



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale

Ciclo XXIX

Coordinatore Chiar.mo Prof. Paolo Dionigi

***IDENTIFICAZIONE DI UNA FIRMA MOLECOLARE
ASSOCIATA ALLA PROGNOSE E ALLA PLATINO SENSIBILITÀ
IN PAZIENTI AFFETTE DA CARCINOMA OVARICO AVANZATO***

Relatore: Chiar.mo Prof. Alberto Riccardi

Correlatore: Dottor Sergio Marchini

Dottoranda:

Dottoressa Vittoria Fotia

Matricola N 424214

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE

- Carcinoma ovarico5
- miRNA22
 - ✓ miRNA e cancro.....25
 - ✓ miRNA e cancro ovarico.....27
 - ✓ miRNA sierici.....28

PARTE SPERIMENTALE

- Obiettivi.....30
- Materiali e metodi.....31
 - ✓ Pazienti31
 - ✓ Microarray.....37
 - ✓ Real time PCR.....39
 - ✓ RNA seq.....42

- Risultati
 - ✓ miRNA tessuto.....45
 - ✓ miRNA sierici.....49
 - ✓ RNAseq.....52

- Discussione.....57

BIBLIOGRAFIA.....62

ABSTRACT

Il carcinoma ovarico è una delle principali cause di morte per cancro nelle donne. L'elevata mortalità per questo carcinoma è principalmente legata alla diagnosi tardiva, alla mancanza di un test di screening e all'insorgenza di meccanismi di chemioresistenza.

I criteri prognostici e predittivi attualmente utilizzati non consentono di predire la recidiva e la responsività ai trattamenti.

Le moderne tecnologie utilizzate in biologia molecolare consentono di studiare nel dettaglio il genoma e il trascrittoma.

Il mio lavoro si è concentrato sullo studio del trascrittoma nelle pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato (stadio III e IV) con l'obiettivo di identificare dei trascritti per distinguere le donne sane da quelle affette da neoplasia ovarica e in questo gruppo quelle con buona e cattiva prognosi.

Nel dettaglio la mia tesi è articolata in tre parti: la prima parte consiste nell'analisi del miRNoma tissutale per identificare dei miRNA differenzialmente espressi tra le pazienti platino resistenti e sensibili, la seconda parte studia sempre i miRNA ma nel siero di donne sane e donne affette da cancro con l'obiettivo di trovare dei miRNA che possano essere utilizzati per la diagnosi precoce del trattamento, nel siero sono state anche ricercate differenze di espressione con correlazioni con la risposta al trattamento. Nella terza parte della tesi invece oltre ai miRNA abbiamo sequenziato l'intero trascrittoma di un piccolo gruppo di pazienti platino resistenti e di un gruppo analogo di pazienti platino sensibili per identificare trascritti differenzialmente espressi in questi due gruppi di pazienti.

Le pazienti arruolate in questo studio sono pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato sottoposte a chemioterapia a base di platino. Le pazienti appartengono a tre casistiche differenti omogenee per istotipo, stadio e trattamento chemioterapico di prima linea. Di esse è disponibile del tessuto tumorale fresco congelato e per due delle tre coorti anche il siero. Sono stati utilizzati i sieri di alcuni soggetti sani per la seconda parte della tesi.

L'analisi del miRNoma è stata effettuata sulla prima coorte mediante microarray e non ha evidenziato dei miRNA differenzialmente espressi con correlazioni con platino resistenza e sensibilità. Anche lo studio dei miRNA sierici non ha evidenziato miRNA

differenzialmente espressi con valore predittivo o prognostico. Confrontando l'espressione dei miRNA sierici di donne sane e di pazienti affette da carcinoma ovarico abbiamo identificato in questo secondo gruppo un'aumentata espressione di 3 miRNA.

Questi risultati sono stati validati anche in real time PCR confermando l'overespressione di miR-1246, miR-595 e miR-2278 nelle donne affette da carcinoma ovarico.

L'ultima parte del lavoro prevedeva lo studio del trascrittoma mediante RNAseq, sono stati identificati in tutto 1371 trascritti differenzialmente espressi in queste pazienti. Gli esperimenti di validazione di questi trascritti mediante real time PCR non hanno avuto esito positivo.

In conclusione non sono stati identificati miRNA tissutali e sierici con correlazione con la sensibilità al platino e la sopravvivenza, nel trascrittoma sono stati identificati numerosi trascritti differenzialmente espressi ma tali risultati non sono stati validati.

Sono stati identificati 3 miRNA sierici differenzialmente espressi tra le pazienti affette da carcinoma ovarico e donne sane, essi potrebbero essere ulteriormente studiati per il loro utilizzo come marcatori di screening e per la neoplasia ovarica, una patologia per cui ad oggi non è riconosciuto un test di screening efficace.

IL CARCINOMA OVARICO

Epidemiologia

Il carcinoma ovarico è la più comune causa di morte associata a neoplasie ginecologiche e rappresenta la quinta causa di morte per cancro nelle donne.

L'80-90% dei tumori ovarici si presenta in donne in età compresa fra 20 e 65 anni.

L'incidenza delle neoplasie maligne ovariche varia nelle diverse aree geografiche, con tassi più elevati in Europa e Nord America. Nei paesi africani e nel sud-est asiatico si osservano meno di 2 nuovi casi all'anno per 100.000 donne, mentre in Europa e nel Nord America si registrano 15 nuovi casi anno per 100.000 donne. In Italia una donna su 74 si ammala di tumore ovarico nell'arco della vita e una su 104 muore per questa neoplasia.

Molto frequentemente si manifesta in fase avanzata e questo contribuisce all'alta mortalità per questa neoplasia.

La sopravvivenza globale a 5 anni delle pazienti con tumori epiteliali maligni dell'ovaio si aggira intorno al 50%. Se il tumore è confinato all'ovaio la sopravvivenza a 5 anni raggiunge il 90%, mentre scende al 15-20% negli stadi avanzati, III e IV.¹⁻²

Fattori di rischio

Recenti studi epidemiologici hanno identificato le seguenti classi di fattori di rischio:

- Fattori familiari genetici
- Fattori endocrini
- Fattori ambientali

La familiarità per carcinoma ovarico è un fattore di rischio associato alla neoplasia. Tra i fattori familiari riveste un ruolo fondamentale la presenza di mutazioni di BRCA presenti in più del 10% delle pazienti affette da carcinoma ovarico.³

Sono state identificate alcune sindromi genetiche:

- La Breast-ovarian cancer syndrome (legata a una mutazione dei geni BRCA1/BRCA2);
- La site specific ovarian cancer syndrome (legata a una mutazione dei geni BRCA1/BRCA2);

- La Sindrome di Lynch 2 (HNPCC) che include carcinoma del colon non associato a poliposi, carcinomi endometriali, mammari, ovarici e altri con minore frequenza;
- Sindrome di Cowden, legata a una mutazione di PTEN, con associazione tra tumori ovarici e tumori cerebrali;
- Sindrome di Gorlin, legata a una mutazione di PTC, con associazione tra tumori ovarici e nevi multipli.

La nulliparità, il mancato allattamento al seno, l'endometriosi, la policistosi ovarica, la sterilità e la stimolazione ovarica mediante l'utilizzo di gonadotropine sembrano essere fattori di rischio endocrino associati al carcinoma ovarico.

Al contrario l'uso di contraccettivi orali sembra avere un effetto protettivo direttamente proporzionale alla durata dell'assunzione. Tale effetto è stato riportato anche in donne portatrici di mutazione BRCA1/2.

Un aumentato rischio di neoplasia ovarica è stato osservato in pazienti con cancro della mammella, indicando la presenza di fattori eziologici comuni fra le due neoplasie.

L'ovaio può essere esposto ad una serie di fattori cancerogeni ambientali attraverso la vagina e le tube di Fallopio. E' stata descritta un'associazione con l'esposizione di asbesto e talco, con l'abuso di alcol, l'obesità e una dieta ricca di grassi.¹⁻²

Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi del carcinoma ovarico è rimasta per anni una questione insoluta.

Non sono state identificate nell'ovaio lesioni morfologiche che possano rappresentare precursori del carcinoma e per questo sono state formulate alcune ipotesi eziopatogenetiche:

- inclusione dell'epitelio celomatico e formazione di CICs: l'epitelio che riveste la superficie ovarica a causa della rottura del follicolo è sottoposto a continui processi riparativi ed è esposto a innumerevoli citochine infiammatorie che possono indurre metaplasia e successiva trasformazione neoplastica.
- modello a due tipi (ipotesi di Kurman): questo modello distingue due tipi diversi di cancerogenesi. Tipo I: comprende i tumori di diversi istotipo ma a basso grado (sieroso, mucinoso, endometriode, cellule chiare e transizionale), essi avrebbero origine da lesioni benigne. Questi tumori presentano mutazioni di numerosi geni quali ARID1A, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN e CTNNB1. Queste mutazioni appaiono precocemente

nello sviluppo dei tumori di tipo I e sono spesso presenti nei loro precursori. I tumori di Tipo I solitamente si presentano come tumori allo stadio FIGO I, di grandi dimensioni . Tipo II: sono tumori ad alto grado quali il carcinoma sieroso ad alto grado (HGSC), il carcinoma endometriode ad alto grado, il carcinosarcoma e l'indifferenziato e si presentano in stadio avanzato. In più del 70% dei casi presentano una mutazione di TP53, il 20% di questi tumori presenta una mutazione di BRCA1 o BRCA2, essi presentano amplificazione di HER2 e di AKT2.⁴

- origine tubarica del carcinoma ovarico: la maggior parte dei carcinomi sierosi ad alto grado si associa alla presenza di carcinoma sieroso intraepiteliale della tuba (STIC). Si suppone che questa lesione rappresenti il precursore del carcinoma sieroso. Fimbria e ovaio sono in stretto contatto, cellule della fimbria si staccano e si impiantano sulla superficie ovarica. Lo STIC mostra iper-espressione della proteina p53 analogamente al carcinoma sieroso di alto grado.

- ipotesi della mestruazione retrograda: il carcinoma endometriode ed il carcinoma a cellule chiare sono correlati con l'endometriosi e verosimilmente si sviluppano da tessuto endometriale veicolato in sede ectopica per mestruazione retrograda.^{2,5}

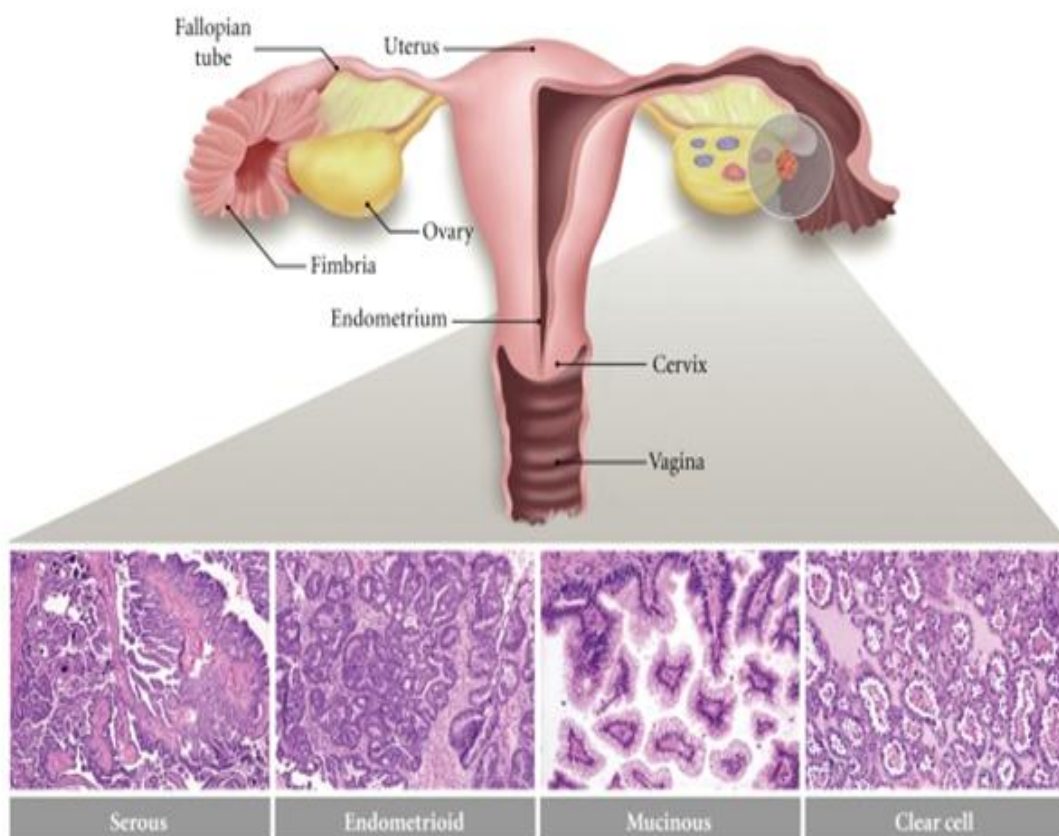
Istopatologia

La classificazione WHO del 2002 del carcinoma ovarico è quella ad oggi più utilizzata essa divide i carcinomi ovarici in primitivi e secondari⁶:

- TUMORI EPITELIALI
 - ✓ Tumori sierosi
 - ✓ Tumori mucinosi
 - ✓ Tumori endometrioidi
 - ✓ Tumori a cellule chiare
 - ✓ Tumori a cellule transizionali
 - ✓ Tumori a cellule squamose
 - ✓ Tumori epiteliali misti
 - ✓ Tumori indifferenziati
- TUMORI DELLO STROMA E DEI CORDONI SESSUALI
 - ✓ Tumori della granulosa e stromali

- ✓ Tumori a cellule del Sertoli-Leydig
- ✓ Tumori dei cordoni sessuali misti o inclassificabili
- ✓ Tumori a cellule steroidee
- TUMORI A CELLULE GERMINALI
 - ✓ Tumori a cellule germinali immature
 - ✓ Tumori a cellule germinali mature
- TUMORI METASTATICI

Di seguito descriverò le varianti più frequenti del tumore ovarico: carcinoma sieroso, endometrioido, mucinoso e a cellule chiare.^{7,8,9,10}



5

Il carcinoma sieroso è l'istotipo più comune, si distingue in basso e alto grado. Le cellule di questo tipo di neoplasia sono simili a quelle dell'epitelio tubarico. Il carcinoma sieroso è caratterizzato da invasione dello stroma, aree di crescita solida e papille complesse con presenza corpi psammomatosi (calcificazioni).

La distinzione morfologica tra basso e alto grado viene effettuata in base al numero di mitosi, alla presenza di necrosi e di atipia cellulare. In particolare il carcinoma sieroso a basso grado è composto da cellule con un basso numero di mitosi, presenza di nuclei uniformi, assenza di necrosi e di cellule con atipie o multinucleate.

Il carcinoma sieroso ad alto grado invece presenta un elevato numero di mitosi, marcate atipie nucleari, è frequentemente abbondante la componente necrotica e sono presenti cellule multinucleate. Da un punto di vista molecolare è ormai accettata una netta distinzione tra i carcinomi sierosi ad alto grado e quelli a basso grado.

I carcinomi sierosi a basso grado sono caratterizzati da mutazioni di BRAF o KRAS (mutualmente esclusive), mentre quelli ad alto grado presentano più frequentemente mutazioni di p53 e con minor frequenza mutazioni di BRCA1 e 2.

I carcinomi mucinosi presentano una maggiore crescita solida con numerose cellule epiteliali atipiche e cospicua stratificazione, frequentemente perdono la stratificazione ghiandolare, sono spesso a componente necrotica e sono simili al carcinoma del colon. Essi sono frequentemente associati a pseudomixoma peritonei, estesa ascite mucinosa e impianti peritoneali cistici che spesso causano aderenze e ostruzione intestinale. La mutazione di KRAS è una alterazione molto comune nei carcinomi mucinosi, circa 75%.

Il carcinoma endometriode si presenta come una combinazione di aree solide e cistiche, presenta aspetti ghiandolari simili a quelli dell'endometrio. Le mutazioni somatiche più frequenti in questo carcinoma sono CTNNB1 (40%) PTEN (20%) e PIK3CA (20%).

Il carcinoma a cellule chiare è caratterizzato da grosse cellule epiteliali con abbondante citoplasma chiaro, possono essere a predominanza solida o cistica, nel primo caso sono organizzati in lamine e tubuli, nel secondo le cellule circoscrivono gli spazi. Le mutazioni più frequenti sono la mutazione inattivante di ARID1A nel 46% dei casi, la mutazione attivante di PIK3CA nel 33%.

Stadiazione

Le neoplasie epiteliali sono stadiate secondo la classificazione FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et Obstetrie).¹¹ Si tratta di una stadiazione di tipo patologico, l'intervento chirurgico è funzionale sia alla diagnosi che alla stadiazione del carcinoma ovarico poiché consente di valutare con precisione ed accuratezza l'estensione anatomica della malattia.

Nel 2014 è stata pubblicata la versione aggiornata della stadiazione del carcinoma dell'ovaio ed è quella comunemente utilizzata:

Stadio I Tumore limitato alle ovaie

Stadio II Tumore esteso ad una o a entrambe le ovaie con diffusione pelvica

Stadio III T3 Tumore che interessa una o entrambe le ovaie con impianti peritoneali (istologicamente confermati) extrapelvici e/o metastasi ai linfonodi regionali

- Stadio IIIa T3a Impianti peritoneali microscopici
- Stadio IIIb T3b Impianti peritoneali di diametro non superiore a 2 cm. Linfonodi negativi
- Stadio IIIc T3ce/o N1 Impianti peritoneali di diametro superiore a 2 cm e/o metastasi ai linfonodi regionali

Stadio IV M1 Metastasi a distanza (escluse le metastasi peritoneali)

Sopravvivenza a 5 aa	
Stadio I	70-90%
Stadio II	50-60%
Stadio III	20-40%
Stadio IV	10%

Fattori prognostici

I fattori di riconosciuta importanza sono i seguenti¹²:

- ✓ Grado di differenziazione: il grado istologico è il fattore prognostico più importante nello stadio I

- ✓ Sottostadio (con particolare attenzione alla rottura, soprattutto pre-operatoria, della cisti)
- ✓ Età del paziente
- ✓ Sottotipo istologico (l'indifferenziato ha la prognosi peggiore)
- ✓ Crescita extracapsulare
- ✓ Ascite
- ✓ Presenza di strette aderenze, dimensioni tumorali, ploidia del DNA, performance status.
- ✓ Mutazione germinale di BRCA

E' possibile identificare due classi di pazienti a diverso rischio di recidiva per gli stadi iniziali del tumore epiteliale ovarico:

- PAZIENTI A BASSO RISCHIO (o a buona prognosi): Stadio IA o IB, grado 1-2 (Sopravvivenza a 5 anni > 90 %)
- PAZIENTI AD ALTO RISCHIO (o a cattiva prognosi): Stadio IA o IB di grado 3 o stadio IC o II o istotipo indifferenziato (sopravvivenza a 5 anni : 50-60%)

E' fondamentale l'esecuzione di un'appropriata procedura chirurgica stadiativa per una diagnosi corretta, una terapia ottimale e per una definizione prognostica adeguata.

Recenti studi hanno suggerito che l'espressione di alcuni microRNA (mi-RNA) ha una rilevanza prognostica in questo setting clinico. In particolare, il miR-200c sembra essere un predittore indipendente di recidiva nella malattia in stadio I¹³.

Negli stadi avanzati i fattori prognostici sono i seguenti:

- ✓ Istotipo mucinoso e a cellule chiare
- ✓ Residuo di malattia dopo chirurgia primaria (debulking sub ottimale)¹⁴
- ✓ Livelli sierici di CA125.¹⁵

Screening

Il carcinoma ovarico viene frequentemente diagnosticato in fase avanzata di malattia e questo correla con una prognosi frequentemente infausta.

Numerosi studi hanno cercato di identificare un esame che consenta una diagnosi precoce della neoplasia in particolare valutando l'utilizzo dell'ecografia transvaginale e il dosaggio del Ca125. Un recente trial multicentrico statunitense ha reclutato 78.216

donne di età' compresa tra 55 e 74 anni, che sono state randomizzate in un gruppo sottoposto a screening annuale con dosaggio del CA125 per 6 anni e con ecografia transvaginale per 4 anni ed in un gruppo di controllo non sottoposto a screening. Secondo questo studio lo screening del carcinoma ovarico basato sul CA125 e sulla ecografia trans-vaginale non riduce la mortalità per questa neoplasia nella popolazione generale, e può causare inoltre una incidenza non trascurabile di morbidità iatrogena per interventi chirurgici non necessari.¹⁶

Secondo uno studio americano durato 14 anni e condotto a partire dai dati di oltre 200mila donne inglesi, lo screening annuale del carcinoma ovarico, in particolare basato sull'analisi del sangue della proteina CA125, potrebbe ridurre la mortalità fino al 20%. Le donne sono state divise in tre gruppi nel primo veniva effettuato uno screening annuale multimodale mediante algoritmo ROCA(Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA) utilizzando il dosaggio del Ca125 ed in seconda linea ecografia trans-vaginale a ultrasuoni; nel secondo gruppo (circa 50mila donne) veniva effettuato uno screening annuale ad ultrasuoni da solo; infine vi era un gruppo di controllo (100mila donne) che non effettuava nessuno screening.

Dal confronto tra il primo gruppo e il gruppo di controllo è emerso che lo screening è risultato associato ad una riduzione del 20% del rischio di decesso per carcinoma ovarico durante il periodo dello studio (circa 14 anni).¹⁷

Nonostante i risultati di questi studi ad oggi non è stata ancora riconosciuta una tecnica di screening per carcinoma ovarico.

I futuri lavori dovranno tener conto delle nuove teorie sulla patogenesi del carcinoma ovarico e sulle sempre maggiori evidenze di una origine extra-ovarica di questa neoplasia.

Le recenti evidenze sulla cancerogenesi ovarica in particolare relativa al carcinoma sieroso ad alto grado, potrebbero modificare l'approccio preventivo nelle donne a rischio eredo-familiare. Se l'epitelio tubarico è la fonte di origine di questi tumori la chirurgia profilattica nelle donne a rischio potrebbe limitarsi alla salpingectomia bilaterale con conservazione delle gonadi e quindi con preservazione sia della funzione endocrina sia della fertilità.

Diagnosi

Il carcinoma ovarico tipicamente si presenta in fase avanzata con comparsa di distensione addominale e/o algie addominali che durano alcuni mesi, in questi casi le pazienti devono essere sottoposte a accurato esame clinico e successiva valutazione strumentale mediante ecografia addome e in caso di riscontro di massa annessiale deve essere eseguito dosaggio del Ca125 e dell'HE4.

Nel caso di sospetto clinico si procederà ad intervento chirurgico a scopo diagnostico e a rx torace pre-chirurgia.

La chirurgia ha un molteplici intento consentendo di effettuare sia la diagnosi che la stadiazione del carcinoma ovarico poiché consente di valutare con precisione ed accuratezza l'estensione anatomica della malattia essendo la stadiazione secondo FIGO di tipo patologico.

Trattamento chirurgico

L'approccio chirurgico iniziale ha un ruolo fondamentale in caso di neoplasia ovarica sospetta sia ai fini diagnostici, permettendo l'accertamento istopatologico della natura della massa, sia ai fini terapeutici, consentendo la sua rimozione e l'accurata valutazione dell'estensione anatomica della malattia.¹⁰

La chirurgia del carcinoma ovarico è prevalentemente una chirurgia laparotomica; la laparoscopia si può utilizzare nella ristadiazione chirurgica della diagnosi incidentale di carcinoma ovarico nella valutazione intraoperatoria della malattia avanzata al fine di studiare la possibilità di una citoreducibilità ottimale consentendo in caso di inoperabilità della paziente un precoce inizio della chemioterapia.

Il 25% delle pazienti si presenta con una malattia in uno stadio clinico apparentemente iniziale (I o II).

Le procedure di stadiazione devono comprendere l'ovariosalpingectomia controlaterale ed isterectomia, l'omentectomia infracolica o totale se l'omento è sede di lesioni sospette, biopsie multiple a livello delle superfici peritoneali più probabili sedi di impianto di neoplasia per caratteristiche di circolazione del fluido peritoneale, appendicectomia, biopsie dei linfonodi pelvici e lombo-aortici palpabili. La linfoadenectomia è attualmente raccomandabile negli stadi iniziali e nei trattamenti conservativi.

Negli stadi avanzati la chirurgia citoriduttiva di prima istanza è il momento più importante del trattamento delle pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato.

Le procedure da eseguire comprendono l'isterectomia totale extra fasciale con annessiectomia bilaterale, l'omentectomia totale, l'appendicectomia, l'asportazione di linfonodi pelvici e aortici solo se aumentati di volume e l'asportazione di tutta la malattia macroscopicamente visibile.

Numerosi studi e recenti metanalisi hanno definitivamente confermato che il tumore residuo post chirurgico è un fattore prognostico indipendente.¹⁴ La sopravvivenza globale e libera da malattia di queste pazienti è direttamente correlata alla quantità di tumore residuo dopo l'intervento chirurgico. Il debulking è definito ottimale quando non vi è residuo tumorale macroscopico.

Nei casi nei quali non sia stato possibile ottenere una citoriduzione ottimale al primo intervento, la terapia chirurgica può essere utilizzata in un secondo tempo e successivamente all'inizio del trattamento chemioterapico; tale strategia terapeutica è definita "chirurgia di intervallo". Questa ha come obiettivo principale quello di ridurre la massa neoplastica nei tumori avanzati per diminuire il rischio di complicanze perioperatorie a parità di risultati terapeutici.

Il ruolo della chirurgia nella recidiva di malattia è complesso e tuttora non del tutto definito. Le tre principali indicazioni alla chirurgia possono includere probabilmente l'alleviamento dell'ostruzione intestinale in casi selezionati, il debulking del tumore nelle pazienti che presentano recidiva platino-sensibile e la rimozione dei singoli siti di malattia che sono sintomatici o a crescita lenta. Alcuni autori inoltre, propongono di associare alla chirurgia secondaria con assenza di residuo tumorale macroscopico, una chemioipertermia intraperitoneale, con infusione di chemioterapico ad alta temperatura (41.5°C). Questo approccio va ancora oggi considerato sperimentale.

Terapia medica

Il trattamento medico si distingue anche nel carcinoma ovarico in tre fasi distinte: chemioterapia neoadiuvante, chemioterapia adiuvante e chemioterapia palliativa.

Nelle pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato sottoposte a citoriduzione sub-ottimale o inoperabili è possibile prendere in considerazione la chemioterapia

neoadiuvante seguita da chirurgia anche se non è stato dimostrato un chiaro vantaggio in termini di PFS e OS.¹⁸

Il trattamento delle forme di carcinoma ovarico precoce (stadio I e II secondo FIGO) è chirurgico, ma in considerazione del rischio di recidiva del 25-30%, in molti casi viene prescritto un trattamento chemioterapico adiuvante. Da analisi multivariate delle caratteristiche clinico-patologiche dei tumori ovarici epiteliali, sono stati identificati quali fattori prognostici indipendenti: il grado di differenziazione, lo stadio FIGO, il sottostadio (in caso di rottura intraoperatoria della capsula ovarica), l'età della paziente, il sottotipo istologico (prognosi peggiore nell'indifferenziato) e la presenza di ascite. Al fine di selezionare le pazienti che possano realmente beneficiare della terapia medica le pazienti con carcinoma ovarico iniziale sono suddivise in tre differenti categorie di rischio. Le pazienti in stadio FIGO Ia e Ib con malattia ben differenziata e con istotipo non a cellule chiare sono definite a basso rischio, in questo stadio la chirurgia è risolutiva nel 95% dei casi.¹⁹ Le pazienti con malattia in stadio FIGO Ia-Ib moderatamente differenziata appartengono al rischio intermedio. I tumori scarsamente differenziati o gli stadi Ic-II o sono ritenuti ad alto rischio, in quanto associate ad un tasso di recidiva del 25-40% e, pertanto, candidate ad un trattamento chemioterapico adiuvante.

Rientrano in questo gruppo le pazienti con rottura intraoperatoria della neoplasia in addome.

Due ampi studi internazionali ICON-1 e ACTION¹⁹, hanno randomizzato, dopo chirurgia primaria, pazienti con malattia in stadio iniziale alla semplice osservazione ovvero ad un trattamento chemioterapico adiuvante con regimi a base di platino per 4-6 cicli. I risultati hanno mostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza a favore delle pazienti sottoposte a chemioterapia (circa il 7% a 5 anni).

Futuri studi mirati all'individuazione di biomarcatori molecolari e genetici che consentano una migliore definizione delle classi di rischio negli stadi precoci, riusciranno a puntualizzare il ruolo della chemioterapia adiuvante in questi pazienti con neoplasia in stadio iniziale.

Lo standard terapeutico nel trattamento di I linea del carcinoma ovarico in fase avanzata (stadio IIb e IV sec. FIGO) è costituito dalla combinazione di carboplatino AUC5 e paclitaxel (175 mg/mq e.v. in 3 ore ogni 21 giorni). La scelta di tale regime terapeutico

è frutto dei risultati ottenuti nel tempo da numerosi studi clinici che hanno dimostrato la superiorità della chemioterapia contenente paclitaxel e la pari efficacia degli schemi con carboplatino rispetto al cisplatino (GOG 111, GOG 114, GOG 158 ed AGO OV.10).²⁰⁻²³ Tuttavia, nonostante l'efficacia iniziale, il 70-80% dei pazienti con neoplasia in stadio avanzato sviluppa una recidiva di malattia entro i primi 2 anni e necessita di una successiva linea di trattamento. Numerosi sforzi sono stati condotti negli ultimi 20 anni per migliorare la efficacia della chemioterapia di I linea. Le strategie adottate sono state differenti, tra queste l'aggiunta di un terzo farmaco, l'utilizzo di nuove doppiette o la modifica del timing del trattamento.

Il primo farmaco biologico che è stato aggiunto alla terapia di I linea del carcinoma ovarico avanzato è il bevacizumab. Nei due studi randomizzati (GOG218 e ICON7) la chemioterapia standard con carboplatino e paclitaxel è stata confrontata con la stessa chemioterapia con somministrazione concomitante di bevacizumab seguita da mantenimento con solo bevacizumab, mostrando un incremento statisticamente significativo della progression free survival (12.7 vs 18.2 mesi nello studio GOG 218 e 16.0 vs 18.3 nello studio ICON7).^{24,25}

Alcuni sottogruppi di pazienti che hanno risposto ad una chemioterapia di prima linea potrebbero trarre beneficio da terapie di mantenimento o di consolidamento, finalizzate alla completa eradicazione tumorale, ed a ritardare la progressione clinica anche se oggi non è raccomandata nella pratica clinica.

La terapia del tumore ovarico recidivato dopo una prima linea è nella maggior parte dei casi a carattere palliativo, risultando curativo in una minoranza delle pazienti.

L'istologia sierosa, la presenza della mutazione di BRCA, le dimensioni tumorali, il numero di siti metastatici sono fattori predittivi indipendenti correlati alla risposta al ritrattamento. La scelta terapeutica è subordinata all'intervallo intercorso tra la fine del trattamento con platino e la comparsa di recidiva (Platinum free interval - PFI). Il tasso di risposta al ritrattamento con platino è direttamente correlato con il PFI. Le pazienti recidivate si distinguono in refrattarie (progredite durante la I linea o entro 1 mese dall'ultimo ciclo di platino), resistenti (progredite o recidivate entro 6 mesi dall'ultimo trattamento con platino), parzialmente platino sensibili (con PFI tra 6 e 12 mesi) e platino sensibili (PFI > 12 mesi).

La correlazione tra risposta e PFI è stata dimostrata anche per altre chemioterapie non a base di platino (topotecan, doxorubicina liposomiale).

Nelle pazienti refrattarie e resistenti la chemioterapia ha efficacia limitata. Gli agenti che sono stati testati in studi di fase III sono il topotecan, la doxorubicina liposomiale peghilata, la gemcitabina, il taxolo settimanale, la trabectedina. Lo studio Aurelia ha testato l'aggiunta di bevacizumab concomitante a chemioterapia (paclitaxel settimanale vs topotecan settimanale vs doxorubicina liposomiale) fino a progressione dimostrando un vantaggio in termini di PFS. Una recente analisi ha mostrato nella coorte di pazienti trattata con paclitaxel settimanale in associazione a bevacizumab una maggiore OS rispetto al paclitaxel settimanale da solo.²⁶ Nella recidiva parzialmente platino sensibile uno studio di fase III ha dimostrato la superiorità della combinazione trabectedina - doxorubicina liposomiale peghilata rispetto alla sola doxorubicina liposomiale in termini di PFS e OS).²⁷

Nel setting della malattia platino-sensibile (PFI >12 mesi) la scelta terapeutica prevede il riutilizzo di regimi a base di platino (carboplatino). Gli schemi con carboplatino e paclitaxel e carboplatino e gemcitabina si sono dimostrati superiori al carboplatino come agente singolo.²⁸

Lo studio OCEANS ha testato l'aggiunta di bevacizumab concomitante a carboplatino e gemcitabina ed in mantenimento fino a progressione dimostrando un vantaggio in termini di PFS, ma non di OS rispetto al braccio trattato con sola chemioterapia.²⁹

Uno studio di Ledermann su pazienti platino sensibili ha testato l'efficacia del PARP inibitore olaparib come mantenimento dopo chemioterapia in carcinomi sierosi di alto grado con mutazione somatica o germinale, mostrando un significativo vantaggio in termini di PFS.³⁰

Platino resistenza e platino sensibilità

Come descritto nella parte relativa al trattamento le pazienti affette da carcinoma ovarico vengono distinte in diversi gruppi in base alla risposta al trattamento a base di platino.

Il parametro di riferimento utilizzato è il PFI (platinum free interval) ovvero il tempo intercorso tra la fine della chemioterapia di prima linea e la ricomparsa della malattia:

- ✓ *Platino refrattarie*: Progredite durante la I linea o entro 1 mese dall'ultimo ciclo di platino
- ✓ *Platino resistenti*: Progredite entro 6 mesi dal termine del trattamento
- ✓ *Platino parzialmente sensibili*: Platinum free interval tra 6 e 12 mesi
- ✓ *Platino sensibili*: Platinum free interval >12 mesi

Questo tipo di classificazione è esclusivamente basato sulla evidenza clinica di risposta al trattamento. Non sono noti al momento parametri clinico patologici che siano in grado di predire la risposta al trattamento e il rischio di recidiva dopo iniziale risposta alla chemioterapia.

La risposta al trattamento a base di platino ha delle importanti implicazioni relative alla sopravvivenza delle pazienti in quanto le pazienti sensibili al platino hanno una prognosi migliore rispetto alle pazienti platino resistenti o parzialmente sensibili.

Per spiegare i meccanismi alla base della platino resistenza esistono numerose ipotesi che sono state elaborate nel corso degli anni, tutte concordi circa la presenza di eterogeneità tumorali all'interno dei carcinomi ovarici.

Il tumore ovarico contiene numerosi cloni cellulari, nella stessa neoplasia convivono cellule platino sensibili e cellule platino resistenti, queste ultime sopravvivrebbero dopo il trattamento con il platino e darebbero origine alla recidiva dopo un'iniziale risposta al trattamento.

Un altro meccanismo che spiega la platino resistenza potrebbe essere quello legato a cellule dormienti che hanno già al loro interno dei meccanismi di resistenza questo spiegherebbe l'insorgenza di recidive tardive di malattia.

Un'altra ipotesi è quella che propone la presenza di un microambiente diverso tra i tumori platino sensibili e quelli platino resistenti, particolari componenti della matrice come la fibrillina I potrebbero creare un microambiente che protegge dal trattamento con platino le cellule staminali resistenti.

Le ipotesi molecolari circa la platino resistenza si basano sull'origine del clone tumorale principalmente rappresentato nella neoplasia esso potrebbe presentare una mutazione driver di p53, che induce instabilità genomica favorendo la possibilità di acquisire mutazioni comprese quelle a carico di BRCA. Le neoplasie platino resistenti invece avrebbero origine da cellule che non sono portatrici di mutazione di p53 ma che

presentano altri eventi driving come può essere l'amplificazione di CCNE1 che induce instabilità cromosomica.³¹⁻³³

Un'ulteriore ipotesi relativa alla platino resistenza è quella legata alla capacità delle cellule del carcinoma sieroso ovarico di acquisire un fenotipo mesenchimale, l'overespressione di geni correlati all'epithelial–mesenchymal transition è stato descritto in un gruppo di pazienti platino resistenti e non in quelle platino sensibili.³⁴

L'acquisizione del fenotipo mesenchimale rende le cellule più resistenti all'apoptosi e capaci di produrre molecole della matrice extracellulare.

Caratterizzazione molecolare del carcinoma ovarico

Negli ultimi anni grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare sono stati effettuati numerosi tentativi di riclassificazione del carcinoma ovarico basati sulla differenza di espressione genica e sui diversi profili mutazionali.

Il lavoro più significativo e più esteso sia per numero di pazienti che di tecniche utilizzate è il TCGAtlas pubblicato su Nature nel 2011.

Il Cancer Genome Atlas [TCGA] project ha valutato l'espressione di RNA messaggero (mRNA), l'espressione di mi-RNA, lo stato di metilazione, il copy number variation in 489 carcinomi ovarici sierosi ad alto grado, e le sequenze del DNA degli esoni dai geni codificanti in 316 di questi tumori.³⁵

I dati del TCGAtlas hanno evidenziato uno spettro mutazionale estremamente semplice per gli HGSC: TP53 risulta mutato in almeno il 96% dei casi e BRCA1/2 risultano mutati nel 22% dei casi, considerando sia le mutazioni germinali che somatiche.

L'analisi del profilo di espressione genica ha consentito di distinguere i carcinomi sierosi ad alto grado in quattro diversi sottotipi: l'Immunoreattivo, il Differenziato, il Proliferativo e il Mesenchimale. L'espressione dei ligandi delle chemochine delle cellule T CXCL11 e CXCL10 e il recettore CXCR3 sono overespressi nel sottotipo Immunoreattivo. Un'alta espressione di fattori di trascrizione, come HMGA2 e SOX11, una bassa espressione di markers di tumore ovarico (MUC1, MUC16) ed un'alta espressione di markers di proliferazione come MCM2 e PCNA definiscono invece il sottotipo Proliferativo. Il sottotipo Differenziato è invece associato ad un'alta espressione di MUC16 e MUC1 e di un marker delle cellule secernenti della tuba, SLPI, suggerendo che possa essere uno stadio di sviluppo più maturo. Una alta espressione dei

geni di HOX e di markers correlati con un' aumentata componente stromale come miofibroblasti (FAP) e periciti microvascolari (ANGPTL2, ANGPTL1), caratterizzano il sottotipo Mesenchimale. Non è stata individuata nessuna differenza dal punto di vista della sopravvivenza tra i sottotipi trascrizionali.

Sono state fatte anche delle analisi della frequenza con cui i pathway noti per essere associati ai tumori sono alterati a causa delle mutazioni, della variazione del numero di copie o dei cambiamenti nell'espressione genica visti fino ad ora. Circa il 50% degli HGSC presenta una alterazione nel pathway della ricombinazione omologa (HR), causata da diversi meccanismi: mutazione somatica o germinale di BRCA1/2 (circa il 20%), ipermetilazione con perdita dell'espressione di BRCA1 (11%), amplificazione o mutazione di EMSY (8%), delezioni localizzate o mutazioni di PTEN (7%), ipermetilazione di RAD51 (3%), mutazione di ATM/ATR (2%) e mutazione dei geni FA (Fanconi Anemia) (5%). Altri pathway che sono stati trovati alterati nei HGSC sono: i pathway RB1 e PI3K/RAS, che sono deregolati rispettivamente nel 67% e 45% dei casi, il pathway di trasduzione del segnale Notch, nel 23% dei casi, il network del fattore di trascrizione FOXM1, alterato nell'87% dei casi. FOXM1 e il suo gene target connesso alla proliferazione sono overespressi, senza presentare una amplificazione. TP53 normalmente reprime FOXM1 in seguito ad un danno al DNA, suggerendo che l'alto numero di mutazioni in TP53 favorisca l'overespressione di FOXM1 (TCGA, 2011). Invece la deregolazione del pathway di trasduzione del segnale PI3K/Pten, causata soprattutto dall'amplificazione di PIK3CA (che codifica per la subunità catalitica di PI3K) ha mostrato di avere un ruolo importante nell'invasione, metastatizzazione e chemioresistenza nel EOC. Questi altri pathway identificati possono essere delle possibilità di attacco terapeutico, puntando su terapie che agiscano sempre più sulle singole modificazioni.

Un'altra analisi molecolare molto interessante è stata effettuata sulle pazienti affette da carcinoma ovarico e arruolate nel protocollo ICON 7, che valutava l'aggiunta del bevacizumab alla chemioterapia standard.

Sono stati analizzati i campioni tissutali inclusi in paraffina da 380 pazienti arruolate nel trial ICON 7 osservando che le pazienti con carcinoma sieroso di sottotipo mesenchimale avevano il maggior beneficio dall'aggiunta del bevacizumab alla chemioterapia, con un miglioramento della PFS mediana di 9.5 mesi (25.5 versus 16.0

mesi), mentre i sottotipi differenziato, immunoreattivo e proliferativo avevano un miglioramento della PFS mediana, rispettivamente, di soli 5.8 mesi (19.4 versus 13.6 mesi), 3.4 mesi (17.9 versus 14.6 mesi), and 3.2 mesi (21.5 versus 18.3 mesi). In un subset di 284 carcinomi sierosi di alto grado inclusi nello studio ICON 7, Gourley e coll . [57] Hanno identificato un' altra firma molecolare, in grado di identificare sottogruppi di tumori a diversa prognosi e a diversa risposta al bevacizumab. ³⁶

Nonostante gli sforzi effettuati per la ricerca di trattamenti sia chirurgici che medici (chemioterapici e non solo) di maggiore efficacia la sopravvivenza delle pazienti affette da carcinoma ovarico è rimasta pressochè invariata negli ultimi 30 anni.

Da quanto descritto risulta necessario identificare nuovi indicatori di prognosi e predittori di risposta ai trattamenti per poter distinguere le pazienti affette da carcinoma ovarico platino sensibile e platino resistente prima di iniziare i trattamenti di prima linea.

Le recenti evidenze hanno confermato la diffusa eterogeneità tumorale di neoplasie che pur insorgendo nella stessa sede ed avendo lo stesso istotipo presentano storie naturali molto diverse tra di loro.

Studi sistematici su coorti di pazienti molto numerose come il TCGA hanno consentito di ottenere una nuova classificazione molecolare dei tumori attraverso l'integrazione di informazioni derivanti dall'analisi multidimensionale.

Gli strumenti bioinformatici attuali potrebbero consentire di ottenere una firma molecolare integrata di RNA codificante e non codificante con una rilevanza clinica, sempre più interessante è il ruolo nei circuiti di trascrizione dei miRNA.

Nel capitolo successivo descriverò nel dettaglio i miRNA e il loro ruolo nella tumorigenesi.

miRNA

I micro RNA sono piccole molecole di RNA non codificante a singolo filamento essi sono lunghi circa 20-22 nucleotidi codificate dal DNA nucleare. Essi interferiscono con l'attività dell'RNA messaggero solitamente tramite la repressione della traduzione o la degradazione della molecola bersaglio.

Geni codificanti per miRNA sono stati identificati in tutti gli organismi pluricellulari, dove svolgono numerose funzioni durante lo sviluppo ed il differenziamento.³⁷

Nelle cellule umane sono stati identificati oltre 1000 miRNA, la cui espressione è, in molti casi, tessuto specifica. In tutti i tumori umani fino ad oggi studiati è stata trovata un'espressione aberrante di tali molecole. Il profilo di espressione dei miRNA nei tumori suggerisce che alcuni miR abbiano un ruolo oncogenico ed altri un ruolo oncosoppressore.

La scoperta dei miRNA ha rivoluzionato il dogma centrale della biologia secondo cui esiste un flusso di informazioni dal DNA, depositario dell'informazione genetica, alle proteine, molecole effettrici delle funzioni cellulari, attraverso l'intermediazione di molecole di RNA. Infatti, le più note classi di RNA cellulari, RNA messaggeri (mRNA), RNA transfer (tRNA) ed RNA ribosomali (rRNA) sono, direttamente o indirettamente, coinvolte nel processo di trasferimento dell'informazione da DNA a proteine. La scoperta di piccoli RNA non codificanti, abbondanti ed ubiquitari in tutte le cellule animali e vegetali ha modificato in parte tale dogma.

Questi piccoli RNA di circa 20-25 nucleotidi (nt) sono stati ritrovati nelle piante, negli animali e nei funghi. La loro scoperta ha dimostrato che molecole di RNA svolgono funzioni ben più varie del solo trasferimento dell'informazione.

I miRNA sono generati dall'enzima Dicer a partire da una molecole di RNA a doppia catena ed il loro principale meccanismo d'azione è quello di inibire a livello post-trascrizionale RNA messaggeri (mRNA) riconosciuti sulla base di omologia di sequenza.

I miRNA costituiscono una numerosa classe di geni endogeni filogeneticamente conservati, la cui funzione è di inibire l'espressione genica principalmente attraverso l'inibizione della traduzione. Essi originano da precursori a RNA bicatenario, che tuttavia si generano in seguito ad appaiamento intracatenario e formazione di strutture a forcina in RNA a singola catena. Anch'essi agiscono attraverso l'appaiamento con

regioni di omologia presenti su mRNA bersaglio, tuttavia tale omologia è imperfetta. Perciò si ritiene che numerose decine o centinaia di geni siano bersagli di miRNA. L'espressione temporale e tessuto specifica di miRNA suggerisce che i miRNA svolgano un importante ruolo in svariati processi biologici attraverso la regolazione dell'espressione dei propri bersagli genici.

La scoperta dei miRNA ha perciò stabilito l'esistenza di nuovi meccanismi molecolari implicati nella difesa contro elementi genetici mobili, nella stabilità del genoma e nella regolazione dell'espressione di geni codificanti per proteine. L'importanza dei miRNA nello sviluppo e nei processi di determinazione cellulare emerse fin dalla scoperta iniziale di questa classe genica.

Il primo membro della famiglia, lineage-4 (*lin-4*), fu scoperto nel 1993 nel nematode *Caenorhabditis elegans*.³⁸

Nel 2000, il secondo piccolo RNA non codificante, *let-7* (*let-7*) fu scoperto sempre da studi svolti in *C. elegans*.³⁹

Analisi filogenetiche dimostrarono che *let-7*, a differenza di *lin-4*, era conservato in tutti gli organismi studiati, suggerendo che il meccanismo di regolazione dell'espressione genica messo in atto da questi piccoli RNA non codificanti, definiti micro RNA (miRNA o miR), fosse esso stesso filogeneticamente conservato. La caratterizzazione di *let-7* suggerì anche l'esistenza di un meccanismo molecolare comune alla base della azione dei miRNA: questi piccoli RNA di circa 21-25 nucleotidi funzionavano come anti-senso regolando l'espressione di mRNA a livello post-trascrizionale. Nel 2001 fu riportata l'identificazione e caratterizzazione di un gran numero di miRNA in *C. elegans*, *Drosophila* e mammiferi. I miRNA sono codificati da geni endogeni, il cui prodotto maturo è precisamente definito e la cui espressione è strettamente controllata.⁴⁰⁻⁴¹ La maggioranza dei miRNA è localizzata in introni di geni codificanti per proteine o sono trascritti in RNA policistronici.

La trascrizione dei miRNA avviene ad opera dell'RNA polimerasi II.

Dopo la trascrizione, la struttura a RNA bicatenario si forma grazie all'appaiamento intra-catenario del trascritto primario (*pri-miRNA*), che forma una struttura secondaria a forcina. Quest'ultima viene riconosciuta e tagliata da Droscha per formare il precursore del miRNA (*pre-miRNA*), di circa 70-90 nucleotidi, il quale viene portato nel citoplasma da Exportin-5. I precursori di miRNA vengono processati mediante l'azione

di un enzima chiamato Dicer.⁴²⁻⁴³ Drosha e Dicer sono membri della famiglia RNase III di nucleasi conservate evolutivamente in vermi, mosche, funghi e mammiferi. Entrambi gli enzimi tagliano RNA a doppia catena lasciando due nucleotidi sporgenti alla estremità 3' nel punto di taglio. Drosha è localizzata nel nucleo, dove riconosce e taglia i pri-miRNA generando pre-miRNA. Dicer è invece presente nel citoplasma, dove riconosce il prodotto di Drosha, il pre-miRNA, e genera il miRNA maturo costituito da due catene appaiate, in genere in modo imperfetto. L'efficienza con cui Dicer agisce su pre-miRNA dipende dalla presenza dei due nucleotidi sporgenti al 3' e da una minima lunghezza dello stelo della forcina. La presenza dei primi nucleotidi sporgenti al 3', generati da Drosha, determina il secondo sito di taglio ad opera di Dicer. I miRNA appaiono operare principalmente attraverso la repressione della traduzione. I miRNA animali presentano un'omologia imperfetta con i propri geni bersaglio e le regioni di omologia sono essenzialmente limitate alle regioni 3' non codificanti degli mRNA.

Funzioni molecolari e biologiche dei miRNA

L'inibizione post-trascrizionale messa in atto da miRNA sui propri bersagli genici opera principalmente attraverso la repressione della traduzione. Sebbene tale meccanismo sia stato dimostrato per diversi miRNA, ad iniziare da lin-4 e let-7 in *C. elegans*, esistono significative eccezioni a questa regola. Nei mammiferi, è stato riportato che miR1 e miR124, rispettivamente espressi nel muscolo scheletrico e nel cervello, sono in grado di indurre la riduzione dei livelli di circa un centinaio di mRNA, guidando le cellule verso un profilo di espressione caratteristico muscolare o neurale.

Date le caratteristiche associate ai miRNA, essi certamente svolgono un ruolo importante nella biologia cellulare e nello sviluppo di numerosi organismi.

È stato dimostrato che alcuni miRNA sono implicati nel differenziamento di alcune cellule specializzate. Nel topo, il miR-181 è espresso preferenzialmente nei linfociti B e la sua espressione ectopica nelle cellule progenitrici staminali promuove il differenziamento verso la filiera B sia in coltura cellulare che in vivo. Questi risultati indicano che il miR-181 è un componente dell'apparato molecolare responsabile del differenziamento ematopoietico.⁴⁴

L'espressione di miRNA può essere regolata da segnali extracellulari. In cellule di mammifero è stata dimostrata la modulazione dell'espressione dei miRNA durante il

differenziamento delle cellule HL60 in cellule monocitarie/macrofagiche in seguito a trattamento con TPA.⁴⁵

Questi risultati suggeriscono che miRNA abbiano un ruolo rilevante nello sviluppo e nel differenziamento cellulare di svariati tessuti dai nematodi ai mammiferi. Nell'uomo e nel topo, infatti, l'espressione dei miRNA è tessuto specifica, con alcuni miRNA espressi preferenzialmente in specifici tessuti.⁴⁶ Ad esempio, miR-1b, miR-7-1 e miR-99b sono espressi preferenzialmente nel cervello, miR-18 nell'ovaio, miR21 nelle cellule ematopoietiche, testicoli ed ovaio, il miR-28 nei soli linfociti B, ed i miR-133a e miR-133b sono espressi nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco. Inoltre, l'espressione di specifici miRNA serve anche a determinare il profilo di espressione di geni codificanti proteine caratteristico di ciascun tessuto. I meccanismi che regolano l'espressione dei miRNA non sono del tutto chiariti, e le loro funzioni biologiche, dipendenti in gran parte dal riconoscimento dei geni bersaglio, sono oggetto di numerosi studi.

MiRNA e cancro

Numerosi studi hanno cercato negli ultimi anni di spiegare il ruolo dei micro RNA nella cancerogenesi, essi possono svolgere un ruolo critico nello sviluppo delle neoplasie attraverso vari meccanismi. Esistono due tipi di miRNA, essi possono avere funzione oncogenica o oncosoppressiva.⁴⁷

L'upregolazione dei miR oncogenici riduce l'espressione degli oncosoppressori, ma la downregolazione dei miR tumor suppressing induce un aumento della produzione degli oncogeni

Mutazioni loss of function nei tumor suppressing miR e mutazioni nella sezione target degli oncogeni possono indurre la tumorigenesi.

Mutazioni loss of function negli oncogenic miR e mutazioni nelle sezioni target dei geni oncosoppressori possono aumentare la sintesi di proteine oncosoppressive con riduzione della tumorigenesi.

Il primo lavoro che ha evidenziato tale associazione è stato svolto sulle leucemie umane in particolare la leucemia linfatica cronica (LLC). Circa il 50% dei casi di LLC presenta una delezione alla regione cromosomica 13q14. La delezione, più spesso emizigote, talvolta coinvolge entrambi i cromosomi determinando la comparsa di delezioni

omozigoti. La caratterizzazione di una piccola regione di circa 30kb, comune bersaglio di delezioni omozigoti, ha evidenziato all'interno di essa solo due geni codificanti per microRNA, miR15a e miR16-1. Analisi di espressione hanno dimostrato che questi due geni sono modulati negativamente in oltre il 68% dei casi di CLL, suggerendo la perdita di espressione di uno dei due o di entrambi sia coinvolta nella patogenesi della LLC.⁴⁸

Sono anche stati evidenziati cambiamenti nucleotidici che inibiscono la maturazione del precursore. Poiché delezioni della stessa regione q14 del cromosoma 13 sono presenti nel 50% dei linfomi mantellari, nel 15-40% dei mielomi e nel 60% dei carcinomi prostatici, è possibile che miR15 e/o miR16 siano coinvolti anche in queste neoplasie.

Altri esempi di microRNA la cui espressione è significativamente ridotta in tumori umani sono i miR-143 e miR-145, i quali presentano livelli ridotti di espressione in tumori del colon, in linee cellulari e polipi rispetto a tessuti normali. Il miR-145 appare presentare livelli di espressione ridotti nella maggioranza dei tumori studiati.⁴⁹

I miRNA non sono solamente sottoespressi in neoplasie umane. Vi sono diversi esempi di sovra-espressione. Il miR-155 è sovraespresso in alcune forme di linfoma e nei tumori mammari.⁵⁰ Questi risultati indicano che miR-155 funziona come un oncogene e coopera con MYC nella linfomagenesi e potenzialmente in altre neoplasie umane. Un altro miRNA che viene sovra-espresso in numerosi tumori umani, suggerendone una funzione oncogenica, è il miR21, sovra-espresso nella maggioranza dei tumori mammari e colon-rettali. Un esempio interessante di anomalia in un miR associato a neoplasie umane è costituito dal miR-142. La caratterizzazione di una traslocazione t(8;17), associata ad una forma di leucemia linfatica acuta dovuta alla sovra-espressione di MYC. MYC è traslocato al locus per miR-142, il quale perde la regione a valle della struttura a forcina e fonde il proprio trascritto primario con il trascritto di MYC. Ciò probabilmente determina l'accumulo del trascritto di fusione e la sovraespressione di MYC. In questo caso, la traslocazione cromosomica ha posto un oncogene, attivandolo, sotto il controllo di un gene codificante per un miRNA.

Let-7 agirebbe come soppressore di RAS. In molti tipi di tumori umani, ed in particolare nei tumori polmonari, let-7 è significativamente sotto-espresso rispetto al tessuto normale. In questi, è stata dimostrata una relazione inversa tra livelli di K-RAS o N-RAS e di let-7, suggerendo un possibile meccanismo associato let-7 nel cancro.⁵¹ Il miR-145, sotto-espresso in molte neoplasie umane, ha tra i propri bersagli l'oncogene

FLI1. Questo oncogene viene attivato nel sarcoma di Ewing mediante fusione con EWS e per inserzione di retrovirus. E' possibile che la sotto-espressione di miR-145, possa mantenere livelli alti di FLI1 in svariati tumori umani.⁵² In molti casi, sono noti solo presunti bersagli genici, ovvero geni i cui mRNA presentano sequenze 70-100% complementari a miRNA.

I miRNAs contribuiscono al processo di trasformazione neoplastica sia come oncosoppressori, quali ad esempio miR-16 o let-7, che come oncogeni, come miR-155. La variazione dell'espressione dei miRNA sembra essere il principale meccanismo attraverso cui questi piccoli RNA contribuiscono alla tumorigenesi. Infatti, profili di espressione di miRNA basati sull'impiego di microarray dimostrano che i tumori presentano quadri di espressione alterati rispetto ai rispettivi tessuti normali, suggerendo che questi quadri di espressione siano, direttamente o indirettamente, coinvolti nella patogenesi neoplastica. Ad ulteriore riprova della rilevanza della alterata espressione dei miRNA nella patogenesi neoplastica, vi è l'osservazione che caratteristici quadri di espressione di miRNA sono anche associati a specifiche caratteristiche cliniche o patologiche di neoplasie umane.

MiRNA e carcinoma ovarico

Numerosi studi con i microarray hanno dimostrato differenti profili trascrizionali dei miRNA nel carcinoma ovarico.^{53,54,55}

Molti miRNA sono marcatamente downregolati nei carcinomi ovarici sierosi ad alto grado.

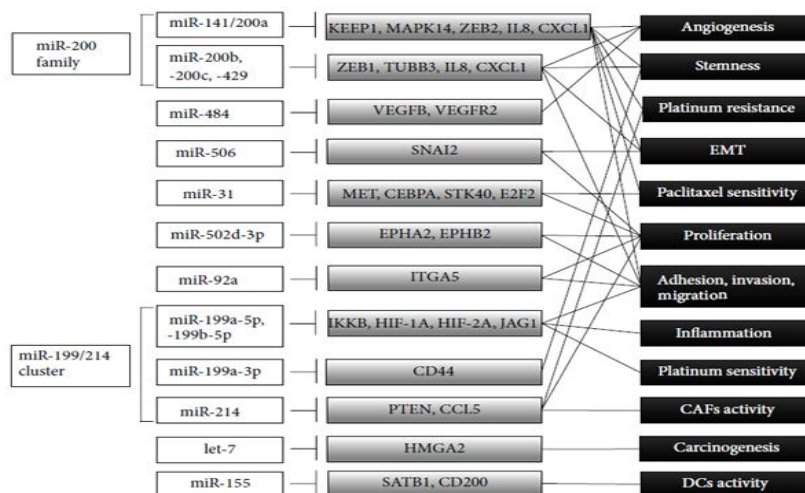


FIGURE 1: Schema of mechanism and target genes of potential therapeutic miRNAs for ovarian cancer.

Iorio et al hanno riportato differenze di espressione dei miRNA tra cellule di tumore ovarico e tessuto normale. Su 29 miRNA selezionati hanno evidenziato 4 (miR141, miR200a, miR200b e miR200c) upregolati e al 25 erano downregolati inclusi miR199a, miR140, miR145 e miR125b nei campioni di carcinoma ovarico confrontati con quelli sani.⁵⁶

Calura et al hanno analizzato miR profiles di EOC in stadio I e hanno trovato differenze di espressione tra i miRNA espressi nei diversi istotipi, Il carcinoma a cellule chiare è caratterizzato da un'alta espressione di miR-30a-5p e miR-30a-3p mentre il carcinoma mucinoso mostra alti livelli di miR-192 e miR194.⁵⁷

Nam et al hanno studiato il miR expression profile di 20 carcinomi sierosi ovarici ad alto grado e li hanno confrontati con tessuti sani, nel carcinoma ovarico hanno identificato 11 miRs upregolati, tra cui miR141, miR200a, miR200b e miR200c, e 12 downregolati tra cui miR-10b, miR-26a e miR-145.⁵⁸

Nel carcinoma ovarico è stata evidenziata un'azione di miRNA 181a nella transizione epitelio mesenchimale in quanto tale miRNA promuove TGF β che a sua volta inibisce SMAD7.⁵⁹

Nel tumore ovarico è stata segnalata una correlazione tra la prognosi e il miRNA 200c che risultava downregolato nelle pazienti con prognosi peggiore.¹³

Il progetto TCGAtlas ha evidenziato 3 miR sottotipi, le analisi dei network hanno evidenziato dei network regolatori che correlano con la prognosi del sottotipo mesenchimale, identificando 8 miRNA che correlano con una prognosi peggiore (miR-25, miR29c, miR-101, miR-128, miR-141, miR-182, miR200a, miR-506).⁶⁰

MiRNA sierici

Recenti evidenze scientifiche hanno rivelato che i miRNA vengono regolarmente secreti dalle cellule tumorali nei fluidi biologici come il siero e il plasma oltre che la saliva, le urine e il latte materno.

Esistono recenti evidenze scientifiche sull'impatto dei miRNA circolanti non solo nel tessuto di origine ma anche nella regolazione di espressione genica di cellule target a distanza.⁶¹ I miRNA circolanti sono resistenti in numerose condizioni di stress come estremi livelli di pH, la bollitura, lungo tempo di conservazione e cicli di ripetuti di congelamento e scongelamento.

Questa particolare resistenza è legata all'associazione con proteine complesse come Ago2 e la presenza di miRNA all'interno di microvescicole.⁶²

Dal 2008 ad oggi numerosi studi hanno evidenziato la rilevanza clinica di miRNA sierici come possibili markers prognostici e diagnostici del carcinoma ovarico

Taylor et al hanno identificato 8 miRNA differenzialmente espressi nel siero di pazienti sani e di donne affette da carcinoma ovarico.⁶³

Oltre alla capacità di distinguere donne sane da donne affette da carcinoma ovarico i miRNA sierici sono stati studiati per comprendere il loro ruolo come marcatori prognostici.⁶⁴⁻⁶⁵

Zheng et al hanno dimostrato in 360 pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato che una bassa concentrazione sierica di let 7f era significativamente correlato con una bassa PFS.⁶⁶

Xu et al hanno studiato la concentrazione di miR 21 trovando come un suo aumento può essere correlato a stadi di malattia avanzata con cattiva prognosi.⁶⁷

Resnick et al hanno comparato 21 miR sierici tra pazienti affetti da carcinoma ovarico e soggetti sani. miR-21, miR-29a, miR-92, miR93 e miR126 erano significativamente overespressi nel siero di pazienti affetti da carcinoma ovarico , mentre miR99b, miR127 e miR155 erano significativamente downespressi.⁶⁸

Hausler et al hanno fatto lo stesso lavoro su una diversa casistica di pazienti trovando 147 miR differenzialmente espressi. Tra gli altri miR-30c-1-3p era significativamente upregolato mentre miR-181a-3p, miR-342-3p e miR-450b-5p erano significativamente down regolati.⁶⁹

Kan et al hanno trovato un' iperespressione dei miR della famiglia miR200 in pazienti affetti da cancro suggerendo che la loro presenza possa essere usata come predittore di carcinoma ovarico. MiR 26a, miR132, miR-145 e let-7b possono essere considerati come potenziali biomarkers di carcinoma ovarico.⁷⁰

Tutti gli studi citati e molti altri pubblicati negli ultimi anni supportano l'idea di un possibile utilizzo dei miRNA sierici nella diagnosi e nel trattamento del carcinoma ovarico. L'aumentata sensibilità delle tecniche di analisi e la riduzione del costo di tali tecniche renderà queste tecniche sempre più utilizzabili nel prossimo futuro.

OBIETTIVI

Gli obiettivi del mio progetto di ricerca sono i seguenti:

- 1) Identificare un miRNA profile delle pazienti affette da carcinoma ovarico che consenta di distinguere precocemente le pazienti platino sensibili da quelle platino resistenti.
- 2) Identificare miRNA sierici rilasciati dal tumore ovarico che siano differenzialmente espressi tra le pazienti platino sensibili e le pazienti platino resistenti
- 3) Confrontare il profilo di espressione dei miRNA di pazienti affette da carcinoma ovarico con quello di soggetti sani per identificare uno o più miRNA che possano essere utilizzati come marcatori precoci di malattia
- 4) Identificare, mediante la tecnica dell'RNA seq geni, mRNA, miRNA e lncRNA differenzialmente nelle pazienti platino sensibili e platino resistenti.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI

Le pazienti arruolate in questo studio sono donne affette da carcinoma ovarico avanzato operate presso i reparti di Ginecologia dell'Ospedale San Gerardo di Monza, degli Spedali Civili di Brescia e del Policlinico Gemelli di Roma.

Le pazienti sono divise in tre coorti: Monza, Brescia e Roma.

Tutte le pazienti al momento dell'intervento chirurgico di asportazione della neoplasie hanno donato un campione di tessuto tumorale eccedente alla diagnosi e un'aliquota di sangue periferico (e per una parte di esse è stato conservato anche il siero), previo firma di consenso informato scritto, alle biobanche di appartenenza.

Oltre alle donne affette da carcinoma ovarico nello studio sono stati arruolati due gruppi di 52 e 13 donne sane, rispettivamente presso gli Spedali Civili di Brescia e il Policlinico Gemelli di Roma, che hanno donato il sangue periferico da cui è stato separato il siero utilizzato per lo studio dei miRNA sierici. L'età media delle donne del primo gruppo era 61, quella del secondo 52.

Monza

I campioni tumorali prelevati presso il reparto di Ginecologia dell'Ospedale di Monza sono conservati all'interno della Biobanca Pandora.

La biobanca "Pandora" raccoglie tessuti tumorali congelati di carcinoma ovarico epiteliale (EOC) creata nel corso degli ultimi 20 anni dal Dipartimento di Oncologia "Mario Negri" di Milano, in collaborazione con l'Ospedale San Gerardo (Monza, Italia). Le biopsie sono regolarmente prelevate in sala operatoria, congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C presso la biobanca "Pandora" Mario Negri.

Per ogni biopsia, le caratteristiche istologiche, i parametri clinici e dati di follow-up dopo la terapia sono memorizzati in una banca dati elettronica che affianca la collezione di tessuto tumorale, il sistema di raccolta dei dati clinici che correda la biobanca

“Pandora- IGOCTB Biobank (Italian Gynaecologic Ovarian Cancer Tissue Bank)”
denominato ”IGOCTB-HeavyBase.

I campioni tumorali delle 143 pazienti arruolate in questo studio sono stati prelevati dal
16/04/1992 al 14/05/2012.

Nelle tabella che segue sono riportate le caratteristiche delle pazienti:

Età media		57
Stato menopausale	Premenopausa	41
	Postmenopausa	102
Tumore Residuo	0	26
	0<TR<1	86
	TR>1	31
FIGO stage	III	123
	IV	20
Ascite	sì	72
	no	71
Grading	G2	25
	G3	13
Linfonodi	Positivi	32
	Negativi	8
	Non asportati	103
PFI (Platinum Free Interval)	PFI<6	47
	6<PFI<12	27
	PFI>12	69
PFS media		31
OS media		53
Follow up medio		54

	PFI<6	6<PFI<12	PFI>12
OS media	25	43	76
PFS media	7	15	53

Brescia

Un'analoga collezione di tessuti tumorali e siero prelevati da pazienti affette da carcinoma ovarico e di siero delle stesse pazienti è stata creata presso il laboratorio Nocivelli degli Spedali Civili di Brescia. Le 99 pazienti arruolate in questo studio hanno donato i loro campioni dal 10/06/2002 al 13/09/2013.

Nelle tabella che segue sono riportate le caratteristiche delle pazienti di Brescia:

Età media		62
Stato menopausale	Premenopausa	22
	Postmenopausa	77
Tumore Residuo	0	21
	0<TR<1	20
	TR>1	58
FIGO stage	III	83
	IV	16
Ascite	sì	85
	no	14
Grading	G2	23
	G3	76
Linfonodi	Positivi	37
	Negativi	16
	Non asportati	46
PFI (Platinum Free Interval)	PFI<6	42
	6<PFI<12	21
	PFI>12	36
PFS media		21
OS media		37
Follow up medio		38

	PFI<6	6<PFI<12	PFI>12
OS media	19	35	61
PFS media	8	14	41

Roma

I campioni tumorali e il siero provenienti dal reparto di Ginecologia del Policlinico Gemelli di Roma sono stati collezionati dal gennaio 2005 all'ottobre 2012.

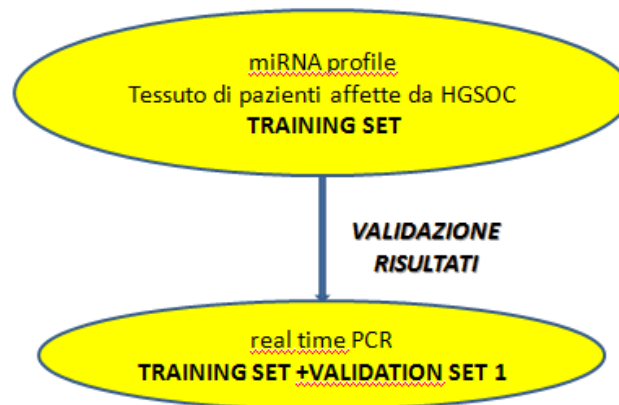
Età media		57
Stato menopausale	Premenopausa	16
	Postmenopausa	42
FIGO stage	III	55
	IV	3
Ascite	sì	31
	no	27
Grading	G2	11
	G3	47
Linfonodi	Positivi	21
	Negativi	36
	Non asportati	1
Follow up medio		38

Nelle successive descrizioni degli esperimenti le pazienti del gruppo di Brescia saranno definite *Training set*, quelle del gruppo di Milano - Monza saranno definite *Validation set 1* e quelle del gruppo di Roma *Validation set 2*

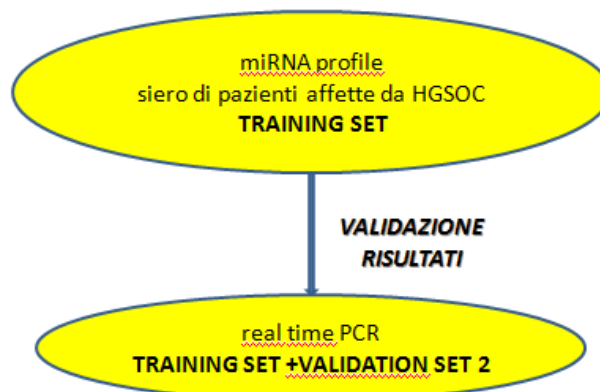
DISEGNO DELLO STUDIO

Di seguito descriverò schematicamente il progetto e successivamente saranno descritti i metodi utilizzati per lo svolgimento dello stesso.

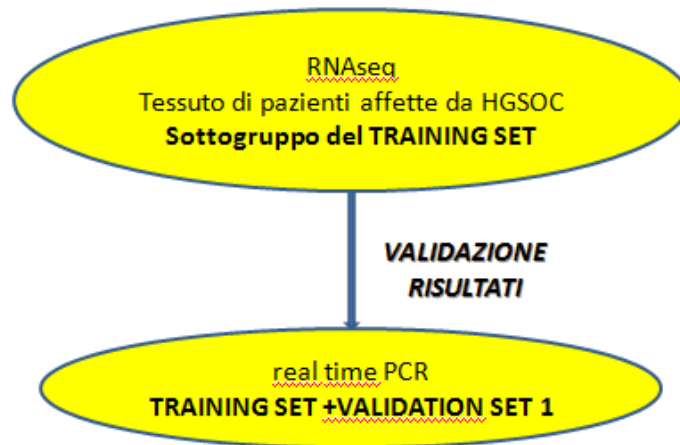
I campioni delle pazienti del training set sono stati analizzati per la valutazione del miRNA profile mediante i microarrays, successivamente erano previsti gli esperimenti di validazione dei risultati sul validation set 1 e sullo stesso training set.



Oltre al miRNA profile tissutale è stato eseguito lo studio sui miRNA sierici del training set validato in real time PCR sul validation set2 e sullo stesso training set.



In ultimo è stato eseguito il sequenziamento mediante RNAseq di un gruppo di pazienti del training set e i risultati sono stati validati mediante real time PCR sul training set e sul validation set 1.



METODI

Microarray

Il principio su cui si basa la tecnica dei microarrays è quello di ibridazione tra molecole complementari di acido nucleico a singolo filamento: la prima chiamata probe è attaccata covalentemente alla superficie di un vetrino ed ha una sequenza appositamente disegnata per potersi legare alla molecola complementare che si vuole studiare nel campione, chiamata target. Per amplificare il segnale e renderlo quindi più facilmente rilevabile in fase di analisi, molte copie della stessa probe vengono posizionate nello stesso punto del vetrino, in modo da formare uno spot. Nel caso di avvenuta ibridazione, essa sarà rilevata in fase di scansione del vetrino grazie alla fluorescenza emessa dalla molecola target marcata con un opportuno fluoroforo.

Analisi del miRNoma

Il protocollo di analisi dei microarray prevede l'impiego di RNA totale arricchito di miRNA.⁷¹

Per l'estrazione dell'RNA da tessuto tumorale viene utilizzato il attraverso miRNAeasy mini kit, seguendo il protocollo relativo all'estrazione del tessuto fresco congelato che prevede un'iniziale lisi meccanica mediante TissueLyser del campione all'interno del Qiazol e la successiva estrazione mediante estrattore automatico QiaCube.

La quantità di RNA di partenza è di 100 ng e il metodo di marcatura prevede la ligazione della cianina 3-pCp al 3' delle molecole di RNA del campione: la prima fase è la defosforilazione dell'RNA; quindi si procede con la denaturazione termica del campione seguita dalla fase di ligazione della cianina per mezzo dell'enzima T4 RNA ligasi. Il campione viene seccato in una centrifuga a vuoto, fino ad ottenere un pellet sul fondo della provetta. Il campione deve essere risospeso in acqua RNase-free e buffer di ibridazione, e viene aggiunto inoltre il Blocking Agent, una soluzione che consente di saturare tutti i siti di legame aspecifico. Dopo un'incubazione a 100°C per 5 minuti il campione è pronto per l'ibridazione: questa fase è molto delicata, in quanto su un singolo vetrino vengono caricati 8 campioni diversi, separati uno dall'altro da una griglia chiamata gasket; una volta assemblata la camera di ibridazione, essa viene posta in un forno per 20 ore a 55°C, in rotazione a 20 rpm.

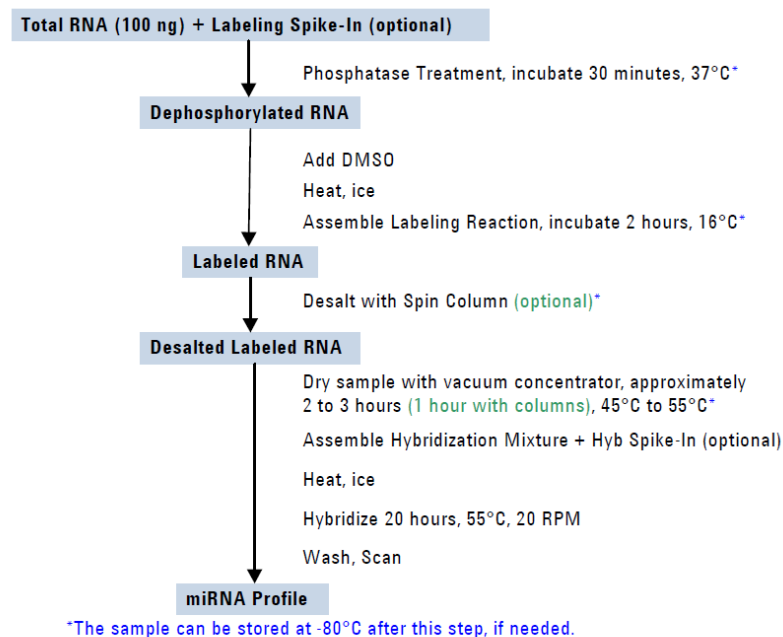


Figure 1 Workflow for sample preparation and array processing with the optional Bio-Rad columns and spike-ins.

Al termine della fase di ibridazione sono necessari diversi passaggi di lavaggio del vetrino, per rimuovere la fluorescenza aspecifica.

A questo punto il vetrino è pronto per la scansione, che viene effettuata sullo Scanner Agilent.

Analisi dei dati di espressione miRNA

Uno degli aspetti più importanti dell'analisi dei microarray è rappresentato dalla normalizzazione dei dati, per differenziare variazioni reali nei livelli di espressione genica da variazioni che possono essere correlate a parametri di scansione. Essa permette il confronto tra valori di espressione derivanti da esperimenti diversi, riducendo o eliminando errori o distorsioni legate alla lettura dello scanner. Per rendere comparabili i valori di espressione tra tutti gli esperimenti si procede con la normalizzazione della matrice di espressione.

In questo studio è stata utilizzata la normalizzazione Lowess o Loess che utilizza una funzione che compensa i bias intensità dipendenti.⁷²

Per l'analisi statistica delle differenze di espressione genica è stato utilizzato test Empirical Bayes che utilizza un approccio Bayesano empirico per il calcolo delle probabilità a posteriori di ogni gene di essere differenzialmente espresso

PCR

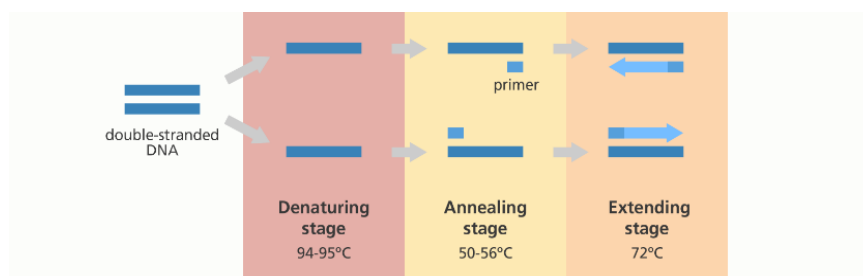
La procedura della PCR (polymerase chain reaction) si basa sull'utilizzo di enzimi noti come DNA polimerasi.³⁷ Questi enzimi termostabili sintetizzano i filamenti di DNA a partire dai deossiribonucleotidi e utilizzando il DNA come stampo. Le DNA polimerasi aggiungono i nucleotidi a molecole di DNA già esistenti denominati primers, essi rappresentano oligonucleotidi sintetici complementari alle sequenze di DNA bersaglio sui filamenti opposti che si trovano nelle posizioni estreme del segmento che deve essere amplificato.

Le estremità 3' dei primers sono rivolte l'una contro l'altra e sono posizionate in modo da permettere l'inizio della sintesi del DNA.

La PCR richiede quattro componenti: un campione contenente il segmento da amplificare, una coppia di primers, i deossinucleitidi trifosfato(dNTP) e la DNA polimerasi.

La miscela di reazione viene scaldata rapidamente per brevemente per ottenere la denaturazione del DNA separando così i due filamenti. La soluzione viene quindi raffreddata e in questo modo i primer possono ibridare con il DNA. I primers sono molto concentrati per aumentare la possibilità che si appaino al DNA denaturato in concentrazione minore prima che i filamenti si riassocino.

A questo punto il frammento di DNA associato al primer subisce l'attività della DNA polimerasi che utilizza i dNTP. Questi cicli di raffreddamento e riscaldamento vengono ripetiti per almeno 25 cicli. Ciascun ciclo amplifica di un fattore 2 la quantità del segmento del DNA, facendo aumentare la sua concentrazione in modo esponenziale.



La tecnica della PCR è una tecnica molto sensibile in effetti consente di rilevare e amplificare anche una sola molecola di DNA, per questa ragione è molto importante cercare di ridurre al minimo il rischio di contaminazione dei campioni.

Questa descritta fino ad ora è la tecnica base della PCR, di essa esistono due varianti molto utilizzate che hanno reso il metodo sempre più indispensabile in biologia molecolare.

Nel mio studio ho utilizzato la retrotrascrizione o RT PCR e la real time PCR.

Retrotrascrizione

La retrotrascrizione(RT PCR) consiste nel retrotrascrivere molecole di cDNA a partire da molecole di RNA, questa tecnica è molto importante in quanto consente di identificare i geni trascritti in mRNA ovvero solo quelle molecole di DNA che sono 'esprese'. L'enzima base di questi procedimenti è la trascrittasi inversa, un enzima che deriva dai retrovirus. Utilizzando questa tecnica è possibile creare una libreria di cDNA. La retrotrascrizione prevede l'utilizzo di enzimi, primers e reagenti diversi a seconda dell'acido nucleico di partenza quindi RNA e miRNA.

Per la retrotrascrizione dei miRNA abbiamo utilizzato mi Script RT Buffer e miScript Reverse Transcriptase, per la retrotrascrizione dell'RNA per i geni invece RT Buffer e RT Random Primers e l'enzima Reverse Transcriptase. I profili termici di reazione sono diversi per i due protocolli.

real time PCR

La PCR può essere resa quantitativa per stimare il numero di copie relativo di sequenze all'interno di un campione.

Questa tecnica consente di rilevare all'interno di un campione l'aumentata presenza di una sequenza di DNA quando questa è presente in quantità maggiore rispetto al normale per quel tipo di cellula.

La real time PCR viene eseguita mediante una sonda che emette un segnale fluorescente che viene emesso quando è presente il prodotto di PCR.

La rilevazione delle emissioni delle sonde avviene valutando quanto più velocemente l'emissione di fluorescenza raggiunge un livello soglia. Per definire questo valore si parla di CT che rappresentano il numero di cicli necessari per raggiungere e superare il livello soglia.

Come per la retrotrascrizione anche per la real time esistono due diversi sistemi in base al prodotto da amplificare, geni o miRNA.

Per la real time PCR per geni abbiamo utilizzato il Quanti Fast Sybr Green con due primers FW e RV, per i miRNA invece abbiamo utilizzato il Quanti Tect Sybr Green e Universal Primer.

L'RT PCR e la real time PC vengono integrate insieme per determinare il livelli di trascrizione relativa di geni e miRNA in una cellula in particolari condizioni.

Nel nostro studio le due tecniche sono state usate in combinazione.

RNA seq

Il profilo di espressione genica riveste un ruolo di primaria importanza per poter distinguere le pazienti con buona e cattiva prognosi e con diversa risposta al trattamento a base di platino. Questo tipo di studio può consentire di identificare una firma molecolare integrata.

La tecnologia dei microarray è efficace per identificare l'espressione dei geni noti ma l'istantanea che fornisce sul trascrittoma è incompleta. Con l'introduzione delle tecnologie NGS ed in particolare dell'RNA seq è stato possibile identificare i limiti dei microarray fornendo un approccio migliore per lo studio del trascrittoma.⁷³

Di seguito descriverò la tecnica e le differenze con i microarray che ad oggi rappresentano la tecnica maggiormente utilizzata per lo studio del trascrittoma.

Le più significative differenze tra i microarray e l'RNA seq sono le seguenti:

- la quantificazione assoluta dei trascritti
- la scoperta di nuovi trascritti, di nuove isoforme di trascritti noti, di varianti di splicing e di geni di fusione l'identificazione di nuovi trascritti include lncDNA miRNA e altri piccoli RNA che possono essere correlati con la stabilità dell'RNA
- l'identificazione di cambiamenti di singoli nucleotidi(SNVs)
- la possibilità di ottenere dati allele specifici e l'alta riproducibilità della tecnica

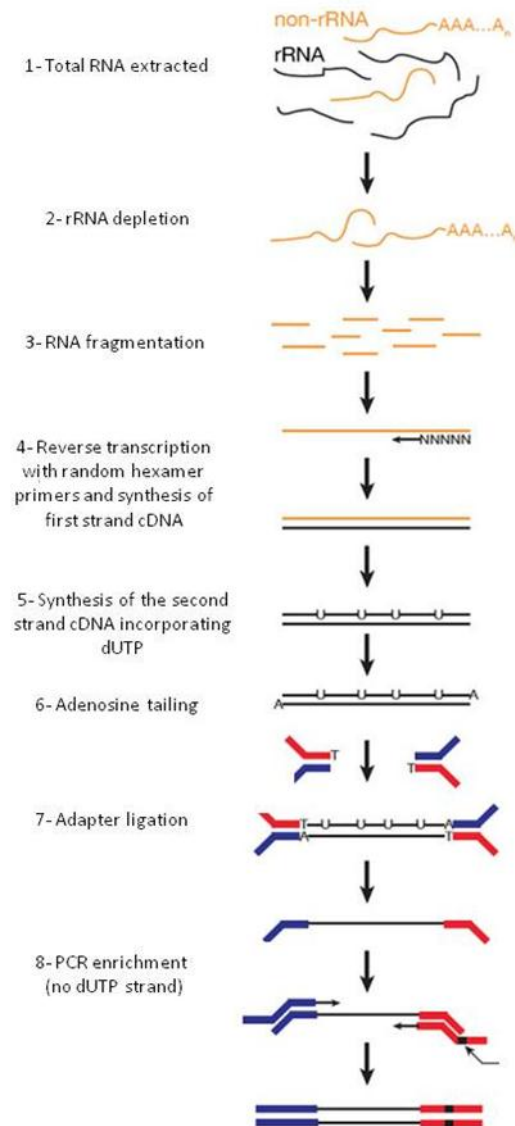
Deve essere però segnalata un'importante caratteristica che depone a favore dei microarray ovvero l'esistenza di metodi d'analisi standardizzati.⁷³⁻⁷⁷

Nonostante siano stati standardizzati numerosi metodi di analisi di RNA seq per la quantificazione e la definizione di nuovi trascritti, l'allineamento delle reads e l'identificazione di geni differenzialmente espressi ad oggi esiste ancora una notevole variabilità sui metodi di analisi.

In considerazione dei limiti delle analisi gene expression mediante microarray e dei numerosi vantaggi nel profilo di trascrizione che sembrano emergere grazie all'utilizzo della tecnologia dell'RNA seq abbiamo deciso di utilizzare questa metodica per investigare il trascrittoma e in particolare le differenze che emergono tra i campioni tumorali di pazienti platino sensibili e di pazienti platino resistenti.

Per il sequenziamento dell'RNA il nostro gruppo ha utilizzato il kit Illumina TruSeq stranded total RNA kit.

Il sequenziamento avviene mediante i seguenti passaggi ⁷⁸:



L'RNA estratto viene controllato esaminando l' integrità e la qualità, determinando il RIN (RNA Integrity Number) e il DIV200 (percentuale di frammenti di nucleotidi >200).

L'RNA ribosomiale viene separato dall'RNA totale utilizzando delle beads magnetiche.

L'RNA viene quindi separato in multipli frammenti in base ai punti di rottura.

Successivamente viene retrotrascritto in cDNA ad opera di enzimi di retrotrascrizione e utilizzando dei primers random.

Viene quindi sintetizzata la catena di DNA complementare e successivamente viene rimosso il template di RNA.

La terminazione 3' viene legata a particolari adattatori che vengono utilizzati come index diversi per identificare i frammenti provenienti dallo stesso paziente.

Seguirà un'amplificazione mediante PCR e successivamente le librerie saranno normalizzate e quindi sequenziate.

Questi esperimenti sono stati effettuati presso i laboratori di Personal Genomic S.r.l dell'Università di Verona.

Analisi risultati RNAseq

I dati generati sono stati analizzati dal gruppo di biostatistica e bioinformatica guidato dalla Professoressa Chiara Romualdi dell'Università di Padova.⁷⁹⁻⁸²

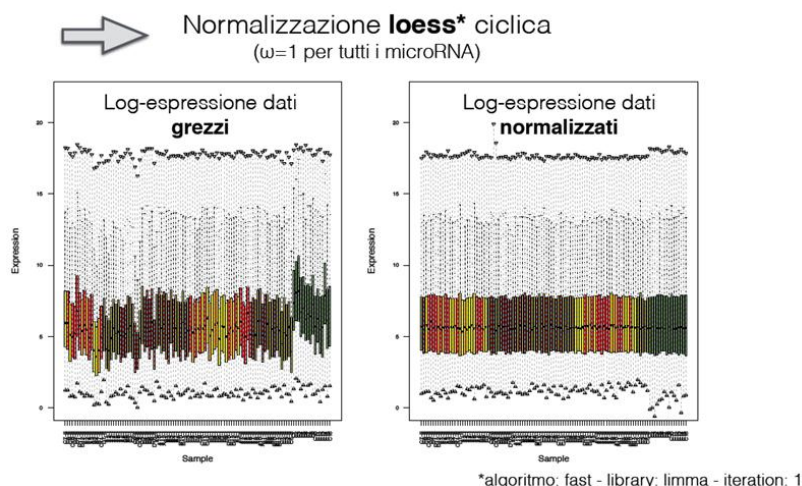
Il primo passaggio consiste nel controllo di qualità delle reads mediante il format FASTQuality. Vengono successivamente eliminate le reads di scarsa qualità e analizzate quelle di migliore qualità, esse vengono allineate con il genoma di riferimento (*H. Sapiens*, NCBI GRCh38), vengono calcolati e normalizzati livelli di espressione dei trascritti e in ultimo vengono comparati i livelli di espressione nei diversi campioni.

RISULTATI

ANALISI miRNA TISSUTALI

I campioni di carcinoma ovarico sieroso ad alto grado sono stati analizzati mediante la tecnica dei microarray per l'analisi di miRNoma per poter distinguere le pazienti platino sensibili da quelle platino resistenti evidenziando anche correlazioni con OS e PFS.

Dopo la scansione i campioni sono stato standardizzati utilizzando le procedure normalizzazione ciclica loess, l'immagine che segue mostra i dati grezzi e la loro successiva normalizzazione.



Per ogni miRNA è stata calcolata la mediana del valore di espressione, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi e sono stati confrontati con i dati di OS e PFS delle pazienti.

TESSUTO

(Resistenti, Parzialmente) VS (Sensibili)

(R,P) vs (S)	rank Diff.Exp.	logFC	AveExpr	P.Value*	adj.P.Val*	OS P.Value (mediana)*	PFS P.Value (mediana)*
differenziate espressi: ρ -value \leq 0.01							
1 hsa-miR-199b-5p	4	0,847	6,04	0,002	0,166	0,002	0,001
2 hsa-miR-423-5p	2	0,362	5,577	0,001	0,166	0,009	0,004
3 hsa-miR-455-3p	3	0,769	4,462	0,002	0,166	0,005	0,001
4 hsa-miR-22-3p	3	0,616	8,726	0,004	0,209	0,009	0,018
differenziate espressi: ρ -value \leq 0.05							
5 hsa-miR-199a-3p	11	0,667	9,398	0,02	0,639	0,007	0,003
6 hsa-miR-15b-5p	12	-0,319	9,655	0,022	0,639	0,039	0
7 hsa-miR-140-5p	20	0,297	5,219	0,039	0,639	0,032	0,003
8 hsa-miR-1246	22	0,482	6,161	0,042	0,639	0,008	0,017
9 hsa-miR-320c	10	0,32	7,294	0,017	0,632	0,04	0,032

* Significatività PValue: \leq **0.01** ; \leq **0.05**

Sul tessuto sono stati identificati 9 miRNA differenzialmente espressi e con p value significativo in OS e PFS.

L'adjusted p value misura la significatività dei test con ipotesi multipla, in cui si definisce o meno il livello per entrare nel processo di una singola ipotesi H_j , considerando i valori delle altre statistiche coinvolte.⁸³ La combinazione di migliaia di geni aumenta la probabilità di errore e quindi può portare ad un aumento dei falsi positivi.

Come si può vedere dalla tabella pur avendo un p value statisticamente significativo nessun miRNA ha un adjusted p value statisticamente significativo.

Non avendo identificato alcun miRNA differenzialmente espresso non è stato possibile procedere con le validazioni in real time PCR come inizialmente previsto dal progetto.

Questi dati risultano in contrasto con quanto emerge in letteratura e anche con i risultati di un progetto condotto dal gruppo di ricerca con cui ho collaborato in questi anni, questo progetto è stato condotto su un gruppo di pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a trattamento neoadiuvante.

Abbiamo pertanto deciso di validare sul validation set 1 i risultati ottenuti sul gruppo di pazienti sottoposte a chemioterapia neoadiuvante.

Di seguito descriverò brevemente la casistica studiata nel paper di riferimento e i risultati utilizzati per gli esperimenti di validazione.⁸⁴

Il campione era composto da 82 donne affette da carcinoma ovarico sottoposte a laparoscopia esplorativa e quindi a chemioterapia con quattro cicli carboplatino e paclitaxel a finalità neoadiuvante.

Sono stati confrontati i campioni tumorali prelevati in occasione della laparoscopia esplorativa e quelli prelevati in occasione della laparotomia post chemioterapia.

Da una prima analisi sono risultati differenzialmente espressi 369 miRNA. L'analisi multivariata ha identificato 4 miRNA (miR199a-3p, miR199a-5p, miR-181a-5p, let-7g-5p) differenzialmente espressi associati con PFS e OS.

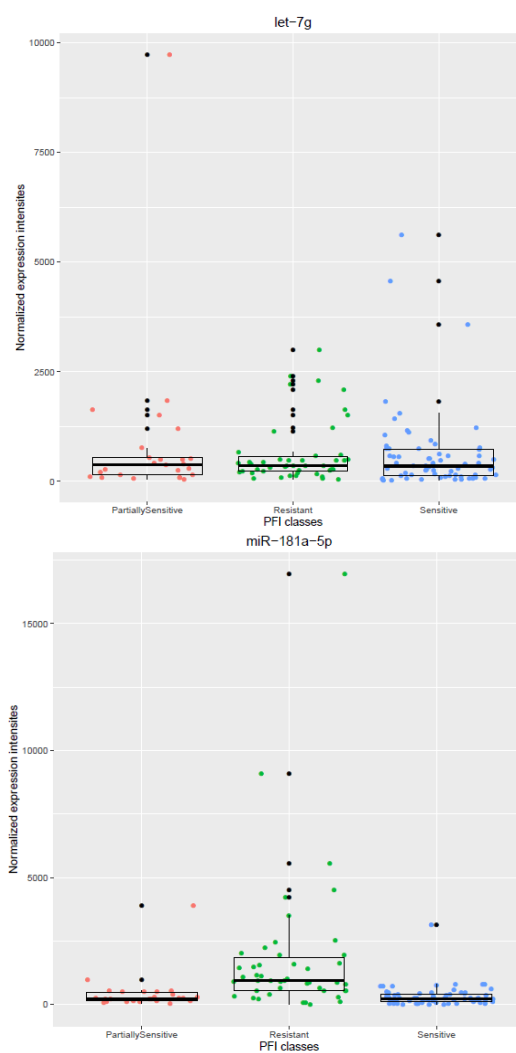
Sui campioni tumorali prelevati dalle pazienti del training set 1 abbiamo effettuato la real time PCR su questi 4 miRNA ottenendo i seguenti risultati confrontandoli sulla base del PFI:

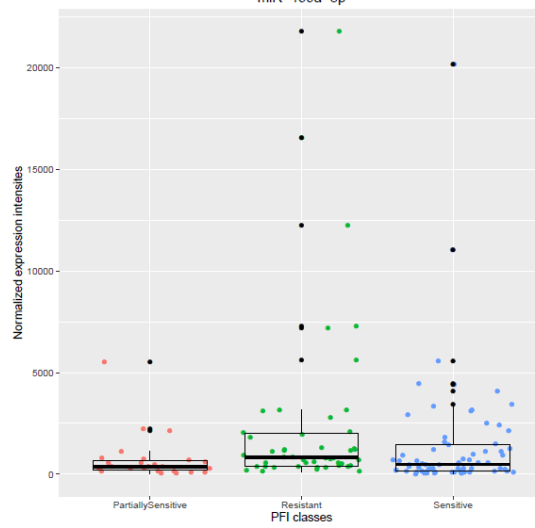
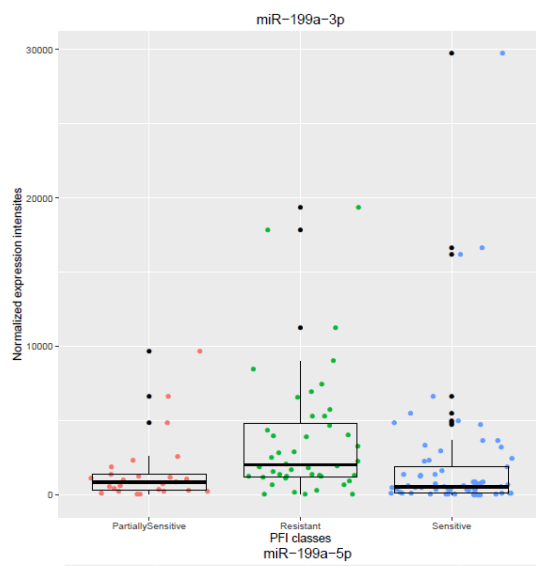
	p-value		
	sensitive vs partially sensitive	partially sensitive vs resistant	sensitive vs resistant
miR-181a-5p	0.4951	0.002604	0.0008508
miR-199a-3p	0.4849	0.008414	0.06362
miR-199a-5p	0.08771	0.01422	0.1818
let-7g	0.5524	0.5605	0.9653

Solo il miR 181a-5p risulta validato in real time PCR con correlazioni con OS, PFS e PFI.

Per la normalizzazione abbiamo usato SNORD 68, RNU5a e RNU6b

Nei boxplot che seguono vi sono i vari miRNA e i risultati divisi per classi di platino sensibilità.





ANALISI miRNA SIERICI

Il secondo obiettivo di questo progetto è l'identificazione dei miRNA sierici che correlino con la prognosi e che siano differenzialmente espressi nei soggetti affetti da neoplasia rispetto ai soggetti sani.

Per questa parte del progetto abbiamo utilizzato il siero di pazienti e donatrici sane di Brescia (training set) e quello di pazienti e donatrici sane di Roma (validation set2).

E' stato necessario ricorrere a questa terza coorte in quanto nella biobanca Pandora non erano stati collezionati i sieri delle pazienti di cui erano disponibili i campioni tumorali.

Nella tissuteca di Brescia oltre ai campioni tumorali delle pazienti affette da carcinoma ovarico è stato congelato al momento della diagnosi anche il siero, questo ha consentito di utilizzare questo set di pazienti per gli esperimenti sui miRNA sierici.

I miRNA sono stati estratti utilizzando il miRNAeasy mini kit Qiagen.

La valutazione dei profili di espressione genica è stata effettuata seguendo il protocollo Agilent.

L'analisi dei risultati non ha evidenziato miRNA differenzialmente espressi tra pazienti platino sensibili e platino resistenti. Gli stessi esperimenti sono stati effettuati su campioni di siero provenienti da 19 soggetti sani e hanno consentito di identificare 97 miRNA differenzialmente espressi, di questi 92 erano up regolati e 5 downregolati.

E' stata effettuata una comparazione tra i miRNA differenzialmente tra siero di pazienti affette da HGS-EOC e da soggetti sani, sono stati selezionati quelli con un fold change più alto e con l'adjusted p-value più basso. Sono stati esclusi i Ct > 36.

I miRNA selezionati sono stati miR1246, miR547-5p, miR595, miR483-3p, miR4290, miR2278, miR32, miR3148 e miR4281.

Questi i risultati degli esperimenti di validazione in real time PCR sulla stessa casistica:

- miR1246, miR595, miR4290 e miR2278 sono risultati overespressi nei pazienti affetti da HGS-EOC rispetto ai soggetti sani
- miR574-5p e miR483-3p non sono stati confermati
- miR32-3p, miR4281 e miR3148 sono risultati al di sopra del Ct 36

Rank From 1 to 97	microRNA	adjust p- value	log Fold Change
1	hsa-miR-483-3p	0.0000	1.04
5	hsa-miR-4290	0.0000	0.96
12	hsa-miR-595	0.0004	1.49
15	hsa-miR-2278	0.0005	1.22
18	hsa-miR-32-3p	0.0008	1,46
24	hsa-miR-3148	0.0008	1.34
50	hsa-miR-1246	0.0077	0.94
64	hsa-miR-574-5p	0.0154	1.44
73	hsa-miR-4281	0.0218	0.87

Questi miRNA sono stati validati su una casistica indipendente, le pazienti affette da HGS- EOC e donatrici sane che afferivano al reparto di Ginecologia del Policlinico Gemelli di Roma.

miR1246, miR595 e miR2278 sono risultati overespressi, mentre miR4290 è risultato downregolato.

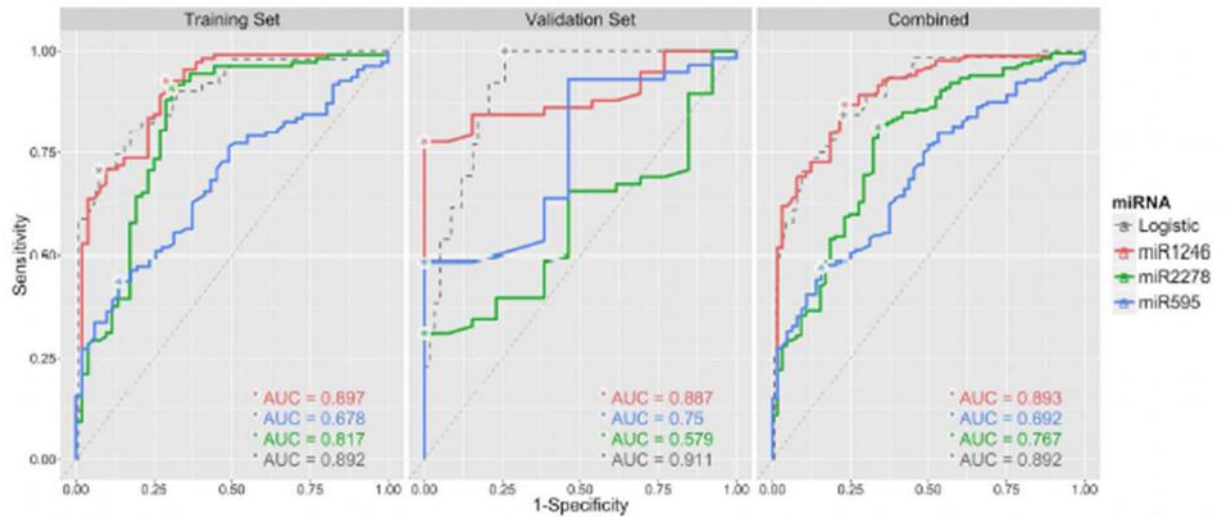
Alla luce di questi risultati si può pensare che questi tre miRNA siano potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce del carcinoma ovarico.

Per saggiare l'accuratezza dei tre miRNA come marcatori diagnostici per il carcinoma ovarico abbiamo utilizzato l'analisi della curva ROC.

Per il miR1246 la sensibilità era 87%, la specificità era 77% e l'AUC 0,89.

Per il miR595 sensibilità 47%, specificità 84% e AUC 0,69. In ultimo, per il miR 2278 sensibilità 81% specificità 66% con AUC 0,76.

Effettuando l'integrazione dei tre miRNA si ottiene un incremento solo dell'AUC nel validation set fino a 0.91.



Risultati RNA seq

Quest'ultima parte dello studio è stata effettuata su un subset di pazienti per l'RNA seq e i risultati sono stati validati sull'insieme del validation set 1 e del training set.

Per lo studio sono stati selezionati 28 biopsie tumorali congelate derivate da pazienti affette da carcinoma ovarico ad alto grado conservate presso gli Spedali Civili di Brescia. Questi campioni sono stati selezionati tra i 99 utilizzati per gli studi di miRNA expression e in particolare abbiamo identificato le 14 pazienti con i valori più bassi di PFI e 14 con i valori più alti.

Gli esperimenti hanno generato almeno 80 milioni di reads per paziente.

Sulla base della differente espressione genica sono stati identificati 1371 trascritti differenzialmente espressi, suddivisi in tre grandi classi:

- 125 trascritti noti
- 539 nuove isoforme di trascritti noti
- 707 trascritti non noti

Quindi dei trascritti differenzialmente espressi sono presenti solo il 9% di trascritti noti, tra essi vi sono geni, pseudogeni e lncRNA.

Nelle tabelle che seguono sono elencati i 125 trascritti noti.

Nella prima tabella sono elencati i 60 trascritti noti significativamente down regolati nelle pazienti platino resistenti rispetto alle pazienti platino sensibili.

GeneName	logFC	FDR	GeneName	logFC	FDR	GeneName	logFC	FDR
CMTM3	-6,81	4,44E-15	CLDN4	-2,38	0,000828	AC239868.3	-1,86	0,012146
LINC00886	-6,54	6,37E-14	RP11-21C17.1	-2,34	0,000495	TMPO	-1,85	0,01947
IDH3A	-5,45	1,77E-09	PGR	-2,26	0,007669	RP3-323A16.1	-1,84	0,013648
ERICH3-AS1	-5,38	3,44E-09	TUBG1P	-2,23	0,003224	RFC4	-1,84	0,019914
CTA-292E10.6	-4,43	5,69E-06	MIR210HG	-2,18	0,015066	TP53INP1	-1,82	0,017918
PGR	-4,34	1,48E-09	DLGAP1-AS2	-2,17	0,022195	LINC00896	-1,80	0,018916
AC079305.10	-3,93	0,000129	RNU4ATAC5P	-2,14	0,002164	C18orf21	-1,80	0,033993
TMED11P	-3,76	0,000345	MT-ND2	-2,13	0,002983	AKR1C6P	-1,79	0,016978
TCF19	-3,48	0,000648	NOL6	-2,13	0,023657	TP53TG3D	-1,76	0,023469
TECR	-3,35	0,000115	MAN1A2	-2,10	0,00409	SERPINA10	-1,75	0,025043
CTD-2515A14.1	-3,34	0,002848	PHC3	-2,09	0,002915	RAD21	-1,73	0,030749
RNU6-442P	-3,13	3,81E-06	HNF1A	-2,07	0,026278	GSE1	-1,73	0,024708
ZNF252P-AS1	-3,10	3,66E-06	OR2B2	-2,00	0,005591	JAKMIP2-AS1	-1,72	0,044322

RP4-755D9.1	-2,98	0,000134	ZNF497	-1,92	0,012121	BTLA	-1,71	0,046048
LYVE1	-2,87	0,018525	GRAMD2	-1,90	0,023977	CLCC1	-1,70	0,042805
PRR29	-2,75	0,027572	MAP3K13	-1,89	0,010822	HIST1H4I	-1,70	0,039714
LRRC37A2	-2,53	0,000238	IPO9-AS1	-1,88	0,014452	FRMD3	-1,70	0,038273
FAM47A	-2,49	0,002749	SRRM1P3	-1,88	0,02769	ADPGK	-1,68	0,033882
CORO1B	-2,41	0,00921	AL035610.2	-1,88	0,01075	PTOV1-AS1	-1,68	0,038432
PRAP1	-2,41	0,000369	TCEB3CL2	-1,87	0,013814	ARHGEF37	-1,65	0,038321

Nella seconda i 65 trascritti noti upregolati

GeneName	logFC	FDR	GeneName	logFC	FDR	GeneName	logFC	FDR
MACROD2	1,60	0,047115	TPGS2	2,07	0,019847	CRLS1	2,79	1,55E-05
A2M-AS1	1,60	0,047338	TP53I11	2,09	0,003045	RP11-25619.3	2,84	9,89E-06
CTD-2015A6.2	1,62	0,041115	RNF19A	2,09	0,036987	RP4-568F9.6	2,86	6,29E-05
GRHL3	1,65	0,040522	CADM2-AS1	2,14	0,007303	RP11-6O2.3	2,95	4,58E-06
CTD-2243E23.1	1,69	0,031596	RP11-1151B14.4	2,16	0,001939	CRLS1	2,98	3,2E-06
RP11-473M14.3	1,71	0,035074	POLR3G	2,22	0,001546	MXD1	2,99	0,001238
POLR2L	1,71	0,042036	AC005550.3	2,24	0,004054	ZNF473	3,17	0,005896
HNRNPA1P62	1,73	0,028147	RP11-707O23.1	2,24	0,001882	CTB-186H2.3	3,28	0,002008
RP11-66B24.4	1,73	0,023384	RP5-1092L12.2	2,25	0,001672	ZNF473	3,34	0,002848
COX15	1,75	0,023625	RP11-424M22.3	2,26	0,000911	TARDBPP1	3,67	3,6E-06
RP11-394I13.3	1,77	0,0212	LA16c-349E10.1	2,32	0,006364	C1orf140	3,89	1,34E-05
NBAT1	1,77	0,027347	CH17-360D5.1	2,32	0,027112	P2RX6	4,18	2,79E-05
AC007750.5	1,79	0,017953	AP000349.2	2,33	0,000511	GSTO2	4,30	1,64E-07
RP11-445F12.2	1,81	0,015992	GRIN3B	2,33	0,003214	AC007255.8	4,33	1,82E-11
RP11-981G7.6	1,83	0,014452	RP11-62I21.1	2,34	0,00099	DENND6B	4,35	9,52E-06
TREH	1,84	0,014515	TFPI	2,35	0,000899	SLC37A2	4,38	3,68E-09
RHBDD1	1,87	0,015212	SND1-IT1	2,38	0,0012	RNF215	4,39	7,46E-06
OR7E12P	1,88	0,01293	IGF2	2,43	0,000262	PXN-AS1	5,30	6,71E-09
PHOSPHO1	1,94	0,019854	RP3-333A15.1	2,46	0,000557	CDC42EP3	5,49	1,27E-09
RP13-213K19.1	1,95	0,007626	RP11-21G15.1	2,47	0,040758			
YME1L1	1,99	0,010632	BASP1P1	2,53	0,003321			
MTO1	2,02	0,043881	RPS27L	2,57	0,000194			

Nella tabella che segue è riportata una sintesi dei risultati ottenuti mediante l'RNA seq relativi a 1371 trascritti differenzialmente espressi:

Subclass	TOT	n. up-regulated	logFC		FDR	n. down-regulated	logFC		FDR
			min	max			min	max	
Known	125	65	1,6	5,5	≤ 0.05	60	-6,8	-1,6	≤ 0.05
Novel isoforms	539	265	1,59	9,16		539	-2,47	-1,89	
Unknown	707	414	1,88	9,35		293	-11,98	-1,91	

Il Gene Name è il nome del gene nomenclato nel database Ensemble.

Il logFC rappresenta il log fold change ovvero il logaritmo del rapporto tra la media di espressione dei trascritti tra pazienti sensibili e resistenti.

Il FDR(False Discovery Rate) è un test statistico di correzione introdotto per distinguere trascritti non indipendenti l'uno dall'altro.

Ad oggi non sono ancora stati riconosciuti metodi di analisi dei risultati ottenuti mediante RNA seq universalmente accettati e non sono stati definiti dei metodi di validazione di tale tecnica.

In questo studio abbiamo effettuato un tentativo di validazione mediante real time PCR, utilizzata ormai in modo routinario per la validazione dei risultati degli arrays

Abbiamo selezionato 5 trascritti seguendo i seguenti criteri: fold change alto, coefficiente di variazione per classe basso e numero di conte per almeno il 60% dei campioni di almeno una delle due classi superiore a 100.

I trascritti selezionati seguendo i suddetti criteri sono :

- Cardioplipina
- RP3
- RP11
- ZNF
- AC00555

Per gli esperimenti di real time abbiamo normalizzato per ciclofillina, G6PD, actina e GAPH.

Il trascritto AC00555 non è stato analizzato in quanto i risultati della real time PCR hanno evidenziato la presenza di multiple isoforme di tale trascritto per cui è stato scartato dall'analisi.

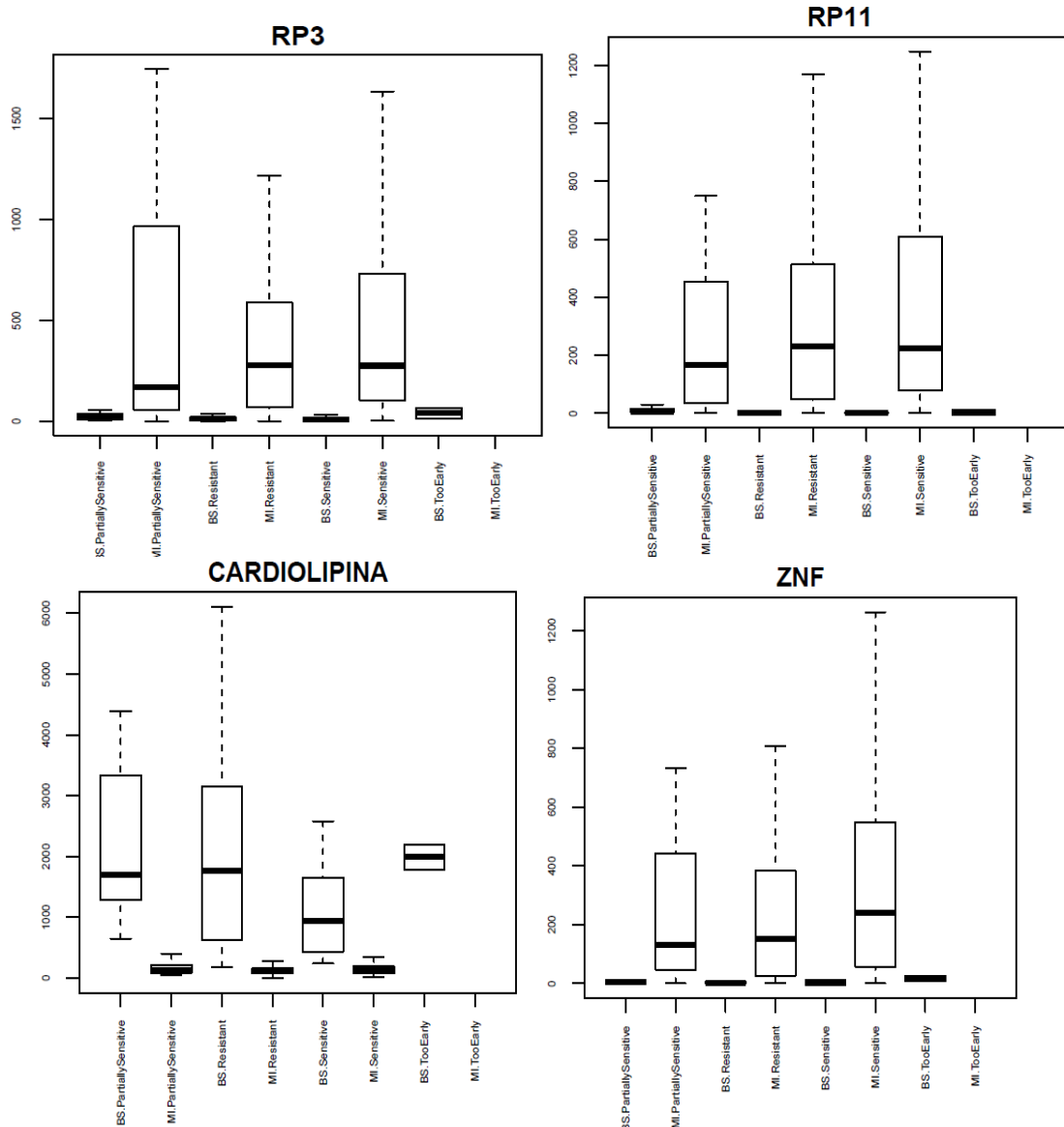
Per gli altri trascritti non sono stati evidenziate correlazioni significative con la prognosi e la risposta al platino.

Gli esperimenti sono stati condotti sul training set e sul validation set.

Come si può vedere dalla tabella non sono state identificate delle differenze statisticamente significative tra le espressioni dei trascritti e PFS e OS.

	CARDIOLIPINA	RP3	RP11	ZNF
SensAllvsResAll_pvalue	0,9074	0,7128	0,3814	0,5931

I boxplot che seguono evidenziano gli stessi risultati divisi per sottogruppi: platino sensibili, resistenti e parzialmente sensibili.



Nei boxplot le pazienti sono state divise sia per coorte di appartenenza sia per platino sensibilità. Appare subito evidente una netta differenza tra le pazienti di Brescia e quelle di Milano Monza, questa evidenza viene definita batch effect dovuta all'utilizzo di due coorti diverse di campioni ottenuti in condizioni sperimentali diverse ad esempio in due laboratori diversi. Nel nostro caso tale diversità è da attribuire alla conservazione e all'estrazione dell'RNA, infatti a partire dalla retro trascrizione i campioni dei due gruppi sono stati processati contemporaneamente. Prima di procedere all'analisi statistica i dati sono stati 'aggiustati' per eliminare il batch effect.

DISCUSSIONE

In conclusione non sono stati identificati miRNA tissutali e sierici con correlazione con la sensibilità al platino e la sopravvivenza, nel trascrittoma sono stati identificati numerosi trascritti differenzialmente espressi correlati con la platino sensibilità ma tali risultati non sono stati validati.

Sono stati identificati 3 miRNA sierici differenzialmente espressi tra le pazienti affette da carcinoma ovarico e donne sane, essi potrebbero essere ulteriormente studiati per il loro utilizzo come marcatori di screening per la neoplasia ovarica, una patologia per cui ad oggi non è riconosciuto un test di screening efficace.

L'analisi dei miRNA tissutali non ha identificato miRNA differenzialmente espressi correlati alla progression free survival e alla sopravvivenza. Al momento non abbiamo effettuato l'analisi per pathway dei risultati ottenuti mediante microarray né un'analisi non supervisionata per identificare eventuali cluster di miRNA che siano in qualche modo correlabili con le caratteristiche cliniche o anatomopatologiche delle pazienti.

Le analisi integrate per pathway eseguite sui risultati del TCGAtlas hanno evidenziato delle differenze prognostiche tra tre gruppi di miRNA, in particolare il sottotipo miR associato al sottotipo mesenchimale era caratterizzato da una prognosi peggiore.⁶⁰

Un grosso studio retrospettivo denominato MiROvaR condotto su 179 campioni di tumore ovarico collezionati in diversi centri italiani, i cui risultati sono stati validati utilizzando 452 campioni del TCGA e 263 campioni provenienti dall'unione di altre due casistiche italiane, ha identificato una firma di 25 miR in grado di predire la risposta al trattamento a base di platino.⁸⁵ Lo studio MiROvaR presenta tuttavia delle importanti differenze con il nostro lavoro: i nostri sono tutti campioni freschi congelati, quelli del MiROvaR sono in parte paraffinati, la casistica di validazione è stata in parte analizzata su dati già prodotti dal TCGA, le pazienti arruolate nel nostro studio sono tutte pazienti affette da carcinoma ovarico ad alto grado in stadio III e IV mentre nella loro casistica sono presenti diversi istotipi tumorali, stadi I-IV, tutti gradi di differenziazione. Il risultato è sicuramente molto interessante ma di difficile riproducibilità in considerazione dell'eterogeneità della casistica e, come gli stessi autori sottolineano nelle conclusioni, meritevole di ulteriori studi.

L'analisi dell'espressione genica dei microarray nel TCGAtlas ha identificato quattro distinti gruppi di pazienti affetti da carcinoma ovarico, l'analisi di OS e PFS di queste pazienti non ha identificato per i geni delle differenze statisticamente significative ³⁵.

Non essendo stati identificati miRNA tissutali differenzialmente abbiamo voluto validare i miRNA identificati come differenzialmente espressi e correlati con la prognosi e la PFI nella casistica di pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a chemioterapia a base di platino a finalità neoadiuvante⁸⁴, le caratteristiche erano equiparabili a quelle delle nostre pazienti e i risultati non erano stati validati su un altro gruppo di pazienti.

Il risultato conferma la necessità di validare i risultati degli studi clinici su gruppi indipendenti, difatti su 4 miRNA è stato validato solo il miR181a. La mancata identificazione di tale miR nei nostri microarray può essere legata alla difficile riproducibilità della sonda spottata sui vetrini utilizzati per l'ibridazione.

Anche in questo lavoro emerge il ruolo sempre più rilevante del miR181 nel carcinoma ovarico in stadio avanzato, in effetti il miR181 è stato già descritto come marcatore correlato alla prognosi in numerosi articoli.

Uno di essi su due differenti serie di pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato ha evidenziato che nelle pazienti in cui era maggiore l'espressione di miR-181a si manifestavano recidive più precoci e la malattia risultava resistente alle terapie e progrediva in modo più rapido, con l'aumento dell'espressione di miR-181a le cellule di carcinoma dell'ovaio diventano molto più mobili, hanno una maggiore capacità di metastatizzazione e resistenza alla chemioterapia. Attraverso il blocco del miR181a si assiste a un'inversione di molte delle caratteristiche di malignità e di resistenza delle cellule tumorali ⁵⁹.

Il miR181 si è dimostrato implicato nel meccanismo di EMT con regolazione del pathway di TGFbeta. Il pathway dell'epithelial mesenchymal transition risulta essere sempre più correlato con i meccanismi di resistenza al platino. Una delle ipotesi terapeutiche potrebbe essere quella di studiare dei composti che vanno ad interferire con questo meccanismo e uno dei possibili bersagli potrebbe essere il miR181.

I dati ottenuti con l'analisi del trascrittoma mediante l'RNAseq ci consentono di affermare che esistono dei trascritti differenzialmente espressi nei tessuti tumorali di

pazienti affette da carcinoma ovarico platino sensibili e platino resistenti, tali dati devono essere confermati.

Il numero totale è 1371 di essi meno del 10% è composto da trascritti noti ovvero il 2% dell'intero genoma questo potrebbe in effetti spiegare i risultati negativi ottenuti utilizzando la tecnologia dei microarray in cui vengono utilizzati come acidi nucleici spottati sul vetrino solo trascritti noti.

Sicuramente la parte più interessante di questo progetto è l'identificazione di trascritti differenzialmente espressi non noti.

L'RNAseq ha sicuramente numerosi vantaggi rispetto ai microarray attraverso la quantificazione assoluta e non relativa dei trascritti e soprattutto la scoperta di nuovi trascritti, di nuove isoforme di trascritti noti, di varianti di splicing e di geni di fusione l'identificazione di nuovi trascritti include lncDNA, miRNA e altri piccoli RNA che possono essere correlati con la stabilità dell'RNA.

In quest'ottica dovrà essere anche rivalutata meglio la tecnica di validazione dei risultati e la loro correlazione con la prognosi.

Oltre ad una validazione che potrebbe prevedere l'utilizzo della stessa metodica ma su una casistica differente, una proposta alternativa potrebbe essere l'utilizzo della digital droplet PCR che è una tecnica più sensibile della real time PCR tradizionale.

L'identificazione dei tre miRNA sierici che sono upregolati nel siero delle donne affette da carcinoma ovarico rispetto ai soggetti sani pone le basi per ulteriori studi che prevedranno l'ampliamento della casistica per avere un'ulteriore conferma del risultato.

La mancanza di un test di screening per il carcinoma ovarico rende questo risultato molto interessante, essendo il dosaggio dei miRNA sierici un test poco invasivo riproducibile e poco costoso. Gli ultimi studi sullo screening del carcinoma ovarico hanno indagato il dosaggio del ca125 e l'utilizzo dell'ecografia transvaginale che però hanno portato all'aumento della morbidità post chirurgica in assenza di un reale vantaggio in termini di sopravvivenza.

Negli ultimi anni molti studi hanno investigato i miRNA sierici come marcatori di screening nella diagnosi del cancro, un esempio significativo è rappresentato dalla

scoperta di miRNA differenzialmente espressi nei pazienti forti fumatori che sviluppano neoplasie polmonari.⁸⁶

miR-1246 è già stato descritto nel carcinoma polmonare, esofageo, mammario ma mai nel carcinoma ovarico, esso è stato associato alla staminalità nel carcinoma polmonare e sembra essere coinvolto nei meccanismi di metastatizzazione, l'associazione con la staminalità è stata descritta anche carcinoma del pancreas dove sembra essere implicato nei meccanismi di resistenza alla chemioterapia.⁸⁷⁻⁸⁸

Il miR-595 gioca un ruolo critico nella carcinogenesi interagendo con SOX7 nel glioblastoma. miR-595 è differenzialmente espresso nel siero di pazienti cirrotici con o senza epatocarcinoma.⁸⁹⁻⁹⁰

L'espressione di miR-2278 provoca l'inibizione della proliferazione cellulare delle cellule leucemiche inducendo apoptosi presentando correlazioni con la risposta all'imatinib.⁹¹

L'analisi della curva ROC ha dimostrato una buona sensibilità e specificità del miR1246 questo potrebbe essere utilizzato per studi prospettici per poterne valutare l'utilizzo come marcatore di screening.

In conclusione dal questo lavoro sono emersi due importanti risultati che meritano ulteriori studi ovvero l'identificazione di tre miRNA sierici che distinguono soggetti sani da pazienti affette da carcinoma ovarico e l'identificazione di numerosi trascritti differenzialmente espressi tra il carcinoma ovarico platino sensibile e platino resistente.

Il primo risultato dovrebbe essere validato in uno studio prospettico per poter investigare l'eventuale utilizzo di questi miR nella diagnosi precoce.

Per quanto riguarda i trascritti differenzialmente espressi essi potrebbero aiutare i clinici nell'identificazione delle pazienti che possono beneficiare di una tripletta ad esempio con l'aggiunta di un farmaco biologico alla terapia standard o l'arruolamento in studi clinici che prevedono l'utilizzo di nuovi farmaci quando risulta poco probabile una buona risposta al trattamento a base di platino.

I numerosi dati forniti dall'analisi del trascrittoma devono essere sempre validati, in primis su altre casistiche retrospettive e successivamente in casistiche prospettiche.

Il caso dello studio della firma molecolare nelle pazienti affette da carcinoma mammario è sicuramente emblematico: nel 2000 ci sono state le prime pubblicazioni sui profili molecolari con lo studio di Perou⁹² e oggi le analisi molecolari fanno parte della pratica clinica dopo essere state validate su studi retrospettivi e ora prospettici⁹³.

BIBLIOGRAFIA

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. *Ovarian cancer*. Lancet. 2014 Oct 11;384(9951):1376-88
2. *Linee guida Tumori dell'ovaio* AIOM Edizione 2016
3. Alsop, K., et al., *BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 2012. 30(21): p. 2654-63.
4. Kurman RJ. *Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma*. Ann Oncol. 2013 Dec;24 Suppl 10:x16-21
5. Karst AM, Drapkin R. *Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution*. J Oncol. 2010;2010:93237
6. *Classificazione istologica delle neoplasie ovariche* WHO 2002
7. McCluggage WG. *Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis*. Pathology. 2011 Aug;43(5):420-32
8. Robbins e Cutran Le basi patologiche delle malattie 7° edizione, Elsevier
9. Cho, K.R. and M. Shih Ie, *Ovarian cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. 4: p. 287-313.
10. G. Bonadonna, G. Robustelli Dalla Cuna Medicina Oncologica 8° edizione, Zanichelli
11. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. 124(1): p. 1-5.
12. Vergote, I., et al., *Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma*. Lancet, 2001. 357(9251): p. 176-82.
13. Marchini, S., et al., *Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections*. Lancet Oncol, 2011. 12(3): p. 273-85.
14. Bristow, R.E., et al., *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2002. 20(5): p. 1248-59.

15. Crawford, S.M. and J. Peace, *Does the nadir CA125 concentration predict a long-term outcome after chemotherapy for carcinoma of the ovary?* Ann Oncol, 2005. 16(1): p. 47-50.
16. Buys, S.S., et al., *Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial.* JAMA, 2011. 305(22): p. 2295-303.
17. Menon, U., et al., *Risk Algorithm Using Serial Biomarker Measurements Doubles the Number of Screen-Detected Cancers Compared With a Single-Threshold Rule in the United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening.* J Clin Oncol, 2015. 33(18): p. 2062-71.
18. Vergote, I., et al., *Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIc or IV ovarian cancer.* N Engl J Med, 2010. 363(10): p. 943-53.
19. Trimbos, J.B., et al., *International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 2003. 95(2): p. 105-12.
20. Piccart, M.J., et al., *Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results.* J Natl Cancer Inst, 2000. 92(9): p. 699-708.
21. Neijt, J.P., et al., *Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer.* J Clin Oncol, 2000. 18(17): p. 3084-92.
22. Ozols, R.F., et al., *Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study.* J Clin Oncol, 2003. 21(17): p. 3194-200.
23. McGuire, W.P., et al., *Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer.* N Engl J Med, 1996. 334(1): p. 1-6.
24. Perren, T.J., et al., *A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer.* N Engl J Med, 2011. 365(26): p. 2484-96.

25. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. 365(26): p. 2473-83.
26. Pujade-Lauraine, E., et al., *Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial*. J Clin Oncol, 2014. 32(13): p. 1302-8.
27. Monk, B.J., et al., *Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2010. 28(19): p. 3107-14.
28. Parmar, M.K., et al., *Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial*. Lancet, 2003. 361(9375): p. 2099-106.
29. Aghajanian, C., et al., *OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer*. J Clin Oncol, 2012. 30(17): p. 2039-45.
30. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. N Engl J Med, 2012. 366(15): p. 1382-92.
31. Chien J, Kuang R, Landen C, Shridhar V. *Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment*. Front Oncol. 2013 Sep 24;3:251
32. Cooke SL, Brenton JD. *Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer*. Lancet Oncol. 2011 Nov;12(12):1169-74.
33. Davis A, Tinker AV, Friedlander M *"Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit?* Gynecol Oncol. 2014 Jun;133(3):624-31.
34. Marchini S, Fruscio R, et al *Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer*. Eur J Cancer. 2013 Jan;49(2):520-30
35. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. 474(7353): p. 609-15.
36. Winterhoff, *Bevacizumab and improvement of progression-free survival for patients with the mesenchymal molecular subtype of ovarian cancer* Journal Clinical Oncology, 2014. 32(abs 5509)

37. Cox, Doudna, O'Donnel *Biologia molecolare. Principi e tecniche*. Zanichelli
38. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. *Post-transcriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell 75, 855-62 (1993).
39. Reinhart, B.J. et al. *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature 403, 901-6 (2000)
40. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 294, 853-8. (2001).
41. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P. *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science 294, 858-62. (2001).
42. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. & Tuschl, T. *New microRNAs from mouse and human*. Rna 9, 175-9 (2003).
43. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature 409, 363-6 (2001).
44. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science 303, 83-6 (2004)
45. Kasashima, K., Nakamura, Y. & Kozu, T. *Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells*. Biochem Biophys Res Commun 322, 403-10 (2004).
46. Liu, C.G. et al. *An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 9740-4 (2004).
47. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. *microRNAs in cancer management*. Lancet Oncol. 2012 Jun;13(6):e249-58
48. Calin, G.A. et al. *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 15524-9. (2002).
49. Michael, M.Z., O' Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P. & James, R.J. *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res 1, 882-91 (2003).

50. Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S. & Borkhardt, A. *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer 39, 167-9 (2004).
51. Johnson, S.M. et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell 120, 635-47 (2005).
52. Kone, J. et al. *F-MuLV acceleration of myelomonocytic tumorigenesis in SV40 large T antigen transgenic mice is accompanied by retroviral insertion at Fli1 and a novel locus, Fim4*. Leukemia 16, 1827-34 (2002).
53. Katz B, Tropé CG, Reich R, Davidson B *MicroRNAs in Ovarian Cancer*. Hum Pathol. 2015 Sep;46(9):1245-56
54. Kinose Y¹, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. *The role of microRNAs in ovarian cancer*. Biomed Res Int. 2014;2014:249393.
55. Davidson B, Tropé CG, Reich R. *The clinical and diagnostic role of microRNAs in ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol. 2014 Jun;133(3):640-6
56. M. V. Iorio, R. Visone, G. Di Leva et al., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer* Cancer Research, vol. 67, no. 18, pp. 8699–8707, 2007.
57. E. Calura, R. Fruscio, L. Paracchini et al. *miRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities* Clinical Cancer Research, vol. 19, no. 15, pp. 4114–4123, 2013.
58. E. J. Nam, H. Yoon, S. W. Kim et al. *MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma* Clinical Cancer Research, vol. 14, no. 9, pp. 2690–2695, 2008.
59. Parikh A, Lee C, Peronne J, Marchini S, Baccarini A, Kolev V, Romualdi C, Fruscio R *MicroRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition*. Nat Commun. 2014;5:2977
60. D. Yang, Y. Sun, L. Hu et al. *Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer* Cancer Cell, vol. 23, no. 2, pp. 186–199, 2013.
61. Ferracin M, Lupini L, et al. *Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients*. Oncotarget. 2015 Jun 10;6(16):14545-55

62. J. D. Arroyo, J. R. Chevillet, E. M. Kroh et al. *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 108, no. 12, pp. 5003–5008, 2011.
63. D. D. Taylor and C. Gercel-Taylor *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer* Gynecologic Oncology, vol. 110, no. 1, pp. 13–21, 2008.
64. Nakamura K, et al *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer*. Mol Cancer. 2016 Jun 24;15(1):48
65. Zheng H et al *Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer*. PLoS One. 2013 Nov 1;8(11):e77853
66. Zheng H, et al. *Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer*. PLoS One. 2013;8:e77853.
67. Xu YZ et al *Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer*. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14:1057–60
68. K. E. Resnick, H. Alder, J. P. Hagan, D. L. Richardson, C. M. Croce, and D. E. Cohn *The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform* Gynecologic Oncology, vol. 112, no. 1, pp. 55–59, 2009.
69. S. F. M. Häusler, A. Keller, P. A. Chandran et al. *Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening* British Journal of Cancer, vol. 103, no. 5, pp. 693–700, 2010.
70. C. W. S. Kan, M. A. Hahn, G. B. Gard et al. *Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer* BMC Cancer, vol. 12, article 627, 2012.
71. miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit Protocol For use with Agilent miRNA microarrays Version 2.4, September 2011 Agilent Technologies

72. Risso D, Romualdi C et al. *A modified LOESS normalization applied to microRNA arrays: a comparative evaluation*. *Bioinformatics*. 2009 Oct 15;25(20):2685-91
73. Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e78644.
74. Parkhomchuk D, Borodina T, Amstislavskiy V, Banaru M, Hallen L, Krobitch S, et al. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res*. 2009 Oct;37(18):e123.
75. Han Y, Gao S, Muegge K, Zhang W, Zhou B. Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinforma Biol Insights*. 2015 Nov 15;9(Suppl 1):29–46.
76. Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet*. 2016 May;17(5):257–71
77. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*. 2009 Jan;10(1):57–63.
78. Zhang Z, Theurkauf WE, Weng Z, Zamore PD. *Strand-specific libraries for high throughput RNA sequencing (RNA-Seq) prepared without poly(A) selection*. *Silence*. 2012;3(1):9.
79. Garber M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C. *Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq*. *Nat Methods*. 2011 Jun;8(6):469–77.
80. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S. *Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments*. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:94.
81. Risso D, Schwartz K, Sherlock G, Dudoit S. *GC-content normalization for RNA-Seq data*. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:480.
82. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47

83. P.H. Westfall and S.S. Young. *Resampling- Based Multiple Testing: Examples and Methods for p- Value Adjustment*, New York: John Wiley & Sons, 1993
84. Petrillo M et al *Identification of high-grade serous ovarian cancer miRNA species associated with survival and drug response in patients receiving neoadjuvant chemotherapy: a retrospective longitudinal analysis using matched tumor biopsies*. *Ann Oncol*. 2016 Apr;27(4):625-34
85. Bagnoli M et al *Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study*. *Lancet Oncol*. 2016 Aug;17(8):1137-46
86. Sozzi G et al *Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study*. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 10;32(8):768-73.
87. Kim G et al. *Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*. 2016 Jan;91:15-22
88. Liao L et al *Expression and clinical significance of microRNA-1246 in human oral squamous cell carcinoma*. *Med Sci Monit*. 2015 Mar 16;21:776-81
89. Hao Y et al *MiR-595 targeting regulation of SOX7 expression promoted cell proliferation of human glioblastoma*. *Biomed Pharmacother*. 2016 May;80:121-6.
90. Fornari F, Ferracin M, *Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC*. *PLoS One*. 2015 Oct 28;10(10):e0141448
91. Kaymaz BT *Revealing genome-wide mRNA and microRNA expression patterns in leukemic cells highlighted "hsa-miR-2278" as a tumor suppressor for regain of chemotherapeutic imatinib response due to targeting STAT5A*. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(10):7915-27
92. Perou CM et al *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
93. Cardoso F et al MINDACT Investigators. *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer* *N Engl J Med*. 2016 Aug 25;375(8):717-29