con frequenza di ripetizione dell'impulso fino a 90Hz e un dutycycle fino al 100%.

L'holder è costituito da quattro trasduttori "piatti" il cui elemento attivo ha un diametro di 12mm con frequenza di 0,65, 1, 2,4, e 4,5 MHz e una potenza acustica massima di 6W/cm² (CW 60s). I trasduttori sono disposti a una distanza fissa che dipende dalla frequenza in modo tale da ottenere la massima omogeneità del profilo di eccitazione prodotto dal campo delle onde ultrasoniche.

Il sistema idraulico invece è costituito da una vasca con capacità di 10l, da una serie di pompe per il ricircolo dell'acqua vasca/holder e una serie di filtri adibiti al degassing e all'eliminazione del particolato dall'acqua.

Il sistema di posizionamento, infine, permette il movimento e il posizionamento della piastra senza l'intervento dell'operatore. È costituito da tre motori che si muovono lungo i tre assi X, Y, e Z con un passo minimo di 10μm.

Una volta deciso il protocollo di trattamento, vanno fornite i parametri al sistema di controllo installato su un computer collegato direttamente al generatore.

Le principali applicazioni dello strumento possono essere:

- sonoporazione della membrana cellulare, con danno controllato consentendo la permeazione di molecole diverse (farmaci, nanoparticelle, acidi nucleici, proteine etc.)
- danneggiamento del biofilm microbico;
- la stimolazione della proliferazione cellulare e rigenerazione tissutale *in vitro*.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo studio presentato in questo elaborato è stato incentrato sulla messa a punto di un protocollo per il trattamento con ultrasuoni di cellule di carcinoma pancreatico umano, al fine di favorire e indurre il rilascio di molecole (microRNA e proteine) da caratterizzare e considerare come nuovi biomarcatori putativi di malattia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari e trattamento con ultrasuoni

Nel seguente studio sono stati utilizzati quattro diversi modelli *in vitro*: tre linee cellulari di tipo epiteliale derivanti da adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC) e una linea epiteliale normale di pancreas. La prima linea tumorale analizzata è stata la T3M-4 derivante da sito metastatico linfonodale, successivamente sono state analizzate le PANC-2 e le PACA-44 derivanti da tumore primario.

Le cellule sono state coltivate in RPMI-1640 (Euroclone) completato con 10% FBS exosome-free, 10 µl/ml di L-glutamina 2 mM e 10 µl/ml di Penicillina-Streptomicina 50 U/ml e 10 µl/ml PES e mantenute in incubatore con atmosfera umidificata a 37 °C con il 5% di CO₂. La linea normale HPanEpic (P10475-Innoprot), è stata mantenuta nelle stesse condizioni ambientali, ma in un terreno specifico denominato EpiCM (medium per le cellule epiteliali specifico-Innoprot) completato con 2% di FBS exosome-free, 1% di supplementi per la crescita delle cellule epiteliali (Innoprot) e l'1% di soluzione di penicillina/streptomicina (Innoprot).

Raggiunta una confluenza tra l'85%-90% le cellule, aderenti, sono state staccate con tripsina e piastrate in piastre da 24 pozzetti (Falcon) in modo da avere 80.000 cellule T3M-4 per pozzetto e 150.000 cellule PANC-2, PACA-44 e HPanEpic, in un volume finale di terreno di 500 µl. La conta cellulare è stata effettuata con contatore automatico Cell Counter (Corning Life Sciences). Successivamente, le piastre sono state incubate a 37 °C/5% CO₂ per 24h.

Dopo le 24h, prima del trattamento con ultrasuoni, è stato rimosso il terreno presente, effettuato un lavaggio con PBS e sono stati aggiunti 300 µl di terreno fresco privo di siero per eliminare possibili interferenze dovute a costituenti sierici. Sulla piastra è stata poi applicata una pellicola in poliestere adesiva, uno strato di gel per trattamento con ultrasuoni e infine un "pad", delle dimensioni della piastra, di materiale fonoassorbente.

I parametri di trattamento sono stati scelti sulla base di quanto riportato in lavori precedenti (D'Souza et al.; 2009-2018; Cornice J. et al.; 2021) e in modo tale da non causare alterazioni morfologiche e morte cellulare superiore al 25%. Le valutazioni sono state effettuate in un primo momento tramite osservazione al microscopio ottico pre- e post-trattamento e, a seguire, con Trypan blue al contatore automatico. Tutte le linee cellulari sono state trattate con ultrasuoni generati dal Sonowell® con frequenza di 1MHz e potenza pari a 70/255esimi

mW/cm² (460,29 kPa); il Duty Cycle (DC) e il tempo di esposizione (Well Time) sono stati invece adattati alla linea cellulare trattata: per le T3M4 30% DC (time on 6 msec time off 14 msec) per 30 minuti, per le PANC-2 e le HPanEpic 10% DC (time on 2 msec time off 18 msec) per 1 ora, per le PACA-44 10% DC (time on 2 msec time off 18 msec) per 40+40 minuti con 10 minuti di riposo, a metà trattamento, in incubatore al fine di preservare la stabilità cellulare. Durante tutto il processo, le cellule sono state mantenute a 37 °C. Terminato il trattamento, il surnatante (US) è stato raccolto, centrifugato a 1500 RCF per 20 minuti, per eliminare eventuali detriti, e posto a -80 °C. Nel caso dei campioni destinati all'analisi proteica, subito dopo il trattamento e prima della centrifugazione sono stati aggiunti al surnatante inibitori delle proteasi e delle fosfatasi.

I campioni di controllo (CTRL) sono stati collezionati con le stesse modalità, ma senza esposizione agli ultrasuoni, la piastra è stata posta in incubatore a 37 °C per un tempo pari al tempo di trattamento (Well Time) e successivamente si è proseguito come precedentemente descritto per il campione sonicato.

3.2 Estrazione RNA

L'RNA totale, inclusa la frazione degli smallRNA (<200 nucleotidi) è stata isolata dai campioni di surnatante utilizzando il kit Plasma/Serum RNA Purification Mini della Norgen Biotek secondo il protocollo del produttore. Per una migliore resa sono state apportate delle modifiche:

- L'estrazione è stata effettuata utilizzando tutto il quantitativo di campione pari a circa 300 µl anziché 200 µl come da protocollo;
- Sono stati utilizzati 700 µl di Lysis Buffer per campione;
- Sono stati effettuati quattro lavaggi con Wash Solution A anziché tre in modo tale da eliminare il più possibile i contaminanti.

Per l'eluizione sono stati scelti 16 µl di Elution Solution A.

Prima di proseguire all'estrazione è stato aggiunto un controllo esogeno, il cel-miR-39-3p, derivante da *C. elegans*, con concentrazione finale di 5 fmol/ml (Qiagen).

La concentrazione e la qualità del RNA è stata poi valutata al NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA).

3.3 Analisi dell'espressione dei micro-RNA

Come controllo dell'avvenuta sonicazione sono stati analizzati i livelli di espressione del hsa-miR-23b-3p per le cellule di carcinoma e hsa-miR-7 per le HPanEpic nei surnatanti di coltura, tramite l'utilizzo del kit TaqMan Small RNA Assay (245306 e 005723, Thermo Fisher). La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System Fisher Scientific. I risultati di RT-qPCR comparativa (metodo 2^{-DDCt}) sono stati normalizzati considerando il controllo esogeno cel-miR-39-3p. Verificata l'efficacia del processo di sonicazione mediante stima dell'espressione dei miRNA di controllo summenzionati nel surnatante (Relative Quantification >2 USvsCTRL), i campioni sono stati nuovamente retro-trascritti tramite Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Applied Biosystem) e analizzati con TaqMan Advanced miRNA Human Serum/Plasma Card (Applied biosystem), card microfluidiche con 384 pozzetti preconfigurate per l'analisi di 188 miRNA umani univoci espressi in siero/plasma. L'analisi di amplificazione è stata eseguita utilizzando lo strumento ViiA7 (Applied Biosystems). La normalizzazione dei risultati è stata effettuata rispetto all'ath-miR-159a, controllo esogeno aggiunto nella fase di retrotrascrizione.

3.4 Analisi dei miRNA differenzialmente espressi, pathway e geni target

I dati di RT-qPCR comparativa (metodo 2^{-DDCt}) sono stati elaborati dal software Quant Studio real-time PCR e elaborati ulteriormente tramite Expression Suite v1.3 (ThermoFisher). Le pathway e i geni bersaglio d'interesse sono state identificate e analizzate tramite il software Diana Tools (Diana miRpath v.3-Tarbase v7.0 Vlachos et al.; 2015) inserendo nell'analisi quei miRNA che presentavano un valore di RQ (Relative Quantification USvsCTRL) nel surnatante dopo sonicazione maggiore di 2.

3.5 Quantificazione e analisi delle proteine

Per il dosaggio delle proteine nei surnatanti, è stato utilizzato il kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) con lettura spettrofotometrica a 562 nm, secondo il protocollo riportato dal produttore.

Le proteine e i relativi livelli di espressione nei surnatanti ottenuti da sonicazione e di controllo sono stati definiti utilizzando Antibody Array C-Series, "Human Apoptosis Array

C1” che permette di analizzare 43 biomarcatori dell’apoptosi tra cui Caspasi-3, Caspasi-8, bad, bax, bcl-2, “Human Cancer Discovery Array C3” per 30 fattori coinvolti nella tumorigenesi e “NF-kappa B Pathway Screening Array” per 90 proteine coinvolte in NF-kappa B signaling pathway (RayBiotech), seguendo il protocollo allegato. I segnali chemiluminescenti sono stati acquisiti utilizzando lo strumento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). L’analisi densitometrica degli spot è stata effettuata tramite ImageJ, seguendo l’algoritmo riportato sul protocollo dal produttore degli array.

3.6 Analisi bioinformatica

Una prima validazione dei miRNA identificati è stata ottenuta consultando dataset pubblici (campioni da pazienti con tumore pancreatico e campioni di controllo) disponibili su Gene Expression Omnibus (GEO), avvalendosi per l’analisi di GEO2R software; e dbDEMC 3.0. Il server Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA), è stato utilizzato per una prima validazione delle proteine evidenziate dall’analisi proteica.

4. RISULTATI

4.1 Gli ultrasuoni inducono il rilascio di miRNA

La prima fase sperimentale si è incentrata sul definire i parametri di trattamento per ogni linea cellulare. Il numero di cellule da piastrare in ogni pozzetto è stato scelto in modo tale da avere dopo 24h, al momento del trattamento, una confluenza del 70% circa, per ridurre la possibilità di passaggio dei miRNA da una cellula all'altra (Guofeng Cheng; 2014). Sulla base di quanto riportato in lavori precedenti (D'Souza et al.; 2009-2018; Cornice J. et al.; 2021) la frequenza e la potenza utilizzate nel trattamento sono pari a 1 MHz e a 70/255esimi (460,29 kPa). Gli altri parametri, tempo di trattamento (Well Time) e Duty Cycle, sono stati valutati e identificati, in un primo momento, attraverso l'osservazione al microscopio ottico con l'acquisizione di immagini, per la valutazione della morfologia cellulare (Figura 11), e in un secondo momento tramite l'analisi dell'espressione del miR-23b-3p per le cellule tumorali e il miR-7 per la linea normale. Il miR-23b-3p è stato scelto come controllo di sonoporazione in quanto associato a diversi tumori primari e con espressione deregolata nei fluidi biologici dei pazienti. Secondo quanto riportato in letteratura, a seconda del tipo tumorale, delle caratteristiche patologiche e cliniche, il miR-23b-3p è risultato down- o up-regolato nel tumore del pancreas. Tuttavia, nella maggior parte dei casi esso si comporta da soppressore tumorale, esercitando la sua azione regolatoria nei confronti di oncogeni associati alla proliferazione, all'angiogenesi e alla migrazione cellulare (Grossi I. et al 2018). In particolare, Chen D. et al (2017) hanno analizzato l'espressione del mi-23b-3p nel siero di pazienti con pancreatite cronica e tumore pancreatico confrontandola dapprima con quella di sieri di pazienti sani e, in un secondo momento, di surnatanti di coltura da cellule di tumore pancreatico transfettate con il relativo mimic. Il mir-23b-3p è risultato iperespresso nei campioni da pazienti con tumore rispetto a quelli da pazienti con pancreatite cronica e, maggiormente, rispetto ai controlli. Il miR-7 è stato invece scelto in quanto associato in particolar modo allo sviluppo e al differenziamento della ghiandola. Da dati riportati in letteratura (Correa-Medina et al 2009; Lopez-Beas et al 2018) l'espressione del miR-7 inizia intorno all'ottava settimana di gestazione e aumenta esponenzialmente fino alla diciottesima settimana, per persistere espresso anche nel pancreas adulto.

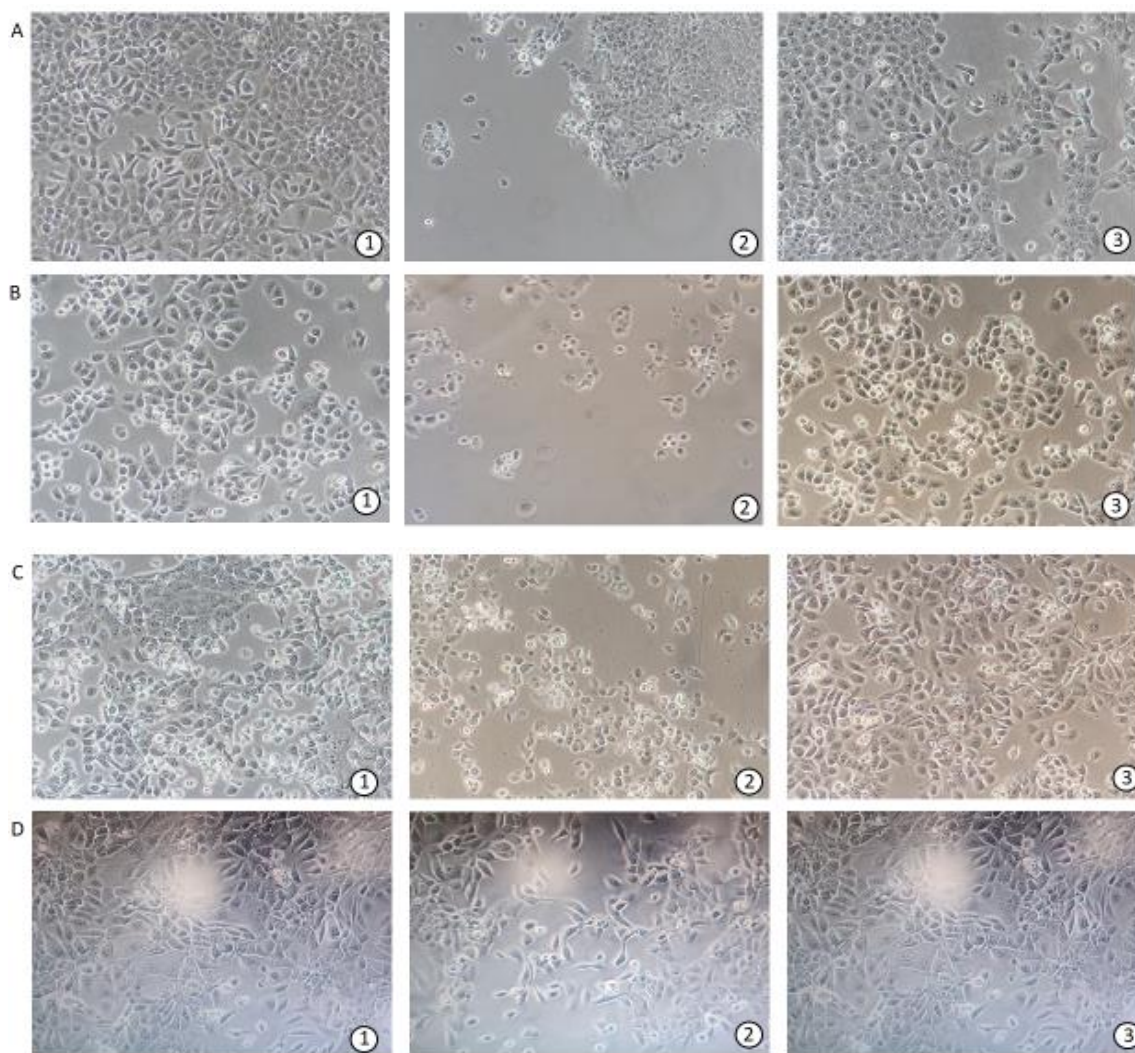


Fig.11: set-up delle condizioni di trattamento con gli ultrasuoni delle linee cellulari pancreatiche: (A) T3M-4; (B) Panc-2; (C) Paca-44; (D) HPanEpic. Le immagini (1) corrispondono alle cellule non sottoposte a trattamento. Le immagini (2) corrispondono al trattamento delle T3M4 con un Dc eguale al 40% (time on 8 ms time off 12 ms) e delle Panc-2, Paca44 e HPanEpic con un Dc del 30% (time on 6 ms time off 14 ms). Nelle suddette condizioni sono evidenti cambiamenti morfologici e cellule morte. Le immagini (3) si riferiscono al trattamento delle T3M4 con un Dc 30% (time on 6 msec time off 14 msec) e al trattamento delle Panc2, Paca44 e HPanEpic con un Dc 10% (time on 2 ms time off 18 ms). In queste ultime condizioni, le cellule non mostrano cambiamenti morfologici e la mortalità è risultata inferiore al 25%.

Il rilascio di questi miRNA è stato quindi considerato come “controllo di efficacia del trattamento con ultrasuoni” nelle fasi di messa a punto delle condizioni sperimentali. Il rilascio maggiore del miR-23b-3p si è osservato con un trattamento ultrasonico di 30 minuti e Dc eguale al 30% (time on 6 msec time off 14 msec) per le cellule T3M4 (RQ medio=22), con un trattamento ultrasonico di 60 minuti e Dc 10% (time on 2 ms time off 18 ms) per le

Panc2 (RQ medio=6), con due trattamenti ultrasonici di 40+40 minuti, con una pausa di 10 minuti tra di essi, e Dc 10% (time on 2 ms time off 18 ms) per le Paca44 (RQ medio=4.5). Per quanto riguarda la linea epiteliale pancreatica normale (HPanEpic), le migliori condizioni sperimentali per il rilascio del miR-7 si sono attestate eguali a quelle delle Panc2 (RQ medio=2.6). I differenti livelli di espressione rilevati dei miRNA sono verosimilmente da attribuirsi a una variabilità nella risposta delle cellule nei confronti dei singoli trattamenti con ultrasuoni, come già descritto in letteratura per altri modelli cellulari di studio. (Lentacker et al., 2014; Miller and Battaglia, 2003; Zhou et al., 2009) (Figura 12).

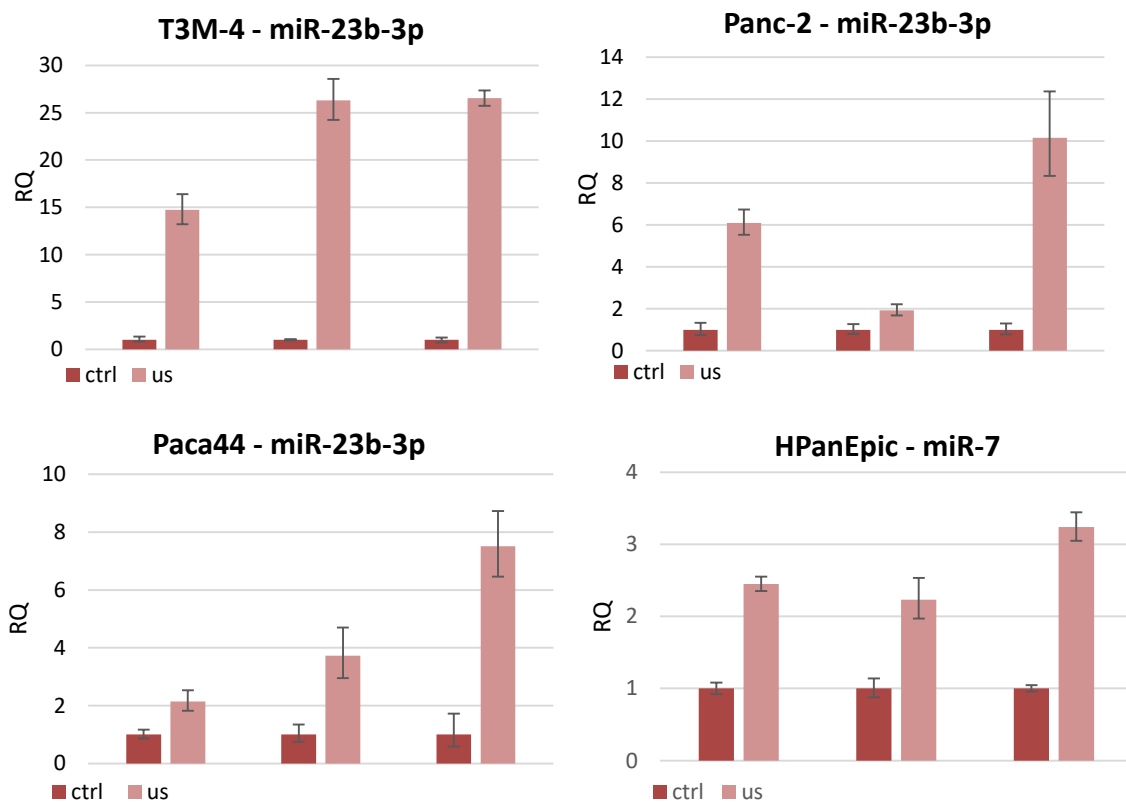


Fig.12: Livelli di espressione del miR-23b-3p, rilevati nei surnatanti delle cellule tumorali T3M-4, Panc-2 e Paca44, e del miR-7, rilevato nei surnatanti delle HPanEpic, senza trattamento (ctrl) e con trattamento con ultrasuoni (us). Ogni saggio è stato eseguito in triplicato alle medesime condizioni. L'incremento di espressione relativo alle T3M-4 si è ottenuto dopo 30 minuti di trattamento con US, quello relativo alle Panc-2 e le HPanEpic dopo 1 ora, mentre nelle Paca44 si è registrato il maggiore rilascio dopo 40+40 minuti di trattamento con una pausa di 10 tra la prima e la seconda stimolazione, per dare tempo alle cellule di "riequilibrarsi" e non subire stress che avrebbe alterato morfologia e la vitalità.

4.2 Identificazione di nuovi miRNA rilasciati in seguito a trattamento con ultrasuoni

Una volta definite le migliori condizioni di trattamento per ogni linea cellulare e dimostrato che gli ultrasuoni inducevano effettivamente un rilascio dei miRNA considerati come controllo, è stato eseguito un profiling di espressione dei miRNA nei surnatanti di coltura (circa 190 target), con lo scopo di identificare nuovi potenziali biomarcatori. Per considerazioni di natura statistica, l'analisi è stata effettuata in triplicato per ogni condizione sperimentale (US e CRTL) e per ogni linea cellulare. I risultati ottenuti sono riassunti nei Volcano plots mostrati in Figura 13.

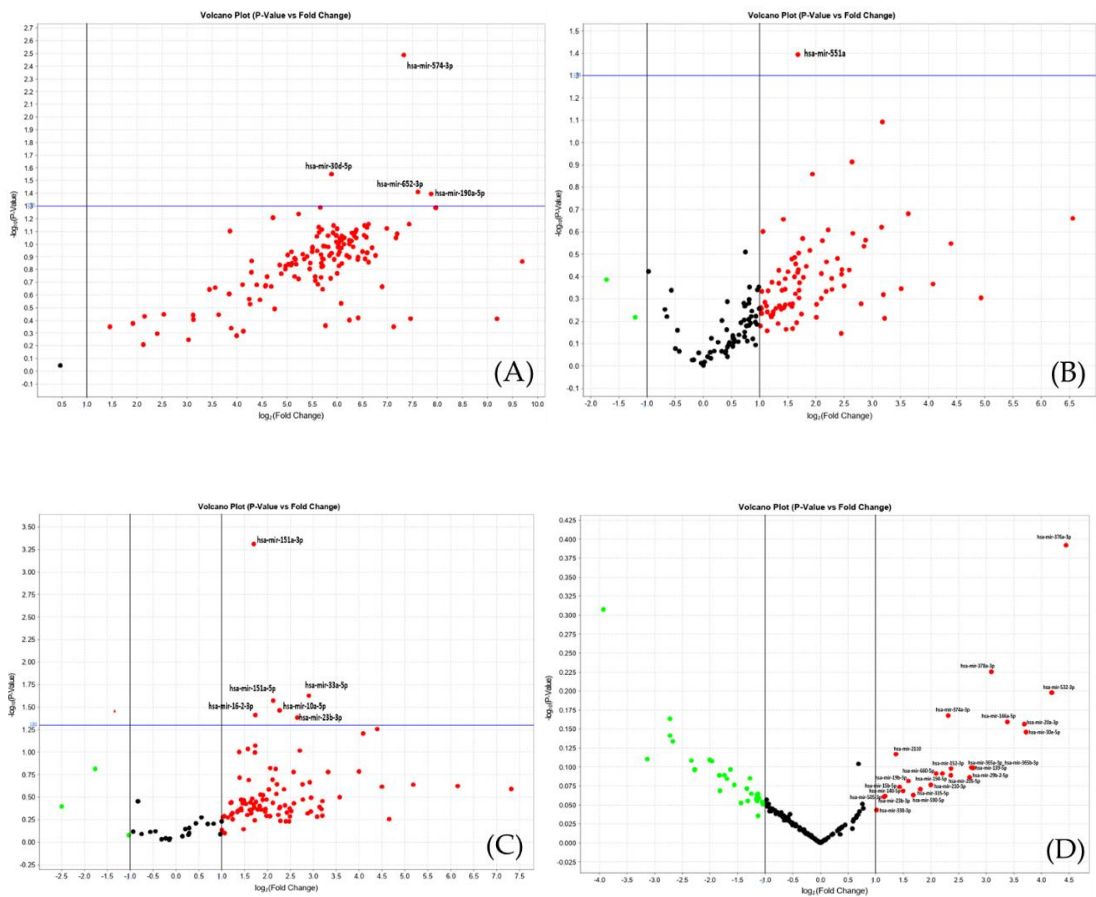


Fig.13 A-D Volcano plot dell'espressione dei miRNA rilasciati dalle T3M-4 (A), Panc-2 (B), Paca-44 (C) e HPanEpic (D). Analisi effettuata tramite il software Expression Suite, i miRNA significativi sono raffigurati al di sopra della linea orizzontale che esprime $P < 0.05$ (comparazione US vs CRTL).

I microRNA differenzialmente espressi sono stati identificati tramite il software di analisi Expression Suite. Dall'analisi sono risultati significativi ($p < 0,05$ $RQ > 2$, RQ : Relative Quantification) 4 microRNA rilasciati dalle T3M4, 1 dalle PANC-2 e 6 dalle PACA44, tutti

riportati in Tabella 8A. Vista la variabilità legata ai diversi modelli cellulari e ai replicati, da considerare come biologici, sono stati considerati anche tutti i miRNA con un $RQ > 2$, a prescindere dalla significatività statistica, identificando così 30 microRNA rilasciati da tutte le linee tumorali (Tabella 8B). Da un confronto tra i miRNA significativi e quelli in comune iperespressi nei surnatanti sono stati identificati due microRNA, hsa-miR-151a-3p e il miR-10a-5p, oltre al miR-23b-3p scelto come controllo di sonicazione. Dall'analisi dei miRNA rilasciati dalle HPanEpic sono stati identificati 11 miRNA iperespressi nei surnatanti a seguito di sonicazione ($RQ > 2$) di cui nessuno significativo e solo uno (hsa-miR-378a-3p) in comune con i miRNA identificati nel profiling delle cellule tumorali (Tabella 8C).

miRNA significativi DE rilasciati dalle cellule tumorali	
miRNA	p-value
hsa-mir-574-3p	0,003
hsa-mir-30d-5p	0,028
hsa-mir-652-3p	0,039
hsa-mir-190a-5p	0,040
hsa-miR-551a	0,040
hsa-mir-151a-3p	0,000
hsa-mir-16-2-3p	0,039
hsa-mir-151a-5p	0,027
hsa-mir-10a-5p	0,034
hsa-mir-23b-3p	0,041
hsa-mir-33a-5p	0,024

miRNA DE rilasciati dalle cellule tumorali	
hsa-let-7a-5p	hsa-miR-23b-3p
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-25-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-28-5p
hsa-miR-127-3p	hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-29b-3p
hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-301a-3p
hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-320b
hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-320e
hsa-miR-186-5p	hsa-miR-378a-3p
hsa-miR-191-5p	hsa-miR-425-5p
hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-502-3p
hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-532-5p
hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-92b-3p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-93-5p

miRNA DE rilasciati dalle HPanEPIC
hsa-miR-29b-2-5p
hsa-miR-660-5p
hsa-miR-210-3p
hsa-miR-2110
hsa-miR-194-5p
hsa-miR-378a-3p
hsa-miR-139-5p
hsa-miR-146a-5p
hsa-miR-19b-3p
hsa-miR-532-3p
hsa-miR-505-3p

(C)

Tab. 8 A-C: (A) miRNA differenzialmente espressi (DE) e significativi ($p.value < 0.05$; $RQ > 2$); (B) miRNA differenzialmente espressi ($RQ > 2$) ma non significativi, comuni alle tre linee tumorali; (C) miRNA DE, ma non significativi, identificati dal profiling delle HPanEpic

4.2.1 Analisi bioinformatica: identificazione di pathway d'interesse e geni target

Al fine di caratterizzare il ruolo dei miRNA identificati nella patogenesi del tumore pancreatico, gli stessi sono stati analizzati tramite Diana Tools v.3 avvalendosi di TarBase v7.0, che consente l'identificazione di geni target già sperimentalmente validati, tramite differenti tecnologie (es. 3'-UTR-luc-assay, IP, microarray). Da un'analisi globale dei miRNA considerati sono risultate circa 51 pathway in cui i miRNA deregolati e significativi sono implicati (Allegato, Tabella 1), e 75 pathway per i 30 miRNA deregolati ($RQ > 2$) in comune e non significativi (Allegato, Tabella 2). Tra tali pathway, ne sono state identificate circa 10 di maggiore interesse, tra cui la "KEGG Pancreatic cancer pathway" (Tabella 9A e 9B). Oltre alle pathway, l'analisi bioinformatica ha permesso l'identificazione dei geni target dei miRNA. È noto che un singolo miRNA può regolare più geni e un singolo gene può essere regolato da più miRNA. Nelle immagini 14 A-B sono rappresentate le correlazioni tra miRNA identificati e geni target nell'ambito della pathway KEGG del carcinoma pancreatico. Essendo poi differenti miRNA e differenti geni target coinvolti in più pathway in comune nell'analisi sulle linee tumorali, si evince che una deregolazione a livello di uno o più geni può essere causa della transizione da stato fisiologico a patologico, con conseguente iniziazione e progressione del tumore. Ad esempio, SMAD è un gene che trascrive per trasduttori di segnale citoplasmatici coinvolti, tra le altre, nella pathway TGF-beta, via di segnalazione che nello stato fisiologico è responsabile della regolazione negativa della crescita cellulare, controlla la senescenza, il differenziamento e l'apoptosi cellulare attraverso la trascrizione di geni specifici. Deregolazioni a livello di uno o più componenti della via, sono state associate a EMT (epithelial mesenchymal transition) e fibrosi legati alla progressione tumorale (Samanta, Debangshu, and Pran K. Datta, 2012). Ancora, PIK3, AKT, PTEN e PDK-1, sono altri geni identificati dall'analisi bioinformatica. Intervengono, ad esempio, nella PIK3-AKT-mTOR pathway, responsabile di diversi processi biologici quali crescita cellulare, riorganizzazione del citoscheletro e progressione del ciclo cellulare. In condizioni fisiologiche, le tirosin-chinasi recettoriali (RTK) e i recettori accoppiati a proteine G (GPCR) attivano la PI3K che catalizza la fosforilazione del PIP2 (fosfatidilinositolo-bisfosfato) che genera PIP3 (fosfatidilinositolo-trifosfato), un secondo messaggero responsabile dell'amplificazione del segnale di PI3K. Il segnale recluta serina/treonina chinasi (AKT) e PDK1 protein-chinasi-1 fosfoinositide-dipendente. PDK1 è responsabile della fosforilazione di AKT e può coinvolgere e attivare ulteriori bersagli tra cui la glicogeno

sintasi chinasi 3 (GSK3), le proteine Forkhead Box O (FoxO), controllando diversi meccanismi cellulari quali la sopravvivenza cellulare. (Papa, Antonella, and Pier Paolo Pandolfi, 2019). PTEN è un regolatore negativo della via di segnalazione, defosforilando PIK3 garantisce che non avvenga una crescita cellulare incontrollata.

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Hippo signaling pathway	2,30E+01	64	9
TGF-beta signaling pathway	2,00E+05	36	9
Wnt signaling pathway	0.00172521298453	55	9
FoxO signaling pathway	0.00294867016338	55	8
mTOR signaling pathway	0.00904562224378	28	7
p53 signaling pathway	0.0105294457946	31	9
Pancreatic cancer	0.0173477364756	29	9
ErbB signaling pathway	0.0268784288409	34	8
Rap1 signaling pathway	0.0396212273227	73	9

(A)

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Hippo signaling pathway	3,17E+03	108	30
TGF-beta signaling pathway	4,61E+03	64	29
TNF signaling pathway	4,02E+05	83	29
p53 signaling pathway	4,02E+05	56	30
FoxO signaling pathway	7,52E+05	101	29
Pancreatic cancer	1,33E+06	53	29
mTOR signaling pathway	7,49E+06	50	29
ErbB signaling pathway	0.000229346285166	64	29
HIF-1 signaling pathway	0.00141201855048	77	29
Wnt signaling pathway	0.0051236027441	95	30

(B)

Tab. 9 A-B: Alcune tra le pathway significative (analisi *in silico* miRpath v3.0) e correlate ai miRNA riportati in Tabella 8A (A), in Tabella 8B (B)

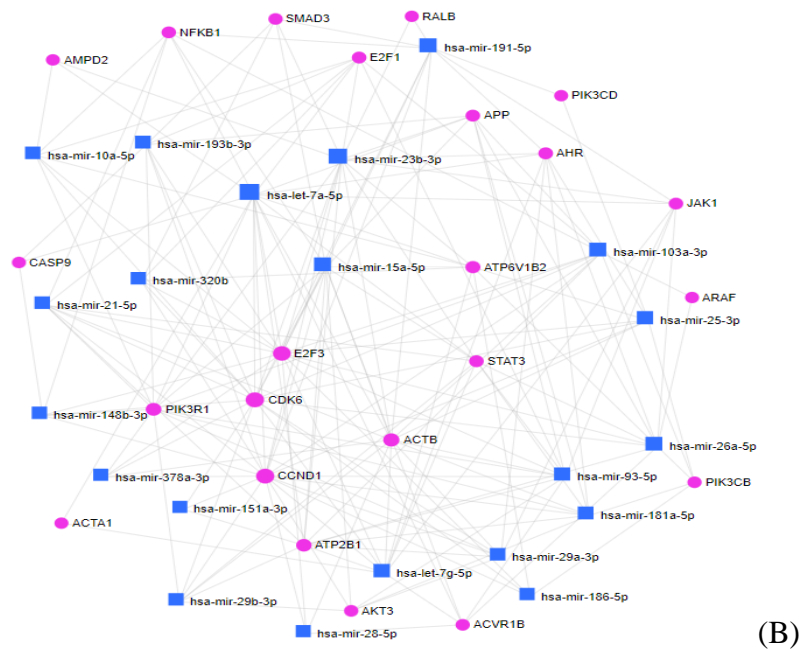
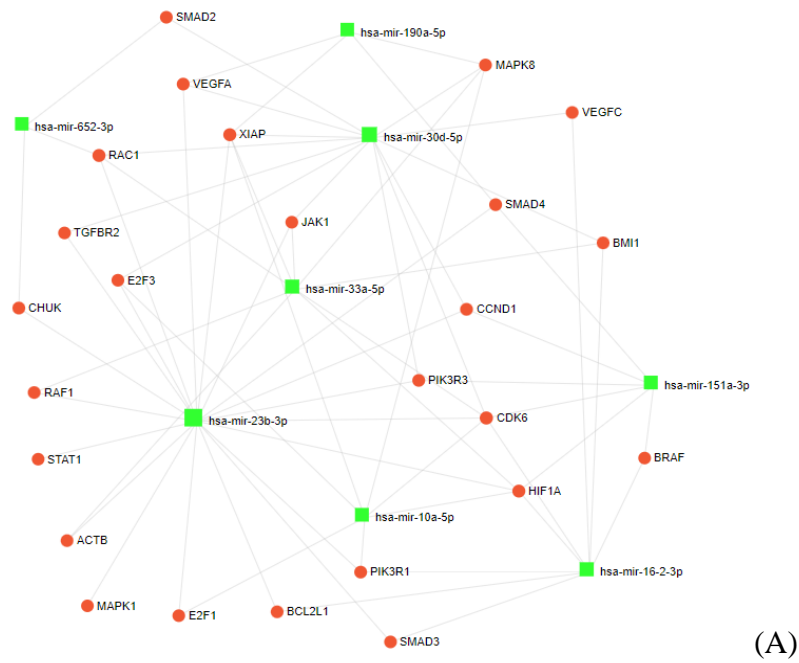


Fig. 14 A-B Grafo delle interazioni tra geni target e miRNA, in relazione alla KEGG Pancreatic Cancer Pathway (analisi tramite miRNet). Tra i miRNA significativi rilasciati nei surnatanti dopo US (Tabella 8A) 8 (quadrati verdi) degli 11 sono coinvolti nella pathway. I relativi geni bersaglio sono rappresentati dai cerchi rossi. Per i miRNA rilasciati nei surnatanti dopo US, ma non significativi (Tabella 8B), 22 dei 30 identificati sono coinvolti nella pathway (quadrati blu). Raffigurati dai cerchi viola, i geni modulati da questi ultimi. Le linee di connessione tra i miRNA e geni mostrano che un singolo gene può essere modulato da più miRNA e che un singolo miRNA regola più geni.

4.2.2 Analisi dei livelli di espressione dei miRNA identificati a seguito di trattamento con ultrasuoni: utilizzo di dataset pubblici per una preliminare validazione.

Una preliminare validazione del coinvolgimento dei miRNA identificati in questo studio è stata ottenuta eseguendo un esame *in silico*, utilizzando database pubblici disponibili su diverse piattaforme.

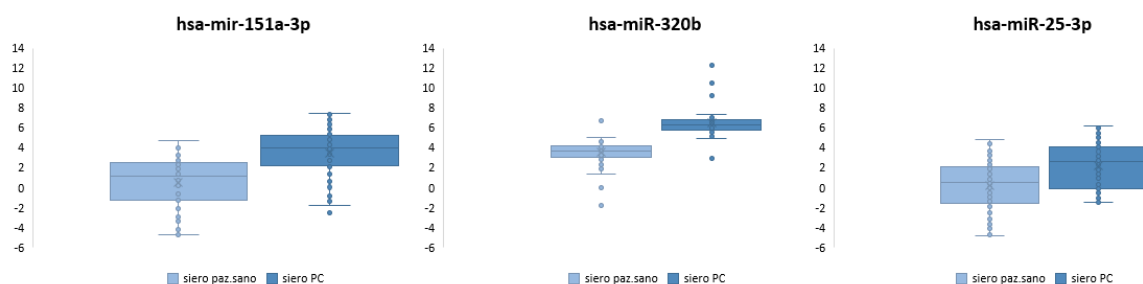
Una prima analisi è stata effettuata utilizzando dbDEMC 3.0 (<https://www.biosino.org/dbDEMC/index>), attraverso la ricerca per tipologia di cancro e acquisendo un totale di 35 studi. Effettuando una cernita sulla base dei miRNA identificati dal profiling, ed escludendo gli studi in cui la numerosità dei campioni era bassa e/o derivanti da sperimentazioni su trattamenti farmacologici, sono stati selezionati 9 differenti dataset (Tabella 11) con dati consultabili e fruibili nel database GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Da un'osservazione globale, sono risultati associati al tumore del pancreas la maggior parte dei miRNA qui identificati, e sono apparsi in particolare interessanti 8 microRNA, i cui livelli d'espressione sono riportati in Figura 15:

- hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-25-5p e hsa-miR-320b (A): identificati esclusivamente in studi su siero;
- hsa-miR-103a-3p e hsa-miR-21-5p (B): identificati in studi sia su tessuto che su sangue;
- hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-26a-5p e hsa-miR-28-5p (C): mostrano globalmente un profilo di espressione simile al miR-23b-3p, già associato al tumore pancreatico, down-regolati nel tessuto e up-regolati nei fluidi biologici.

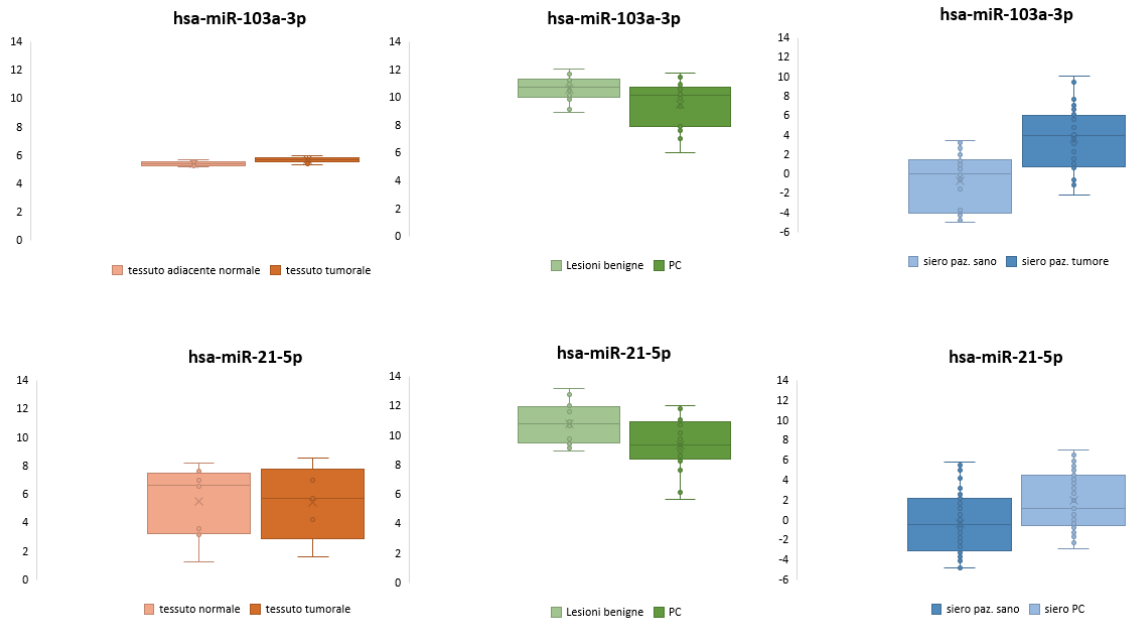
dbDEMC ID	Tipologia Esperimento	GEO ID	Numero Casi	Numero Controlli
EXP00119	Profilo di espressione di miRNA in cisti tumorali pancreatiche e in adenocarcinoma pancreatico (PDAC) campioni tissutali PDAC vs cisti tumorali pancreatiche	GSE29352	14	20
EXP00134/135/136	Profilo di espressione di miRNA in microdissezioni tissutali PDAC vs cellule duttali normali PDAC vs cellule acinari normali PDAC vs pancreatite cronica	GSE25820	5	4 (cellule duttali) 4(celle acinari) 5 (pancreatite cronica)
EXP00322	Analisi del miRNoma circolante (sangue) Pz. Con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE31568	93	70
EXP00334	analisi del miRNoma circolante (siero) Pz. Con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE59856	100	150
EXP00484	Profilo di espressione di miRNA in campioni inclusi in paraffina di adenocarcinoma pancreatico (PDAC) confrontato con il tessuto adiacente non tumorale	GSE71533	36	16
EXP00529	Analisi del miRNoma circolante (siero) Pz. con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE106817	115	2759
EXP00538	analisi del miRNoma circolante (siero) Pz. con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE113486	40	100
EXP00609	Analisi del miRNoma circolante (siero) Pz. con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE113740	25	969
EXP00620	Analisi del miRNoma circolante (siero) Pz. con carcinoma pancreatico vs controlli sani	GSE112264	50	41

Tab. 11: Prospetto riassuntivo dei dataset presi in considerazione nell'analisi.

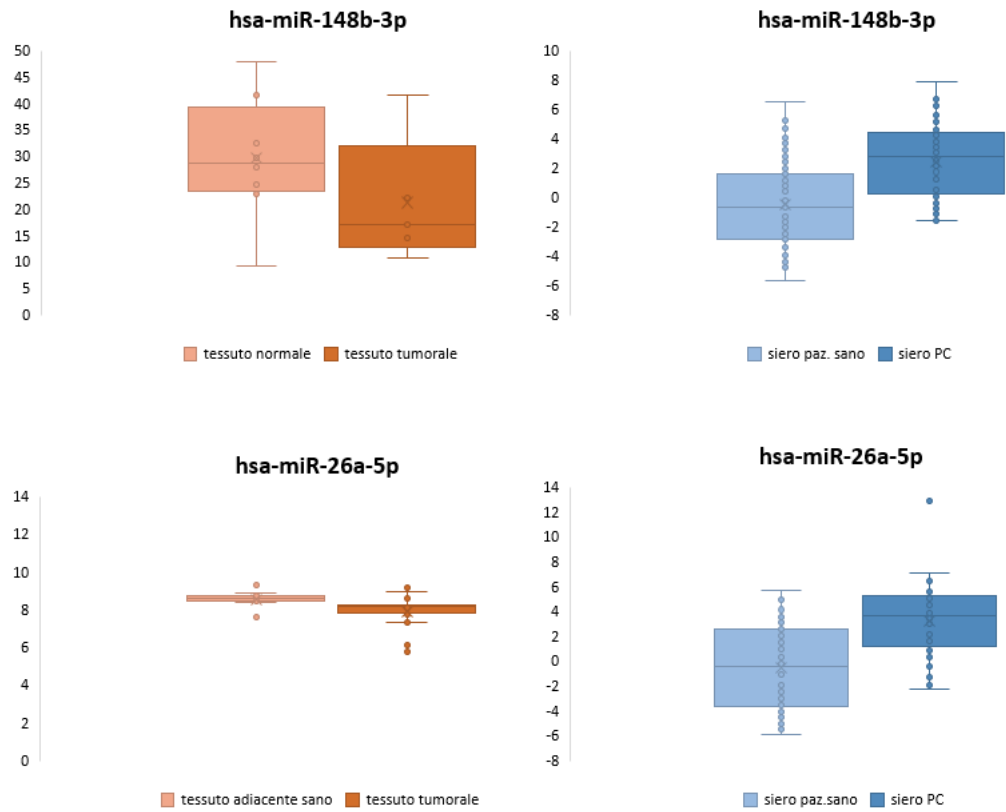
(A)



(B)



(C)



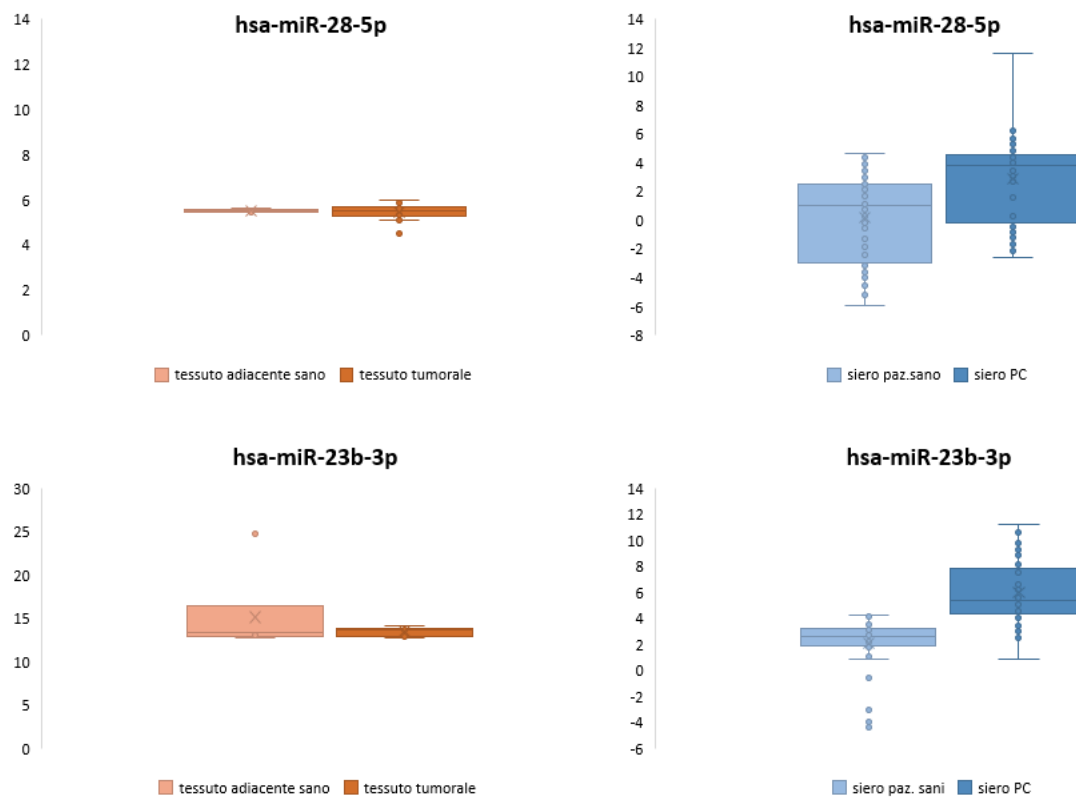


Fig.15 A-C Boxplot rappresentativi dell'espressione dei relativi miRNA sulla base delle analisi effettuate con GEO2R sui dataset selezionati (Tabella 13). Asse Y: livello d'espressione del gene, in base ai dati dei vari dataset.

4.3 Fattori proteici rilasciati a seguito di trattamento con ultrasuoni

Oltre a quella del miRNoma, è stata effettuata un'analisi delle proteine rilasciate a seguito del trattamento ultrasonico.

L'analisi *in silico* relativa all'identificazione dei geni target ha mostrato che la maggior parte di essi è coinvolta in processi biologici chiave, quali apoptosi, sopravvivenza e crescita cellulare. Sono stati pertanto utilizzati tre tipologie di Antibody Array che hanno permesso di analizzare in modo relativo e semiquantitativo i livelli di espressione di più proteine contemporaneamente. Dall'analisi densitometrica degli spot (Figura 16) sono stati identificati circa 30 fattori proteici (Tabella 12, Figura 17 A-C) maggiormente espressi (fold increase $\geq 1,5$; signal increase $\geq 50\%$) nei surnatanti da campioni trattati con ultrasuoni rispetto ai controlli. Alcuni di queste proteine risultano tra i geni target dei miRNA identificati dal profiling. Per le HPanEpic sono state identificate solo quattro proteine rilasciate nel surnatante dopo sonicazione coinvolte nella regolazione dell'apoptosi (Tabella 12, Figura 16D).

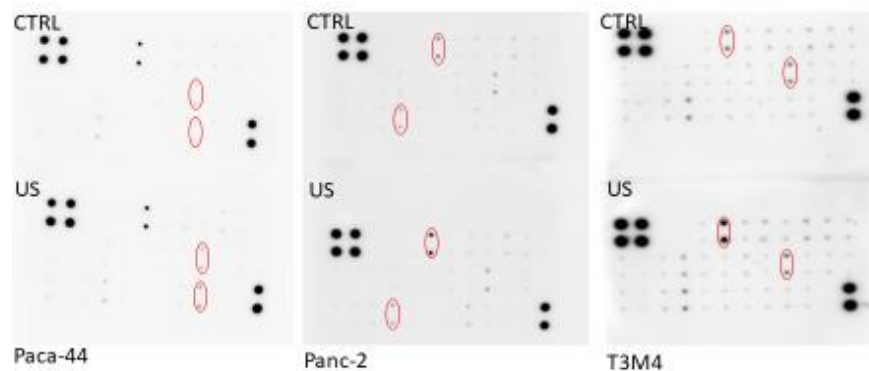
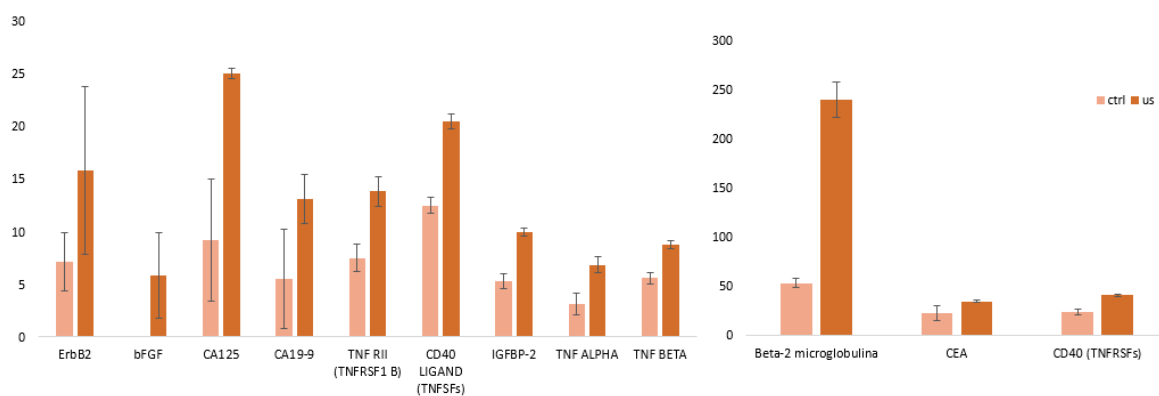


Fig.16: Esempi di segnali ottenuti da antibody array. L'immagine presenta l'acquisizione del "Human Cancer Discovery Array C3". In rosso sono evidenziati alcuni spot relativi a proteine con espressione più elevata nei campioni trattati (US) rispetto ai controlli (CTRL). Elaborazione effettuata con ImageJ.

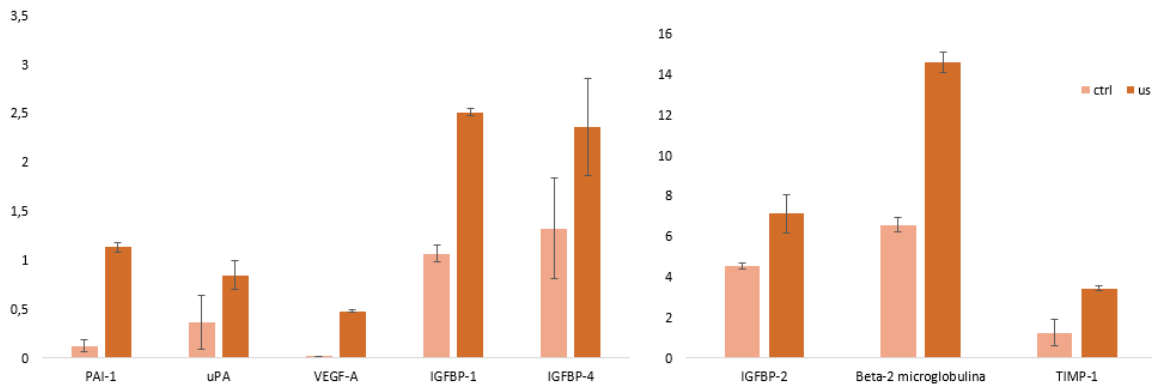
PROTEINE RILASCIATE DOPO TRATTAMENTO CON US		
Cellule tumorali		HPanEpic
bax	HTRA2	IGFBP-1
bcl-2	IGF-1	BID
bcl-w	IGF-2	HTRA2
Beta-2 microglobulina	IGFBP-1	Survivin
bFGF	IGFBP-2	
BID	IGFBP-4	
BIM	IL-8 (CXCL8)	
CA125	PAI-1	
CA19-9	Thrombospondin 1	
Caspase-3	TIMP-1	
Caspase-8	TNF ALPHA	
CD40 (TNFRSFs)	TNF BETA	
CD40 LIGAND (TNFSFs)	TNF RII (TNFRSF1 B)	
CEA	uPA	
ErbB2	VEGF-A	
Ferritin	HSP27	

Tab.12: Fattori proteici maggiormente espressi nei surnatanti di coltura dopo sonicazione (fold increase $\geq 1,5$; incremento segnale $\geq 50\%$).

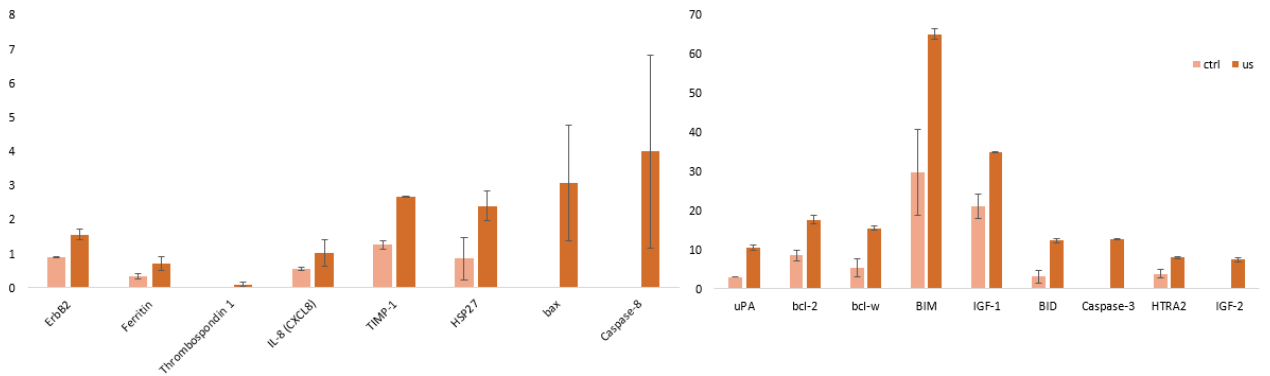
(A) T3M4



(B) Panc-2



(C) Paca-44



(D) HPanEpic

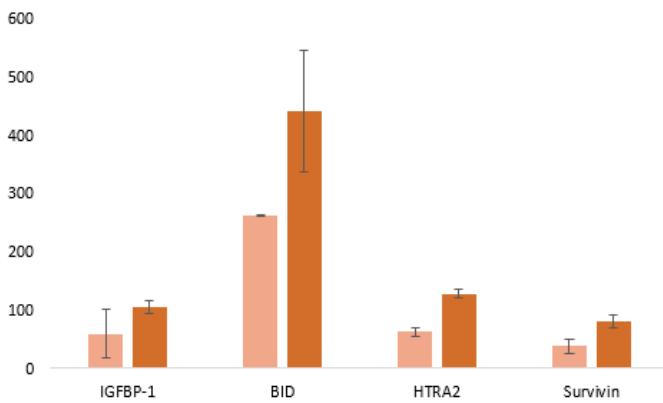


Fig. 17 Livello di espressione delle proteine rilasciate a seguito di sonicazione nei surnatanti di coltura delle cellule tumorali (A-B-C) e normali (D). Gli istogrammi sono stati ottenuti secondo l'algoritmo dell'azienda produttrice degli array, considerando 2 replicati e la SD. Asse Y: segnale densitometrico (Pixel Density).

4.3.1 Analisi bioinformatica delle proteine identificate come potenziali biomarcatori

A sostegno dei risultati ottenuti con gli array è stata effettuata un'analisi bioinformatica tramite il software GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis-<http://gepia.cancer-pku.cn/>) che permette di ricavare i livelli dell'espressione genica sulla base di dataset RNAseq (database TCGA e GTEx) contenenti 9.736 campioni tumorali e 8.587 campioni normali. Tali dati di sequenziamento “coprono” circa 20.000 geni codificanti, 25.000 geni non codificanti e oltre 14.000 pseudogeni (Tang Z. et al., 2017).

Dall'analisi differenziale è risultato che la maggior parte delle proteine identificate risultano iperesprese nel tumore rispetto al controllo sano (Tabella 13), confermando quindi un loro possibile coinvolgimento nella tumorigenesi e nella progressione del cancro del pancreas.

Proteina	Gene	livello medio di espressione nel tumore	livello medio di espressione nei controlli sani	log2(foldchange)	adjP-value
Bax	<i>Bax, Bcl2l4</i>	132,439	21,13	2,592	1,33E-72
Beta-2-microglobulina	<i>b2m</i>	8387,353	568,217	3,881	1,69E-64
bFGF	<i>Fgf2, bFgf, Fgf-2, Fgfb, Hbgf-2</i>	1,64	0,21	1,126	1,94E-31
BID	<i>Bid, Fp497</i>	33,15	3,43	2,947	1,17E-65
BIM	<i>Bim, Bam, Bod</i>	8,19	3,33	1,086	6,28E-34
Caspase-3	<i>Casp-3</i>	18,93	3,6	2,115	2,21E-75
Caspase-8	<i>Casp-8</i>	17,019	3,92	1,873	4,85E-43
CD40	<i>Tnfrsf5, Bp50, CDW40, p50</i>	23,29	9,49	1,211	1,24E-17
ErBB2	<i>erbb2, CD340, HER-2, Her-2/neu, Tkr1, ngl, neu,HER2, MLN19</i>	68,09	16,14	2,011	2,00E-30
Ferritina	<i>Fth, Fhc, Fth1, Fthl6, Hfe5, Pig15, Plif</i>	3493,844	1600,491	1,126	1,90E-14
HTRA2	<i>Htra2, OMI, Park14, PRSS25</i>	27,88	8,45	1,612	8,04E-55
IGF-2	<i>Igf2, C11orf43, IGF-II, PP9974</i>	16,2	2,27	2,395	1,34E-23
IGFBP-4	<i>Igfbp-4</i>	399,845	51,99	2,919	1,18E-52
IL-8	<i>Cxcl8, Gcp-1, IL8, NAF, NAP1</i>	23,27	1,02	3,613	2,55E-35
PAI1	<i>PAI, PAI-1, Serpine1</i>	89,052	6,66	3,555	2,12E-49
Thrombospondin 1	<i>Thbs1, Thbs, TSP, TSP1</i>	87,111	12,012	2,76	8,43E-28
TIMP-1	<i>timp1, CLGI, EPA, EPO, HCI, Timp</i>	1414,424	46,951	4,884	1,15E-72
TNF RII (TNFRSF1 B)	<i>TNFRSF1B, CD120b, TBPII, TNF-R-II, TNFR1B, TNFR2, p75</i>	19,401	2,14	2,7	1,58E-59
uPA	<i>Prap1, UPA</i>	10,84	0,09	3,441	7,26E-40

Tab.13 Risultati dell'analisi differenziale effettuata dei target proteici identificati tramite GEPIA. In giallo i geni codificanti per le proteine maggiormente espresse nei surnatanti post-sonicazione (fold change $\geq 1,5$).

5. DISCUSSIONE

Il tumore pancreatico (PC), ad oggi, è uno dei carcinomi con il maggior tasso di mortalità. Ciò si deve al ritardo nella diagnosi causata dall'assenza di sintomi nelle fasi precoci e dalla indisponibilità di test diagnostici e di screening specifici, sensibili e poco invasivi. Uno degli obiettivi più rilevanti è quindi l'identificazione di nuovi marcatori non invasivi con valore diagnostico, prognostico e/o predittivo. Una delle sfide attuali consiste nel riuscire a superare i limiti, ormai noti, associati alle molecole da considerare come biomarcatori, come la bassa concentrazione, il livello di specificità, la variabilità nei livelli d'espressione in una popolazione e la bassa riproducibilità (Valihrac L. et al., 2019).

A tal riguardo, per le peculiari caratteristiche che li rendono stabili nel torrente circolatorio, i miRNA, corte molecole di acido nucleico non codificante, sono ritenuti candidati biomarcatori di malattia, così come proteine o frammenti proteici, perché rilasciati fisiologicamente dal microambiente tumorale nel circolo ematico, da cui potrebbero essere estratti e analizzati per una caratterizzazione a fini diagnostici (Valihrac L. et al., 2019; Karimi P. et al.; 2014). L'utilizzo di metodi innovativi può dare un forte contributo per l'identificazione di nuovi biomarcatori. Questo studio è stato incentrato sull'uso degli ultrasuoni focalizzati come strumento per incrementare il rilascio di biomarcatori putativi da sistemi cellulari.

La sonoporazione induce, infatti, la formazione di pori transienti sulle membrane cellulari, favorendo il passaggio bidirezionale di molecole di diversa natura (miRNA, mRNA, proteine etc...) (Lentacker I. et al., 2014; Hu Y. et al.; 2023), e amplificando così il processo fisiologico di rilascio delle stesse. Lo studio è stato condotto su diverse linee cellulari tumorali pancreatiche, al fine di identificare nuovi biomarcatori putativi da validare, auspicabilmente, direttamente su siero/plasma di pazienti. (Meijering et al., 2009).

Particolare interesse è stato suscitato nelle ultime decadi dai miRNA di cui diversi studi hanno dimostrato il coinvolgimento nello sviluppo e nella progressione tumorale. Inoltre, come precedentemente accennato, per loro natura, essi sono in grado di attraversare fisiologicamente la membrana plasmatica mediante meccanismi di secrezione attiva o passiva. Lo studio sui modelli cellulari qui utilizzati ha dimostrato che la stimolazione ultrasonica è effettivamente in grado di incrementare il rilascio di miRNA, recuperabili mediante una semplice estrazione dai surnatanti di coltura. L'analisi dei livelli di espressione dei miRNA isolati dai surnatanti delle colture sottoposte a trattamento con ultrasuoni, in

comparazione con quelli ottenuti dalle stesse colture di controllo non trattate, ha messo in luce circa 30 miRNA differenzialmente espressi e 11 statisticamente significativi (hsa-miR-574-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-551a, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-23b-3p e hsa-miR-33a-5p) su cui è stata concentrata l'attenzione. Tali miRNA risultano coinvolti in pathway biochimiche, come quella TGF-beta, FoxO, mTOR, p53, ErbB, regolando geni chiave nel processo di patogenesi tumorale (es SMAD3/4, TP53, AKT, PTEN, PIK3). Inoltre, dall'analisi di dataset da pazienti con tumore pancreatico, è stata effettuata una preliminare validazione che ha confermato globalmente i dati sperimentali ottenuti. Infatti, i miR-151a-5p, miR-25-5p, miR-320b, miR-103a-3p, miR-21-5p, miR-148b-3p, miR-26a-5p e miR-28-5p risultano iperespressi nei sieri e/o tessuti di pazienti con tumore pancreatico, sottolineando il loro potenziale diagnostico. In riferimento ai microRNA identificati, l'analisi bioinformatica ha messo in evidenza molteplici geni target e relative pathway, coinvolti in processi biologici fisiologici, la cui deregolazione in termini di espressione e funzionali svolge un ruolo chiave nei meccanismi di iniziazione e progressione tumorale.

Il modo in cui questi miRNA siano coinvolti nell'iniziazione e nella progressione del tumore pancreatico non è stato ancora completamente descritto, poiché in letteratura sono molto esigue le evidenze a tal riguardo. Han Q et al. (2020) hanno dimostrato *in vitro* e successivamente su modello *in vivo*, tramite l'utilizzo del corrispettivo mimic, il coinvolgimento del miR-28-5p nell'iniziazione e nella progressione del PC attraverso la regolazione negativa del gene Rap1b correlato alla proliferazione cellulare e alla risposta immunologica tumorale. Il miR-320b invece sembra che inibisca FOXM1 (Forkhead box protein M1), attivatore della via di segnalazione Wnt/ β -catenina, inducendo quindi inibizione della proliferazione, migrazione e invasione cellulare. In cellule di PC esso risulta essere ipo-espresso, con conseguente iper-espressione di FOXM1 (Jingyang Z. et al., 2021; Cao W. et al. 2020).

Inoltre, sono ancora molto poche le evidenze sui livelli dell'espressione dei miRNA circolanti e sul loro significato nel tumore del pancreas.

Di particolare interesse sono i miRNA circolanti correlati al tumore pancreatico come, ad esempio, il miR-210 (Ho et al.; 2010) o il miR-1290 (Li et al.; (2013), descritti nel siero di pazienti con tumore resecabile (I e II stadio) e con un potere discriminatorio potenzialmente maggiore rispetto al CA19-9, utilizzato nella diagnostica. Il miR-196a (Kong et al.; 2011) è invece risultato interessante non solo perché significativamente iperespresso nel tumore rispetto ai controlli, ma anche per la sua capacità di distinguere i diversi stadi di progressione,

mentre il miR-25-3p è risultato associato esclusivamente a stadi precoci della malattia (Xue J. et al.;2019).

Combinazioni di due miRNA (miR-16+miR-196a e miR-1290+miR-1246) e il Ca19-9 hanno mostrato un aumento significativo dell'accuratezza nella distinzione tra sieri di pazienti affetti da carcinoma pancreatico e sieri di controlli sani (Liu J. et al. 2011, Wei J. et al. 2020).

Inoltre il miR-151a-5p e il miR-103a-3p sono stati identificati con un alto livello di espressione nel siero di pazienti con PC rispetto al siero dei controlli sani in uno studio riportato da Villa-Navarro E. et al. (2019), il miR-21-5p e il miR-26a-3p sono risultati significativamente deregolati negli stadi precoci della malattia e con un valore predittivo del rischio di sviluppare il PC (Xue J. et al., 2019). Interessante è uno studio condotto da Seimiya et al. (2023) nel quale hanno dimostrato che il mir-21-5p associato a RNA satellite umani II (HSaII) nel siero ha un alto potenziale come metodo diagnostico per il PC. Li et al. (2010) riportano un'iperespressione del miR-200a in molti tumori e una correlazione tra la sua deregolazione e l'iperespressione del gene Sip1, implicato nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e nella perdita di funzionalità della E-caderina. In particolare, nel tumore al pancreas, l'iperespressione del miR sembra attribuibile a una ipometilazione del DNA. Inoltre, il miR-200a si ritrova iperespresso nel siero di pazienti con carcinoma pancreatico a stadio precoce, nonostante aumentati livelli siano riscontrabili anche in pazienti affetti da pancreatite cronica. Questo aspetto limita il ruolo del miR come biomarcatore di malattia, nonostante si conservi un suo valore potenzialmente utile come elemento correlabile ad essa.

Oltre all'analisi dei microRNA, che ha portato all'identificazione di biomarcatori candidati, questo studio è stato esteso anche all'analisi del secretoma proteico. L'analisi delle proteine rilasciate in seguito a sonicazione ha rivelato molecole interessanti, già note come associate a processi di sviluppo e progressione tumorale (es. VEGF-A, Bax, CA19-9, CA125, IL-8). Tra di esse, molte risultano il prodotto di geni target dei miRNA identificati (es. miR-23b-3p, miR-151a-5p, miR-103a-3p, miR-320). Nonostante, anche in questo caso, i dati in letteratura siano scarsi, Ali S. et al. (2010), analizzando il siero di pazienti con PC in comparazione con quello di controlli sani, hanno evidenziato un'iperespressione del miR-21, mostrandone una correlazione con diversi geni tra cui PTEN e TIMP1, i cui prodotti sono parte del secretoma identificato in questo studio. Medesima situazione è evidenziabile per proteine quali TSP-1 e uPA che insieme ad altre proteine sono state definite come "secrete associate al tumore pancreatico" (Mauri P. et al 2005).

Altri prodotti proteici come la Ferritina e la β -2-microglobulina sono stati oggetto di studi come potenziali biomarcatori circolanti. La ferritina, coinvolta nell'omeostasi del ferro, presenta livelli alti di espressione nel siero di pazienti con PC rispetto al siero di pazienti sani. La sua deregolazione è stata associata ad una iperespressione del gene MYC, oncogene correlato al rischio di sviluppo di PC, e ad una regolazione negativa di TP53 con conseguente deregolazione apoptotica (Park JM et al, 2021). La β -2-microglobulina presenta alti livelli nel siero dei pazienti con PC rispetto ai controlli sani, in particolar modo in quei pazienti con carcinoma allo stadio 2 (tumore borderline-Vareedayah AA et al.; 2018) (Pezzilli et al., 1995).

I risultati ottenuti dalle linee cellulari tumorali risultano inoltre avvalorati da quelli ottenuti dalle cellule epiteliali normali di pancreas. Infatti, ad eccezione del miR-378a-3p, non risulta alcun miRNA in comune tra i modelli cellulari tumorali e quello di controllo normale, mostrando così che alle cellule tumorali risultano associati specifici miRNA rilasciati a seguito di trattamento ultrasonico. In relazione al profilo proteico, la linea epiteliale pancreatica normale ha evidenziato soltanto 4 proteine coinvolte nel fisiologico meccanismo apoptotico (es. Survivina, Bid, Bim e Htra2).

6. CONCLUSIONI

In questo studio è stata utilizzata una nuova tecnologia basata sull'applicazione di ultrasuoni focalizzati al fine di indurre un incremento del rilascio di potenziali nuovi biomarcatori da cellule di cancro pancreatico, mettendone in luce l'efficacia e concretizzando un'idea di "proof of concept". L'analisi ha condotto all'identificazione di nuovi microRNA e proteine da considerare come biomarcatori candidati di malattia a valenza potenzialmente diagnostica, prognostica e predittiva, che si propone di validare in un prossimo futuro direttamente sui sieri da pazienti affetti da tumore del pancreas. Lo studio ha permesso di ottenere dati originali, interessanti e applicabili in un contesto, come quello del cancro pancreatico, che, per le sue intrinseche caratteristiche, presenta ancora aspetti inesplorati su cui basare nuovi studi che potrebbero contribuire non solo all'approfondimento delle conoscenze di base, ma soprattutto a una migliore gestione clinica della malattia.

In conclusione, i risultati ottenuti incoraggiano ulteriori studi volti ad approfondire il ruolo dei miRNA e dei fattori proteici, qui identificati e descritti, nel processo di tumorigenesi pancreatico e a validarne la funzione come biomarcatori non invasivi di malattia su sieri di pazienti. Oltre che singoli miRNA o proteine, si potrebbero considerare anche dei gruppi di differenti microRNA e/o proteine al fine di irrobustire il potenziale diagnostico.

Bibliografia

- Aldrich JE. Basic physics of ultrasound imaging. *Crit Care Med.* 2007 May;35(5 Suppl):S131-7. doi: 10.1097/01.CCM.0000260624.99430.22. PMID: 17446771.
- Ali S, Almhanna K, Chen W, Philip PA, Sarkar FH. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *Am J Transl Res.* 2010 Sep 28;3(1):28-47. PMID: 21139804; PMCID: PMC2981424.
- Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 3;21(5):1723. doi: 10.3390/ijms21051723. PMID: 32138313; PMCID: PMC7084905.
- Aronson, J.K., & Ferner, R.E. (2017). Biomarkers—A general review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76, 9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22;108(12):5003-8. doi: 10.1073/pnas.1019055108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383194; PMCID: PMC3064324.
- Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia.* 2020 Oct;63(10):1966-1973. doi: 10.1007/s00125-020-05203-7. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32894306; PMCID: PMC7565096.
- Bardeesy, N., DePinho, R. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2, 897–909 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrc949>
- Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Mar;37(1):33-44. doi: 10.1007/s10555-017-9724-7. PMID: 29282605.
- Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol.* 2014 Jul;51(4):759-74. doi: 10.1177/0300985813502820. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24045890; PMCID: PMC4013251.

- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007;297:1901–1908.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007 May 2;297(17):1901-8. doi: 10.1001/jama.297.17.1901. PMID: 17473300.
- Bouakaz A, Zeghimi A, Doinikov AA. Sonoporation: Concept and Mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2016;880:175-89. doi: 10.1007/978-3-319-22536-4_10. PMID: 26486338.
- Brunetti O, Russo A, Scarpa A, Santini D, Reni M, Bittoni A, Azzariti A, Aprile G, Delcuratolo S, Signorile M, Gnoni A, Palermo L, Lorusso V, Cascinu S, Silvestris N. MicroRNA in pancreatic adenocarcinoma: predictive/prognostic biomarkers or therapeutic targets? *Oncotarget*. 2015 Sep 15;6(27):23323-41. doi: 10.18632/oncotarget.4492. PMID: 26259238; PMCID: PMC4695121.
- Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, and Ragoussis J (2008). hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1340–1348.
- Cao W, Zhou G. LncRNA SNHG12 contributes proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by absorbing miRNA-320b. *Biosci Rep*. 2020 Jun 26;40(6):BSR20200805. doi: 10.1042/BSR20200805. PMID: 32432698; PMCID: PMC7276652.
- Cecconi D, Palmieri M, Donadelli M. Proteomics in pancreatic cancer research. *Proteomics*. 2011 Feb;11(4):816-28. doi: 10.1002/pmic.201000401. Epub 2011 Jan 13. PMID: 21229586.
- Chen D, Wu X, Xia M, Wu F, Ding J, Jiao Y, Zhan Q, An F. Upregulated exosomal miR-23b-3p plays regulatory roles in the progression of pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):2182-2188. doi: 10.3892/or.2017.5919. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28849236; PMCID: PMC5652966.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18, 997–1006 (2008). <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>

- Cheng G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jan;81:75-93. doi: 10.1016/j.addr.2014.09.001. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25220354.
- Cheng J, Lou Y, Jiang K. Downregulation of long non-coding RNA LINC00460 inhibits the proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis of pancreatic cancer cells via modulation of the miR-320b/ARF1 axis. *Bioengineered.* 2021 Dec;12(1):96-107. doi: 10.1080/21655979.2020.1863035. PMID: 33345740; PMCID: PMC8806231.
- Chevillet JR, Khokhlova TD, Giraldez MD, Schade GR, Starr F, Wang YN, Gallichotte EN, Wang K, Hwang JH, Tewari M. Release of Cell-free MicroRNA Tumor Biomarkers into the Blood Circulation with Pulsed Focused Ultrasound: A Noninvasive, Anatomically Localized, Molecular Liquid Biopsy. *Radiology.* 2017 Apr;283(1):158-167. doi: 10.1148/radiol.2016160024. Epub 2016 Nov 1. PMID: 27802108; PMCID: PMC5375625.
- Connor, A.A., Gallinger, S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nat Rev Cancer* 22, 131–142 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00418-1>
- Cornice J, Capece D, Di Vito Nolfi M, Di Padova M, Compagnoni C, Verzella D, Di Francesco B, Vecchiotti D, Flati I, Tessitore A, Alesse E, Barbato G, Zazzeroni F. Ultrasound-Based Method for the Identification of Novel MicroRNA Biomarkers in Prostate Cancer. *Genes (Basel).* 2021 Oct 28;12(11):1726. doi: 10.3390/genes12111726. PMID: 34828332; PMCID: PMC8619582.
- Correa-Medina M, Bravo-Egana V, Rosero S, Ricordi C, Edlund H, Diez J, Pastori RL. MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr Patterns.* 2009 Apr;9(4):193-9. doi: 10.1016/j.gep.2008.12.003. Epub 2008 Dec 24. PMID: 19135553.
- Cui Mengying, Wang Hongdan, Yao Xiaoxiao, Zhang Dan, Xie Yingjun, Cui Ranji, Zhang Xuewen Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge; *Frontiers in Genetics* VOLUME=10 2019 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00626> DOI=10.3389/fgene.2019.00626 ISSN=1664-8021
- Daoud AZ, Mulholland EJ, Cole G, McCarthy HO. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer.* 2019

Nov 21;19(1):1130. doi: 10.1186/s12885-019-6284-y. PMID: 31752758; PMCID: PMC6868851.

- D'Souza AL, Chevillet JR, Ghanouni P, Yan X, Tewari M, Gambhir SS. Tumor characterization by ultrasound-release of multiple protein and microRNA biomarkers, preclinical and clinical evidence. *PLoS One*. 2018 Mar 16;13(3):e0194268. doi: 10.1371/journal.pone.0194268. PMID: 29547636; PMCID: PMC5856340.
- D'Souza AL, Tseng JR, Pauly KB, Guccione S, Rosenberg J, Gambhir SS, Glazer GM. A strategy for blood biomarker amplification and localization using ultrasound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 6;106(40):17152-7. doi: 10.1073/pnas.0903437106. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19805109; PMCID: PMC2749842.
- Evelyne Maes, Inge Mertens, Dirk Valkenburg, Patrick Pauwels, Christian Rolfo, Geert Baggerman, Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 96, Issue 3, 2015, Pages 437-448, ISSN 1040-8428 <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.07.006>.
- Fan, Z., Liu, H., Mayer, M. and Deng, C. X.: Spatiotemporally controlled single cell sonoporation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(41), 16486–16491, doi:10.1073/pnas.1208198109, 2012.
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1792(6):497-505. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013. Epub 2009 Mar 5. PMID: 19268705.
- Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep*. 2016 Oct;5(4):395-402. doi: 10.3892/br.2016.747. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27699004; PMCID: PMC5038362.
- Gentiluomo M, Canzian F, Nicolini A, Gemignani F, Landi S, Campa D. Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. *Semin Cancer Biol*. 2022 Feb;79:105-131. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.08.003. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32818625.
- Grossi I, Salvi A, Baiocchi G, Portolani N, De Petro G. Functional Role of microRNA-23b-3p in Cancer Biology. *Microna*. 2018;7(3):156-166. doi: 10.2174/2211536607666180629155025. PMID: 29962353.

- Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jun 27;4:50. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02. PMID: 31304427; PMCID: PMC6624347.
- Han Q, Li J, Xiong J, Song Z. Long noncoding RNA LINC00514 accelerates pancreatic cancer progression by acting as a ceRNA of miR-28-5p to upregulate Rap1b expression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Aug 8;39(1):151. doi: 10.1186/s13046-020-01660-5. PMID: 32771045; PMCID: PMC7414678.
- Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Sci Signal.* 2015 Mar 17;8(368):re3. doi: 10.1126/scisignal.2005825. PMID: 25783160.
- Herting, C.J., Karpovsky, I. & Lesinski, G.B. The tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: current perspectives and future directions. *Cancer Metastasis Rev* **40**, 675–689 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09988-w>
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2006 May 15;20(10):1218-49. doi: 10.1101/gad.1415606. PMID: 16702400.
- Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol.* 2010 Apr;3(2):109-13. doi: 10.1593/tlo.09256. PMID: 20360935; PMCID: PMC2847318.
- Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, Gao F. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol.* 2021 Jul 21;27(27):4298-4321. doi: 10.3748/wjg.v27.i27.4298. PMID: 34366606; PMCID: PMC8316912.
- Hu Y, Wei J, Shen Y, Chen S, Chen X. Barrier-breaking effects of ultrasonic cavitation for drug delivery and biomarker release. *Ultrason Sonochem.* 2023 Mar;94:106346. doi: 10.1016/j.ultsonch.2023.106346. Epub 2023 Feb 26. PMID: 36870921; PMCID: PMC10040969.
- Huang N, Wang J, Xie W, Lyu Q, Wu J, He J, Qiu W, Xu N, Zhang Y. MiR-378a-3p enhances adipogenesis by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 30;457(1):37-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.055. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25529446.

- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*, 6(6), 590-610.
- Jingyang Z, Jinhui C, Lu X, Weizhong Y, Yunjiu L, Haihong W, Wuyuan Z. Mir-320b Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Targeting FOXM1. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(8):1106-1113. doi: 10.2174/1389201021999200917144704. PMID: 32942974.
- Karimi P, Shahrokni A, Ranjbar MR. Implementation of proteomics for cancer research: past, present, and future. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(6):2433-8. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.6.2433. PMID: 24761843
- Kasuga A, Okamoto T, Udagawa S, Mori C, Mie T, Furukawa T, Yamada Y, Takeda T, Matsuyama M, Sasaki T, Ozaka M, Ueki A, Sasahira N. Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 21;23(3):1205. doi: 10.3390/ijms23031205. PMID: 35163129; PMCID: PMC8835700.
- Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Jul;18(7):493-502. doi: 10.1038/s41575-021-00457-x. Epub 2021 May 17. PMID: 34002083; PMCID: PMC9265847.
- Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci.* 2011 Feb;56(2):602-9. doi: 10.1007/s10620-010-1285-3. Epub 2010 Jul 8. Erratum in: *Dig Dis Sci.* 2011 Mar;56(3):921. PMID: 20614181.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162. doi: 10.1093/nar/gky1141. PMID: 30423142; PMCID: PMC6323917.
- Kumar S, Mohan A, Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers.* 2006 Sep-Oct;11(5):385-405. doi: 10.1080/13547500600775011. PMID: 16966157.
- Kuznetsova, A., Popova, O., Panchenkov, D. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: tumor microenvironment and problems in the development of novel therapeutic strategies. *Clin Exp Med* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00886-1>

- Lentacker I, De Cock I, Deckers R, De Smedt SC, Moonen CT. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jun;72:49-64. doi: 10.1016/j.addr.2013.11.008. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24270006.
- Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2010;690:3-12. doi: 10.1007/978-90-481-9060-7_1. PMID: 20700834.
- Levati L, Pagani E, Romani S, Castiglia D, Piccinni E, Covaciu C, Caporaso P, Bondanza S, Antonetti FR, Bonmassar E, Martelli F, Alvino E, D'Atri S. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Jun;24(3):538-50. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00857.x. Epub 2011 May 5. PMID: 21466664.
- Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res.* 2013 Jul 1;19(13):3600-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3092. Epub 2013 May 22. PMID: 23697990; PMCID: PMC3707520.
- Li CL, Nie H, Wang M, Su LP, Li JF, Yu YY, Yan M, Qu QL, Zhu ZG, Liu BY. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncol Rep.* 2012 Jun;27(6):1960-6. doi: 10.3892/or.2012.1719. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22426647.
- Li, Ang, et al. "Pancreatic Cancers Epigenetically Silence SIP1 and Hypomethylate and Overexpress miR-200a/200b in Association with Elevated Circulating miR-200a and miR-200b Levels Pancreatic Cancers Hypomethylate miR-200 and Hypermethylate SIP1." *Cancer research* 70.13 (2010): 5226-5237.
- Lieu D. Ultrasound physics and instrumentation for pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Oct;134(10):1541-56. doi: 10.5858/2009-0730-RA.1. PMID: 20923312.
- Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2012 Aug 1;131(3):683-91. doi: 10.1002/ijc.26422. Epub 2011 Nov 19. PMID: 21913185.
- Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, Hu Z, Zhuang R, Ning G, Zhang C, Yuan Y, Li Z, Zen K, Ba Y, Zhang CY. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin Chem.* 2012

Mar;58(3):610-8. doi: 10.1373/clinchem.2011.172767. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22194634.

- Longnecker, Daniel S. 2021. Anatomy and Histology of the Pancreas. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2021.01
- López-Beas J, Capilla-González V, Aguilera Y, Mellado N, Lachaud CC, Martín F, Smani T, Soria B, Hmadcha A. miR-7 Modulates hESC Differentiation into Insulin-Producing Beta-like Cells and Contributes to Cell Maturation. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018 Sep 7;12:463-477. doi: 10.1016/j.omtn.2018.06.002. Epub 2018 Jun 15. PMID: 30195784; PMCID: PMC6070677.
- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), 1202-1207.
- Lucchetti D, Perelli L, Colella F, Ricciardi-Tenore C, Scoarughi GL, Barbato G, Boninsegna A, De Maria R, Sgambato A. Low-intensity pulsed ultrasound affects growth, differentiation, migration, and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *J Cell Physiol*. 2020 Jun;235(6):5363-5377. doi: 10.1002/jcp.29423. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31967331.
- Lukas Valihrach, Peter Androvic, Mikael Kubista, Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 72, 2020, 100825, ISSN 0098-2997, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.10.002>.
- Mahesh G, Biswas R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2019 Jun;39(6):321-330. doi: 10.1089/jir.2018.0155. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30998423; PMCID: PMC6591773.
- Mauri, Pierluigi, et al. "Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: a strategy for identification of novel cancer markers." *The FASEB journal* 19.9 (2005): 1125-1127.
- Meijering, B. D. M. et al. (2009) 'Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation', *Circulation Research*, 104(5), pp. 679-687. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183806.
- Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IR; Bioeffects Committee of the American Institute of Ultrasound in Medicine. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med*.

- 2012 Apr;31(4):623-34. doi: 10.7863/jum.2012.31.4.623. PMID: 22441920; PMCID: PMC3810427.
- Miller, D. L., Bao, S. and Morris, J. E.: Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system., *Ultrasound Med. Biol.*, 25(1), 143–149, doi:10.1016/s0301-5629(98)00137-9, 1999.
 - Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Feb;98:12-23. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.10.003. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26481951
 - Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis.* 2015 Feb;35(1):3-11. doi: 10.1055/s-0034-1397344. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25632930; PMCID: PMC4797991.
 - Monesi, V., Adamo, S. and Bernardini, N. (2018) *Istologia di monesi*. Padova: Piccin.
 - Ni XG, Zhou L, Wang GQ, Liu SM, Bai XF, Liu F, Peppelenbosch MP, Zhao P. The ubiquitin-proteasome pathway mediates gelsolin protein downregulation in pancreatic cancer. *Mol Med.* 2008 Sep-Oct;14(9-10):582-9. doi: 10.2119/2008-00020.Ni. PMID: 18584046; PMCID: PMC2435493.
 - O'Connor, James P B et al. "Imaging biomarker roadmap for cancer studies." *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 14,3 (2016): 169-186. doi:10.1038/nrclinonc.2016.162
 - Pacia CP, Zhu L, Yang Y, Yue Y, Nazeri A, Michael Gach H, Talcott MR, Leuthardt EC, Chen H. Feasibility and safety of focused ultrasound-enabled liquid biopsy in the brain of a porcine model. *Sci Rep.* 2020 May 4;10(1):7449. doi: 10.1038/s41598-020-64440-3. PMID: 32366915; PMCID: PMC7198482.
 - Palma CA, Al Sheikha D, Lim TK, Bryant A, Vu TT, Jayaswal V, Ma DD. MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. *Mol Cancer.* 2014 Apr 5;13:79. doi: 10.1186/1476-4598-13-79. PMID: 24708856; PMCID: PMC4021368.
 - Pan, Sheng, Teresa A. Brentnall, and Ru Chen. "Proteome alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer letters* 469 (2020): 429-436.
 - Papa, Antonella, and Pier Paolo Pandolfi. "The PTEN–PI3K axis in cancer." *Biomolecules* 9.4 (2019): 153.

- Paproski RJ, Jovel J, Wong GK, Lewis JD, Zemp RJ. Enhanced Detection of Cancer Biomarkers in Blood-Borne Extracellular Vesicles Using Nanodroplets and Focused Ultrasound. *Cancer Res.* 2017 Jan 1;77(1):3-13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3231. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27793845.
- Park JM, Mau CZ, Chen YC, Su YH, Chen HA, Huang SY, Chang JS, Chiu CF. A case-control study in Taiwanese cohort and meta-analysis of serum ferritin in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021 Oct 28;11(1):21242. doi: 10.1038/s41598-021-00650-7. PMID: 34711879; PMCID: PMC8553768.
- Pezzilli R, Billi P, Fiocchi M, Beltrandi E, Cappelletti O, Sprovieri G, Miglioli M. Serum beta 2-microglobulin in chronic diseases of the pancreas. *Int J Pancreatol.* 1995 Apr;17(2):161-6. doi: 10.1007/BF02788534. PMID: 7622938.
- Phenix CP, Togtema M, Pichardo S, Zehbe I, Curiel L. High intensity focused ultrasound technology, its scope and applications in therapy and drug delivery. *J Pharm Pharm Sci.* 2014;17(1):136-53. doi: 10.18433/j3zp5f. PMID: 24735765.
- Pittman ME, Rao R, Hruban RH. Classification, Morphology, Molecular Pathogenesis, and Outcome of Premalignant Lesions of the Pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Dec;141(12):1606-1614. doi: 10.5858/arpa.2016-0426-RA. PMID: 29189063.
- Plmaer, Philip E. S, Breyer, B, Bruguera, C. A, Gharbi, H. A, Goldberg, B. B. et al. (1995). *Manual of diagnostic ultrasound / edited by P. E. S. Palmer.* Geneva : World Health Organization.
- Qin W, Ren Q, Liu T, Huang Y, Wang J. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1. *FEBS Lett.* 2013 May 2;587(9):1434-9. doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.023. Epub 2013 Mar 20. PMID: 23523916.
- Rawat M, Kadian K, Gupta Y, Kumar A, Chain PSG, Kovbasnjuk O, Kumar S, Parasher G. MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes (Basel).* 2019 Sep 25;10(10):752. doi: 10.3390/genes10100752. PMID: 31557962; PMCID: PMC6827136.
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):1039-49. doi: 10.1056/NEJMra1404198. PMID: 25207767.
- Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathol Int.* 2014 Jan;64(1):10-9. doi: 10.1111/pin.12114. PMID: 24471965.

- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5451-5465. doi: 10.1002/jcp.27486. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30471116.
- Samanta, Debangshu, and Pran K. Datta. "Alterations in the Smad pathway in human cancers." *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 17 (2012): 1281.
- Sarhadi VK, Armengol G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules.* 2022 Jul 23;12(8):1021. doi: 10.3390/biom12081021. PMID: 35892331; PMCID: PMC9331210.
- Sboros, V.: Response of contrast agents to ultrasound., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60(10), 1117–1136, doi:10.1016/j.addr.2008.03.011, 2008.
- Seimiya T, Suzuki T, Iwata T, Kishikawa T, Sekiba K, Shibata C, Ishigaki K, Fujiwara H, Oyama H, Kanai S, Sato T, Nakai Y, Ishibashi R, Moriyama M, Nakagawa R, Ijichi H, Otsuka M, Koike K. Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer. *iScience.* 2023 Jan 19;26(2):106021. doi: 10.1016/j.isci.2023.106021. PMID: 36798431; PMCID: PMC9926314.
- Shi C, Zhang H, Wang M, Tian R, Li X, Feng Y, Peng F, Qin R. OPA Interacting Protein 5 Antisense RNA 1 Expedites Cell Migration and Invasion Through FOXM1/Wnt/ β -Catenin Pathway in Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci.* 2022 Mar;67(3):915-924. doi: 10.1007/s10620-021-06919-1. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33782807.
- Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016 Jul 1;76(13):3666-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27325641; PMCID: PMC4930690.
- Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(W1):W98-W102. doi: 10.1093/nar/gkx247. PMID: 28407145; PMCID: PMC5570223.
- Teenan O, Sahni V, Henderson RB, Conway BR, Moran CM, Hughes J, Denby L. Sonoporation of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells In Vitro to Enhance the Liberation of Intracellular miRNA Biomarkers. *Ultrasound Med Biol.* 2022

- Jun;48(6):1019-1032. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.01.019. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35307235.
- Traub B, Link KH, Kornmann M. Curing pancreatic cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021 Nov;76:232-246. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.05.030. Epub 2021 May 29. PMID: 34062264.
 - VanBavel, E.: Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 93(1–3), 374–383, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.017, 2007.
 - Vareedayah AA, Alkaade S, Taylor JR. Pancreatic Adenocarcinoma. *Mo Med.* 2018 May-Jun;115(3):230-235. Erratum in: *Mo Med.* 2018 Nov-Dec;115(6):517. PMID: 30228728; PMCID: PMC6140147.
 - Vila-Navarro E, Duran-Sanchon S, Vila-Casadesús M, Moreira L, Ginès À, Cuatrecasas M, Lozano JJ, Bujanda L, Castells A, Gironella M. Novel Circulating miRNA Signatures for Early Detection of Pancreatic Neoplasia. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019 Apr;10(4):e00029. doi: 10.14309/ctg.0000000000000029. PMID: 31009404; PMCID: PMC6602779.
 - Wagner PD, Srivastava S. New paradigms in translational science research in cancer biomarkers. *Transl Res.* 2012;159(4):343–353. doi:10.1016/j.trsl.2012.01.015
 - Wang F, Zheng Z, Guo J, and Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 2010; Epub; ahead of print.
 - Wang J, Wu J. Role of miR-155 in breast cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jun 1;17(6):2350-5. doi: 10.2741/4056. PMID: 22652783.
 - Wang WS, Liu LX, Li GP, Chen Y, Li CY, Jin DY, Wang XL. Combined serum CA19-9 and miR-27a-3p in peripheral blood mononuclear cells to diagnose pancreatic cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013 Apr;6(4):331-8. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0307. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23430754.
 - Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology.* 2022 Aug;163(2):386-402.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2022.03.056. Epub 2022 Apr 7. PMID: 35398344; PMCID: PMC9516440.
 - Xue J, Jia E, Ren N, Lindsay A, Yu H. Circulating microRNAs as promising diagnostic biomarkers for pancreatic cancer: a systematic review. *Onco Targets Ther.*

- 2019 Aug 19;12:6665-6684. doi: 10.2147/OTT.S207963. PMID: 31692495; PMCID: PMC6707936.
- Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 15;18(4):981-92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2347. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22114139; PMCID: PMC3288338.
 - Zhang JZ, Saggar JK, Zhou ZL, Hu B. Different effects of sonoporation on cell morphology and viability. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012 May;12(2):64-8. doi: 10.17305/bjbms.2012.2497. PMID: 22642588; PMCID: PMC4362440.
 - Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2018 May 21;24(19):2047-2060. doi: 10.3748/wjg.v24.i19.2047. PMID: 29785074; PMCID: PMC5960811.
 - Zhao, ZhiYu, and Wei Liu. "Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment." *Technology in cancer research & treatment* 19 (2020): 1533033820962117.
 - Zhou, Y., Kumon, R. E., Cui, J. and Deng, C. X.: The size of sonoporation pores on the cell membrane., *Ultrasound Med. Biol.*, 35(10), 1756–1760, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.012, 2009.
 - Zhu L, Nazeri A, Pacia CP, Yue Y, Chen H. Focused ultrasound for safe and effective release of brain tumor biomarkers into the peripheral circulation. *PLoS One.* 2020 Jun 3;15(6):e0234182. doi: 10.1371/journal.pone.0234182. PMID: 32492056; PMCID: PMC7269259.

ALLEGATI

1: KEGG Pathway (n=51) identificate tramite analisi bioinformatica con Diana Tarbase, per i miRNA deregolati e statisticamente significativi (n=11) rilasciati dopo il trattamento con ultrasuoni delle linee tumorali pancreatiche.

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Proteoglycans in cancer	7,56E+00	86	9
Hippo signaling pathway	2,30E+01	64	9
Lysine degradation	6,28E+01	24	8
Fatty acid biosynthesis	2,42E+04	4	4
Oocyte meiosis	3,67E+04	52	8
TGF-beta signaling pathway	2,00E+05	36	9
Ubiquitin mediated proteolysis	4,22E+04	66	10
Protein processing in endoplasmic reticulum	6,62E+05	72	8
Pathways in cancer	1,68E+06	146	9
Adherens junction	1,72E+03	38	9
Cell cycle	0.000236713254372	53	8
Wnt signaling pathway	0.00172521298453	55	9
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.00226382667082	54	8
Renal cell carcinoma	0.00226382667082	31	8
Shigellosis	0.00226382667082	31	9
FoxO signaling pathway	0.00294867016338	55	8
Spliceosome	0.00347550832444	52	9
Bacterial invasion of epithelial cells	0.00366320562105	30	9
Chronic myeloid leukemia	0.00824292110754	31	8
Colorectal cancer	0.00902953291108	27	8
mTOR signaling pathway	0.00904562224378	28	7
Regulation of actin cytoskeleton	0.00945072041707	75	9
p53 signaling pathway	0.0105294457946	31	9
Hepatitis B	0.0107425584962	53	8
Circadian rhythm	0.0122131360716	17	7
Axon guidance	0.0129787162582	46	9
Progesterone-mediated oocyte maturation	0.0136454019899	37	8
Toxoplasmosis	0.0159623168486	43	8
Salmonella infection	0.0159623168486	35	9
Endocytosis	0.0159722705998	70	9
Vibrio cholerae infection	0.0167201528979	25	9
Estrogen signaling pathway	0.0169454799599	39	8
Pancreatic cancer	0.0173477364756	29	9
RNA transport	0.0183554349846	60	9
AMPK signaling pathway	0.0229164721531	48	8
Fatty acid metabolism	0.0262376886201	16	7
Glioma	0.0262376886201	25	7
Neurotrophin signaling pathway	0.0262376886201	47	9

Thyroid hormone signaling pathway	0.0262376886201	48	9
ErbB signaling pathway	0.0268784288409	34	8
Prostate cancer	0.0268784288409	34	8
mRNA surveillance pathway	0.0268784288409	38	9
Viral carcinogenesis	0.0268784288409	70	9
Pathogenic Escherichia coli infection	0.0367966020653	24	8
Focal adhesion	0.0367966020653	73	9
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	0.038251861315	2	2
RNA degradation	0.038251861315	31	8
Rap1 signaling pathway	0.0396212273227	73	9
Long-term depression	0.0419720709101	21	8
MAPK signaling pathway	0.0419720709101	85	9
Epstein-Barr virus infection	0.0447990233477	71	9

2: KEGG Pathway (n=75) identificate tramite analisi bioinformatica con Diana Tarbase, per i miRNA deregolati ma non significativi (n=30) rilasciati dopo il trattamento con ultrasuoni delle linee tumorali pancreatiche.

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Proteoglycans in cancer	9,76E-07	155	30
Viral carcinogenesis	2,64E-01	153	30
Renal cell carcinoma	7,94E-01	61	29
Cell cycle	6,16E+00	102	29
Protein processing in endoplasmic reticulum	1,78E+01	133	30
Ubiquitin mediated proteolysis	2,43E+02	110	29
Adherens junction	2,43E+02	63	30
Hippo signaling pathway	1,63E+03	109	30
Endocytosis	4,18E+03	155	30
TGF-beta signaling pathway	5,02E+03	64	29
Colorectal cancer	9,01E+03	54	29
Spliceosome	2,36E+04	101	30
Focal adhesion	2,55E+05	152	30
Lysine degradation	4,18E+05	39	28
p53 signaling pathway	4,61E+04	56	30
Pancreatic cancer	6,55E+05	54	29
FoxO signaling pathway	1,05E+06	101	29
Oocyte meiosis	1,07E+06	80	29
N-Glycan biosynthesis	1,38E+06	36	24
Hepatitis B	1,44E+06	101	29
Endometrial cancer	1,93E+04	44	29
Prostate cancer	2,01E+05	72	29
TNF signaling pathway	4,51E+06	82	29
Thyroid hormone signaling pathway	6,48E+06	87	29

Chronic myeloid leukemia	9,87E+06	58	29
Pathways in cancer	0.000116880185691	265	30
Bacterial invasion of epithelial cells	0.000139405727197	58	29
Fatty acid metabolism	0.000146061898777	33	26
Prion diseases	0.000162243017211	21	25
Glioma	0.000227539076647	48	29
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.000254736332613	98	30
Sphingolipid signaling pathway	0.000254744131911	84	29
mTOR signaling pathway	0.000254744131911	49	29
Steroid biosynthesis	0.000316093518719	16	23
HIF-1 signaling pathway	0.000396739114794	79	29
Neurotrophin signaling pathway	0.000396739114794	88	29
Epstein-Barr virus infection	0.000396739114794	143	29
RNA degradation	0.000396739114794	58	30
Small cell lung cancer	0.000498851846842	65	30
ErbB signaling pathway	0.000571058912566	63	29
Shigellosis	0.000950355176815	49	29
Non-small cell lung cancer	0.000950355176815	42	29
mRNA surveillance pathway	0.00122333782874	69	30
Acute myeloid leukemia	0.00127497847107	45	27
Estrogen signaling pathway	0.00147064146633	71	29
MAPK signaling pathway	0.00148445812211	168	30
Transcriptional misregulation in cancer	0.00180757330693	117	29
Apoptosis	0.00440694094405	64	29
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	0.00529994937989	104	29
RNA transport	0.00533598488112	113	30
Huntington's disease	0.0073949107067	123	29
Inositol phosphate metabolism	0.0077730908266	43	27
Circadian rhythm	0.00796921447493	25	27
Thyroid cancer	0.00796921447493	23	28
Axon guidance	0.00796921447493	80	29
Platelet activation	0.00796921447493	87	29
Progesterone-mediated oocyte maturation	0.00881014456553	63	29
Wnt signaling pathway	0.0097220144002	94	30
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0102570192002	64	29
Regulation of actin cytoskeleton	0.0111977137299	138	30
Phosphatidylinositol signaling system	0.0134654643344	55	28
Insulin signaling pathway	0.0134828551325	95	29
Alzheimer's disease	0.0135286965681	111	29
HTLV-I infection	0.0135286965681	168	30
Prolactin signaling pathway	0.0143280531692	50	29
Central carbon metabolism in cancer	0.0151912644393	48	30
Carbon metabolism	0.01561840626	70	30
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0166919078214	70	28
Toxoplasmosis	0.0196837626338	79	29

Fatty acid biosynthesis	0.0209372489119	8	23
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	0.0244041133953	13	22
Legionellosis	0.0319297812534	39	27
Bladder cancer	0.0339364125021	30	30
Notch signaling pathway	0.0382787597421	35	28
Influenza A	0.0474131477184	113	29

3: KEGG Pathway (n=45) identificate tramite analisi bioinformatica con Diana Tarbase, per i miRNA deregolati ma non significativi (n=11) rilasciati dopo il trattamento con ultrasuoni della linea normale pancreaticca.

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Fatty acid biosynthesis	2,55E-04	5	5
Proteoglycans in cancer	3,43E-01	79	10
Viral carcinogenesis	5,86E+02	70	10
Adherens junction	1,77E+04	36	10
Fatty acid metabolism	5,04E+04	14	8
Chronic myeloid leukemia	6,38E+05	37	10
Hippo signaling pathway	9,50E+05	53	10
Glioma	1,10E+06	30	10
Oocyte meiosis	1,92E+06	45	10
Sphingolipid signaling pathway	7,31E+06	49	10
Neurotrophin signaling pathway	0.000119780694794	51	10
p53 signaling pathway	0.000165366112192	33	10
Estrogen signaling pathway	0.000213950471052	39	10
Central carbon metabolism in cancer	0.000394276725498	29	9
Hepatitis B	0.000533054863217	55	10
Colorectal cancer	0.000696678063597	28	10
mRNA surveillance pathway	0.000873122601573	39	9
ErbB signaling pathway	0.000873122601573	38	10
Insulin signaling pathway	0.000873122601573	56	10
Prolactin signaling pathway	0.000873122601573	30	10
Renal cell carcinoma	0.0011157708819	30	9
Axon guidance	0.00112054341695	47	10
Endometrial cancer	0.00140579657211	24	9
Pancreatic cancer	0.00175658915646	27	9
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.00181054198936	64	10
Cell cycle	0.00220130369458	51	10
Regulation of actin cytoskeleton	0.00255911065592	72	10
Non-small cell lung cancer	0.00267373541952	24	10
Ubiquitin mediated proteolysis	0.0027526193533	51	10
Prostate cancer	0.0031536625887	37	10
mTOR signaling pathway	0.00315796999678	27	9
Focal adhesion	0.00390243707819	73	10

Progesterone-mediated oocyte maturation	0.00390243707819	36	10
Endocytosis	0.00466670725402	70	10
Lysine degradation	0.00493539776173	18	10
Bacterial invasion of epithelial cells	0.00554617398668	31	8
Melanoma	0.00636025315833	28	10
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.00683871336415	51	10
Bladder cancer	0.010317646288	18	10
MAPK signaling pathway	0.0108536700215	84	10
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.0108536700215	45	10
FoxO signaling pathway	0.0133570236728	50	10
RNA degradation	0.0177991718635	31	9
HTLV-I infection	0.0181714281643	83	10
Nucleotide excision repair	0.0376643616805	16	8

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale”



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



*Ministero dell'Università
e della Ricerca*

