



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Medicina Clinica e Scienze del Comportamento.
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica
Settore Scientifico Disciplinare MED/09 (MEDICINA INTERNA)

MIRNA CIRCOLANTI NEL CARCINOMA EPATOCELLULARE

IL DOTTORE
DOMENICO SALEMI

IL COORDINATORE
CHIA.MO PROF ANTONIO PINTO

IL TUTOR
CHIA.MO PROF. MARIO COTTONE

CICLO XXIX
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016/2017

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Carcinoma Epatocellulare	3
1.1 Genetica dell'epatocarcinoma.....	4
1.2 Epatocarcinogenesi, diagnosi e stadiazione	5
2. I MicroRNA	7
2.1 Biogenesi dei miRNA	8
2.2 Identificazione degli mRNA target	10
2.3 Funzione dei miRNA	11
2.4 Regolazione dei miRNA	12
2.5 miRNAs circolatori	13
2.6 Cambiamenti metodologici nello studio dei miRNA circolatori.....	15
3. MIRNA E HCC.....	16
3.1 miRNA nella regolazione della replicazione virale.	17
3.2 Ciclo cellulare e apoptosi	17
3.3 Alterazione di pathway cellulari	18
3.4 Ruolo diagnostico e prognostico dei miRNA in HCC	18
3.5 miRNA nella terapia per HCC.....	20
SCOPO DELLA RICERCA.....	22
MATERIALI E METODI	25
5.1 Pazienti e campioni	25
5.2 Schema dello studio.....	25
5.3 Processamento dei campioni ed estrazione dei miRNA circolanti	26
5.4 miRNA profiling.....	27

5.5 Espressione dei miRNA	31
5.6 Linee cellulari	34
5.7 Analisi statistica.....	35
RISULTATI	36
6.1 MiRNA profile in HCC.....	36
6.2 miRNA circolanti in HCC rispetto ai donatori	37
6.3 miRNA circolanti in HCC rispetto a pazienti HCC trattati e cirrotici.....	40
6.4 Espressione dei miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b in HCC.	43
6.5 Espressione dei miRNA in linee cellulari.....	52
CONCLUSIONI	56
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUZIONE

1. Carcinoma Epatocellulare

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma più comune di tumore maligno del fegato ed è il quinto tumore per frequenza e la seconda causa di morte correlata al cancro nel mondo (1-4).

Tra i principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'HCC vi è l'epatite B e C, responsabili di circa l'85% dei casi di carcinoma epatocellulare in tutto il mondo, con una prevalenza di epatite B in Asia e in Africa e di epatite C in Giappone e nel mondo occidentale. Altre cause riconosciute sono l'abuso di alcol, alcune malattie metaboliche ereditarie (emocromatosi e deficit di alfa-1-antitripsina) e la sindrome metabolica. L'incidenza di HCC è maggiore nei maschi che nelle femmine, probabilmente a causa di una maggiore esposizione a fattori di rischio quali l'alcolismo e fumo (5)

La cirrosi rappresenta quindi il principale fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare, altri co-fattori di rischio sono: co-infezione dei virus dell'epatite (HBV + HCV), il genotipo C del'HBV, il genotipo 1b dell'HCV, la co-infezione da virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana acquisita (HIV) e valori di transaminasi costantemente elevati (almeno 5 volte la norma).

L'Italia meridionale si caratterizza per una maggiore incidenza rispetto al Nord e al Centro. Questa differenza può essere spiegata innanzitutto con un'incidenza diversa tra le diverse aree del Paese del virus dell'epatite C (HCV) (5)

Anche se il virus dell'epatite B è un fattore eziologico noto per l'HCC, il suo ruolo in Italia è praticamente marginale per effetto della campagna di vaccinazione che si effettua dal 1978 in poi.

La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con carcinoma epatocellulare in Italia negli anni dal 2005 al 2007 è stato, rispettivamente, del 17% per i maschi e il 16% per le femmine. Pur essendo migliorata rispetto ai precedenti periodi, risulta largamente insoddisfacente. (5)

1.1 Genetica dell'epatocarcinoma

Nell'ultima decade numerosi studi sono stati pubblicati nel tentativo di identificare delle alterazioni genetiche nell'epatocarcinoma.

L'insorgenza e la progressione dell'epatocarcinoma si caratterizzano per la presenza di modificazioni patologiche di molte vie di segnale intracellulari ed extracellulari: generalmente le prime mutazioni avvengono nei meccanismi proliferativi ed apoptotici, mentre negli stadi più avanzati le cellule tumorali acquisiscono ulteriori anomalie genetiche che promuovono i processi di angiogenesi, invasività e metastasi. Per esempio, nell'HCC frequentemente si riscontrano deregolati gli oncosoppressori Rb (6) e TP53 (7) così come le via di WNT/ β -catenina (8).

Lo studio di Ladeiro e coll. fu uno dei primi ad integrare la classificazione molecolare dell'epatocarcinoma basata sulle alterazione geniche con lo studio dei profili di espressione dei miRNA, al fine di individuare associazioni tra mutazioni in oncogeni/geni oncosoppressori e caratteristiche clinico-patologiche (9).

Così l'analisi di profiling dei microRNA ha consentito di classificare univocamente i campioni in esame in gruppi ben separati tra loro e contraddistinti da caratteristiche istologiche (tumore/non tumore, tumore benigno/maligno), caratteristiche cliniche (infezione da HBV, consumo di alcol) e mutazioni in oncogeni/geni oncosoppressori (β -catenina, fattore epatico nucleare 1 (HFN1) (9)

1.2 Epatocarcinogenesi, diagnosi e stadiazione

Lo sviluppo dell'HCC in un fegato con pregressa malattia cronica è un processo multifattoriale che comporta un graduale accumulo di danni genetici e di instabilità cromosomica (Figura 1)

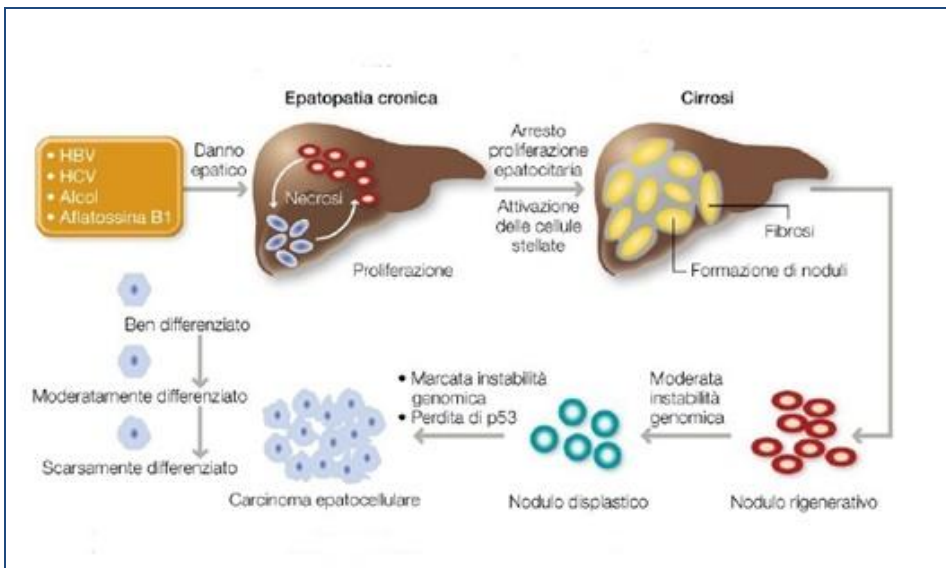


Figura 1. Processo di Epatocarcinogenesi

L'infezione da HBV, HCV o l'esposizione cronica all'alcol possono causare un danno epatico cronico in seguito al quale gli epatociti vanno incontro a un'intensa stimolazione mitogena dovuta all'esposizione ad elevati livelli di fattori di crescita e citochine attivate dall'infiammazione, determinando a sua volta fenomeni di rigenerazione fibrotica. (10)

Cicli continui di questo processo necrotico/rigenerativo promuovono un danno cronico che culmina nella cirrosi epatica, caratterizzata dalla formazione di noduli di rigenerazione epatica circondati da depositi di tessuto fibroso. L'elevata attività proliferativa, che spesso si accompagna all'acquisizione di alterazioni genetiche, può determinare lo sviluppo di micronoduli iperplastici (11)

Il processo di cancerogenesi epatica avviene progressivamente, dove dalla piccola lesione, il micronodulo, spesso non visibile alle tecniche di imaging, si determina un accrescimento in macronodulo, talora visibile all'imaging, nel quale si verificano

alterazioni tali da rendere le cellule displastiche. Le cellule displastiche acquisendo alterazioni genetiche possono progredire fino a formare delle lesioni premaligne. Da queste possono insorgere focolai di epatocarcinoma, che poi possono estendersi ulteriormente. (12)

Per questo, i pazienti cirrotici sono collocati in programmi di screening standardizzati per la diagnosi precoce del carcinoma epatocellulare.

L'uso della tomografia computerizzata e apparecchiature per la risonanza magnetica sempre più sofisticate hanno portato ad una maggiore sensibilità e specificità delle tecniche diagnostiche dell'HCC. La diagnosi precoce rimane un punto chiave per migliorare la prognosi di questo tumore. Soprattutto se si tiene conto che alcune terapie come la resezione chirurgica o la RFA (Termoablazione con Radiofrequenza) mostrano una maggiore efficacia terapeutica proprio su quei pazienti in stadi precoci.

(13) Poiché la maggior parte dei casi di HCC si verifica in pazienti con pregressa cirrosi epatica, la stadiazione e la prognosi dei pazienti è condizionata non solo dall'estensione del tumore ma anche dalla residua funzione epatica. Le classificazioni BCLC (Barcelona Clinic for Liver Cancer) e CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) tengono conto sia del grado di compenso della cirrosi e dei danni al fegato (Child-Pugh; ipertensione portale) che della estensione della neoplasia (dimensione, invasione vascolare valutata mediante analisi strumentale) (5).

Il grado di disfunzione epatica del paziente cirrotico con HCC deve essere definito prima di ogni decisione terapeutica. La stadiazione Child-Pugh è lo standard di riferimento per la valutazione della cirrosi (14).

L'algoritmo BCLC consente la stratificazione dei pazienti in 5 gruppi sulla base di performance status, Child-Pugh e caratteristiche della neoplasia. Questa classificazione è stata convalidata e approvata dall' AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) e dall' EASL (European Association for the Study of the Liver) (15, 16), su questa base, i pazienti suddivisi nei 5 stadi, sono indirizzati al trattamento terapeutico più adeguato (17,18)

2. I MicroRNA

I microRNA (miRNAs) sono piccoli RNA (tipicamente 20-26 nucleotidi), non codificanti e filogeneticamente preservati che effettuano una regolazione negativa post-trascrizionale dell'espressione genica. Essi operano attraverso il legame all'mRNA target inducendo repressione della traduzione, destabilizzazione dell'RNA e degradazione dell'RNA, sebbene siano stati anche riportati esempi di up-regolazione genica attraverso i miRNA (19-21) Per sopprimere l'espressione genica i miRNA legano specifiche sequenze dell' mRNA target, un minimo di 6 bp sono necessarie per un corretto miRNA-mRNA match, questa sequenza è detta "seed sequence" (22).

I miRNA agiscono in realtà anche attraverso un imperfetto appaiamento, anzi è proprio questo che consente ad ogni miRNA di avere come target più di un mRNAs (anche più di 100). In generale, ogni miRNA può avere molti mRNA target e molteplici miRNAs possono regolare lo stesso gene/mRNA (23,24). Per questo la deregolazione di uno o pochi miRNA può determinare l'alterazione di diversi pathway e anche di sistemi cellulari, contribuendo allo sviluppo di disordini e patologie, come il cancro (21).

Il primo miRNA ad essere identificato fu il miR lin-4, nel 1993 da Ambros e collaboratori nel nematode *Caenorhabditis elegans*. Questi miRNA erano capaci di regolare lo sviluppo temporale della larva, reprimendo la trascrizione dell'mRNA target dei geni *lin-14* and *lin-41* (25). Dopo queste iniziali scoperte, fu però chiaro che il ruolo dei miRNA non era ristretto solo ai piccoli organismi, ma che le loro funzioni erano determinanti anche nel contesto degli animali superiori, come l'uomo. Da quella iniziale scoperta più di 20.000 miRNA sono stati identificati in 193 specie (Sanger miRBase release; <http://www.mirbase.org/>). E' stato stimato che siano in grado di modulare l'espressione genica di all'incirca il 60% dei geni codificanti (26)

Le recenti scoperte hanno fortemente supportato il ruolo chiave dei miRNA in vari processi biologici come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, il controllo del

differenziamento e il metabolismo (27-29). Non stupisce inoltre che molti studi indichino che i miRNA possano agire come oncogeni o oncosoppressori (30-32)

2.1 Biogenesi dei miRNA

La genesi dei miRNA è un processo multistep, che richiede sia una fase citoplasmatica che nucleare, dove un lungo RNA a doppio filamento viene processato fino ad ottenere un corto RNA a singolo filamento (21). (Figura 2)

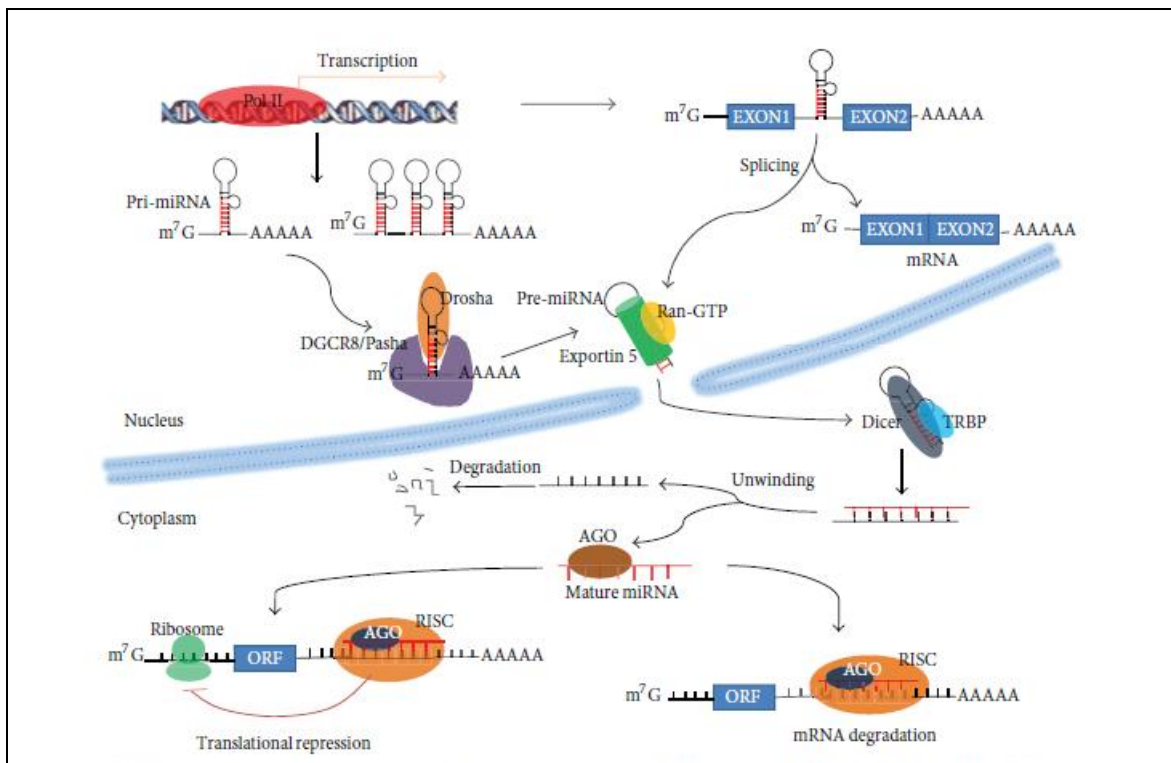


Figura 2. Biogenesi dei miRNA.

La genesi dei miRNA inizia nel nucleo con la formazione di un miRNA primario, detto pri-miRNA generato per azione della RNA Polimerasi II o III. Da questo punto di vista, i miRNA possono essere suddivisi in due grandi classi: miRNA intergenici, generati da trascritti localizzati tra geni codificanti e miRNA intragenici, generati da sequenze localizzate all'interno delle regioni codificanti (33,34).

I pri-miRNA possono essere trascritti come trascritti policistronici o come trascritti individuali, si ripiegano fino ad assumere una struttura terziaria caratterizzata da diversi loop dai quali deriveranno i miRNA (35)

Solitamente le sequenze sono trascritte come lunghi pri-miRNA con un *cap* e una coda di *poly-A*.(36) I pri-miRNA saranno sottoposti a un processo di maturazione all'interno del nucleo in cui sono rimossi *cap* e *poly-A* e tramite le regioni loop sono riconosciuti da Drosha. (37). Drosha appartiene a un complesso che sottende alla maturazione dei pri-miRNA, denominato "Microprocessore". Il microprocessore è formato dall'endonucleasi Drosha e dall'RNA-binding protein DGCR8 (38,39) Il microprocessore converte il pri-miRNA in un stem loop di circa 60-70 nucleotidi con due estremità "protuding" di circa 3 nucleotidi chiamato miRNA precursore o pre-miRNA(40).

Dopo essere stato processato da Drosha, il pre-miRNA viene esportato tramite riconoscimento con l'estremità "protuding" nel citoplasma da un complesso composto dall'esportina 5 e dalla proteina nucleare GTP-binding RanGTP (41,42). Nel citoplasma, il pre-miRNA viene ulteriormente processato dalla endonucleasi RNasi III chiamata Dicer che tramite un dominio PAZ riconosce le estremità "protuding" e taglia l'RNA a doppio filamento, generando dei miRNA duplexes di circa 21-23 nucleotidi (ds-miRNAs) (43,45). Questa conformazione di miRNA può essere caricata da proteine trasportatrici dette Argonata (AGO), una famiglia composta da 4 membri con specifiche funzioni (46). (Figura 3)

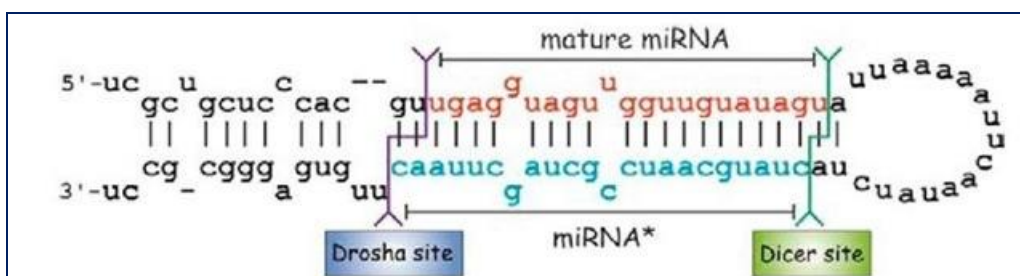


Figura3. Esempio di miRNA precursore. I siti di clivaggio degli enzimi Drosha e Dicer sono mostrati

Il miRNA duplex è caricato da proteine AGO, che insieme all'enzima Dicer e alla proteina TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) compongono il complesso RISC (RNA inducing silencing complex), struttura capace di indurre "silenzamento trascrizionale"(47). La proteina TRBP identifica il filamento "guida" e il filamento "passenger" nella molecola duplex ds-miRNA. TRBP rileva le proprietà termodinamiche dei ds-miRNA, in tal modo riconosce il filamento meno stabile, caricando i ds-miRNA nel corretto orientamento per la proteina AGO, che grazie al dominio PAZ nell'estremità N-terminale lega i filamenti di RNA rimuovendo il filamento "passenger" rilasciando così la molecola matura (47-50)

2.2 Identificazione degli mRNA target

Cardine essenziale per la funzione dei miRNA è l'identificazione dell'mRNA target da parte del miRNA all'interno del complesso RISC. Come già accennato la regione in cui si verifica l'accoppiamento mRNA - miRNA è denominata "seed sequence", consiste di un minimo di sei paia di basi (bp) corrispondente usualmente ai nucleotidi 2-7 dell'estremità 5' del miRNA (3'UTR del mRNA) (49). A livello dell'mRNA comunque sono presenti oltre alla regione di interazione con la "seed sequence" molte altre sequenze caratterizzate dai cosiddetti "elementi responsivi ai miRNAs" (MRES), sequenze in grado di interagire con i miRNA. Gli elementi responsivi ai miRNAs sono distribuiti lungo tutto l'mRNA, sia a livello delle regioni 5'UTR nonché nelle regioni codificanti stesse (51,52) (Figura 4). Inoltre, recenti scoperte dimostrano fra l'altro che un certo numero di interazioni miRNA-mRNA non avvengono attraverso questi meccanismi canonici (53).

E' chiaro quindi che la sola corrispondenza della "seed sequence" non è assolutamente sufficiente a spiegare i meccanismi di identificazione delle molecole target, ma che caratteristiche della "struttura di legame" ove avviene il riconoscimento dell'mRNA target abbiano un ruolo fondamentale in questo processo.

Proprio su queste ulteriori caratteristiche del legame miRNA-mRNA target si basano gli algoritmi di calcolo dei software di predizione (54).

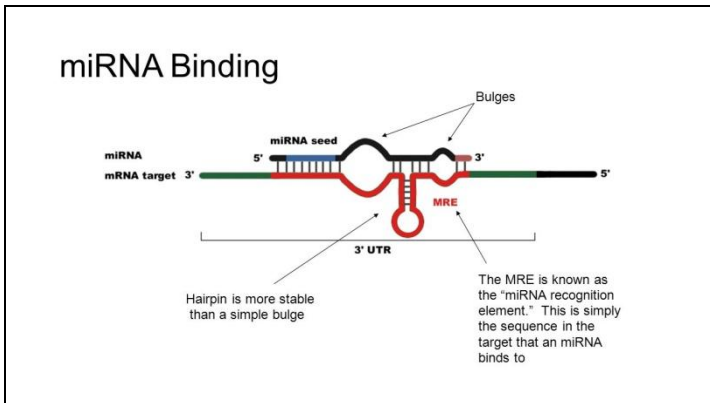


Figura 4. Regioni legame miRNA-mRNA target

2.3 Funzione dei miRNA

Ad ogni modo, per la funzione dei miRNA è essenziale la formazione del complesso RISC, composto almeno da una proteina AGO e da un miRNA. Il complesso RISC formato esclusivamente da miRNA e proteine AGO che legano l'mRNA prende il nome di *Minimal RISC*. (53)

Se da un lato al miRNA è deputato il compito di riconoscimento dell'RNA target, le proteine AGO determinano il modo d'azione del complesso RISC. Difatti i miRNAs possono specificatamente riconoscere il loro mRNA target e attraverso repentini cicli di attacco/distacco dall'mRNA possono così facilmente controllare molte molecole differenti, le proteine AGO di per sé costituiscono una piattaforma essenziale ed efficiente per legare miRNA, mRNA e fattori accessori. (42,43).

Il complesso *minimal RISC* sebbene sia dotato di autonomia funzionale, quasi sempre funge però da struttura di supporto per fattori quali proteine per l'assemblaggio di RISC, proteine coinvolte nella regolazione traduzionale, proteine coinvolte nel metabolismo dell'RNA, che possono determinare modalità e destino degli mRNA legati. (53).

Il complesso RISC dopo aver legato uno specifico miRNA agisce determinando una inibizione della traduzione o una degradazione dell'RNA. Tali meccanismi di silenziamento genico, secondo recenti dati non costituirebbero in realtà delle modalità alternative di inibizione, ma piuttosto un processo sequenziale, dove l'mRNA legato e complessato da RISC sarebbe inizialmente bloccato per la traduzione e conseguentemente destinato alla degradazione. (55)

Oltre che svolgere la propria attività regolativa all'interno del citoplasma, il complesso RISC sembrerebbe avere delle funzioni inibitorie anche a livello del nucleo cellulare. In particolare, secondo recenti dati, i complessi miRISC (miRNA-RISC) sarebbero capaci di effettuare uno "shuttling" nucleo-citoplasmatico grazie a proteine importine/esportine connesse alle proteine AGO che facilitano il passaggio attraverso la membrana nucleare (56,57).

Diverse sono le ipotesi riguardo il ruolo svolto dai miRNA nel contesto nucleare, da autori che mostrano una regolazione della degradazione post-trascrizionale di RNA nucleari e l'interazione con RNA ribosomiali, ad autori che li ritengono coinvolti nei meccanismi di splicing alternativo e di trascrizione genica (53).

2.4 Regolazione dei miRNA

I miRNA, come ampiamente mostrato, hanno la capacità di interagire e di conseguenza gestire le funzioni di mRNA target, determinando una fine regolazione post-trascrizionale. Ma chiaramente anche i miRNA, a loro volta, sono regolati sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale

La trascrizione è uno step essenziale per la regolazione dell'espressione dei miRNA. Molte caratteristiche dei geni codificanti proteine, come le isole CpG, le TATA box e le modificazioni istoniche sono presenti anche nei promotori dei geni codificanti per i miRNA, suggerendo che i regolatori della trascrizione dei miRNA siano gli stessi dei

geni codificanti proteine: fattori di trascrizione (TFs), *enhancers*, and *silencing elements* (58)

Inoltre, in alcuni casi sembra che i miRNA possano autoregolare la propria trascrizione, agendo su propri fattori di trascrizione stabilendo un feedback negativo o positivo. (53)

L'espressione dei miRNA è anche controllata da processi che intervengono in fase post-trascrizionale, per esempio, singoli miRNA presenti in uno stesso cluster genomico ed elaborati dallo stesso pri-miRNA, possono poi essere trascritti in diverse forme mature. Chiaramente una down-regolazione dell'espressione di geni chiave nella maturazione dei miRNA, come ad esempio di Drosha, determina una reazione sulle sintesi e sulle attività dei miRNA. (59).

2.5 miRNAs circolatori

I miRNA sono nucleotidi endogeni, che possono però essere rilasciati nello spazio extracellulare e ritrovarsi così nei liquidi corporei, come il sangue, urina e saliva (60)

I miRNA circolatori sono relativamente stabili, soprattutto in confronto con l'RNA extracellulare, suggerendo che questi miRNA siano protetti in qualche misura da alcuni meccanismi di degradazione (61). La stabilità dei miRNA in ambiente extracellulare è attribuibile sia al fatto di trovarsi all'interno di esosomi o microvescicole, sia all'essere legati a lipoproteine ad alta densità o a proteine AGO (62,63)

Due sono le ipotesi proposte per spiegare l'origine dei miRNA circolatori, la prima suggerisce che le cellule abbiano sviluppato meccanismi di rilascio selettivo di miRNA atte a mediare la segnalazione cellula-cellula (64,65). In tal senso, la comunicazione cellulare necessaria per coordinare le diverse funzioni biologiche all'interno dello stesso tessuto o in differenti tessuti/organi sarebbe deputata anche a fattori non "tradizionali", come appunto i miRNA.

Gli esosomi formati per gemmazione da vescicole interne di compartimenti endosomiali citoplasmatici, contenenti proteine, mRNA e miRNA, sarebbero attivamente secreti dalla membrana plasmatica interagendo con cellule bersaglio specifiche, dove secondo alcuni autori, determinerebbero cambiamenti funzionali (66).

La seconda ipotesi riguardo al ruolo dei miRNA circolanti è che questi vengano rilasciati in modo non selettivo, dopo un sovraccarico di produzione o per una aumentata escrezione. I miRNA sarebbero legati a proteine e potrebbero essere rilasciati come conseguenza dell'apoptosi o della degradazione di componenti cellulari dovute ad alterazioni e a danni in alcuni tessuti o organi (67,68).

A prescindere dalle cause che ne determinano la presenza nei fluidi biologici, risulta chiaro che i miRNA si trovino in circolo fundamentalmente legati a proteine o all'interno di microparticelle (Figura 5)

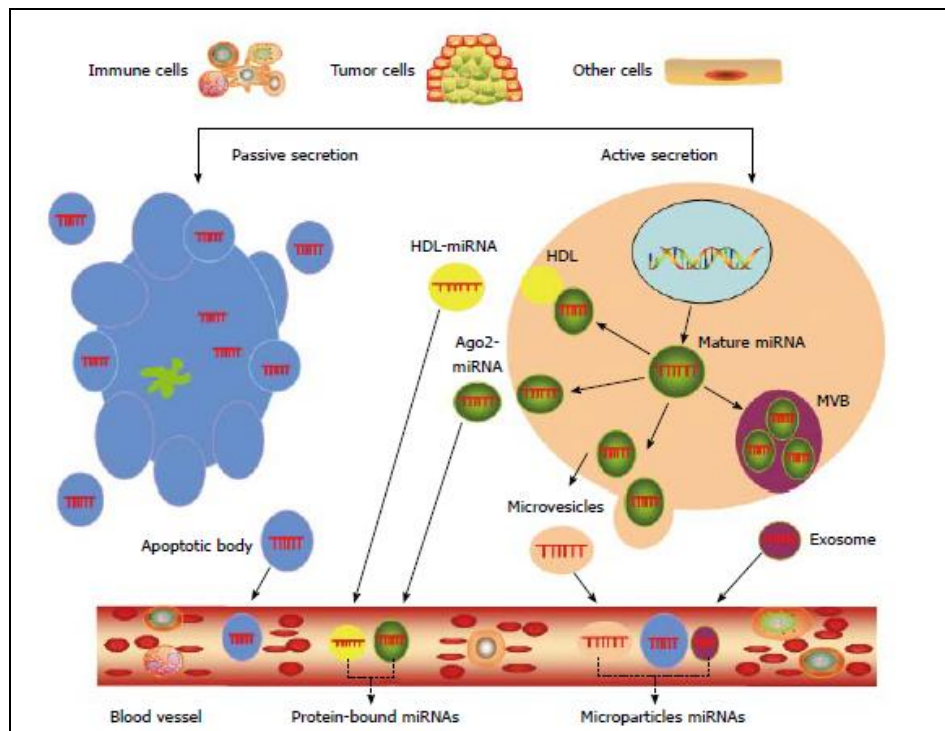


Figure 5. Meccanismi di secrezione dei miRNA nei vasi sanguigni.

Da questo punto di vista i miRNA attraggono come potenziali biomarcatori poiché possono essere tessuto e malattia specifici, stabili in circolo e in grado di distinguere tra individui sani e malati (69).

Se i miRNA presenti in circolo siano soprattutto liberi nel plasma o all'interno di microvescicole, rappresenta un argomento poco chiarito, con risultati contrastanti a sostegno delle due evidenze (70,71).

Diversi autori non solo attribuiscono un ruolo ai miRNA circolanti nel contesto fisiologico, ma anche nell'ambito della progressione neoplastica. Sono ritenuti potenziali regolatori delle comunicazioni intercellulari delle cellule neoplastiche, mostrando fra l'altro un effetto paracrino sulla crescita tumorale (72-74).

La prima descrizione riguardante la presenza di miRNA nel siero e il loro potenziale impiego come marcatore neoplastico risale al 2008 (75) .

Da allora è stato compreso come i miRNA siano ampiamente connessi all'insorgenza e alla progressione del cancro.

2.6 Cambiamenti metodologici nello studio dei miRNA circolatori

Per valutare i miRNA circolanti è essenziale rimuovere tutte le componenti cellulari come eritrociti, leucociti e piastrine dal sangue. Variazioni pre-analitiche potrebbero alterare la corretta quantificazione dei miRNA.

In particolare, per esempio, gli eritrociti esprimono alti livelli di miR-451 e miR-16, il loro riscontro può rappresentare un segno di emolisi nei campioni di plasma (76,77)

Inoltre anche se i miRNA sono stabili e resistenti alla degradazione nel siero o nel plasma, ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono determinarne una degradazione (78). La poca quantità di queste molecole, se confrontate con le quantità di proteine e di lipidi, ne rende complesso l'opera di isolamento. Fra l'altro proprio le proteine e i lipidi potrebbero interferire con l'isolamento e i processi di estrazione dei miRNA. Rispetto ai primi protocolli, oggi, molti problemi sono stati

sostanzialmente risolti grazie all'avvento di colonnine leganti i piccoli RNA, che caratterizzano quasi tutti i più comuni kit commerciali.

Inoltre, a causa della bassa resa, i metodi tradizionali di quantificazione dell'RNA, come l'uso dello spettrofotometro, non sono in grado di effettuare una corretta quantificazione proprio in virtù delle dimensioni o della qualità dei miRNA isolati dal plasma. Attualmente, la qRT-PCR è considerata la tecnica di elezione per la valutazione dei miRNA (79).

3. MIRNA E HCC

I miRNA stanno rapidamente emergendo come fattori chiave nello sviluppo di molte neoplasie, tra cui anche l'HCC. I miRNA, partecipando in molti processi cellulari, sono implicati nell'iniziazione e nella progressione del carcinoma epatocellulare (80) (Figura 6)

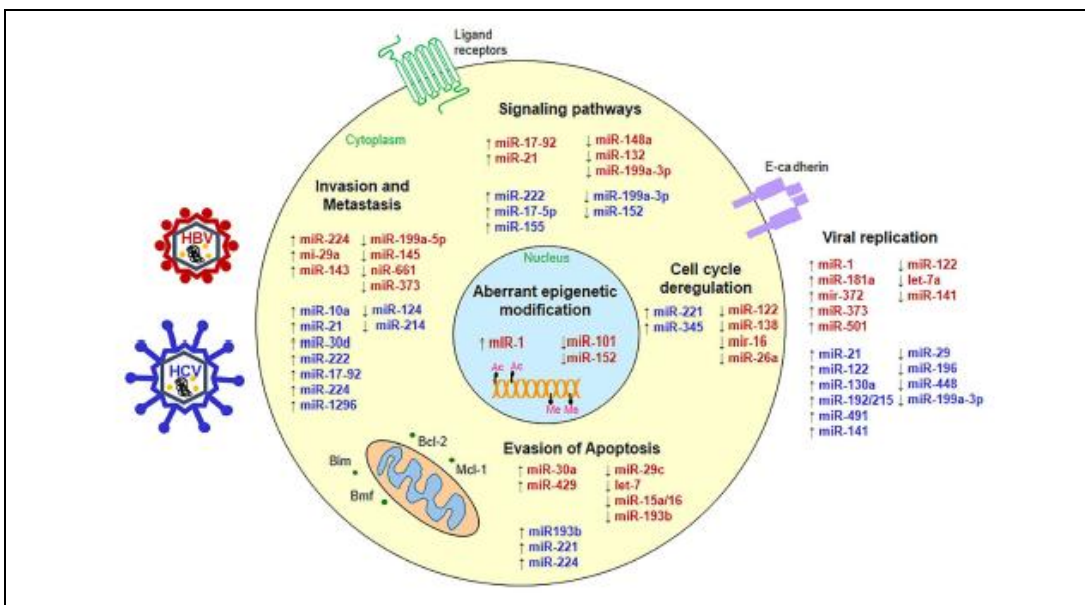


Figura6. Stato dei miRNA nel contesto dell'infezione da virus epatici

3.1 miRNA nella regolazione della replicazione virale.

I miRNA sono essenziali nel sostenere la replicazione virale e nel perturbare i principali pathway molecolari in cellule infettate dai virus HBV e HCV.

I virus HBV e HCV usano i miRNA dell'ospite per completare il ciclo di vitale e stabilire un'infezione cronica. (81)

Infezioni croniche con HBV o HCV aumentano notevolmente il rischio relativo di insorgenza di cancro al fegato. Difatti, queste infezioni virali croniche sono presenti in più del 70% dei casi di HCC (82)

Per esempio, il mir-122, che è spesso down-regolato in molte patologie epatiche, mostra effetti opposti sulla replicazione dei virus HBV e HCV (83)

Il miR-122 controlla la replicazione di HCV attraverso il legame con il sito ribosomiale IRES (Internal Ribosomal Entry Site) al 5-UTR del RNA virale aumentando la replicazione virale e promuovendo la traduzione di HCV (83) Al contrario del miR-122, il miR-199a-3p pur legando lo stesso elemento IRES inibisce la replicazione di HCV (84).

Diversamente il miR-196 mostra un ruolo protettivo up-regolando l'espressione dell'Eme Ossigenasi 1 e inibendo indirettamente la trascrizione dell'HCV (85)

3.2 Ciclo cellulare e apoptosi

I miRNA possono alterare la proliferazione cellulare attraverso la regolazione di fattori coinvolti nel ciclo cellulare, nella crescita e nell'apoptosi.

Per esempio, il miR-26a controlla il checkpoint G1/S avendo come target l'mRNA della ciclina D2/E2 (86) mentre la downregolazione della famiglia dei miR Let-7 causa una aumentata proliferazione cellulare attraverso il pathway di STAT3 (87). Altro esempi sono rappresentati dalla downregolazione dei miR-195 e miR-138, e viceversa dalla overespressione dei miR-221 e miR-222, che determinano, attraverso

l'inibizione della trascrizione delle cicline o il blocco degli inibitori delle chinasi, la progressione tumorale (88)

Le cellule neoplastiche per proliferare in modo deregolato ed aberrante devono sfuggire al controllo dei fisiologici meccanismi apoptotici. In studi condotti su casi di HCC particolarmente aggressivi, fenomeni come la down-regolazione dei miR-29, miR-101 e miR-122 causa un aumento delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2, Mcl-1, e Bcl-w, determinando un'accentuata proliferazione (89).

3.3 Alterazione di pathway cellulari

Molti fattori chiave di pathway cellulari sono bersaglio di miRNA, questo è il caso ad esempio dell'oncosoppressore PTEN, regolatore della via di trasduzione PI3K/AKT, inibito dai miR-21, miR-222 e miR-29a in HCC (89).

L'alterazione di pathway biologici può contribuire all'acquisizione da parte delle cellule di capacità invasive e metastatiche. Il miR-224, un miRNA altamente espresso in HCC, causa metastasi inibendo, tra gli altri, i geni target: Cdc42 e Bcl-2 (90)

Il miR-122 è in grado di inibire l'angiogenesi e le metastasi intraepatiche sopprimendo l'espressione dell'enzima TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme) (91).

3.4 Ruolo diagnostico e prognostico dei miRNA in HCC

Le numerose evidenze a sostegno dell'espressione differenziale di miRNA nelle cellule di carcinoma epatocellulare rispetto ai normali epatociti suggerisce il potenziale ruolo dei miRNA nella diagnosi e nella prognosi dell'HCC.

Molti studi hanno cercato di individuare un pannello di miRNA o almeno un certo numero di miRNA in grado di discriminare tra tumore e sano, dai primi esperimenti condotti su tessuto epatico sino agli ultimi a livello plasmatico.

Se da un lato diversi studi sul carcinoma epatocellulare indicano numerosi miRNA deregolati, d'altro lato, non vi sono dati confermati su quali specifici miRNA possano svolgere il ruolo di marcatore neoplastico. In particolare, di volta in volta diversi autori evidenziano il ruolo potenziale come marcatore diagnostico e / o prognostico di differenti miRNA (92) (Figura 7).

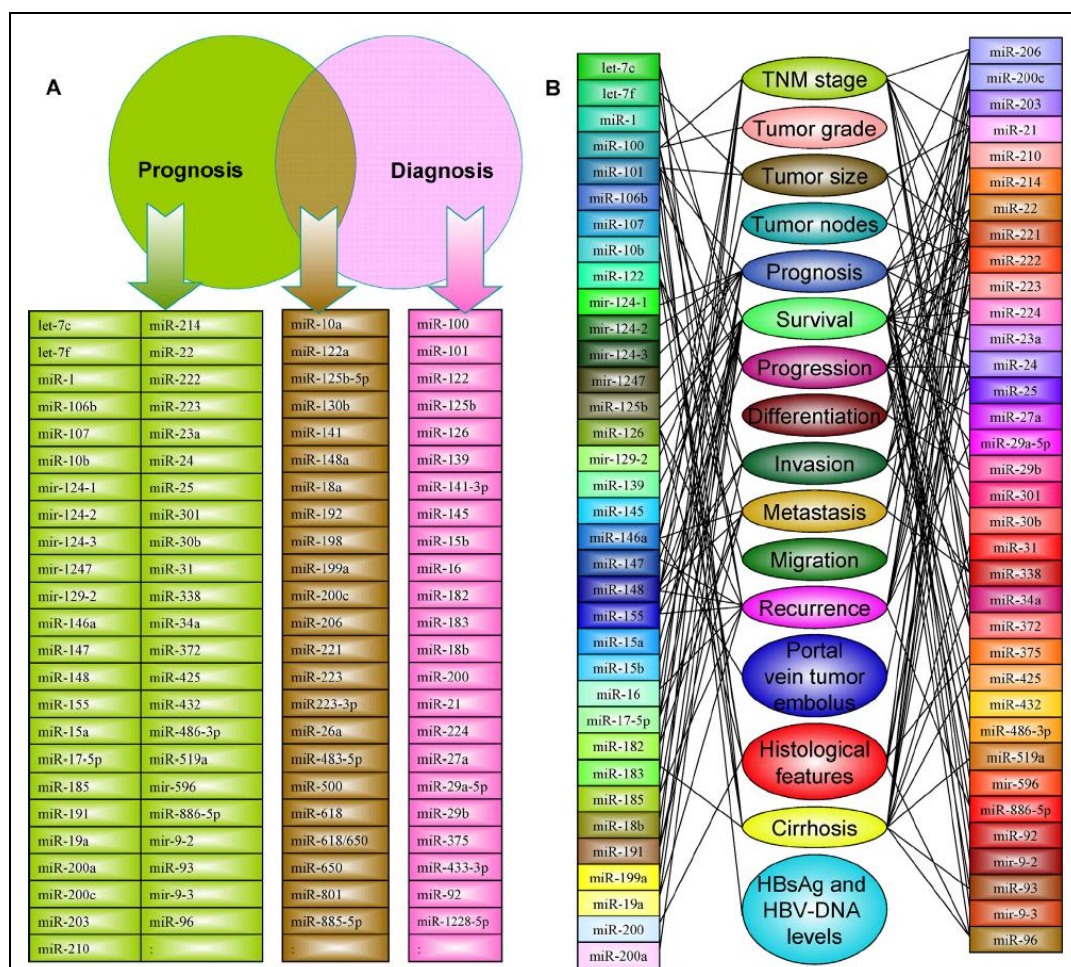


Figura 7: Ruolo diagnostico e prognostico dei miRNA in HCC

Molto sforzi sono stati fatti per sviluppare biomarcatori circolanti non invasivi per la diagnosi dell'HCC ma nonostante i miRNA siano altamente stabili nel siero, l'accuratezza diagnostica della analisi non è ancora soddisfacente. A volte, la discrepanza dei livelli di espressione di alcuni miRNA è davvero molto evidente. Per esempio, l'espressione sierica del miR-101 in uno studio si è mostrata

significativamente superiore nei pazienti HBV-HCC rispetto ai controlli sani mentre un altro studio ha indicato un dato esattamente contrario (92).

Molti autori ritengono inoltre che i miRNA possano essere utili strumenti per valutare la prognosi dell'HCC e seguire gli eventuali progressi del tumore in termini di invasività, metastatizzazione, migrazione e recidive.

Su e coll. hanno mostrato che l'espressione di miR-25 era significativamente più elevata in tessuti neoplastici di HCC che nei normali ed era significativamente correlata con la classificazione TNM (93). Allo stesso modo, anche l'espressione sierica del miR-17-5p era più elevata e significativamente correlata con lo stadio TNM del carcinoma epatico (94). Il livello dei miR-29b, miR-34, miR-100, miR-146 miR-206, e miR-338 correla con lo stadio TNM e si ritrovano meno presenti nei tessuti HCC e nel siero di pazienti affetti da carcinoma epatico (92).

3.5 miRNA nella terapia per HCC

Come detto precedentemente, alterazioni dell'espressione di miRNA si associano all'insorgenza dell'HCC. L'espressione esogena di miR-oncosoppressori o l'inibizione di onco-miR può determinare una regressione parziale dei fenotipi maligni.

In studi condotti su modelli murini di HCC, sono stati testati i potenziali effetti di terapie basate sulla somministrazione o inibizione di miRNA.

La somministrazione sistemica di miR-26a, un miRNA espresso ad alti livelli nei tessuti normali ma poco presente in HCC, ha causato l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e l'induzione di apoptosi (95).

Studi indicano che la diminuzione del livello del miR-221 attraverso il legame con l'antimiR-221 possa prolungare la sopravvivenza delle cellule e indurre una riduzione del numero e delle dimensioni dei noduli tumorali in topi (96). D'altra parte, il

restauro di miR down-regolati, come il miR-122, con l'introduzione di miR esogeno nel sistema cellulare, può inibire la tumorigenesi e le metastasi in vivo (91).

SCOPO DELLA RICERCA

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la forma più comune di tumore maligno del fegato ed è il quinto tumore per frequenza e la seconda causa di morte correlata al cancro nel mondo.

La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con HCC negli anni 2005-2007 in Italia è stata rispettivamente del 17% per i maschi e 16% per le femmine (5) La prognosi infausta è da associare in modo particolare alla tardiva scoperta del tumore (13,97,98)

Le metodologie diagnostiche e prognostiche ad oggi usate, nonostante i progressi fatti nella terapia e nel trattamento di questo tumore, sono ancora insufficienti per diagnosticare e valutare la prognosi negli stadi precoci della patologia.

In ambito oncologico, le biotecnologie stanno rapidamente cambiando i trattamenti terapeutici e il modo di studiare e analizzare le neoplasie, tant'è che negli ultimi anni numerosi studi sono stati pubblicati nel tentativo di identificare firme genético-molecolari relative all'epatocarcinoma.

La scoperta di biomarcatori presenti nei fluidi corporei e nei tessuti associati con l'insorgenza dell'HCC è una delle più promettenti tecniche per aumentare l'accuratezza diagnostica e prognostica per l'HCC.

In questo contesto i miRNA circolanti mostrano diverse e importanti caratteristiche che li possono rendere nuovi e ideali biomarker: sono stabili nei fluidi corporei e sono caratterizzati da facilità e basso costo di analisi grazie a metodiche di quantizzazione sensibili, come la RealTime quantitativa (qRT-PCR) (75,99) Tali caratteristiche e, al contrario, la mancanza di metodi non invasivi per monitorare gli stadi precoci di HCC spiegano poiché molti li ritengono una grande promessa come biomarcatori diagnostici e prognostici. (100)

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante a singolo filamento di circa 21-30 nucleotidi. Essi modulano l'espressione di vari geni target sia livello post

trascrizionale che traduzionale. Sono responsabili di una regolazione fine dei processi fisiologici contribuendo in modo però sostanziale ai normali meccanismi di regolazione genica. I miRNA sono implicati nello sviluppo, nel differenziamento cellulare e nella regolazione del ciclo cellulare e la loro espressione aberrante è comune nell'insorgenza dei tumori, del diabete e di disordini immunodegenerativi (30-32). I miRNA sono rilasciati nello spazio extracellulare ed essi sono estremamente stabili nei fluidi corporei, inclusi siero e plasma, dove sono associati in microvescicole o legati a proteine (75). Sulla relazioni tra miRNA e HCC diversi studi hanno mostrato un'aberrante espressione di specifici miRNA nel siero e nel plasma di pazienti affetti da HCC così come a livello del tessuto tumorale (101).

In tal senso questo studio vuole fare un'analisi di *profiling* di espressione dei miRNA circolanti allo scopo di individuare un pannello di miRNA validi per una diagnosi precoce della malattia, che possano eventualmente dare anche indicazioni prognostiche e che rappresentino utili marcatori per seguire il decorso clinico della patologia. Per raggiungere tale scopo, l'approccio più adatto ed innovativo è sembrato essere quella di una analisi del *miRNoma* circolante.

Lo studio presuppone due fasi: la prima prevede l'analisi globale di circa 380 miRNA del plasma attraverso metodica quantitativa RQ-PCR su pazienti affetti da epatocarcinoma, su pazienti post trattamento in risposta clinica e strumentale, pazienti cirrotici e donatori sani. I miRNA esaminati rappresentano circa la metà dell'intero *miRNoma* umano conosciuto e valutabile, in particolare, sono presi in considerazione tutti i miRNA a funzione nota, cioè tutti quei miRNA ad oggi caratterizzati da un punto di vista funzionale. L'analisi globale dei miRNA circolanti per singolo paziente è resa particolarmente difficoltosa dall'esiguo numero di molecole presenti in circolo, per questo è necessario procedere a uno specifico step di preamplificazione.

Il secondo punto dello studio prevede poi la validazione su una coorte più ampia e tramite saggi singoli di alcuni specifici miRNA individuati come differenzialmente

espressi dalla fase di screening. Sul pannello di miRNA sarà condotta un'analisi quantitativa per esaminarne i livelli di espressione nel plasma di pazienti affetti da epatocarcinoma rispetto alle altre categorie di pazienti esaminati.

I risultati ottenuti permetteranno la selezione di specifici miRNA plasmatici, utili come potenziali marcatori sia in fase diagnostica sia per monitorare la patologia in modo non invasivo.

MATERIALI E METODI

5.1 Pazienti e campioni

Diagnosi, selezione e arruolamento dei pazienti è condotto presso l'Unità di Medicina Interna della A.O. "Villa Sofia-Cervello" di Palermo, un consenso informato scritto è ottenuto da ciascun paziente. Ai pazienti sono applicati criteri diagnostici e di stadiazione secondo l'algoritmo BCLC (Barcelona Clinic for Liver Cancer) e trattati secondo il trattamento più adeguato indicato dal sistema adottato.

I pazienti arruolati possono suddividersi in differenti categorie: pazienti affetti da epatocarcinoma HCV-correlato di nuova diagnosi, pazienti affetti da epatocarcinoma sottoposti al trattamento terapeutico con una risposta completa valutata secondo criteri clinici e strumentali, pazienti cirrotici HCV-correlati ma viremia negativi post-trattamento, e donatori sani arruolati presso l'Unità di Ematologia della A.O. "Villa Sofia-Cervello" di Palermo (5,14,15).

Campioni di sangue periferico in provette in EDTA sono stati raccolti per un totale di 46 pazienti studiati.

5.2 Schema dello studio

Lo studio prevede due fasi: un primo step di analisi di *miRNA profiling* utilizzando un *Array-TaqMan Human MicroRNA*, in combinazione con tecniche di preamplificazione *RT Megaplex* ed un secondo step di validazione dei risultati ottenuti su miRNA candidati.

Per la prima fase di analisi globale dei miRNA, sono stati raccolti campioni di sangue periferico da 16 pazienti. I pazienti sono stati selezionati per ottenere 4 gruppi confrontabili: 4 campioni da carcinoma epatocellulare di nuova diagnosi (HCC), 4 da

pazienti affetti da carcinoma epatocellulare trattato in remissione clinica e strumentale, 4 da pazienti con cirrosi trattati viremia-negativi e 4 donatori sani.

Per approcciare la seconda fase dello studio, su miRNA selezionati ed identificati dallo screening iniziale, è stata eseguita una analisi con saggio singolo su una nuova coorte di pazienti: 10 HCC, 10 HCC trattati e 10 donatori sani

5.3 Processamento dei campioni ed estrazione dei miRNA circolanti

Innanzitutto, per poter ottenere i miRNA circolanti, il primo passo consiste nella separazione per centrifugazione del plasma dal sangue. I campioni di sangue periferico prelevati in provette in EDTA sono centrifugati a 2000 g per 5 minuti, e il sovranatante ottenuto è successivamente centrifugato a 4000 g per 5 min. Il plasma è trasferito in una provetta pulita e centrifugato nuovamente a 12.000 g per 15 min. 200 µL di plasma così ottenuti sono trasferiti in una nuova provetta e conservati a -80°C fino all'esecuzione dell'esperimento.

Ottenuto il plasma si procede ad estrarre l'RNA dai campioni, in particolare, è usato il kit *miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)* designato per estrarre l'RNA totale, compresi i piccoli RNA, dai fluidi corporei.

Procedura:

1. I campioni di plasma possono essere preparati prima dell'estrazione o scongelati.
2. Aggiungere 5 volumi del reagente QIAzol al campione e incubare a temperatura ambiente per 5 min
3. Aggiungere cloroformio per un volume eguale al campione di partenza e vortexare vigorosamente per 15s, incubando a temperatura ambiente per 2-3 min
4. Centrifugare per 15 minuti a 12.000xg a 4 ° C.

Dopo centrifugazione, il campione si separa in 3 fasi: una parte superiore, incolore, costituita da una fase acquosa contenente RNA; un'interfase bianca e una fase inferiore, rossa, costituita da materiale organico.

5. Trasferire la fase acquosa superiore in un tubo di raccolta e aggiungere 1,5 volumi di etanolo al 100%

6. Caricare circa 700 μ l di campione, compreso l'eventuale precipitato che può essersi formato, in una colonna RNeasy MinElute e centrifugare a 8000xg per 15 s a temperatura ambiente e ripetere il passaggio per il resto del campione.

8. Aggiungere 700 μ l di buffer RWT alla colonna RNeasy MinElute e centrifugare per 15 s a 8000xg

9. Aggiungere 500 μ l buffer RPE sulla colonna RNeasy MinElute e centrifugare per 15 s a 8000xg

10. Caricare 500 μ l di etanolo all'80% nella colonna RNeasy MinElute

11. Centrifugare la colonna RNeasy MinElute alla massima velocità per 5 minuti per asciugare la membrana

12. Aggiungere 17 μ l di acqua RNasi-free direttamente al centro della RNeasy MinElute e centrifugare a massima velocità per 1 min per ottenere 15 μ l di eluato.

5.4 miRNA profiling.

Per effettuare uno studio del *miRNoma* umano è stato usato un sistema di *TaqMan Array-TLDA Human miRNA panel (MFC MicroFluidic Card ThermoFisher)*. Questa tecnologia rappresenta un metodo di RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) attraverso cui si possono contemporaneamente saggiare i livelli di espressione di circa 380 miRNA in una singola analisi. In particolare è usata la *TaqMan Card A*, i miRNA quantizzati attraverso questa *Card* rappresentano circa il 50% dei miRNA attualmente valutabili, in particolare, si tratta dei cosiddetti miRNA “a funzione nota”; la composizione della card è indicata sul sito www.thermofisher.com).

Per ottenere il profilo di miRNA plasmatici per ogni paziente è stato condotto un esperimento che consta di tre step, descritti nei dettagli di seguito. L'RNA totale estratto mediante colonnine RNeasy MinElute è sottoposto a trascrizione inversa (RT) usando dei pool di primer specifici per retrotrascrivere i 380 miRNA della *TaqMan Card A*.

In seguito per generare abbastanza cDNA per il successivo step di Real-Time PCR, il cDNA è pre-amplificato usando *Megaplex PreAmp primer*.

Il prodotto di pre-amplificazione insieme ai reattivi per la reazione TaqMan RealTime sono caricati in ognuna delle 8 porte della *TaqMan Human MicroRNA Card A*.

Schema del workflow seguito è mostrato in Figura 8

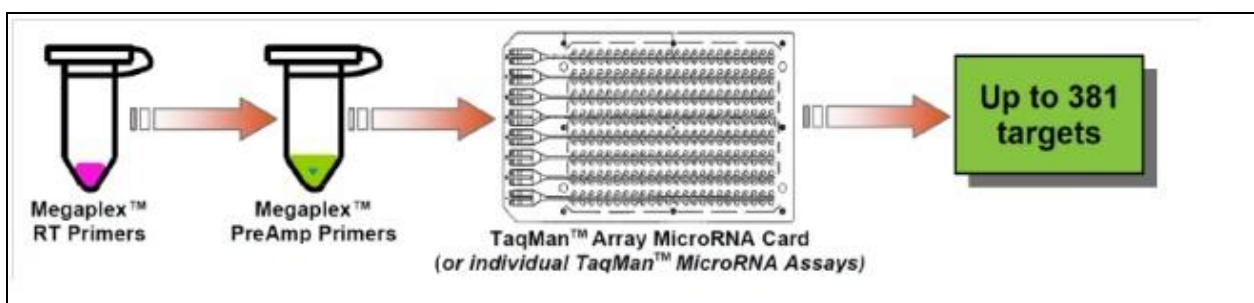


Figura 8. Schema del workflow seguito per *TaqMan Array-TLDA MicroRNA Card*

RetroTrascrizione (RT)

L'RNA è estratto da 16 campioni costituenti il gruppo di pazienti su cui fare l'analisi di *profiling*: 4 campioni di HCC alla diagnosi, 4 campioni di HCC trattati e in risposta completa, 4 pazienti cirrotici trattati, 4 donatori sani.

Per ognuno di questi campioni per analizzare l'espressione dei miRNA, l'RNA estratto è sottoposto a reazione di retrotrascrizione usando *High Capacity cDNA Archive Kit (ThermoFisher)* con specifici primers per i 380 miRNAs. Tali primers sono contenuti nella *Megaplex RT Human Pool A for TaqMan miRNA* facilitando molto e rendendo lineare il workflow per la quantizzazione di 380 miRNA in

parallelo, attraverso la retrotrascrizione del cDNA di tutti questi miRNA in una singola reazione.

La reazione si effettua con 5 µl di RNA in un volume finale di 10 µl:

RT Reaction Mix Components	Volume for one sample (µL)
Megaplex RT primers (10x)	1 µL
dNTPs with dTTP(100nM)	0,2 µL
Mutiscribe Reverse Transcriptase (50U/µL)	0,5 µL
10x RT Buffer	1 µL
Rnase Inhibitor (20U/µL)	0,1 µL
Nuclease-free water	2,2 µL
Total	5 µL

Il profilo termico per la reazione di retro-trascrizione (RT) è descritto di seguito:

Stage	Temp	Time
Hold	16 °C	30 min
Hold	42 °C	30 min
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

Reazione di Pre-Amplificazione

Quando è possibile avere solo una piccola quantità di RNA, l'uso dei *Megaplex PreAmp Primers* aumenta significativamente l'abilità di evidenziare bassi livelli di miRNA, dando la possibilità di generare un ampio profilo di espressione a partire da scarse quantità di RNA. La reazione di pre-amplificazione è condotta sul cDNA della retrotrascrizione precedente, con i *Megaplex PreAmp Primers Human Pool A* designati per essere usati con i *Megaplex RT Human Pool A*. Difatti i primers del

Megaplex PreAmp Pool consistono di primers forward specifici per ciascuno dei 380 miRNA e un primer reverse universale.

La pre-amplificazione consente una uniforme amplificazione di tutti i miRNA prima della quantizzazione attraverso Real-Time PCR

La reazione di pre-amplificazione si effettua con 2,5 µl di cDNA in un volume finale di 25 µl secondo lo schema seguente:

RT Reaction Mix Components	Volume for one sample (µL)
TaqMan PreAmp Mater Mix (2x)	12,5 µL
Megaplex PreAmp Primers (10x)	2,5 µL
Nuclease-free water	7,5 µL
Total	22,5 µL

Il profilo termico per la reazione di pre-amplificazione è descritto in figura:

Stage	Temp	Time
Hold	95 °C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2 min
Cycle (12)	95 °C	15 sec
	60 °C	4 min
Hold	99.9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

Dopo lo step di pre-amplificazione, il prodotto è diluito 1:4 con TE 0.1X

RealTime PCR

Il prodotto di pre-amplificazione così diluito è aggiunto alla *TaqMan Universal PCR Master Mix* e portato a un volume finale di 100 µl, in accordo a quanto descritto:

Components	Volume for one Array (μL)
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (2x)	450 μL
Diluted PreAmp product	360 μL
Nuclease-free water	90 μL
Total	900 μL

Si tratta di una reazione di RQ-PCR condotta su strumento RealTime 7900HT (Applied Biosystems). La mix di reazione è caricata in ognuna delle 8 porte della *TaqMan Human MicroRNA Card A*, seguendo il profilo termico specifico:

Stage	Temp	Time
Hold	37 °C	10 min
Hold	50 °C	2 min
Hold	72 °C	50 sec
Cycle (55)	95 °C	15 sec
	60 °C	50 sec
	72 °C	1 min

I dati di qRT-PCR sono quantificati utilizzando il software SDS 2.3 utilizzando come controllo endogeno i miR U6, l'RNU48 e il miR-21.

Il valore di ciclo soglia (cycle threshold: C_T), calcolato relativamente al controllo endogeno, è stato utilizzato per l'analisi (ΔC_T). Il metodo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (algoritmo delta-delta- C_T) è stato utilizzato per calcolare le variazioni relative nell'espressione genica tra i diversi gruppi

5.5 Espressione dei miRNA

Per confermare i miRNA identificati come differenzialmente espressi tramite l'analisi di *miRNA profiling*, si è proceduto alla valutazione su una nuova e più ampia coorte

attraverso analisi basata su saggio singolo. L'RNA è estratto dai 30 campioni di plasma della nuova coorte (10 HCC, 10 HCC trattati e in risposta, 10 donatori sani) usando *miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)* come descritto precedentemente. In seguito su questo si conduce dapprima una reazione di retrotrascrizione usando un saggio *TaqMan microRNA Assay (ThermoFisher)* specifico per ogni miRNA analizzato: miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b oltre chiaramente ai miR U6, RNU48 e miR-21e in seguito reazione RealTime PCR usando *TaqMan MiRNA Assay*

La reazione di retrotrascrizione è condotta per ogni campione usando *High Capacity cDNA Archive Kit (ThermoFisher)* con lo specifico primer 5x per il miR in esame.

2 µL di RNA è aggiunto alla mix di reazione in un volume finale di 5 µL. La mix è così composta:

RT Reaction Mix Components	Volume for one sample (µL)
Specific miR- RT primers (5x)	1 µL
dNTPs with dTTP(100nM)	0,05 µL
Mutiscribe Reverse Transcriptase (50U/µL)	0,34 µL
10x RT Buffer	0,5 µL
Rnase Inhibitor (20U/µL)	0,1 µL
Nuclease-free water	1,0 µL
Total	3,5 µL

Con un profilo termico uguale alla retrotrascrizione con Megaplex RT Primers:

Stage	Temp	Time
Hold	16 °C	30 min
Hold	42 °C	30 min
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

A questa fa seguito una reazione di RQ-PCR (Realtime PCR) per valutare l'espressione dei miRNA in saggi singoli sulla nuova coorte di pazienti per confermare i dati ottenuti dalla analisi di *profiling*.

Tale reazione è condotta su strumento RealTime 7900HT (Applied Biosystems) con metodica Taqman allo scopo di effettuare una singola quantizzazione dei miRNA circolanti.

In un volume finale di 30 μL , 5 μL di cDNA della retro-trascrizione miRNA specifica è analizzato attraverso *TaqMan assay* secondo la seguente reazione:

Components	Volume for one Array (μL)
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (2x)	15 μL
TaqMan assay miR- (20x)	1,5 μL
Nuclease-free water	8,5 μL
Total	30 μL

Con il seguente profilo termico:

Stage	Temp	Time
Hold	37 °C	10 min
Hold	50 °C	2 min
Hold	95 °C	10 min
Cycle (50)	95 °C	15 sec
	60 °C	1 min

Il valore di ciclo soglia (cycle threshold: C_T), calcolato relativamente al controllo endogeno, è stato utilizzato per l'analisi (ΔC_T). Il metodo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (algoritmo delta-delta-Ct) è stato utilizzato per calcolare le variazioni relative nell'espressione genica tra i diversi gruppi.

5.6 Linee cellulari

È stato condotto uno studio dei profili di espressione dei miRNA a livello cellulare su diverse linee cellulari. Le linee cellulari HepG2 e Huh7 (provenienti dal Laboratorio del Prof. Alessandro, Università di Palermo) derivano da cellule di carcinoma epatico. La linea cellulare MV4-11 (acquistate presso la American Type Culture Collection (ATCC), CRL-9591) deriva da cellule di leucemia mielomonocitica bifenotipica.

La linea HepG2 è mantenuta in terreno MEM (Minimum Essential Medium Eagle), la linea Huh7 è mantenuta in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mentre la linea MV4-11 è mantenuta in terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

Le cellule sono state coltivate ed espanse a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂ in terreno contenente 10% di siero fetale bovino (Sigma-Aldrich) ed antibiotici 1X.

L'RNA totale è estratto dai lisati cellulari tramite estrattore automatico *QIAasyphony* (*Qiagen*).

L'RNA è retroscritto tramite *High Capacity cDNA Archive Kit* (*ThermoFisher*) con *Megaplex RT Human Pool A* contenente i specifici primers per i 380 miRNA, come descritto precedentemente. Effettuata la retroscrittura si procede, seguendo lo stesso protocollo già descritto, con la RealTime PCR con metodica TaqMan utilizzando le *TaqMan Human MicroRNA Card A*.

Il sovrnatante delle linee cellulari è raccolto prima che le cellule siano a confluenza e da questo è estratto l'RNA tramite colonnine di estrazione *miRNeasy Serum/Plasma Kit*.

Si procede poi a una reazione di retroscrittura usando un saggio *TaqMan microRNA Assay* (*ThermoFisher*) per ogni miRNA analizzato: miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b e i “miR reference”: U6, RNU48 e miR-21 a cui fa seguito una reazione di PCR RealTime con *TaqMan MiRNA Assay*, secondo il protocollo sopra descritto.

Il valore di ciclo soglia (cycle threshold: C_T), calcolato relativamente al controllo endogeno, è stato utilizzato per l'analisi (ΔC_T). Il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (algoritmo delta-delta-Ct) è stato utilizzato per calcolare le variazioni relative nell'espressione genica tra i diversi gruppi

5.7 Analisi statistica.

I risultati per ogni run TaqMan sono quantificati separatamente. I dati sono quantificati utilizzando SDS 2.3 software e normalizzati usando U6, RNU48 e miR-21 come controllo.

Difatti in letteratura ancora non si è pervenuti a un unanime consenso circa i miRNA da utilizzare come calibratore per il plasma. Questa è una problematica tutt'ora non risolta. In questo lavoro si utilizzano sia l'U6 che l'RNU48. Inoltre è utilizzato come controllo anche il miR-21. La scelta di questo miR si basa su lavori presenti in letteratura che lo usano come normalizzatore, sebbene vi siano altri autori che lo associano all'HCC. Dai nostri dati non si evince tale associazione, in più è uniformemente espresso e viene utilizzato insieme ai due reference RNU48 e U6. L'uso di tre controlli endogeni permette un confronto anche all'interno dei normalizzatori per evitare *bias* legati a una errata normalizzazione (102-104).

I valori "Undetermined" sono considerati come 55 (l'ultimo ciclo della reazione). Il ciclo threshold (C_T), rapportato al controllo endogeno è usato per l'analisi quantitativa (ΔC_T). Il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ è usato per calcolare i cambiamenti relativi in termini di espressione genica tra i differenti campioni. L'espressione differenziale dei miRNA è usata dal software Relative Expression Software Tool (REST) per calcolare la differenza in termini di espressione fra gruppi confrontati e la significatività statistica della stessa. La differenza di espressione è considerata statisticamente significativa per valori di $p\text{-value} < 0.05$ (105).

Le Heatmap sono realizzate con il software *RStudio* utilizzando i valori di ΔC_T

RISULTATI

6.1 *MiRNA profile in HCC*

L'analisi del profilo dei miRNA circolanti nel plasma è condotto attraverso *TaqMan Custom Array-TLDA Human miRNA* su 16 campioni: 4 provenienti da pazienti affetti da epatocarcinoma di nuova diagnosi HCV-correlato, 4 da pazienti affetti da epatocarcinoma sottoposti a trattamento terapeutico con una risposta completa valutata secondo criteri clinici e strumentali, 4 da pazienti cirrotici HCV-correlati viremia negativi post-trattamento e 4 donatori sani.

Per tutti questi campioni, secondo le modalità descritte nei materiali e metodi, si è potuto valutare tramite RQ-PCR il livello di espressione di circa 380 miRNA.

Innanzitutto, le prime considerazioni dello studio hanno riguardato i dati relativi all'espressione quantitativa dei miRNA nel plasma dei 4 pazienti su cui si è posta una diagnosi di epatocarcinoma.

Per ottenere un dato di espressione dei miRNA “normalizzato”, si sono utilizzati come miRNA di riferimento l'U6, l'RNU48 e il miR-21 che mostrano la più bassa variazione tra i diversi miR di normalizzazione così come evidenziato da altri autori (102-104).

Scopo di questa prima fase era di effettuare uno studio di *miRNA profiling* per capire, quindi, nei pazienti con diagnosi di HCC quale fosse lo spettro dei miRNA presenti in circolo.

Dei circa 380 miRNA analizzati attraverso la *Micro Fluidic Card A*, approssimativamente il 60% di questi è presente nei campioni plasmatici, con un numero di miRNA circolanti che varia da un minimo di 182 a un massimo di 248 (51%–68% del totale).

Interessante è notare che i dati di espressione provenienti dai 4 pazienti HCC sono del tutto coerenti, tant'è che i miRNA presenti nel plasma dei campioni sono pressoché simili. Circa il 60-70% dei miRNA presenti sono condivisi tra i 4 campioni, difatti il test ANOVA, statistica di analisi dei dati che consente di verificare ipotesi relative a differenze tra le medie di due o più popolazioni, condotta sui miRNA presenti, mostra p-value statisticamente significativo ($p < 0,05$)

Analizzando inoltre i top 20 miRNA over-rappresentati nel plasma dei diversi campioni HCC questa percentuale sale addirittura all'98%, praticamente questi 20 miRNA sono identici fra i campioni di HCC.

Data questa sostanziale condivisione del profilo di espressione dei miRNA fra i diversi campioni di HCC, si è cercato di capire se, in termini “quantitativi”, vi fosse una distribuzione omogenea o disomogenea dei miRNA all'interno di ogni campione. Considerando i valori di C_T (ciclo threshold) inferiore a 35 come il cut-off per indicare l'ultimo ciclo di “good detected” si individuano innanzitutto una media di circa 138 miRNA (range 96-168) “ben evidenziabili” nel plasma (sui circa 215 presenti) Dato che tra questi però i livelli di espressione sono estremamente differenti, si è condotta una analisi $\Delta\Delta C_T$ all'interno di ciascun campione. Considerando quei miRNA il cui C_T è di 35 (indicato come ultimo ciclo di “good detected”) è stato calcolato il ΔC_T usando il miRNA U6 come normalizzatore e calcolato il $\Delta\Delta C_T$ rispetto ai miRNA più espressi. Così sono stati individuati ben 27 miRNA (range 23-36) “molto abbondanti” nel plasma dei pazienti HCC con $\Delta\Delta C_T > 9$ se comparati ai miRNA meno presenti (>1000 fold), ed altri 74 miRNA “abbondanti”(range 50-91) con un $\Delta\Delta C_T > 6$ (>100 fold).

6.2 miRNA circolanti in HCC rispetto ai donatori

L'analisi di *profiling* dei miRNA presenti nel plasma sul singolo paziente resa possibile, come detto, dallo step di pre-amplificazione del cDNA dei miRNA, senza

ricorrere quindi a pool di pazienti, restituisce un quadro quanto più fedele dell'espressione dei miRNA nel contesto plasmatico. L'aver ottenuto dati pressoché uguali in termini di espressione fra i pazienti affetti da HCC permette di individuare e di focalizzare l'attenzione su specifici miRNA così da poterli confrontare con l'espressione in altre categorie di pazienti.

Innanzitutto abbiamo comparato i miRNA presenti nel plasma dei pazienti HCC con quelli presenti nel plasma di donatori sani, al fine d'individuare un pattern di espressione differenziale.

Confrontando il numero di miRNA circolanti tra HCC e donatori si osserva innanzitutto una differenza nel numero di miRNA presenti, in particolare, nel plasma degli HCC si trovano tra i 182 e i 248 miRNA espressi, 51%–68% del totale, mentre nei soggetti sani vi sono circa 194 miRNA presenti, 53% del totale, evidenziando che il numero dei miRNA circolanti risulta più alto nei pazienti HCC rispetto ai donatori sani (chi-square $p=0.001$).

Allo scopo di identificare i miRNA differenzialmente espressi tra il plasma dei pazienti HCC e il plasma dei donatori, si è portata avanti una *supervised analysis* sui dati ottenuti dalle *Card-TLDA Human miRNA* attraverso il software statistico REST. Il software, così come descritto precedentemente, calcolando le differenze di espressione in termini di ΔC_T e la ripetitività dei dati fornisce un dato di espressione differenziale in termini di fold e di p-value.

L'analisi REST identifica un set di 24 miRNA differenzialmente espressi tra plasma HCC e donatori, 5 dei quali over-rappresentati nel plasma dei pazienti HCC e 19, al contrario, meno presenti (Tabella 1).

Tabella 1. miRNA differenzialmente espressi nel plasma dei pazienti HCC vs plasma dei donatori sani

miRNA	Expr.	P value REST	Fold REST
hsa-miR-224	UP	0,000	1536444,062
hsa-miR-139-3p	UP	0,022	448723,219
hsa-miR-98	UP	0,000	11167,498
hsa-miR-32	UP	0,000	56,974
hsa-miR-330	UP	0,058	10181,338
hsa-miR-139-5p	DOWN	0,000	0,025
hsa-miR-29a	DOWN	0,000	0,003
hsa-miR-106b	DOWN	0,000	0,008
hsa-miR-122	DOWN	0,000	0,008
hsa-miR-223	DOWN	0,008	0,003
hsa-miR-302b	DOWN	0,019	0,003
hsa-miR-218	DOWN	0,020	0,018
hsa-miR-125b	DOWN	0,025	0,000
hsa-miR-486	DOWN	0,031	0,014
hsa-miR-20a	DOWN	0,033	0,007
hsa-miR-16	DOWN	0,036	0,015
hsa-miR-150	DOWN	0,042	0,021
hsa-miR-184	DOWN	0,044	0,009
hsa-miR-192	DOWN	0,044	0,029
hsa-miR-154	DOWN	0,046	0,126
hsa-miR-15a	DOWN	0,046	0,020
hsa-miR-520d-5p	DOWN	0,047	0,000
hsa-miR-429	DOWN	0,050	0,000
hsa-miR-455-3p	DOWN	0,050	0,000

In particolare, nel gruppo dei miRNA over-rappresentati si ritrova il miR-224, già descritto in letteratura associato all'HCC, e i miR-139-3p, miR-330 e miR-32 identificati per la prima volta in questo studio in associazione con l'HCC (106,107). Inoltre, è da sottolineare, come questi miRNA siano fortemente rappresentati nel plasma HCC mentre si ritrovino a bassi livelli nel plasma dei donatori sani. (Tabella 1).

Nel gruppo dei sottorappresentati si ritrovano i miR-106b, miR-122 e miR-223 in accordo a dati presenti in letteratura (108-111)

Considerando esclusivamente quei miRNA differenzialmente presenti tra le due categorie, era interessante evidenziare se questi dati fossero tali da consentire una clusterizzazione dei soggetti analizzati tra HCC e donatori. Così una *unsupervised*

hierarchical cluster analysis chiaramente mostra come i pazienti HCC vengano raggruppati nello stesso cluster in confronto con i donatori. La Heatmap di tale analisi, ottenuta mediante R Studio, come indicato precedentemente, è mostrata in Figura 9

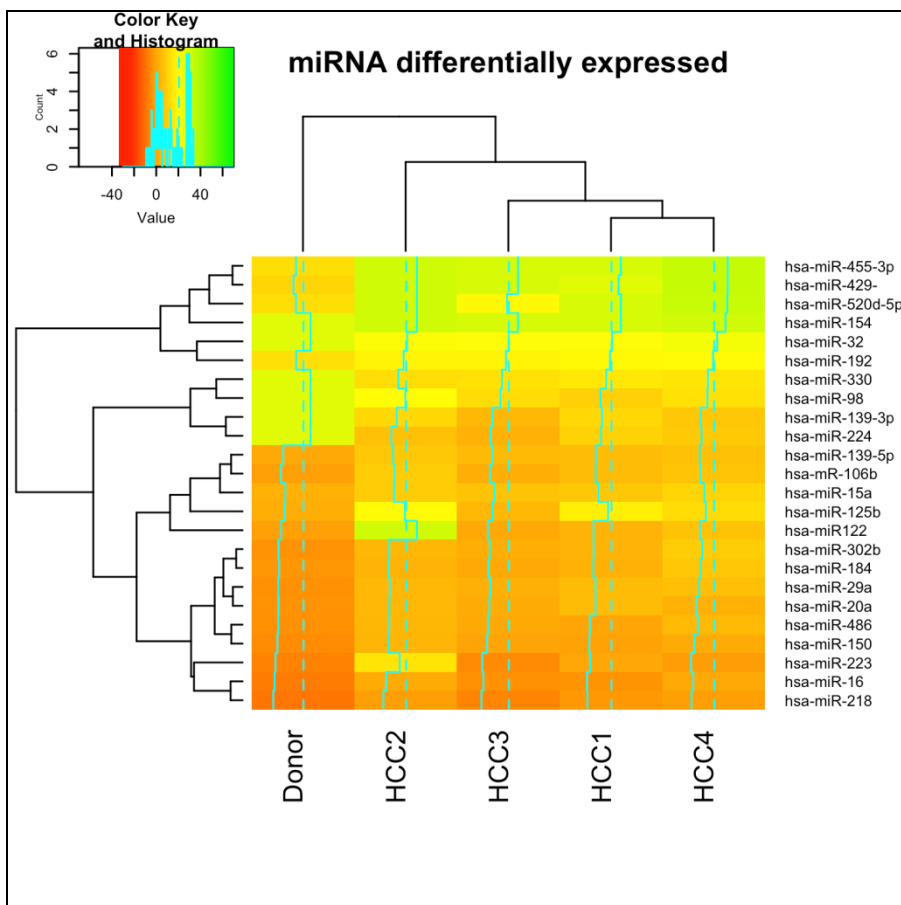


Figure 9 Heatmap dei miRNA differenzialmente espressi nei campioni di plasma in HCC comparati ai campioni di donatori sani

6.3 miRNA circolanti in HCC rispetto a pazienti HCC trattati e cirrotici

Dopo aver confrontato il *profile* dei miRNA plasmatici tra pazienti affetti da HCC e donatori sani al fine di riscontrare un pattern di miRNA differenzialmente presenti tra la condizione patologica e la condizione fisiologica, è sembrato, allo stesso modo, interessante confrontare l'espressione dei miRNA nella condizione di neoplasia alla

diagnosi sia rispetto al plasma di pazienti con pregresso HCC trattato e in risposta strumentale per evidenziarne delle differenze tra il momento di insorgenza e dopo trattamento, sia rispetto al plasma di pazienti cirrotici trattati per confrontarlo con uno stato di alterazione non neoplastico del contesto epatico.

Così come descritto precedentemente, attraverso metodica *TaqMan Custom Array-TLDA Human* si sono analizzati i 380 miRNA circolanti, individuando un numero di miRNA presenti nel plasma dei pazienti HCC trattati tra i 154 e 213 (43%–54%) ed un numero tra i 206 e 231 (57%-64%) nei pazienti cirrotici trattati. Risulta quindi che il numero dei miRNA circolanti in una fase attiva della patologia sia superiore rispetto ai pazienti trattati (chi-square $p=0.0352$)

Utile ai fini dello studio risulta la ricerca dei miRNA che si presentino in quantità differente tra le diverse categorie analizzate, l'analisi con il software REST restituisce un pannello di circa 20 miRNA differenzialmente presenti tra plasma di pazienti HCC e plasma di pazienti HCC trattati e in risposta completa. In particolare, nei pazienti HCC rispetto ai pazienti in risposta completa, 18 risultano over-rappresentati e 2 risultano decrementati (Tabella 2).

Tabella 2. MiRNA differenzialmente espressi nel plasma dei pazienti HCC vs plasma dei pazienti HCC trattati

miRNA		p value REST	Fold REST
hsa-miR-224	UP	0,007	958.658,78
hsa-miR-545	UP	0,002	164.757,24
hsa-miR-15a	UP	0,006	23.707,04
hsa-miR-383	UP	0,005	3.951,11
hsa-miR-330	UP	0,013	13.059,45
hsa-miR-636	UP	0,013	6.082,73
hsa-miR-561	UP	0,025	123.667,86
hsa-miR-515-5p	UP	0,033	5.304,36
hsa-miR-651	UP	0,039	16.599,91
hsa-miR-133b	UP	0,04	1.983,31
hsa-miR-329	UP	0,031	1.480,32
hsa-miR-32	UP	0,011	1.206,73
hsa-miR-215	UP	0,007	431,754
hsa-miR-410	UP	0,037	312,452
hsa-miR-34c	UP	0,037	247,045
hsa-miR-34a	UP	0,043	45,865
hsa-miR-99b	UP	0,008	35,053
hsa-miR-139-3p		0,177	1.063,87
hsa-miR-520d-5p	DOWN	0,038	0
hsa-miR-518d	DOWN	0,052	0,021

È interessante sottolineare come si ritrovino in tale pannello miRNA già riscontrati come over-rappresentati in HCC rispetto ai donatori, nello specifico: i miR-224, miR-330, miR-32 e miR-139-3p, seppur quest'ultimo in modo non statisticamente significativo (p-value=0,17). Una *unsupervised hierarchical cluster analysis* effettuata tramite software R Studio condotta sui miRNA differenzialmente presenti tra HCC e HCC in risposta mostra una chiara *clusterizzazione* delle due categorie. (Figura 10)

Il confronto tra campioni di plasma HCC e campioni di plasma di pazienti cirrotici non individua un profilo differenziale simile ai precedenti confronti, ma è tuttavia da sottolineare che nei pazienti cirrotici rispetto ai donatori ritroviamo una over-rappresentazione dei miR-139-3p, miR-224 e miR-330

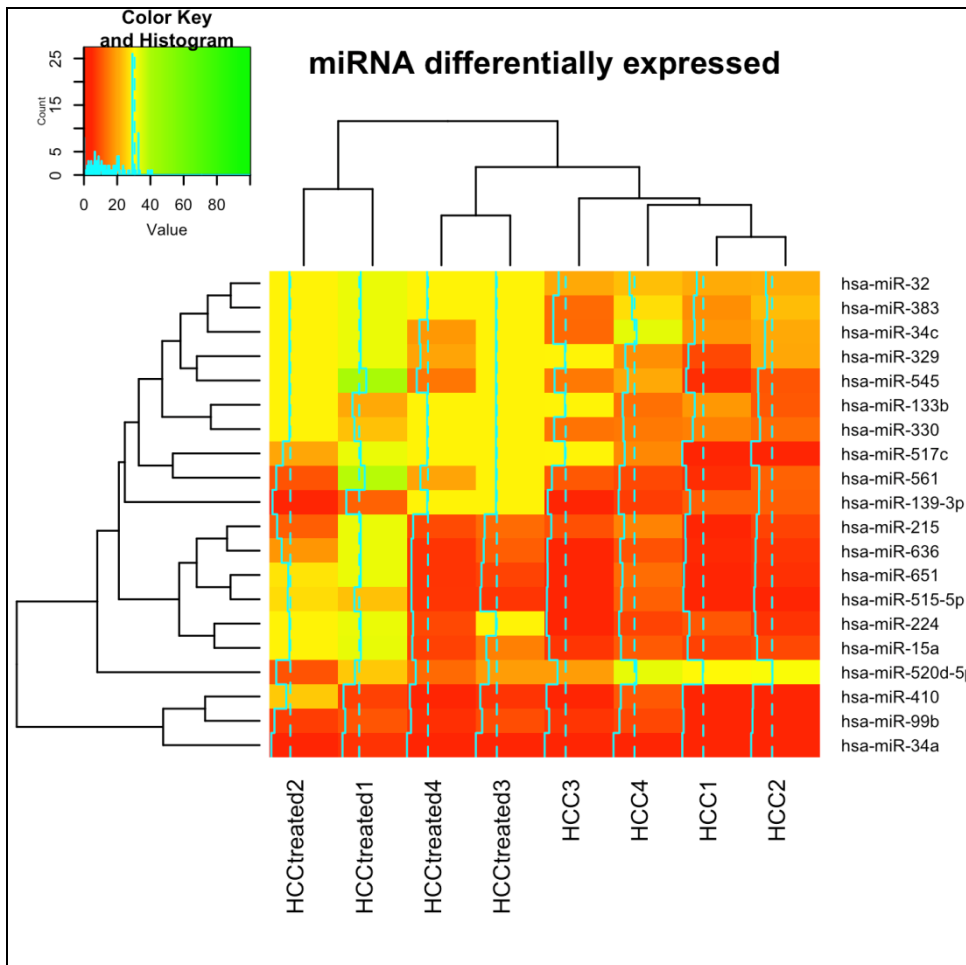


Figure 10 Heatmap dei miRNA differenzialmente espressi nei campioni di plasma in HCC comparati ai campioni di HCC trattati e in risposta completa

6.4 Espressione dei miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b in HCC.

L'analisi globale dei miRNA circolanti restituendo il quadro dell'espressione dei miRNA nel contesto fisiologico e patologico, mostra, come indicato nelle tabelle 1 e 2, e nelle heatmap i miRNA associati all'HCC. Passo successivo dello studio è chiaramente la conferma dei dati riscontrati attraverso una valutazione su una nuova coorte di 30 campioni costituita da: 10 HCC, 10 HCC trattati e in risposta completa e 10 donatori. A differenza dell'analisi di *profiling* attraverso *TaqMan Array microRNA*, questa validazione dei dati si effettua con un saggio singolo per ogni miRNA preso in considerazione. Si tratta di una analisi attraverso una

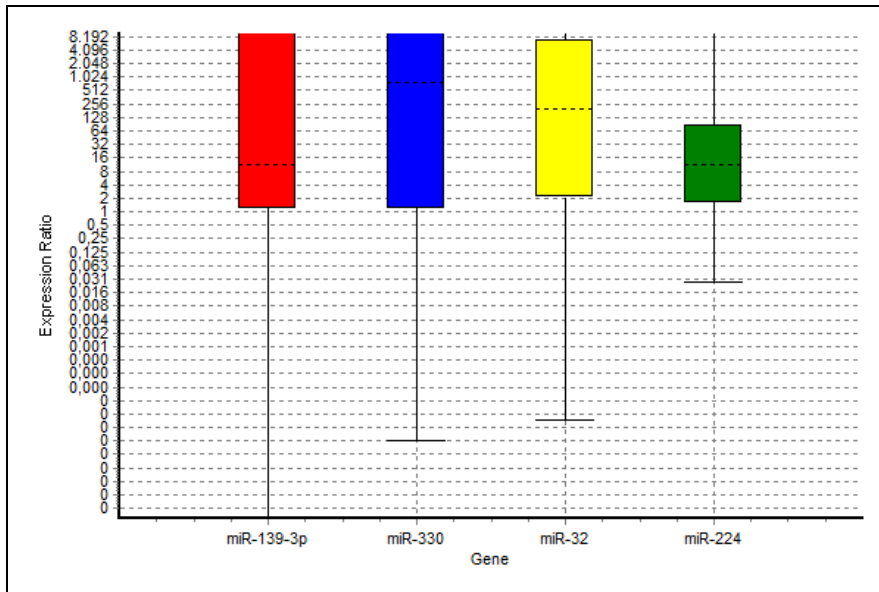
reazione in cui ogni miRNA è retro-trascritto e valutato singolarmente a partire dall'RNA estratto dal plasma. Questa procedura è considerata “gold standard” per confermare dati provenienti da analisi globale di espressione, sia per ampliare la casistica presa in esame sia per ovviare a eventuali problemi di co-amplificazione dei 380 miRNA. L'analisi statistica è effettuata tramite REST così come nelle analisi precedenti e descritta nei materiali e metodi.

Tenuto conto delle differenze di espressione riscontrate dal *profiling*, sono stati selezionati 7 miRNA per essere riconfermati tramite saggio singolo, in particolare, i miR: miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32 e considerati over-espressi e i miR-122, miR-223 e miR-106b, considerati come down-regolati.

I miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, confermano, nella nuova coorte, una maggiore presenza nel plasma dei pazienti con HCC in fase attiva rispetto ai pazienti in risposta terapeutica e ai donatori sani.

In particolare, considerando i pazienti HCC rispetto ai donatori individuiamo che i miR-330, miR-32 e miR-224 sono fortemente presenti nel plasma dei pazienti HCC ($p=0,036$, fold=335,5; $p=0,034$, fold=98,5; $p=0,014$, fold=15,3 rispettivamente) con una differenza statisticamente rilevante, e che il miR-139-3p è anch'esso over-espresso negli HCC anche se in modo non statisticamente significativo ($p=0,154$, fold= 75,6) (Figura 11)

A



B

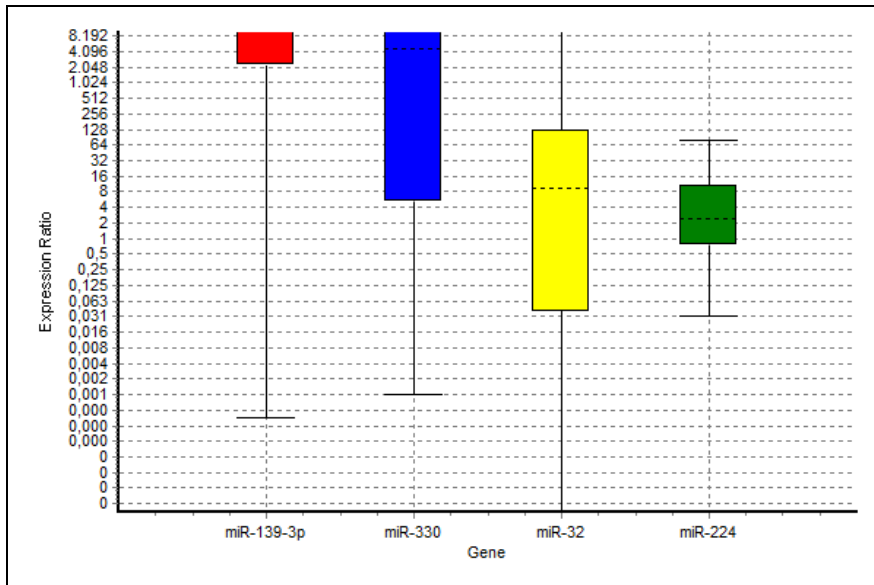
miR	Fold change REST HCC vs donatori	p-value REST	Result
miR-139-3p	75,584	0,154	
miR-330	335,461	0,036	UP
miR-32	98,360	0,034	UP
miR-224	15,348	0,014	UP

Figura 11. A) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-139-3p, miR-330, miR-32 e miR-224 ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) In tabella i valori di fold change e di p-value per ogni miR, calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori

Considerando poi gli HCC rispetto ai pazienti trattati, si nota che una elevata presenza di questi quattro miRNA si associa anche in questo caso con l'epatocarcinoma, in particolare, in modo statisticamente significativo per i miR-139-3p e miR-330 ($p=0,007$, $fold=5879,3$ e $p=0,019$, $fold=1526,2$

rispettivamente) e comunque più rappresentati il miR-32 e il miR-224 ($p=0,529$, $fold=4,7$; $p=0,347$, $fold=2,1$ rispettivamente) (Figura 12)

A



B

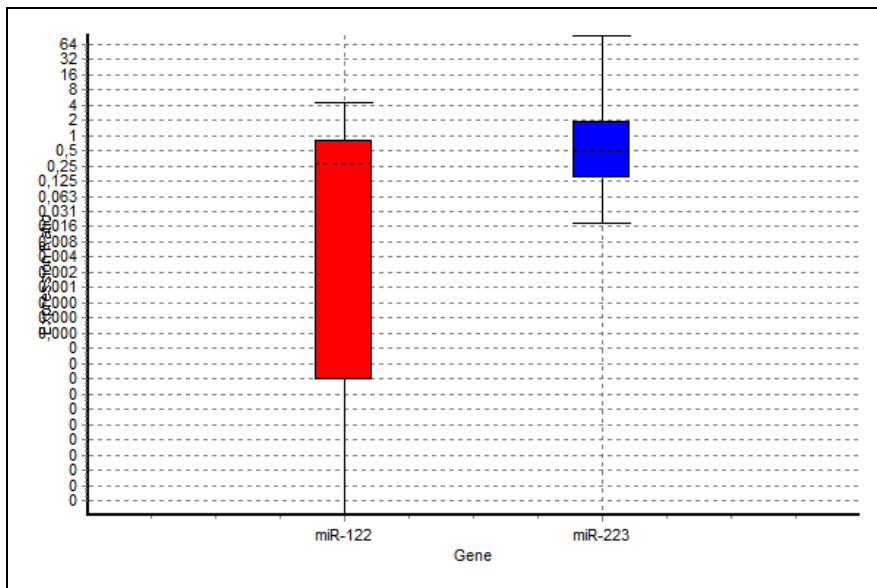
miR	Fold change REST HCC vs HCC trattati	p-value REST	Result
miR-139-3p	5.879,300	0,007	UP
miR-330	1.526,185	0,019	UP
miR-32	4,682	0,529	
miR-224	2,152	0,347	

Figura 12. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-139-3p, miR-330, miR-32 e miR-224 ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) Valori di fold change e di p-value per ogni miR calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati

Sulla nuova coorte sono rivalutati anche i miRNA indicati come decrementati in HCC dalla analisi di *profiling*, e si conferma che tutti i 3 miRNA: miR-122, miR-223 e miR-106b mostrano lo stesso pattern di espressione nei saggi singoli.

Procedendo alla valutazione dei singoli miRNA tra plasma di pazienti HCC e donatori, si conferma un forte decremento del miR-122, tanto da essere statisticamente significativo ($p=0,016$, $fold=0,012$) e un decremento comunque dei miR-223 e miR-106b ($p=0,678$, $fold=0,587$; $p=0,771$, $fold=0,573$ rispettivamente) come mostrato nelle Figure 13 e 14. (miR-106b si trova in un grafico a parte poiché è analizzato in una run RealTime PCR differente dai miR-223 e miR-122 e deve essere per questo rapportato a valori di miR “normalizzatori” U6, RNU48, miR-21 differenti)

A

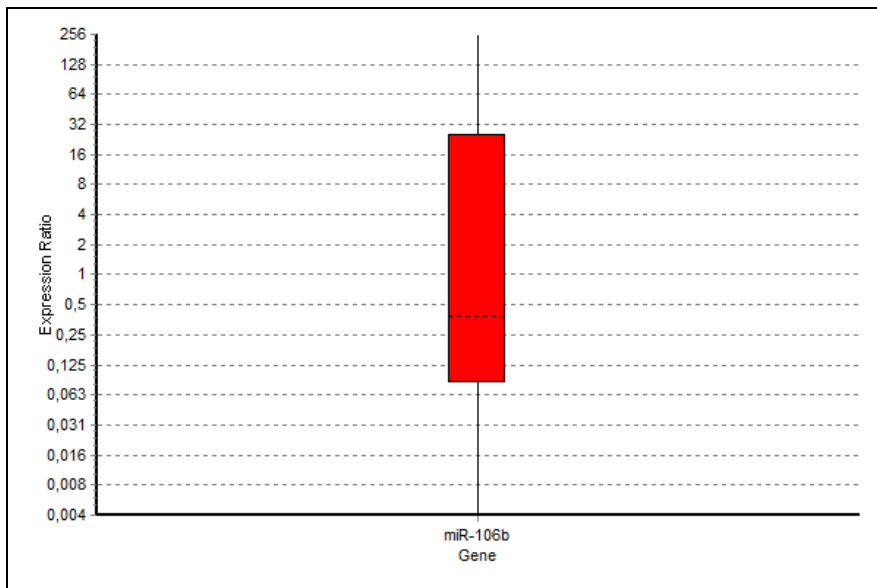


B

miR	Fold change REST HCC vs donatori	p-value REST	Result
miR-122	0,012	0,016	DOWN
miR-223	0,678	0,587	

Figura 13. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-122 e miR-223 ottenuta da REST confrontando l’espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell’espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile. B.) Valori di fold change e di p-value per ogni miR calcolato da REST confrontando l’espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori.

A



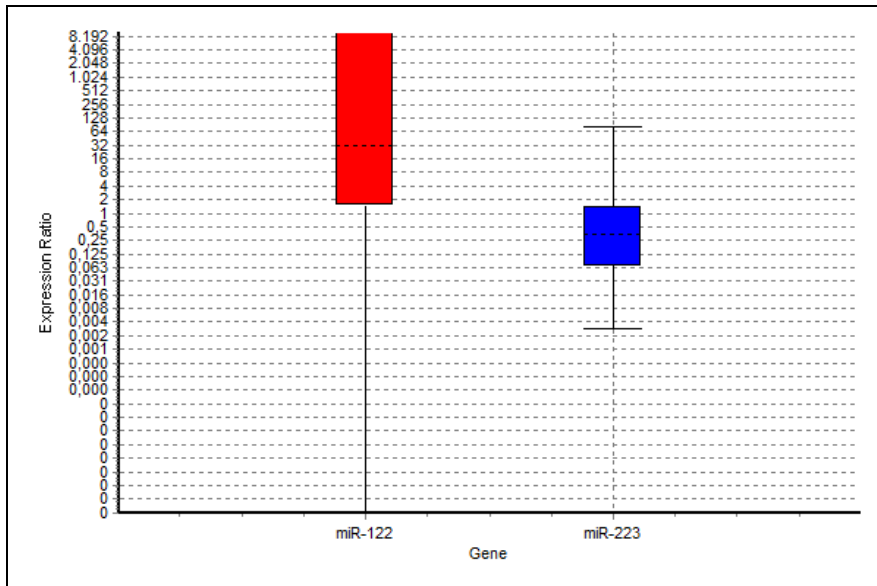
B

miR	Fold change REST HCC vs donatori	p-value REST	Result
miR-106b	0,573	0,771	

Figura 14. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione del miR-106b ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) Valori di fold change e di p-value per il miR-106b calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai donatori

Il confronto tra pazienti HCC e pazienti trattati mostra diminuita presenza del miR-223 ($p=0,384$, $fold=0,411$) nel plasma degli HCC mentre gli altri due miRNA, il miR-122 e miR-106b mostrano una inversione del loro trend rispetto ai donatori, presentandosi aumentati rispetto ai pazienti trattati ($p=0,143$, $fold=259,6$; $p=0,169$, $fold=16,4$ rispettivamente) come mostrato nelle Figure 15 e 16 (miR-106b si trova in un grafico a parte poiché è analizzato in una run RealTime PCR differente dai miR-223 e miR-122 e deve essere per questo rapportato a valori di miR “normalizzatori” U6, RNU48, miR-21 differenti)

A

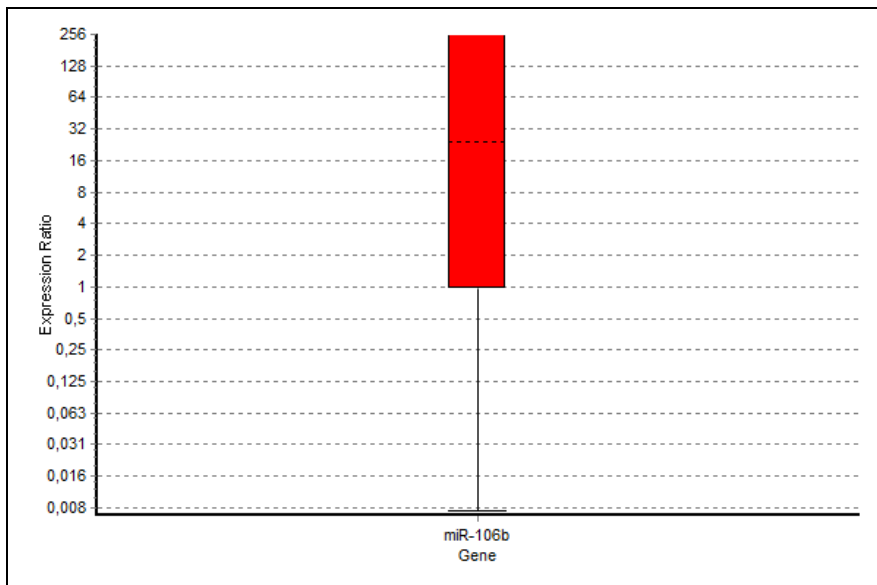


B

miR	Fold change REST		Result
	HCC vs HCC trattati	p-value REST	
miR-122	259,574	0,143	
miR-223	0,411	0,384	

Figura 15. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-122 e miR-223 ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) Valori di fold change e di p-value per ogni miR calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati

A



B

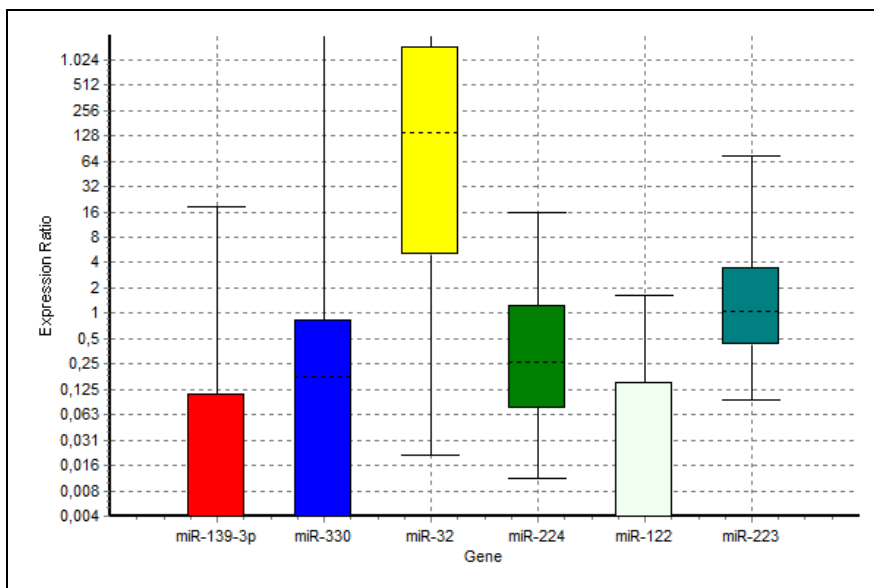
miR	Fold change REST HCC vs HCC trattati	p-value REST	Result
miR-106b	16,399	0,169	

Figura 16. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione del miR-106b ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) Valori di fold change e di p-value per il miR-106b calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC rispetto ai pazienti HCC trattati

In seguito, è sembrato interessante capire e valutare se vi fossero delle differenze nella espressione dei miRNA tra i pazienti trattati in risposta e i donatori. Così come ipotizzabile e già preventivamente analizzato attraverso l'analisi di *profiling*, è evidente una diversa distribuzione dei miRNA tra le due classi e che sicuramente da un punto di vista di espressione dei miRNA i pazienti trattati non ritornino ad un profilo equivalente ai donatori. Tale confronto è applicato ai 7 miRNA differenzialmente, mostrando una forte presenza nel plasma dei pazienti trattati del miR-32, ($p=0,015$, $fold=131,5$) al contrario una scarsa presenza del miR-139-3p, del miR-122 e del miR-106b ($p=0,015$, $fold=0,00$; $p=0,002$, $fold=0,000$; $p=0,020$,

fold=0,001 rispettivamente) mentre mostrano un profilo non statisticamente significativo i miR-330, miR-224 e miR-223 (Figure 17-18; miR-106b si trova in un grafico a parte poiché è analizzato in una run RealTime PCR differente dai miR-223 e miR-122 e deve essere per questo rapportato a valori di miR “normalizzatori” U6, RNU48, miR-21 differenti)

A

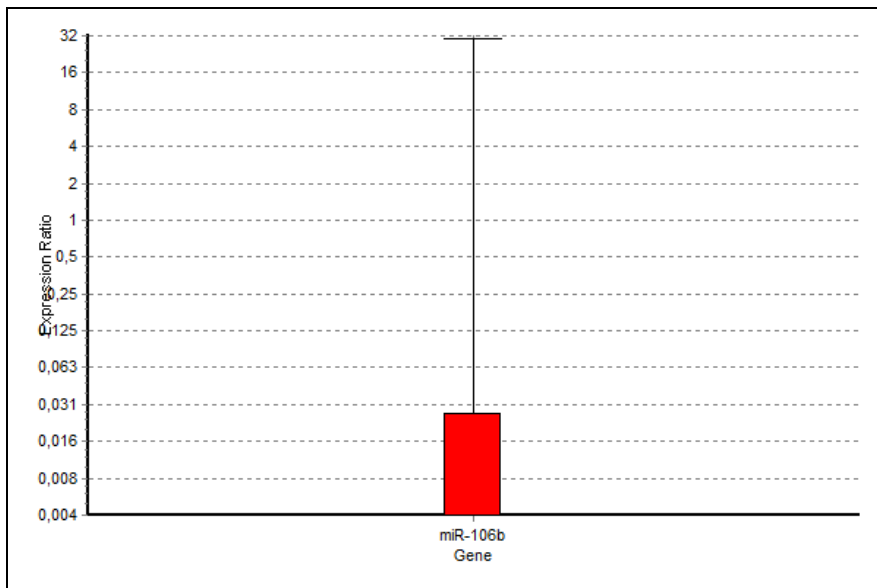


B

Gene	Fold change REST HCC trattati vs donatori	p-value REST	Result
miR-139-3p	0,000	0,015	DOWN
miR-330	0,069	0,296	
miR-32	131,497	0,015	UP
miR-224	0,272	0,102	
miR-122	0,000	0,002	DOWN
miR-223	1,420	0,567	

Figura 17. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-139-3p,-330, -32,-224,-122,-223 ottenuta da REST confrontando l’espressione nei pazienti HCC trattati rispetto ai donatori I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell’espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile
B.) Valori di fold change e di p-value per ogni miR calcolato da REST confrontando l’espressione nei pazienti HCC trattati rispetto ai donatori

A



B

miR	Fold change REST HCC trattati vs donatori	p-value REST	Result
miR-106b	0,001	0,020	DOWN

Figura 18. A.) Rappresentazione grafica dei dati di espressione dei miR-106b ottenuta da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC trattati rispetto ai donatori. I dati sono mostrati come expression ratio medio tra i due gruppi. La figura mostra box plot dell'espressione in cui la parte superiore e inferiore di ogni box indicano rispettivamente il 75° e 25°percentile, mentre la linea tratteggiata rappresenta la mediana. Le linee sopra e sotto il box indicano il 90° e 10° percentile B.) Valori di fold change e di p-value per il miR-106b calcolato da REST confrontando l'espressione nei pazienti HCC trattati rispetto ai donatori

6.5 Espressione dei miRNA in linee cellulari

Se da un lato le evidenze scientifiche sono concordi con l'identificazione di miRNA nei fluidi corporei, dall'altro il loro specifico riscontro e l'identificazione di potenziali meccanismi di estrusione così come di modelli per studiare tali meccanismi, nell'epatocarcinoma, sono ancora poco noti.

Le linee cellulari diversamente dai pazienti, non risentono delle differenze interindividuali e potrebbero essere utili per effettuare delle considerazioni circa la natura della presenza in circolo dei miRNA.

380 miRNA sono valutati tramite *TaqMan Array-TLDA Human miRNA panel* sia per la linea cellulare Huh7 che per la linea HepG, linee derivanti da cellule di carcinoma epatocellulare. Innanzitutto si effettua un confronto tra le due linee: la Huh7 mostra l'espressione di 193 miRNA su 380, mentre sono riscontrabili 232 miRNA su 380 nella linea HepG2.

Prendendo in considerazione i livelli di espressione dei miRNA presenti nelle due linee, e valutandone i 50 più rappresentati, si evidenzia come essi siano abbastanza condivisi fra le due, si tratta di 40 miRNA su 50 (80%). E anche estendendo l'osservazione ai 100 miRNA più espressi, 71 sono condivisi.

Nella tabella 3 sono riportati i 20 miRNA più espressi in ognuna delle due linee cellulari, 19 miRNA su 20 sono condivisi.

Tabella 3: 20 miRNA maggiormente espressi nella linea cellulare HepG2 e Huh7

Linea cellulare HepG2	Linea cellulare Huh7
hsa-miR-520a	hsa-miR-142-5p
hsa-miR-642	hsa-miR-503
hsa-miR-503	hsa-miR-222
hsa-miR-548b	hsa-miR-642
hsa-miR-222	hsa-miR-520°
hsa-miR-191	hsa-miR-548b
hsa-miR-17	hsa-miR-191
hsa-miR-106a	hsa-miR-320
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-376b
hsa-miR-484-	hsa-miR-146a
hsa-miR-146a	hsa-miR-193b
hsa-miR-518f	hsa-miR-484
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-17
hsa-miR-337-5p	hsa-miR-106a
hsa-miR-331	hsa-miR-337-5p
hsa-miR-24	hsa-miR-518f
hsa-miR-320	hsa-miR-24
hsa-miR-193b	hsa-miR-483-5p
hsa-miR-376b	hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-454	hsa-miR-331

A questo punto si è voluto confrontare questo profilo di espressione con i dati provenienti da una linea cellulare molto diversa, specificatamente, con la linea MV4-11, cellule di leucemia mielomonocitica bifenotipica. Esaminando i 100 miRNA più espressi tra la linea MV4-11 e le due di epatocarcinoma sono solo 57 quelli condivisi. Segno, come atteso, di un profilo di miRNA associato alla specifica patologia.

Suddividendo in quartili i dati di espressione dei miRNA delle linee cellulari HepG2 e Huh7 e considerando il pannello di 7 miRNA costituito dai miR: miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-224, miR-122, miR-223 e miR-106b differenzialmente espressi tra il plasma di pazienti HCC e il plasma dei donatori, si osserva che questi miRNA si riscontrano distribuiti fra i diversi quartili.

In particolare in HepG2, i miR-122, miR-106b e miR-224 appartengono al 1° quartile, i miR-330 e miR-223 al 2° quartile ed infine i miR-139-3p e miR-32 al 3° quartile, con quest'ultimo addirittura assente nelle cellule HepG2.

Per la linea Huh7, i miR-122 e miR-106b rientrano nel 1° quartile, i miR-224, miR-330, miR-139-3p e miR-223 nel 2° quartile e il miR-32 nel 3° quartile.

Dopo aver preso in considerazione i livelli di espressione dei miRNA delle cellule HepG2 e Huh7, si è valutato la presenza o meno dei miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-224, miR-122, miR-223 e miR-106b nel sovranatante delle colture cellulari stesse, per analizzare ed interpretare i livelli di questi miRNA in un ambiente extracellulare.

Il sovranatante delle linee cellulare mostra un pattern di espressione differente rispetto alla sola “rappresentatività” dell'interno delle cellule. Ad esempio il miR-330 pur essendo relativamente abbondante all'interno delle cellule è praticamente assente nel sovranatante, mentre al contrario il miR-32 quasi assente nelle linee cellulari, è abbastanza presente nel sovranatante. (Vedi Tabella 4).

Tabella 4 Livelli di espressione del pannello miRNA in linea cellulare HepG2 e Huh7				
miR	HepG2 (C _T)		Huh7(C _T)	
	Sovr.	Linea	Sovr.	Linea
miR-139-3p	NE	45,0	NE	48,6
miR-330	NE	34,5	NE	38,7
miR-32	35	51,7	37	NE
miR-224	22	31,9	28	35,9
miR-122	NE	28,6	27	30,1
miR-223	26	39,7	24	49,3
miR-106b	39	31,6	40	34
miR-21/U6 reference	27/24	28/15	27/24	30/14

NE: Non Evidenziabile; Sovr:Sovranatante

E' interessante notare come, soprattutto nella linea HepG2, i dati relativi ai miR-32, miR-224 e miR-122 concordino con i dati dell'espressione quantitativa nel plasma dei pazienti HCC.

I valori dei singoli ΔC_T sono ottenuti, come detto precedentemente, tramite differenza tra *miR-s* C_T e il miR-21/U6 C_T.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni l'interesse della ricerca scientifica nel contesto dei tumori solidi si è focalizzato sulla scoperta e sulla valutazione di specifici biomarcatori circolanti, marcatori non invasivi che consentano una diagnosi precoce e che possano essere utili strumenti di monitoraggio dello stadio clinico della patologia. Diversi studi sono stati pubblicati nel tentativo di identificare firme molecolari relative all'espressione genica nell'epatocarcinoma

Recenti evidenze scientifiche hanno riportato la presenza di miRNA circolanti in molti fluidi corporei tra cui il plasma. I miRNA possono trovarsi in vescicole rilasciate dalle cellule o liberi nell'ambiente extracellulare legati a particelle proteiche o lipoproteiche, ed è stata scoperta un certo grado di correlazione tra i livelli dei miRNA circolanti e quelli delle cellule. I miRNA sono peraltro altamente stabili nel plasma e pertanto sono ritenuti potenziali fattori diagnostici di alcune malattie dell'invecchiamento così come biomarcatori per i tumori, tra cui l'HCC.

E' stato riportato che i tumori possano avere sia alti che bassi livelli di espressione dei miRNA, a seconda delle caratteristiche del tessuto e del cancro. I miRNA sierici sono stati ampiamente studiati come potenziali biomarker per l'uso nella diagnosi dell'HCC tenendo in considerazione che l'aberrante livello sierico dei miRNA nel cancro potesse essere causato dal contenuto delle cellule tumorali primarie.

Molti miRNA si ritiene abbiano un ruolo fondamentale nella regolazione della tumorigenesi e dei fenomeni di metastatizzazione dell'HCC, ma nello specifico ancora non sono chiare le loro funzioni. Allo scopo di chiarire proprio questo punto una recente revisione dei dati ha proposto l'individuazione di 23 miRNA (miR-1, miR-9, miR-15b, miR-130b, miR-16, miR-18a, miR-21, miR-34, miR-92a, miR-101,

miR-122, miR-129-2, miR-132, miR-195, miR-199a, miR-221, miR-222, miR-223, miR-224, miR-375, miR-500, miR-675, miR-885-5p) rilevabili nel sangue e nei tessuti di HCC, coinvolti nello sviluppo e nella progressione del carcinoma epatocellulare attribuendogli il nome di HepatomiRNoma periferico. (112)

L'attività di ricerca sui miRNA nell'HCC procede soprattutto attraverso l'analisi di singoli miRNA in linee cellulari, nel tessuto o nel plasma, con metodiche di analisi e rilevazione differenti, contribuendo a generare *bias* nel confronto fra studi differenti e risultati contraddittori. Oggi si ritiene che, grazie all'avvento di metodologie più avanzate, il modo migliore per approcciare gli studi sui miRNA ed aumentare le conoscenze relative alla biologia dell'HCC, sia quello di una mappatura globale di questi miRNA.

In questo studio è stato innanzitutto utilizzato un approccio di questo tipo, tramite l'uso di *TaqMan Array-TLDA Card A Human* sono stati esaminati circa 380 miRNA circolanti, avendo così un profilo completo del cosiddetto *miRNoma a funzione nota*, difatti sebbene i miRNA ad oggi conosciuti siano circa 2000, l'analisi attraverso tecniche di RQ-PCR è possibile all'incirca per 700 di questi, ulteriormente suddivisibili in due gruppi, quelli a funzione nota e quelli non nota. La *Card A* contiene in spot, appunto, i miRNA a funzione nota.

Avere dati quantitativi dal plasma del singolo paziente grazie a tecniche di pre-amplificazione del cDNA ha consentito uno specifico e puntuale confronto dell'espressione dei miRNA all'interno dei singoli gruppi analizzati e tra i gruppi.

È stata evidenziata una distribuzione non omogenea dei miRNA all'interno del plasma dei pazienti HCC, con profili di espressione che vanno da miRNA "particolarmente abbondanti" a miRNA assenti. I miRNA over-rappresentati nel plasma sono sostanzialmente simili tra i campioni di plasma HCC, indicando che la strada del *profiling* globale è in effetti da perseguire per questo tipo di studio.

Dal confronto tra il plasma dei pazienti affetti da epatocarcinoma e i donatori sani è poi emerso una differenza di espressione dei miRNA trovando un totale di 24

miRNA circolanti presenti in modo significativamente differente tra i due gruppi. Una *unsupervised hierarchical cluster analysis* condotta sui miRNA differenzialmente espressi chiaramente mostra come i pazienti HCC vengano raggruppati nello stesso cluster in confronto con i donatori.

Da evidenziare che di questi, ben 14 miRNA sono stati precedentemente identificati come biomarcatori circolanti per il carcinoma epatocellulare, dando ancora di più coerenza al risultato dell'analisi di *profiling*. Inoltre si è osservato che 4 miRNA sono abbondantemente presenti nel plasma degli HCC e poco presenti nei donatori sani: miR-224, miR-139-3p, miR-330 miR-32, e al contrario i miR-122, miR-223 e miR106b sono poco presenti nel plasma degli HCC se confrontato con i donatori, suggerendo che questi miRNA circolanti possano essere utili biomarker per il rilevamento del carcinoma epatocellulare.

L'analisi di *miRNA profiling* è stata condotta anche su pazienti affetti da epatocarcinoma sottoposti a trattamento terapeutico in risposta completa valutata secondo criteri clinici e strumentali e su pazienti cirrotici HCV-correlati viremia negativi post-trattamento. Questo ha consentito di confrontare l'intero pannello di miRNA tra questi e il plasma degli HCC.

Dal confronto tra pazienti con HCC in fase attiva e pazienti trattati in risposta completa si individuano tramite analisi REST un pannello di circa 20 miRNA differenzialmente presenti. In particolare, fra questi si trovano over-rappresentati i miR-224, miR-139-3p, miR-330 e miR-32 già differenzialmente espressi rispetto ai donatori. Questo suggerisce per questi miRNA un potenziale ruolo anche come marcatori della patologia, utilizzabili per seguirne il decorso in modo non invasivo.

Il confronto tra campioni di plasma HCC e campioni di plasma di pazienti cirrotici non mostra un profilo differenziale, ma comunque è importante osservare che nei pazienti cirrotici rispetto ai donatori sani ritroviamo un over-rappresentazione dei miR-224, miR-139-3p e miR-330. Questo risultato conferma che la presenza nel plasma di questi miRNA sia associabile comunque a un danno a livello epatico.

Il secondo step dello studio è consistito nella convalida tramite saggio singolo su una nuova coorte di pazienti dei sette miRNA trovati dalla analisi di *profiling* differenzialmente espressi tra HCC da un lato e donatori e HCC trattati dall'altro: miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b. Da notare che tre di questi, i miR-122,-223,-224 sono descritti come appartenenti al cosiddetto *HepatomiRNoma*.

Come detto, i miRNA sono rivalutati nello stesso set di pazienti utilizzati per il *profiling* e in una nuova coorte di 30 pazienti attraverso metodica qRT-PCR con saggio singolo miRNA-specifico. Infatti, sebbene, da un punto di vista metodologico la *Card TaqMan microRNA Array* è promettente per misurare simultaneamente in modo high-throughput l'espressione dei miRNA e l'introduzione della preamplificazione del cDNA dei miRNA riduce significativamente la quantità di RNA necessario possono introdursi potenziali *bias* dovuti proprio alla preamplificazione determinando una qualche variazione quantitativa (113) I saggi qRT-PCR specifici per ogni miRNA utilizzati nello step di convalida non richiedono invece preamplificazione.

È da sottolineare che i miRNA selezionati hanno evidenziato una sostanziale conferma dei loro livelli quantitativi e della espressione differenziale sulla nuova coorte presa in esame.

I miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, individuati come sovra-rappresentati, mostrano anche sulla nuova coorte una maggiore presenza nel plasma dei pazienti con HCC in fase attiva rispetto ai pazienti in risposta terapeutica e ai donatori sani. In particolare i miR-139-3p, miR-330 e miR-32 sono associati per la prima volta all'epatocarcinoma.

Il mir-224, uno dei più noti, è implicato nella sopravvivenza delle cellule e nei processi di invasività. Durante la carcinogenesi epatocellulare inibisce l'apoptosi bloccando *apoptosis inhibitor-5* (API-5) (114) stimola anche alcuni target come PAK4 e MMP9 aumentando le capacità migratorie e la progressione tumorale

crescente in cellule HepG2 (115) Promuove la proliferazione cellulare attraverso la proteina SMAD4, evento significativamente associato con una minore sopravvivenza dei pazienti. (116). I livelli sierici sembrano essere più alti nei pazienti con carcinoma epatocellulare (106) ed un recente lavoro (107) riporta che i pazienti con carcinoma epatocellulare con alti livelli sierici del miR-224 mostrano scarsa sopravvivenza rispetto a quello con bassi livelli sierici.

I dati del nostro lavoro confermano l'over-espressione del miR-224 nel plasma dei pazienti affetti da HCC sia confrontato ai donatori ($p=0.014$, fold=15.3) che ai pazienti trattati, ($p=0.347$, fold=2.1) suggerendo che la presenza di questo miR possa essere indice di danni al fegato e di potenziale trasformazione neoplastica.

Inoltre nella linee cellulari HepG2 e Huh7 analizzate questo miR si trova più elevato nel sovrnatante che nelle cellule stesse. Questo dati indicano che nelle cellule neoplastiche vi è probabilmente una elevata produzione di miR-224 rispetto alla norma e che parte di questa overproduzione potrebbe venir liberata nell'ambiente extracellulare.

Come detto, nessuno studio valuta il miR139-3p nel contesto dell'epatocarcinoma, un recente lavoro attribuisce a questo miR il ruolo di oncosoppressore nel tumore alla vescica agendo attraverso l'inibizione della metalloproteasi MMP1, responsabile dell'aumento delle capacità metastatiche e invasive. Nei tessuti neoplastici del tumore alla vescica si ritrova meno presente che nei tessuti circostanti la neoplasia. (117)

Nella sua forma 5p invece, è stato associato all'HCC, in particolare la sua down-regolazione si associa ad aumentata capacità metastatica e proliferativa. (118,119)

Non vi sono dati in letteratura sulla espressione plasmatica nell'epatocarcinoma, dai dati dello studio presente, il miR-139-3p mostra una maggiore presenza nel plasma dei pazienti HCC rispetto ai donatori ($p=0,154$, fold=75,6) e soprattutto ai pazienti trattati ($p=0,007$, fold=5879,3)

Se il miR-139-3p agisse da oncosoppressore anche nell'HCC, la cellula neoplastica che riuscisse a eliminarlo all'esterno, così come si trova nel plasma HCC, ne avrebbe un vantaggio in termini proliferativi. Nella linee cellulari HepG2 e Huh7 il miR-139-3p è presente a bassi livelli.

Il miR-330 sembra regolare negativamente l'espressione della molecola ITGA5, integrina importante nei fenomeni di transizione epitelio-mesenchimale. Nel cancro colon rettale il miR-330 si presenta downregolato nelle cellule tumorali, così come anche nelle cellule del melanoma cutaneo (120,121) Esperimenti in vitro e in vivo in un recente studio esplicano il ruolo di oncosoppressore del miR-330 attraverso l'inibizione di MUC1 (mucina associata alla superficie cellulare) nelle cellule pancreatiche tumorali. (122)

Non vi sono dati in letteratura sulla espressione plasmatica nell'epatocarcinoma, il mir-330 nei pazienti valutati è particolarmente presente nel plasma dei pazienti HCC sia rispetto ai donatori ($p=0.036$, $fold=335.5$) che rispetto soprattutto ai trattati. ($p=0,019$, $fold=1526,2$). Dai pochi lavori a disposizione e non sull'HCC, il miR-330 sembrerebbe fungere da oncosoppressore, in tal senso la sua condizione sembra del tutto simile a quella del miR-139-3p per cui la cellula neoplastica per progredire ha necessità di avere bassi livelli interni di miR-330 attraverso l'eliminazione all'esterno. Nelle linee HepG2 e Huh7, il miR-330 ha un trend simile al 139-3p, bassi livelli nella cellula neoplastica.

Il ruolo del miR-32 è poco noto, in un recente studio Yan et al. riscontra il miR upregolato nelle linee cellulari e nei tessuti di HCC, con un'azione inibente su PTEN, ritenendo che attraverso appunto la via PTEN/Akt possa determinare proliferazione e migrazione delle cellule tumorali. (123) Il miR-32 sembra esplicare un effetto oncogeno anche a livello delle cellule del cancro gastrico, attraverso la down-regolazione del target KLF4 (Kruppel-like factor 4), membro ad azione oncosoppressiva della famiglia di fattori di trascrizione Kruppel-like che regolano il ciclo cellulare. (124) Insieme a questi dati però se ne ritrovano altri di segno opposto

dove sembra reprimere la proliferazione cellulare, come nel tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC), inibendo la transizione epitelio mesenchimale e le capacità metastatiche attraverso la modulazione del target TWIST (125) Non vi sono dati in letteratura sulla espressione plasmatica nell'epatocarcinoma, nel nostro studio mostra una elevata presenza sia rispetto ai donatori ($p=0,034$, $\text{fold}=98,5$) sia rispetto ai pazienti HCC trattati ($p=0,529$, $\text{fold}=4,7$). Il riscontro di valori elevati anche nel sovrnatante delle linee cellulari HepG2 e Huh7 confermano l'elevata espressione riscontrata nel plasma dei pazienti.

Allo stesso modo dei miRNA sovra-rappresentati in HCC, i miR-106b, miR-122 e miR-223, individuati come sotto-rappresentati, nella nuova coorte di pazienti analizzati confermano una netta e minore presenza nel plasma dei pazienti con HCC in fase attiva soprattutto rispetto ai donatori sani

Il miR-122 è uno dei più importanti miRNA coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi, associato ai processi di migrazione, invasione e cellulare e progressione neoplastica attraverso vari meccanismi biomolecolari (126) Uno dei meccanismi regolati è rappresentato dalla inibizione della proteina Bcl-w, proteina antiapoptotica della famiglia bcl-2 . Bassi livelli di miR-122 non sono in grado inibire l'azione di Bcl-w, determinando una promozione della proliferazione cellulare (127-130) Inoltre Fornari e coll. hanno dimostrato che la sottoespressione di miR-122 up-regola i livelli di ciclina G1 e down-regola p53 favorendo una crescita cellulare deregolata, tant'è che il miR-122 mostra un ruolo importante come potenziale biomarker per la diagnosi, la prognosi e la terapia del carcinoma epatocellulare (131,132)

Il miR-122 è caratterizzato da un trend non ben definito, essendo stato individuato sia come upregolato che downregolato nel plasma dell'epatocarcinoma. (108,109,113) Inoltre è da tener presente che quei studi ove si riscontra una upregolazione sono condotti su HCC correlati ad una infezione da HBV, mentre questo non si verifica nei pochissimi in cui si valuta l'HCC-HCV correlato (133) Quindi probabilmente la

upregolazione riscontrata in letteratura potrebbe fundamentalmente attribuirsi all'infezione da HBV che caratterizza i pazienti analizzati, soprattutto considerato il ruolo differente mostrato dal miR-122 nei meccanismi di deregolazione che sostengono l'infezione da virus HBV e HCV. (83,84)

Anche nella nostra analisi il miR-122 comunque presenta un comportamento anomalo, in particolare si presenta downregolato in HCC rispetto ai controlli ($p=0,016$, $fold=0,012$) ma ritrovandosi over-rappresentato nel confronto tra HCC e HCC in trattamento ($p=0,143$, $fold=259,6$) Nel nostro studio, concordemente a quello trovato nel plasma HCC, nel sovrnatante della linea HepG2 il miR-122 è assente rispetto invece a una forte presenza nelle cellule. In tale senso il miR-122, essenziale alla replicazione dell'HCV potrebbe essere particolarmente presente solo all'interno della cellula e non all'esterno.

Il miR-223 si ritrova coinvolto nei meccanismi di regolazione della *multidrug resistance*. (MDR) dove la sua sovra-espressione potrebbe inibire l'espressione della proteina ABCB1 aumentando la sensibilità delle cellule neoplastiche ai farmaci antitumorali. (134,135) Pertanto, è stato ipotizzato che il miR-223 possa agire come un potenziale biomarcatore terapeutico per pazienti con carcinoma epatico che mostrano resistenza antitumorale. Inoltre il miR-223 potrebbe modulare la proliferazione delle cellule dell'epatocarcinoma avendo come target Rab1(Ras-related protein Rab-1) inibendo la tumorigenesi e promuovendo l'apoptosi. (136)

I dati del nostro studio concordano con diversi lavori in letteratura nell'evidenziare una down-regolazione del miR-223 nel plasma dei pazienti HCC rispetto ai donatori ($p=0,678$, $fold=0,587$) e ai pazienti trattati ($p=0,384$, $fold=0,411$) (109,110,137,138)

Il miR-106b sembra promuovere la migrazione cellulare tramite la formazione di fibre atte a promuovere la transizione epitelio-mesenchimale attraverso la regolazione delle Rho-GTPasi, RhoA e RhoC(139). È stata anche riscontrata una up-regolazione a livello del tessuto tumorale di HCC dove sembra mostrare un ruolo oncogenico mentre si presenta a bassi livelli nel plasma dell'HCC (111,140,141)

I nostri risultati concordano con i dati in letteratura, seppur il miR-106b mostri un andamento anomalo, così come il miR-122, avendo una bassa presenza a livello del plasma dei pazienti HCC confrontato con il plasma dei donatori sani ($p=0,771$, $fold=0,573$) ma un dato in controtendenza a confronto dei pazienti trattati ($p=0,169$, $fold=16,4$). In tal senso nei nostri esperimenti sulle linee cellulari si trova una maggiore quantità di miR-106b nelle cellule piuttosto che nei rispettivi sovranatanti, ciò potrebbe indicare che la cellula neoplastica necessita di maggiore quantità di miR106b, che difatti si trova in basse quantità nell'ambiente extracellulare.

Concludendo, in questo lavoro a partire da una analisi di *profiling* globale è stato individuato un pannello di 7 miRNA differenzialmente espressi tra il plasma dei pazienti HCC e i pazienti trattati e i donatori sani : miR-224, miR-139-3p, miR-330, miR-32, miR-122, miR-223 e miR-106b.

L'analisi su una nuova e più ampia coorte ha confermato i dati del *profiling*, in particolare, i miR-139-3p, miR-330 e miR-32 sono stati per la prima volta associati all'HCC.

Questo studio ha indicato che questi 7 miRNA e in particolare i miR-139-3p, miR-32 e miR-330 come marcatori del carcinoma epatocellulare. Inoltre i nostri dati supportano l'idea che il sangue, studiato mediante saggi high-throughput, sia una risorsa promettente per la scoperta di nuovi marcatori diagnostici.

I risultati ottenuti promuovono i miRNA esaminati a ulteriori progetti di screening in quadri di diagnosi di epatocarcinoma non chiaramente definita, al fine di valutarne il contributo in fase diagnostica e nel monitoraggio della malattia.

Le analisi effettuate sulle linee cellulari, confrontati con i dati di espressione nel plasma hanno permesso di fare ipotesi sulle condizioni che concorrono alla aberrante proliferazione e alla progressione delle cellule neoplastiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Ishak, K.G., Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts, in Atlas of tumor pathology, J. Rosai, Editor. 2001, AFIP. p. 199-230.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69—90. 6
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10—29.
4. Befeler, A.S. and Di Bisceglie, A.M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology*, 122: 1609-1619, 2002.
5. AIOM Linee Guida HCC Edizione 2015
6. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, et al. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 1997;57:1986-1990.
7. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350:429-431.
8. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15089-15094.
9. Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, 47: 1955-1963, 2008
10. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):339-46
11. Paraskevi A.F., Jonathan G., James H. & Ronald A. 2006. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res*. 66: 4766–4773
12. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol* 32, 225-237, 2000

13. Bruix J and Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases: Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 53: 1020-1022, 2011
14. Durand F, Valla D: Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 42:S110-S107
15. Bruix, J., M. Sherman, J.M. Llovet, et al., Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*, 2001. 35: 421-30.
16. Bruix, J. and M. Sherman, Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2005. 42: 1208-36.
17. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. European Association For The Study Of The Liver.; European Organisation For Research And Treatment Of Cancer *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4):908-43.
18. Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J.M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A.K. et al. EASL Panel of Experts on HCC. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001; 35: 421-430
19. Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 2007;128(6):1105–18.
20. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460(7256):705–10.
21. Yao S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biol Proced Online*. 2016 Mar 9;18:8.
22. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.
23. Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 2010;29:2302–8.
24. Vo NK, Dalton RP, Liu N, Olson EN, Goodman RH. Affinity purification of microRNA-133a with the cardiac transcription factor, Hand2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;
25. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75, no. 5, pp.843–854, 1993.

26. Friedman R, Friedman R.C.; Farh, K.K.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19, 92–105
27. Adlakha YK, Seth P. The Expanding Horizon of MicroRNAs in Cellular Reprogramming. *Prog Neurobiol.* 2016 Dec 12.
28. Scheideler M. MicroRNAs in adipocyte formation and obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016 Oct;30(5):653-664
29. Iorio, M.V.; Croce, C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* 2012, 4, 143–159.
30. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*2004;116:281–97.
31. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8
32. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:352–8.
33. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006;22(3):165–73.
34. Wang Z. miRNAs Targeting and Targeting miRNAs. In: Wang Z, editor. *MicroRNA Interference Technologies*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2009. p. 1–58.
35. Kohler A & Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev. Mol Cell Biol* 10, 761–773
36. Kim VN, Nam JW. 2006. Genomics of miRNA. *Trends Genet* 22:165–173.
37. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9.
38. Han, J.; Lee, Y.; Yeom, K.-H.; Kim, Y.-K.; Jin, H.; Kim, V.N. The DROSHA-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004, 18, 3016–3027.
39. Hannon, G.J.; Plasterk, R.H.A.; Denli, A.M.; Tops, B.B.J.; Ketting, R.F. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 2004, 432, 231–235. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1795
40. Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Radmark, O.; Kim, S. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425, 415–419.
41. Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG & Dargemont C (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278, 5505–5508

42. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE & Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
43. Chendrimada, T.P.; Gregory, R.I.; Kumaraswamy, E.; Norman, J.; Cooch, N.; Nishikura, K.; Shiekhattar, R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005, 436,
44. Tang G (2005) siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30, 106–114
45. Gianpiero Di Leva, George A. Calin, and Carlo M. Croce. MicroRNAs: Fundamental Facts and Involvement in Human Diseases *Birth Defects Research (Part C)* 78:180–189 (2006)
46. Chen, P.Y.; Meister, G. MicroRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol. Chem.* 2005, 386, 1205–1218.
47. Lund, E.; Güttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J.E.; Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004, 303, 95–98.
48. Schirle, N.T.; MacRae, I.J. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 2012, 336, 1037–1040.
49. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120, 15–20.
50. Cerutti, L., Mian, N. And Bateman, A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25: 481-482 (2000).
51. Lee, I.; Ajay, S.S.; Yook, J.I.; Kim, H.S.; Hong, S.H.; Kim, N.H.; Dhanasekaran, S.M.; Chinnaiyan, A.M.; Athey, B.D. New class of microRNA targets containing simultaneous 50-UTR and 30-UTR interaction sites. *Genome Res.* 2009, 19, 1175–1183.]
52. Forman, J.J.; Coller, H.A. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. *Cell Cycle* 2010, 9,1533–1541.
53. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 13;17(10). pii: E1712.Review. PubMed PMID: 27754357;
54. Grimson, A.; Farh, K.K.-H.; Johnston,W.K.; Garrett-Engele, P.; Lim, L.P.; Bartel, D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 2007, 27, 91–105.
55. Meijer, H.A.; Kong, Y.W.; Lu, W.T.; Wilczynska, A.; Spriggs, R.V.; Robinson, S.W.; Godfrey, J.D.; Willis, A.E.;Bushell, M. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* 2013, 340, 82–85.

56. Weinmann, L.; Hock, J.; Ivacevic, T.; Ohrt, T.; Mutze, J.; Schwillle, P.; Kremmer, E.; Benes, V.; Urlaub, H.; Meister, G. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 2009,136, 496–507.
57. Nishi, K.; Nishi, A.; Nagasawa, T.; Ui-Tei, K. Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA* 2013, 19, 17–35.
58. D. L. Corcoran, K. V. Pandit, B. Gordon, A. Bhattacharjee, N. Kaminski, and P. V. Benos, “Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 4,Article ID e5279, 2009
59. R. I. Gregory, K. P. Yan, G.Amuthan et al., “TheMicroprocessor complex mediates the genesis of microRNAs,” *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 235–240, 2004.
60. Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, Emekdas G, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* 2015; 42: 713-720
61. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10513–8.
62. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003–8.
63. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):423–33.
64. Chen, X.; Liang, H.; Zhang, C.-Y.; Zhang, J.; Zen, K. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012, 22, 125–132.
65. Calvopina DA, Coleman MA, Lewindon PJ, Ramm GA. Function and Regulation of MicroRNAs and Their Potential as Biomarkers in Paediatric Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11)
66. Valadi, H.; Sjöstrand, M.; Bossios, A.; Ekström, K.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O.; Sahlgrenska, A.; Sahlgrenska, A. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol*. 2007, 9, 654–659
67. Corsten, M.F.; Dennert, R.; Jochems, S.; Kuznetsova, T.; Devaux, Y.; Hofstra, L.; Wagner, D.R.; Staessen, J.A.; Heymans, S.; Schroen, B. Circulating microRNA-208b and

- microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ.: Cardiovasc. Genet.* 2010, 3, 499–506.
68. Pritchard, C.C.; Kroh, E.; Wood, B.; Arroyo, J.D.; Dougherty, K.J.; Miyaji, M.M.; Tait, J.F.; Tewari, M. Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res.* 2012, 5, 492–497.
69. Reid, G.; Kirschner, M.B.; van Zandwijk, N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 2011, 80, 193–208.
70. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogossova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5003-5008
71. Nolte-’t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, ‘t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 9272-9285
72. Khoury S, Tran N. Circulating microRNAs: potential biomarkers for common malignancies. *Biomark Med* 2015; 9: 131-151
73. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Croce CM. A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biol* 2013; 10: 169-174
74. Chen WX, Cai YQ, Lv MM, Chen L, Zhong SL, Ma TF, Zhao JH, Tang JH. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumour Biol* 2014; 35: 9649-9659
75. Zhang YC, Xu Z, Zhang TF, Wang YL. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic tools for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21(34): 9853-9862
76. Kirschner, M.B.; Kao, S.C.; Edelman, J.J.; Armstrong, N.J.; Vallety, M.P.; van Zandwijk, N.; Reid, G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS ONE* 2011, 6, e24145.
77. McDonald, J.S.; Milosevic, D.; Reddi, H.V.; Grebe, S.K.; Algeciras-Schimnich, A. Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clin. Chem.* 2011, 57, 833–840.

78. Zhao, H.; Shen, J.; Hu, Q.; Davis, W.; Medico, L.; Wang, D.; Yan, L.; Guo, Y.; Liu, B.; Qin, M. Effects of preanalytic variables on circulating microRNAs in whole blood. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2014, 23, 2643–2648.
79. El-Khoury, V.; Pierson, S.; Kaoma, T.; Bernardin, F.; Berchem, G. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: The impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci. Rep.* 2016.
80. Yang N, Ekanem NR, Sakyi CA, Ray SD. Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics. *Adv Drug Deliv Rev* (2014) 81C:62–74
81. Sidhu K, Kapoor NR, Pandey V, Kumar V. The "Macro" World of microRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2015 Mar 25;5:68.
82. Sun J, Lu H, Wang X, Jin H. microRNAs in hepatocellular carcinoma: regulation, function, and clinical implications. *Scientific World Journal* (2013)
83. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. MiR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* (2014) 62:448–57.
84. Gupta P, Cairns MJ, Saksena NK. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Virology* (2014)
85. W. Hou, Q. Tian, J. Zheng, and H. L. Bonkovsky, "MicroRNA 196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins," *Hepatology*, vol. 51, no. 5, pp. 1494–1504, 2010.
86. Chen L, Zheng J, Zhang Y, Yang L, Wang J, Ni J. Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and independent pathways. *Mol Ther* (2011)
87. Lan FF, Wang H, Chen YC, Chan CY, Ng S S, Li K, Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16(INK4A). *Int J Cancer* (2011) 128:319–31.
88. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107:264–9
89. Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* (2011) 26:437–49.
90. Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, Yoshima T, Ochi H, Chayama K. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* (2013)

91. W.C.Tsai, P.W. C. Hsu, T. C. Lai et al., “MicroRNA-122, a tumor suppressor MicroRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 49, no. 5, pp. 1571– 1582, 2009
92. He S, Zhang DC, Wei C. MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Sep;39(4):426-34
93. Su ZX, Zhao J, Rong ZH, et al. Upregulation of microRNA-25 associates with prognosis in hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol* 2014;9:47.
94. Zheng J, Dong P, Gao S, Wang N, Yu F. High expression of serum miR-17-5p associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2013;60:549—52.
95. J. Kota, R. R. Chivukula, K. A. O’Donnell “Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model,” *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1005–1017, 2009.
96. J. K. Park, T. Kogure, G. J. Nuovo “miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival,” *Cancer Research*, vol. 71, pp. 7608–7616, 2011.
97. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:424—32.
98. Poon RT, Fan ST. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: patient selection and postoperative outcome. *Liver Transpl* 2004;10:S39—45.
99. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 145-156
100. Arrese M, Eguchi A, Feldstein AE. Circulating microRNAs: emerging biomarkers of liver disease. *Semin Liver Dis* 2015; 35: 43-54
101. Jiahui Qi, Jin Wang, Hiroshi Katayama, Subrata Sen, and Song-mei Liu. Circulating microRNAs (cmRNAs) as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Neoplasma*. 2013 ; 60(2): 135–142
102. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2014 Jul;41(7):4513-9.
103. Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, Run W, Tian L, Jia X, Gao Y. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Mar;120(5):183-93.

104. Tang G, Shen X, Lv K, Wu Y, Bi J, Shen Q. Different normalization strategies might cause inconsistent variation in circulating microRNAs in patients with hepatocellular carcinoma. *Med Sci Monit.* 2015 Feb 26;21:617-24
105. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36
106. Li J, Wang Y, Yu W, Chen J, Luo J. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Mar 4;406(1):70-3
107. Zhuang LP, Meng ZQ. Serum miR-224 reflects stage of hepatocellular carcinoma and predicts survival. *Biomed Res Int.* 2015;2015:731781.
108. Fiorino S, Bacchi-Reggiani ML, Visani M, Acquaviva G, Fornelli A, Masetti M, Tura A, Grizzi F, Zanello M, Mastrangelo L, Lombardi R, Di Tommaso L, Bondi A, Sabbatani S, Domanico A, Fabbri C, Leandri P, Pession A, Jovine E, de Biase D. MicroRNAs as possible biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatitis B- and C-related-hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2016 Apr 21;22(15):3907-36.
109. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, Zhang Z, Lu S, Huang X, Wang Z, Qiu S, Wang X, Yang G, Sun H, Tang Z, Wu Y, Zhu H, Fan J. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 20;29(36):4781-8
110. Bhattacharya S, Steele R, Shrivastava S, Chakraborty S, Di Bisceglie AM, Ray RB. Serum miR-30e and miR-223 as Novel Noninvasive Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol.* 2016 Feb;186(2):242-7.
111. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho JY, Cho HC, Shim SG, Paik YH. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med.* 2015 Sep 18;47:e184
112. Bronte F, Bronte G, Fanale D, Caruso S, Bronte E, Bavetta MG, Fiorentino E, Rolfo C, Bazan V, Di Marco V, Russo A. HepatomiRNoma: The proposal of a new network of targets for diagnosis, prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Jan;97:312-21
113. Mestdagh P., Mestdagh P, Feys T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA *Nucleic acid Research* 2008 Dec 36(21)e143

114. Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13205-15.
115. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9798-807. Erratum in: *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):2022
116. Wang Y, Ren J, Gao Y, Ma JZ, Toh HC, Chow P, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7):e68744
117. Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, Enokida H. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2016
118. Gu W, Li X, Wang J. miR-139 regulates the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma through the WNT/TCF-4 pathway. *Oncol Rep.* 2014 Jan;31(1):397-404
119. Fan Q, He M, Deng X, Wu WK, Zhao L, Tang J, Wen G, Sun X, Liu Y. Derepression of c-Fos caused by microRNA-139 down-regulation contributes to the metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Cell Biochem Funct.* 2013 Jun;31(4):319-24
120. Yoo HI, Kim BK, Yoon SK. MicroRNA-330-5p negatively regulates ITGA5 expression in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2016 Nov;36(5):3023-3029
121. Su BB, Zhou SW, Gan CB, Zhang XN. MiR-330-5p regulates tyrosinase and PDIA3 expression and suppresses cell proliferation and invasion in cutaneous malignant melanoma. *J Surg Res.* 2016 Jun 15;203(2):434-40
122. Tréhoux S, Lahdaoui F, Delpu Y, Renaud F, Leteurtre E, Torrisani J, Jonckheere N, Van Seuninghen I. Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Oct;1853(10 Pt A):2392-403
123. Yan SY, Chen MM, Li GM, Wang YQ, Fan JG. MiR-32 induces cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *Tumour Biol.* 2015 Jun;36(6):4747-55.

124. Yan C, Yu J, Liu Y, Kang W, Ma Z, Zhou L. MiR-32 promotes gastric carcinoma tumorigenesis by targeting Kruppel-like factor 4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Nov 27;467(4):913-20.
125. Li L, Wu D. miR-32 inhibits proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by targeting TWIST1 in non-small-cell lung cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2016 Mar 14;9:1489-98
126. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepää AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* 2009 Jun 1;23(11):1313-26.
127. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L et al. (2008). Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 123: 1616–1622
128. Young DD, Connelly CM, Grohmann C, Deiters A. Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *J Am Chem Soc.* 2010 Jun 16;132(23):7976-81.
129. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog.* 2011 Feb;50(2):136-42
130. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell.* 2012 May;3(5):364-71
131. Fornari F, Ferracin M, Trerè D, Milazzo M, Marinelli S, Galassi M, Venerandi L, Pollutri D, Patrizi C, Borghi A, Foschi FG, Stefanini GF, Negrini M, Bolondi L, Gramantieri L. Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC. *PLoS One.* 2015 Oct 28;10(10):e0141448
132. Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015;15(2):142-50. Review
133. El-Garem H, Ammer A, Shehab H, Shaker O, Anwer M, El-Akel W, Omar H. Circulating microRNA, miR-122 and miR-221 signature in Egyptian patients with chronic hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2014 Nov 27;6(11):818-24
134. Allen KE, Weiss GJ. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 2010

Dec;9(12):3126-36. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0397

135. Yang T, Zheng ZM, Li XN, Li ZF, Wang Y, Geng YF, Bai L, Zhang XB. MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Sep;238(9):1024-32.
136. Dong Z, Qi R, Guo X, Zhao X, Li Y, Zeng Z, Bai W, Chang X, Hao L, Chen Y, Lou M, Li Z, Lu Y. MiR-223 modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation through promoting apoptosis via the Rab1-mediated mTOR activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Dec 17
137. Khairy A, Hamza I, Shaker O, Yosry A. Serum miRNA Panel in Egyptian Patients with Chronic Hepatitis C Related Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(5):2699-703
138. Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, Emekdas G, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2015 Mar;42(3):713-20.
139. Yau WL, Lam CS, Ng L, Chow AK, Chan ST, Chan JY, Wo JY, Ng KT, Man K, Poon RT, Pang RW. Over-expression of miR-106b promotes cell migration and metastasis in hepatocellular carcinoma by activating epithelial-mesenchymal transition process. *PLoS One*. 2013;8(3):e57882
140. Li BK, Huang PZ, Qiu JL, Liao YD, Hong J, Yuan YF. Upregulation of microRNA-106b is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2014 Dec 3;9:226
141. Tan W, Li Y, Lim SG, Tan TM. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014 May 28;20(20):5962-72.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio tutor Professore Mario Cottone, per la cordialità, la disponibilità e per aver seguito con interesse la mia attività di ricerca rappresentando in tal modo uno stimolo per l'attività stessa.

Ringrazio poi il Dott. Roberto Virdone, per l'attenzione, la sua attività di coordinamento ed entusiasmo mostrato per questo progetto di ricerca, ringrazio anche il Dott. Andrea Affronti e Sandra Riggio per la loro importante collaborazione nell'attuazione di questa attività.

Un sentito ringraziamento alla Dott.ssa Alessandra Santoro, per il costante sostegno nella realizzazione di questo progetto di ricerca e per il continuo stimolo ed esempio a migliorare nel proprio lavoro

Ringrazio la Dott.ssa Lucia Cascio, per la sua grande disponibilità e l'assidua e affabile attenzione. Ringrazio poi per la loro generosità, competenza e condivisione i colleghi del Laboratorio, le Dott.sse Cecilia Agueli, Maria Grazia Bica, Maria La Rosa, Anna Marfia, Cinzia Russo Lacerna, Paola Dragotto ed in particolare per l'aiuto, il sostegno e il supporto le Dott.sse Valentina Randazzo, Sonia Cannella e Gabriella Bruno.