



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Scienze molecolari e biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
Settore scientifico disciplinare: BIO/18 (Genetica)

Variazioni di miRNA circolanti in casi di carcinoma mammario
sottoposti a regime dietetico con oli addizionati di polifenoli

IL DOTTORE
DOTT.SSA ORNELLA CONSIGLIO

IL COORDINATORE
PROF.SSA PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
PROF. FABIO CARADONNA

CO TUTOR
DOTT.SSA MARIA CINQUEGRANI
Locorotondo Labs S.r.l - Palermo

CICLO XXIX
ANNO ACCADEMICO 2016-2017

“To strive, to seek, to find and not to yield”

Ulysses

I dati ottenuti per questa tesi di dottorato sono stati concessi dall'azienda "Locorotondo Labs S.r.l", con sede legale a Palermo e rappresentano una quota parte dei dati totali ottenuti e ritenuti divulgabili a solo scopo scientifico, liberi da segreto industriale o da altri scopi di tutela della proprietà.

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il carcinoma mammario	6
1.2 Dieta mediterranea e carcinoma mammario.....	7
1.3 L'Epigenetica	9
1.4 I miRNA.....	10
1.4.1 miRNA e cancro.....	11
1.4.2 miRNA e dieta.....	13
2. SCOPO DELLA RICERCA E STRATEGIA SPERIMENTALE	15
3. MATERIALI E METODI.....	17
3.1 Selezione e trattamento dei pazienti e dei soggetti sani	18
3.2 Scelta dei miRNA da studiare	19
3.3 Estrazione di RNA totale.....	20
3.4 Preparazione delle librerie.....	20
3.5 Sequenziamento mediante FLOW cell.....	23
3.6 Determinazione diretta di profili espressione di miRNA attraverso Real-Time PCR Open Array	27
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	28
4.1 Espressione dei 20 miRNA	29
4.2 Variazione di espressione di miRNA genericamente coinvolti nel cancro	39
4.3 Variazione di espressione di miRNA associati a tumori solidi	41
4.4 Variazione di espressione di miRNA specifici per il carcinoma mammario	44
4.5 Variazione di espressione di miRNA caratteristici del carcinoma mammario triplo negativo ...	47
5. CONCLUSIONI	51
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	55
Sitografia.....	69

1. INTRODUZIONE

1.1 Il carcinoma mammario

Il carcinoma mammario è il tumore più frequente nel sesso femminile e rappresenta il 25% di tutti i tumori che colpiscono le donne, risultando essere la prima causa di mortalità in quest'ultime.

Il carcinoma mammario è una malattia potenzialmente grave se non è individuata e curata per tempo (Visovsky C 2014). È dovuto alla moltiplicazione incontrollata di alcune cellule della ghiandola mammaria che si trasformano in cellule maligne: ciò significa che hanno la capacità di staccarsi dal tessuto che le ha generate per invadere i tessuti circostanti e, col tempo, anche gli altri organi del corpo. In teoria si possono formare tumori da tutti i tipi di tessuti della mammella, ma i più frequenti nascono dalle cellule ghiandolari (dai lobuli) o da quelle che formano la parete dei dotti. Vi sono diversi fattori di rischio per il cancro al seno:

- L'età: più del 75% dei casi di tumore del seno colpisce donne sopra i 50 anni (Emaus MJ et al., 2015).
- La familiarità: circa il 5-7% delle donne con tumore al seno ha più di un familiare malato (soprattutto nei casi giovanili). Vi sono, inoltre, anche alcuni geni che, se mutati, predispongono a questo tipo di tumore: sono il BRCA1 e il BRCA2 (Hallam S et al., 2015; Golmard L et al., 2016). Le mutazioni di questi geni sono responsabili del 50 per cento circa delle forme ereditarie di cancro alla mammella e dell'ovaio.
- Gli ormoni: svariati studi hanno dimostrato che un uso eccessivo di estrogeni (gli ormoni femminili per eccellenza) facilitano la comparsa del carcinoma. Per questo tutti i fattori che ne aumentano la presenza hanno un effetto negativo. Viceversa tutto ciò che riduce la produzione di estrogeni, come ad esempio accade durante la gravidanza, ha un effetto protettivo (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group 2013).
- Gli stili di vita: anche l'obesità e il fumo hanno effetti negativi (Brown KA and Simpson ER, 2015).
- La dieta abituale: diversi studi hanno dimostrato l'utilità di una dieta particolare nella prevenzione delle ricadute del carcinoma in donne già colpite (Ford NA et al., 2015). Ora si sta valutando l'utilità della stessa dieta nella prevenzione primaria, ovvero in chi non ha ancora sviluppato la malattia (Ford NA et al., 2015). Alla base di questa alimentazione c'è un apporto elevato di fitoestrogeni, ormoni vegetali simili agli estrogeni femminili che sono contenuti principalmente nella soia e nei suoi derivati, ma anche nelle alghe, nei semi di lino, nel cavolo, nei legumi, nei frutti di bosco, nei cereali integrali. Inoltre va limitato lo zucchero raffinato, privilegiato il pesce rispetto alle altre proteine animali e consumato grandi quantità di fibre proveniente da frutta, cereali, verdura e legumi.

1.2 Dieta mediterranea e carcinoma mammario

Dati di epidemiologia descrittiva indicano che i tassi di incidenza e di mortalità per svariate patologie cronico-degenerative e per numerosi tipi di cancro variano nel mondo. In particolare, i tassi di incidenza per malattie cardiovascolari, per alcuni tumori (colon-retto, mammella, prostata, polmone), diabete e obesità hanno livelli più elevati in paesi del Nord-America, Nord Europa ed Australia, e quelli più bassi in paesi asiatici (Cina, Giappone, Corea, Thailandia) e in alcune regioni dell’Africa centrale e occidentale (Morrison M et al., 2015). La presenza di variazioni geografiche così pronunciate ha indotto numerosi epidemiologi e ricercatori di tutto il mondo a intraprendere studi “ecologici”, detti anche studi di correlazione, per valutare l’impatto di fattori ambientali sul rischio di sviluppare patologie cronico-degenerative e tumori. Tali studi hanno fornito solide evidenze e dati sperimentali a supporto dell’ipotesi che le principali cause delle suddette patologie risiedano in fattori legati all’ambiente e, soprattutto, nello stile di vita, cioè l’alimentazione, l’attività fisica e il fumo di sigaretta (Bernard ME et al., 2015).

Nonostante i risultati degli studi di correlazione abbiano indicato con chiarezza che esiste una stretta associazione fra alimentazione e cancro, gli studi di intervento, cioè quelli che misurano il rischio di sviluppare una o più forme tumorali confrontando l’adozione di regimi alimentari diversi in gruppi di soggetti selezionati o rispetto ad una popolazione di riferimento, sono ancora oggi sorprendentemente poco rappresentati e per la maggior parte limitati all’impiego di supplementi e/o integratori alimentari nell’uomo e di regimi alimentari e/o di restrizione calorica nell’animale da esperimento.

Il Progetto DIMESA riprende in chiave moderna i principali obiettivi del precedente progetto MeDiet I, uno dei pochi studi al mondo randomizzati di intervento alimentare, basato sull’impiego di un regime alimentare di tipo mediterraneo, ideato e condotto dall’U.O. di Oncologia Sperimentale del Dipartimento Oncologico dell’ARNAS-Civico, in collaborazione con il Registro Tumori Specializzato della Mammella della Provincia di Palermo dello stesso Dipartimento. Il progetto MeDiet I ha indicato che una dieta tradizionale siciliana è in grado di ridurre significativamente il rischio di sviluppo del carcinoma mammario, così come di altre patologie neoplastiche cronico-degenerative. La riproposizione con rimodulazione del progetto MeDiet I nasce dall’osservazione che in Sicilia l’incidenza di molti tumori, e tra questi il tumore della mammella, è sensibilmente più bassa rispetto ad altre regioni del Nord Italia e dall’ipotesi che tale differenza possa essere, in buona parte, attribuita all’alimentazione.

Negli ultimi 20 anni, grazie al completamento del Progetto *Human Genome* ed alla messa a punto di tecnologie avanzate ad alta produttività (*microarray*), è divenuto possibile valutare simultaneamente e comparativamente l'attività di migliaia di geni (fino a oltre 40.000), sia noti che ancora non identificati (analisi di *genomica funzionale*), determinando i cosiddetti *profili di espressione genica* di cellule e/o tessuti umani. Questi nuovi approcci metodologici hanno fornito ai ricercatori di base opportunità senza precedenti per ottenere informazioni di importanza cruciale sui meccanismi che sono alla base dello sviluppo e della progressione di svariate patologie cronico-degenerative, incluso il cancro, consentendo di:

- a) sviluppare nuovi criteri diagnostici e di classificazione dei tumori (nuova “tassonomia” del cancro);
- b) identificare nuovi parametri prognostici;
- c) definire gli eventi genetici e molecolari associati allo sviluppo ed alla progressione tumorale;
- d) valutare la predisposizione ad ammalarsi di cancro.

Questi progressi hanno inoltre contribuito allo sviluppo di altre scienze “omiche” (epigenomica, proteomica, metabolomica, interattomica, ecc.) che, insieme alla valutazione di varianti alleliche (polimorfismi), potrebbero consentire la determinazione fine del rischio individuale di sviluppare una determinata patologia. Da un punto di vista antropologico e culturale, l'enorme e tumultuoso sviluppo di tali metodologie avanzate, con la possibile identificazione di tratti genetici sempre più precisi e individualmente associati allo sviluppo di patologie ad elevato impatto socio-economico e sanitario (cardio- e cerebro-vascolari, tumori, diabete mellito, sindrome metabolica, ecc.), porta inevitabilmente con sé il rischio di poter e voler identificare nel proprio DNA un “destino genetico” che potrebbe contribuire paradossalmente all'istaurarsi della malattia o più genericamente alla perdita dello stato di salute. In realtà, l'attività dei nostri geni ed i meccanismi che ne regolano la funzione sono direttamente ed immediatamente influenzati dall'ambiente e, soprattutto, dallo stile di vita, con particolare riferimento all'alimentazione. Numerosi dati sperimentali dimostrano come i macro- e i micro-nutrienti inducano modificazioni reversibili ma sostanziali dello stato di attività dei nostri geni e, pertanto possano risultare determinanti anche nello sviluppo di patologie caratterizzate da elevati tassi di incidenza e mortalità, come quelle sopra ricordate. In tal senso, lo sviluppo e la disponibilità di studi di *nutrigenomica* appare essenziale per la comprensione dei fenomeni che legano diverse componenti alimentari allo sviluppo di patologie cronico-degenerative e tumorali (Aragòn F et al., 2014).

1.3 L'Epigenetica

Per epigenetica si intende una qualunque attività di regolazione dei geni attraverso processi chimici che non comportino cambiamenti nel codice del DNA, ma possono modificare il fenotipo dell'individuo o della progenie. Questi fenomeni epigenetici alterano l'accessibilità fisica al genoma da parte di complessi molecolari deputati all'espressione genica e quindi alterano il funzionamento dei geni. A oggi l'epigenetica viene definita come "lo studio delle modifiche ereditabili nella funzione del genoma che si verificano senza cambiamenti della sequenza di DNA".

I principali meccanismi epigenetici di regolazione genica comprendono metilazione del DNA, modifiche della struttura della cromatina per (de)acetilazione e metilazione della coda degli istoni, e piccoli RNA non codificanti che influenzano l'espressione genica mediante degradazione mirata degli mRNA o inibizione della traduzione (Choudhuri S, 2011).

La metilazione del DNA è l'aggiunta di gruppi metilici a determinate citosine presenti nel DNA. Il DNA della maggior parte dei vertebrati contiene una piccola quantità di citosine metilate, che tendono a raggrupparsi in regioni non codificanti al 5' dei geni dove si trovano le sequenze del promotore. La metilazione delle regioni del promotore può bloccare l'accesso a proteine richieste per l'attivazione della trascrizione o servire come sito di legame per proteine che condensano la cromatina in configurazioni inattive. L'effetto finale è il silenziamento dell'espressione genica localizzato o regionale.

Un altro meccanismo comporta cambiamenti negli istoni, le proteine che hanno un ruolo nell'impacchettamento del DNA cromosomico. Ciascuna molecola di istone ha una coda che protrude e che può essere marcata in differenti posizioni con l'aggiunta di gruppi metilici, acetilici o fosfato. Le varie combinazioni di queste marcature generano un codice istonico che è letto da altre proteine come un insieme di segnali per modificare la struttura della cromatina e l'attività genica.

In ultima analisi troviamo i microRNA: questi sono piccole molecole di RNA (small non coding RNAs) a singolo filamento della lunghezza di circa 20-25 nucleotidi che svolgono diverse funzioni, la più nota della quale è attualmente quella di intervenire nella regolazione post-trascrizionale. Vengono suddivisi in tre sottofamiglie e precisamente:

- a) siRNA (Short Interfering RNAs), che mediano il silenziamento genico portando alla degradazione dell'RNA messaggero cui sono complementari;
- b) miRNA (o microRNA) che pur non essendo perfettamente complementari alla sequenza dell'RNA bersaglio, ne provocano un blocco della traduzione senza causarne la degradazione (Kundu ST et al., 2016);

c) piwiRNA presenti esclusivamente a livello testicolare, che interagiscono con macromolecole proteiche e sembrano essere coinvolti nella spermatogenesi e nello sviluppo embrionale.

1.4 I miRNA

I microRNA o miRNA appartengono ad una classe di corti RNA a singolo filamento prodotti da geni presenti in tutti gli organismi pluricellulari; si legano e regolano l'espressione di RNA messaggeri prodotti da geni strutturali.

I geni che producono i microRNA sono inizialmente trascritti in molecole di RNA più lunghe, dette microRNA primari (pri-miRNA), che si ripiegano in forcine. I pri-miRNA ripiegati sono quindi convertiti nei miRNA maturi mediante una maturazione sequenziale. Innanzitutto, un enzima nucleare detto Drosha taglia i pri-miRNA in RNA a forcina più piccoli, detti precursori dei microRNA (pre-miRNA), lunghi circa 70 nucleotidi. I pre-miRNA sono poi esportati nel citoplasma, dove l'enzima Dicer li taglia in microRNA maturi a singolo filamento, della lunghezza di circa 20-25 nucleotidi (Banzhaf – Strathmann J and Edbauer D 2014).

Uno dei due RNA è la forma matura del microRNA che si assembla con un gruppo di proteine per formare un miRNA-mediated silencing complex (miRISC). Ogni miRISC regola negativamente la traduzione degli RNA messaggeri contenenti sequenze complementari a quella del microRNA contenuto nel miRISC. In particolare, se l'appaiamento di un miRNA in un certo miRISC è perfettamente complementare alla sequenza presente sull'RNA messaggero, il messaggio bersaglio viene distrutto. Se, invece, il miRNA mostra una complementarietà parziale con l'mRNA, viene inibita la traduzione di quello stesso mRNA piuttosto che indurlo la degradazione. Questo effetto inibitorio richiede solitamente il legame di più microRNA su diversi siti parzialmente complementari all'interno di un dato mRNA; l'inibizione tuttavia non è necessariamente permanente (fig.1).

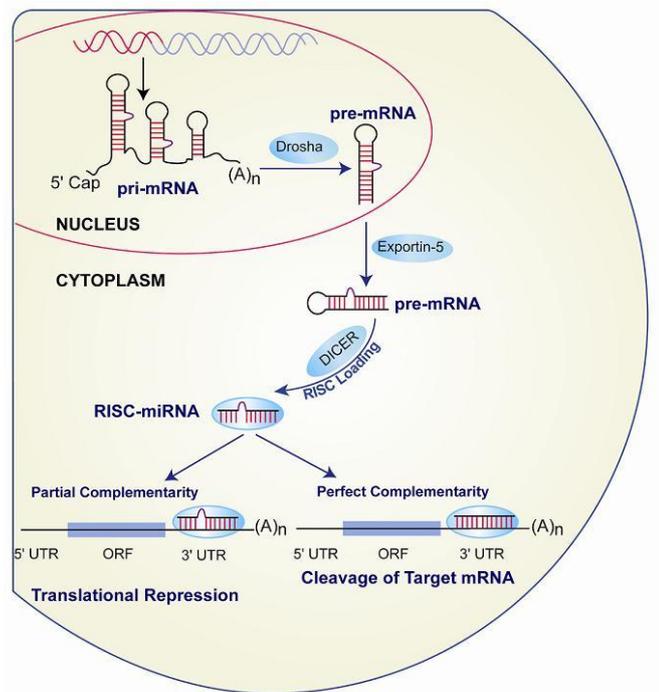


Fig.1: biosintesi dei miRNA e silenziamento traduzionale da parte di quest'ultimi.

(da www.genscript.com)

I miRNA svolgono ruoli importanti durante lo sviluppo dell'organismo embrionale, specialmente nella formazione di cellule specializzate come i neuroni, le cellule del sistema immunitario e le cellule muscolari scheletriche e cardiache (Becker WM et al., 2013).

1.4.1 miRNA e cancro

Le mutazioni che generano oncogeni o che alterano le funzioni di geni soppressori tumorali sono cruciali per lo sviluppo di un tumore, ma non bastano a spiegare tutti i cambiamenti che accompagnano la conversione da cellula normale a tumorale. Molte delle proprietà delle cellule cancerose non sono provocate da mutazioni, ma da modificazioni epigenetiche che coinvolgono i microRNA.

Oltre a essere prodotti in quantità alterate nelle cellule cancerose, alcuni microRNA possono essere anche essi stessi mutati. La causa della differente espressione dei geni miRNA tra le cellule maligne e normali può essere spiegata con meccanismi diversi, tra cui:

- a) alterazioni cromosomiche che coinvolgono regioni contenenti geni miRNA;
- b) mutazioni puntiformi del DNA;

- c) meccanismi epigenetici;
- d) alterazioni del *machinery* responsabile della produzione dei miRNA.

Lo sviluppo di diverse tecnologie ha permesso la caratterizzazione dei profili di espressione dei miRNA per diversi tumori, tra cui la leucemia linfatica cronica, il cancro al seno, il cancro del polmone, del carcinoma papillare della tiroide, i tumori pancreatici, il glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro alla prostata, il carcinoma epatocellulare (Di Leva G and Croce CM, 2013).

I miRNA si trovano spesso nei siti fragili dei cromosomi, che sono suscettibili all'amplificazione o alla delezione. Le delezioni cromosomiche ad esempio sono eventi frequenti nelle cellule del cancro al seno e la perdita di eterozigosi al 17p13.3 è stata riportata nel 49% dei tumori alla mammella (Damavandi Z et al., 2016).

Si è visto che molti miRNA sono down-regolati nel carcinoma alla mammella come ad esempio miRNA let 7, suggerendo che una ridotta espressione let 7 potrebbe essere associato ad una prognosi infausta. Un'associazione tra down regolazione di let 7 e prognosi infausta è stata precedentemente riportata nel cancro del polmone umano (Iorio V, Ferracin M et al., 2005).

Il gene *miRNA 125b-1* si trova nella regione cromosomica 11q23-24 e la down regolazione del suo miRNA è stata riscontrata in alcuni tipi di cancro, compresi quello al seno, quello ovarico e alla vescica (Banzhaf – Strathmann J and Edbauer D 2014). Nella maggior parte dei tumori al seno, la down regolazione del miRNA 125b– 1 è associata ad una prognosi infausta. Altri miRNA, quali: miRNA 18a, miRNA 22, miRNA 181, miRNA 206, miRNA 221/222, sono coinvolti nella down regolazione del Receptor- α degli estrogeni e nella eliminazione di ER- α in linee cellulari di carcinoma mammario (Usmani A et al., 2016).

La deregolazione di altri miRNA è stata ampiamente dimostrata in altri tipi di tumore. Ad esempio:

- miRNA 106b, miRNA 93 e miRNA 25 sono up-regolati in pazienti con carcinoma epatocellulare (Yen CS et al., 2016);
- miRNA 486-5p è down regolato nel carcinoma colon rettale (Liu C et al., 2016);
- miRNA 126-3p e miRNA 451a sono down regolati nel cancro al polmone (Chen Q et al., 2016).

1.4.2 miRNA e dieta

L'Organizzazione Mondiale della Sanità, come riportato dalla letteratura, stima che circa il 30% delle morti per cancro sono attribuiti a fattori di rischio modificabili come le abitudini alimentari, lo stile di vita, l'inattività fisica, il fumo e il consumo di alcol (Gavrilas LI et al., 2016).

Vi è un'evidenza clinica, sperimentale ed epidemiologica che suggerisce che la dieta è uno dei più importanti fattori determinanti il rischio per lo sviluppo di una serie di malattie croniche. Vari alimenti naturali hanno dimostrato di esercitare azioni pleiotropiche nelle cellule tumorali. Dati recenti suggeriscono che gli agenti ambientali, in particolare componenti alimentari bioattivi svolgono un ruolo diretto o indiretto nella modulazione dell'espressione dei miRNA (Parasramka MA et al., 2012; Shah MS et al., 2011; Saini S et al., 2010; Davidson LA et al., 2009b; Davis CD and Ross SA, 2008).

Un gruppo crescente di prove dimostra che un'elevata assunzione di n-3 acidi grassi polinsaturi (PUFA) sopprime lo sviluppo del cancro del colon (Turk HF et al., 2012; Kachroo P et al., 2011; Davidson LA et al., 2009a; Chang WL et al., 1998), il cancro al seno (Dimri M et al., 2010), e il glioblastoma (Leaver HA et al., 2002), modificando l'espressione genica e vie di segnalazione cellulare.

I polifenoli, ad esempio, sono dei metaboliti secondari onnipresenti in frutta, verdura, cereali integrali, olio e bevande, compresi il tè, caffè e vino. Diversi studi clinici, sperimentali, ed epidemiologici hanno suggerito un'associazione inversa tra il consumo di alimenti ricchi di polifenoli e lo sviluppo di malattie croniche (Spencer JP et al., 2008; Schroeter H et al., 2006; Arts IC e Hollman PC, 2005; Scalbert A et al., 2005). Dal punto di vista meccanicistico, i polifenoli tra cui gli ellagitannini, estratti ricchi di flavanoli, epigallocatechina-3-gallato, curcumina e resveratrolo sembrano modulare le diverse espressioni dei miRNA e i loro obiettivi in diversi modelli di cancro. In particolare il polifenolo Tirosole è capace di indurre apoptosi ed inibire la proliferazione cellulare in linee cellulari trasformate (Fabiani R, 2016); non è stato ad oggi ancora studiato un suo eventuale effetto modulatore di geni miRNA.

Determinare la variazione dei livelli di miRNA nel siero dopo esposizione ad agenti dietetici potrebbe essere utilizzato come strumento diagnostico per monitorare gli effetti del trattamento nel tempo (Shah, MS et al., 2012).

Vi è un crescente interesse ad utilizzare interventi dietetici per prevenire, rallentare la progressione delle malattie croniche, in particolare il cancro. Decenni di osservazioni e studi epidemiologici hanno suggerito che le nostre scelte alimentari quotidiane influenzano il rischio di cancro. Cambiamenti epigenetici e alterazioni molecolari che collegano

l'alimentazione alla carcinogenesi è un'area attiva di ricerca, tra cui emergono dati che indicano che la dieta e componenti bioattivi della dieta possono modificare l'espressione genica attraverso la modulazione dei miRNA (Gavrilas LI et al., 2016).

2. SCOPO DELLA RICERCA E STRATEGIA SPERIMENTALE

Scopo principale della ricerca qui presentata è la valutazione dei livelli di espressione di particolari miRNA circolanti nel sangue periferico sia di donne sane che di pazienti affette da carcinoma mammario che hanno accettato di assumere quantità fissate di olio addizionato con polifenoli.

Si è proceduto con l'analisi comparata *multi steps* andando dal valutare comparativamente variazioni di espressione di miRNA generalmente coinvolti in processi cancerosi al confronto di variazioni di espressione di altri miRNA associati a stati neoplastici via via sempre più specifici rispetto al carcinoma mammario. Questa strategia di lettura dati potrebbe suggerire varie associazioni di interesse e potrà fornire indicazioni di coinvolgimento di miRNA distinguendo fra quelli con associazioni generiche rispetto a quelli con coinvolgimenti specifici.

Inoltre, il confronto all'interno dei due diversi gruppi di donne, sane e affette, potrebbe consentire l'identificazione di un *subset* di miRNA la cui espressione e/o funzione risulti significativamente modificata dall'intervento alimentare in relazione, o meno, alla patologia.

Infine, con le informazioni che sarà possibile ottenere alla conclusione dello studio si otterrà fondamentalmente un aumento delle conoscenze scientifiche sugli effetti epigenetici *in vivo* che alcuni alimenti, o componenti bioattivi, producono.

Ad oggi questo studio rimane uno dei primi tentativi preliminari di ottenere dati su modifiche di espressione di miRNA *in vivo* dopo volontari e regolari assunzioni di alimenti bioattivi, sia in soggetti sani che in pazienti affetti da carcinoma mammario.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione e trattamento dei pazienti e dei soggetti sani

All'interno di questo progetto sono stati studiati 35 soggetti, omogenei per età, di cui 18 sani e 17 affetti da carcinoma mammario giudicati dall'equipe medica come equivalenti secondo parametri di classificazione/stadiazione oncologica. I campioni sono stati reclutati nell'ambito della banca biologica DIMESA, all'interno della quale gruppi di soggetti sani e affetti da tumore al seno sono stati sottoposti ad un trattamento di intervento alimentare basato sull'assunzione programmata di due tipologie di olio extravergine di oliva differentemente arricchite in polifenoli (Moral R., et al 2016). Il progetto ha previsto ed ottenuto i necessari consensi etici.

In particolare, gli oli associati alle diete dei soggetti studiati sono stati arricchiti in Tirosole (fig.2) e suoi derivati. Successivamente, gli oli, sono stati caratterizzati in base al contenuto di questi composti antiossidanti: tutti quegli oli che contenevano quantità maggiori di 250 parti per milione (ppm) di antiossidante, sono stati classificati come oli "HIGH" e, conseguentemente, tutti quegli oli il cui contenuto di polifenoli si attestava sotto la predetta soglia, sono stati considerati come oli "LOW".

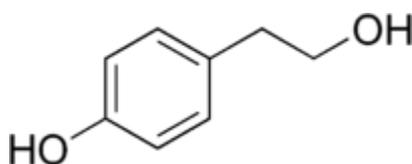


Fig.2: struttura del Tirosole.

Tutti i soggetti sani hanno seguito, per un mese, una dieta comprendente l'assunzione dell'"olio LOW", seguita da una settimana di "Wash out", cioè di mancata assunzione per permettere il rinnovo fisiologico delle componenti sieriche, ed un secondo mese durante il quale era prevista, per gli stessi soggetti, una dieta comprendente l'assunzione dell'"olio HIGH". Pertanto, di ogni soggetto sano sono stati effettuati e conservati nella bio-banca quattro prelievi ematici: un primo prelievo effettuato in condizioni basali, o a tempo zero (T_0), e tre prelievi relativi ai tre momenti dell'intervento alimentare.

I soggetti affetti da tumore al seno sono stati sottoposti in modo random e alternativo al trattamento con i 2 tipi di olio in modo che ciascun paziente ne assumeva soltanto un tipo: 8

pazienti hanno assunto olio LOW e 9 olio HIGH. A tutti i pazienti, pertanto, sono stati effettuati solo due prelievi ematici: quello basale (T_0) e quello a conclusione dell'intervento alimentare.

In totale, considerando le varie fasi e i soggetti studiati, sono stati analizzati 106 campioni di RNA. Per semplicità di riporto si denomina l'insieme dei 18 soggetti sani come gruppo **SS**, gli 8 pazienti che hanno assunto olio LOW verranno riportati come gruppo **CL** ed infine i 9 pazienti che hanno assunto olio HIGH verranno denominati come gruppo **CH**.

I dati ottenuti sono stati analizzati, elaborati e confrontati con l'ausilio del software statistico "Open Source": *Statistical Computing Resources UCLA* (University of California at Los Angeles).

3.2 Scelta dei miRNA da studiare

In questo studio sono state considerate le variazioni di espressione di 20 miRNA (Tab. I) rilevati nel sangue intero e per questo definiti "circolanti". Per ognuno dei 106 campioni studiati è stata registrata la variazione di ogni singolo miRNA ricavando quindi più di 2000 dati da analizzare.

N	miRNA	Ruolo in oncogenesi
1	miR let 7d	Onco soppressore
2	miR 15	Onco soppressore
3	miR 16	Onco soppressore
4	miR 18a	Onco promotore
5	miR 21	Onco promotore
6	miR 22	Onco soppressore
7	miR 25	Onco promotore
8	miR 92a	Onco promotore
9	miR 93	Onco promotore
10	miR 106a	Onco promotore
11	miR 106b	Onco promotore
12	miR 125b	Onco soppressore
13	miR 126	Onco soppressore
14	miR 128	Onco soppressore
15	miR 133a	Onco soppressore
16	miR 181a	Onco promotore
17	miR 206	Onco soppressore
18	miR 221	Onco promotore
19	miR 222	Onco promotore
20	miR 1274a	Onco promotore

Tab.I miRNA studiati e loro ruolo in oncogenesi.

3.3 Estrazione di RNA totale

In un primo momento abbiamo eseguito l'estrazione dell'RNA totale, utilizzando l'RNeasy Protect Animal Blood Kit (Qiagen). Partendo da 500 μ l di sangue si è ottenuta una resa bassa: 0,7 μ g di RNA totale in 30 μ l di solvente; di norma bisognerebbe avere almeno 1 μ g in 5 μ l di solvente.

Dalle prove effettuate è emerso che la concentrazione dell'RNA totale estratto dai campioni è un fattore limitante per la buona resa del successivo sequenziamento dei miRNA. Infatti, dai campioni prova della banca, con concentrazione < 200ng/ μ l si sono generate librerie poco ricche in specie di miRNA.

Per vedere se la bassa efficienza di estrazione derivava dal metodo di conservazione del campione (a -20°C) abbiamo effettuato l'estrazione su sangue fresco, notando che il risultato non cambiava. Abbiamo quindi aumentato il volume di partenza: 1 ml invece di 500 μ l e così facendo abbiamo ottenuto il doppio della concentrazione. Ma la soluzione più efficiente al problema tecnico si è avuta utilizzando un kit (miRNeasy Mini kit, QIAGEN®) più idoneo all'estrazione dell'RNA da buffy coat che ha fatto ottenere 3 μ g totali di RNA su 30 μ l di solvente, secondo la quantizzazione ottenuta con Nanodrop (Thermo Scientific). Operando quindi, di routine, l'estrazione di RNA partendo dal buffy coat invece che da sangue intero, abbiamo ottenuto quantità di RNA idonei ai successivi steps della ricerca.

3.4 Preparazione delle librerie

Dopo l'estrazione dell'RNA è necessario preparare le librerie; questa fase si divide in diversi steps:

1. Si opera la ligation degli adattatori: si comincia con legare quello al 3' e poi quello al 5' (fig.3);

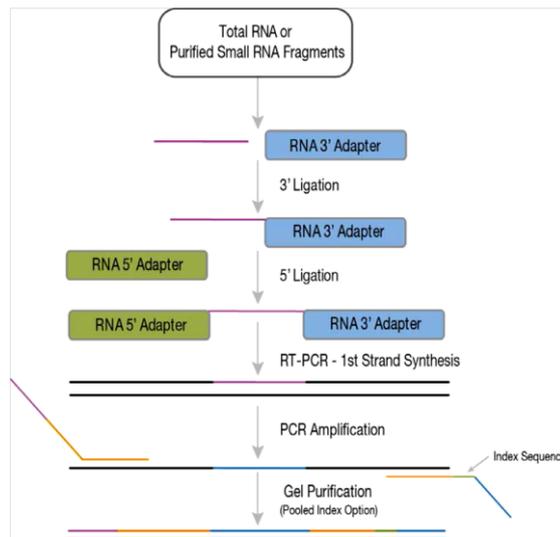


Fig.3: vari steps per la preparazione delle librerie, ligation degli adattatori al 3' e al 5', retrotrascrizione dell'RNA, amplificazione del cDNA e purificazione dei microRNA.

2. Si effettua l'RT PCR: si opera una retrotrascrizione dell'RNA per ottenere una popolazione di cDNA;
3. Si amplificano per PCR i cDNA: in questa fase vengono aggiunti gli INDEX che sono frammenti di DNA, forniti dal kit, che servono per 'nominare', riconoscere il campione (fig.4). Ad esempio lo strumento saprà che l'INDEX 1 corrisponde al campione 1, e così via;

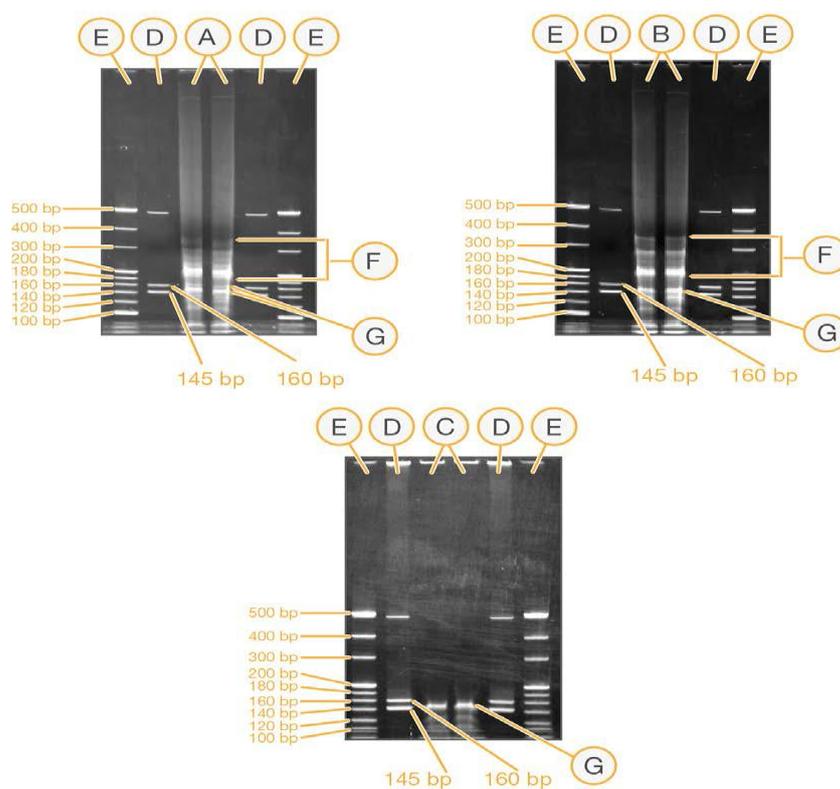
Index Sequence

RPI1 ATCACG RPI7 CAGATC
 RPI2 CGATGT RPI8 ACTTGA
 RPI3 TTAGGC RPI9 GATCAG
 RPI4 TGACCA RPI10 TAGCTT
 RPI5 ACAGTG RPI11 GGCTAC

Fig.4: frammenti di DNA chiamati Index che servono per riconoscere il campione.

4. Si isolano i microRNA: vengono caricati i cDNA su un gel di poliacrilammide precast 6% (ratio 19:1) e viene effettuata la corsa in presenza di markers opportuni. Dopo la corsa si ritaglia dal gel la banda di interesse, individuando quella di peso molecolare

compresa fra 160 e 140 bp (fig.5) in quanto corrispondente al generico peso molecolare dei miRNA distinto dai tRNA di peso minore.



A Human brain total RNA
 B Mouse brain total RNA
 C Prepurified microRNA
 D Custom RNA Ladder
 E HIGH Resolution Ladder
 F Small noncoding RNAs
 G MicroRNA

Fig.5: corsa elettroforetica in gel di poliaccrilammide dei cDNA. La banda d'interesse si trova tra 160 e 140 bp.

5. Si effettua l'eluizione della banda in acqua milliQ overnight;
6. Si quantizza il cDNA eluito mediante QUBIT;
7. Si procede con l'elettroforesi capillare mediante QIAxcel per vedere se la libreria è idonea: lo strumento fornisce un valore di "bontà" del campione restituendo un picco a circa 150 bp (fig.6);

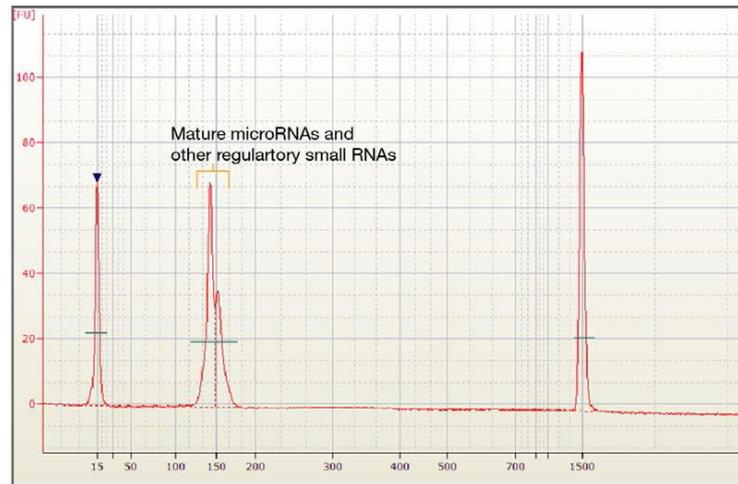


Fig.6: elettroforesi capillare condotta mediante QIAxcel: il picco a circa 150 bp indica che il campione è accettabile.

8. Si porta la concentrazione della libreria ad 1nM per adeguare il campione e renderlo idoneo ad sequenziamento;
9. Si uniscono tutti i campioni ottenendo un pool. Si inserisce inoltre una libreria di controllo chiamata PhiX, la cui quantità deve essere il 10% rispetto alla libreria che si sta studiando;
10. Si fa una denaturazione con idrossido di sodio a temperatura ambiente per 5 minuti. La denaturazione serve perché lo strumento (Miseq, Illumina) ha bisogno di un singolo filamento che poi legherà gli adattatori presenti nella FLOW cell. Si aggiunge poi il Tris-HCl a pH 7 per neutralizzare l'idrossido di sodio e la soluzione di ibridazione (già presente nel kit);
11. Si caricano 600 μ l nell'apposito vano dello strumento "Miseq" (Illumina) e si avvia lo stesso, dopo averlo programmato per ripetere 50 volte un ciclo di amplificazione standard.

3.5 Sequenziamento mediante FLOW cell

Il sequenziamento viene anch'esso suddiviso in varie fasi:

1. Formazione dei clusters. L'adapter presente nel singolo filamento di cDNA si lega alla sonda della FLOW cell (cella a flusso) permettendo l'amplificazione. La FLOW cell

(fig.7) è un supporto in vetro delle dimensioni di un vetrino da microscopio che contiene 8 lanes a loro volta suddivise in 120 tiles, definite come quei quadrati in cui è possibile fissare circa 220.000 oligos di DNA. Nella fattispecie del nostro studio abbiamo utilizzato la FLOW cell della ditta Illumina, kit MiSeq reagent kit v3, in grado di sequenziare la maggior parte dei miRNA conosciuti;

In queste tiles si formano i clusters che vengono sottoposti a imaging utilizzando combinazioni di LED e filtri specifici per ciascuno dei quattro dideossinucleotidi con marcatura fluorescente. Ultimato l'imaging di una delle tiles, la cella a flusso viene riposizionata per l'esposizione della tile successiva. Il processo è ripetuto per ciascun ciclo di sequenziamento;



Fig.7: esempio di una FLOW cell.

Lo strumento numera e fotografa le tiles per ogni ciclo, farà 4 foto per ciascun ciclo su entrambi i lati (si leggono sia sopra che sotto). Le foto sono 4 perché rivela le 4 fluorescenze (A, B, C e D) (fig.8);

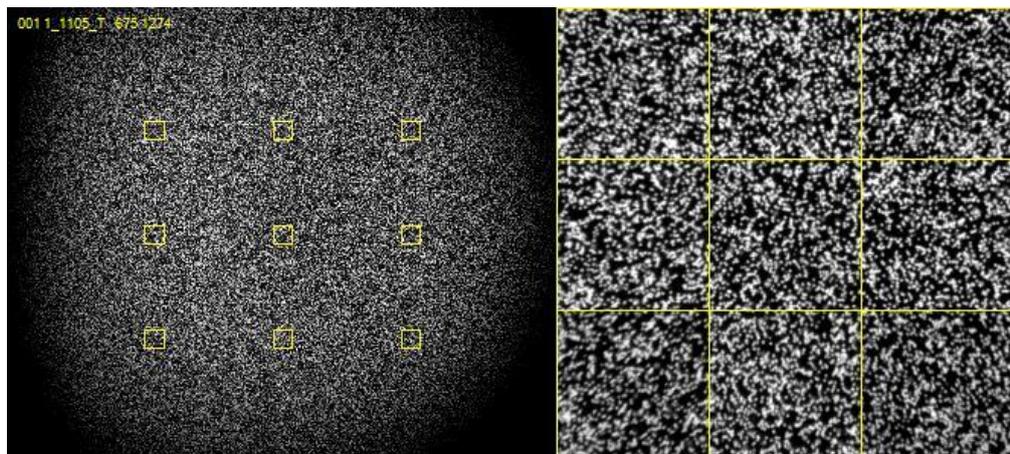


Fig.8: foto dei quadrati di spazio (tile) analizzati dal Miseq.

2. Dopo l'amplificazione, si stacca il filamento vecchio e rimane quello nuovo legato alla sonda che cercherà attorno a se una ulteriore sonda a cui si legherà con il 3' formando i così detti BRIDGE AMPLIFICATIONS. L'unico fattore limitante è la distanza, quindi, i frammenti non devono essere né troppo corti né troppo lunghi (fig.9);

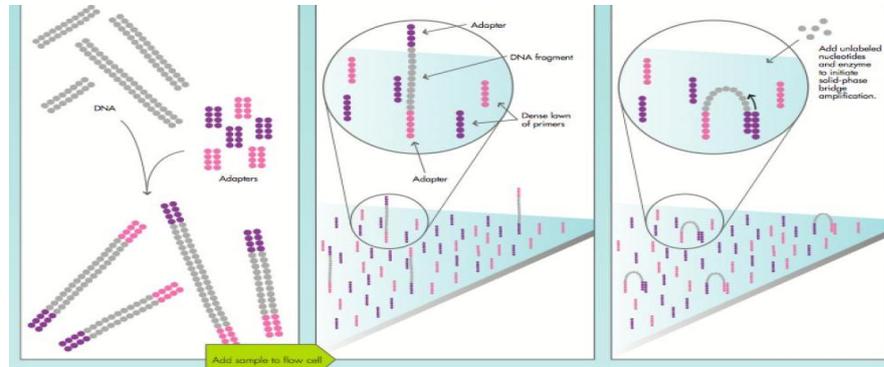


Fig.9: formazione dei bridge amplifications.

3. Dopo un ulteriore ciclo di amplificazione, quindi, si otterranno 2 filamenti: uno che sarà legato al complementare dell'adattatore 3' e l'altro al 5';
4. Avviando ulteriormente un successivo ciclo di amplificazione, sarà possibile ottenere molti cloni per poter poi avere un segnale robusto e far sì che lo strumento riveli la fluorescenza (fig.10);

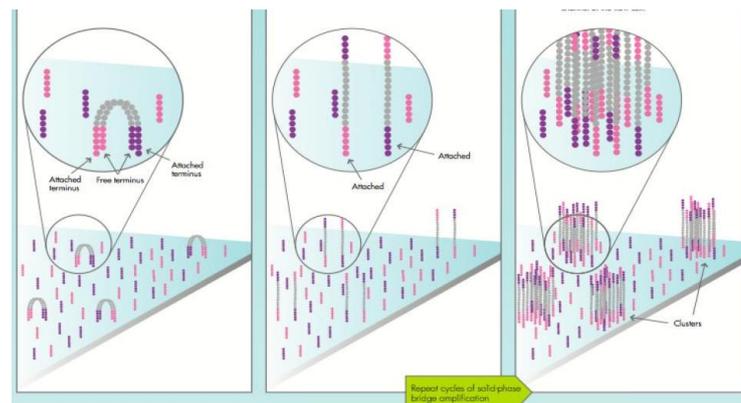


Fig.10: ulteriori amplificazioni per poter ottenere un segnale più intenso.

5. Si denatura il doppio filamento: quello reverse viene tagliato ed eliminato e rimane legato solo quello forward;
6. Inizia il vero e proprio sequenziamento (per PCR convenzionale): al filamento si legherà un primer di sequenza che si ibrida all'adattatore al 5'. Ad ogni ciclo di amplificazione viene incorporato un nucleotide fluorescente e lo strumento effettua 4 foto (stavolta sono 2 i fluorofori), una per ogni base azotata: in base alla fluorescenza emessa da ogni tile è determinata la base azotata. Questo avviene per ogni ciclo (fig.11);
7. Viene quindi valutata la fluorescenza in termini di *four-colour cyclic reversible termination* (CRT).

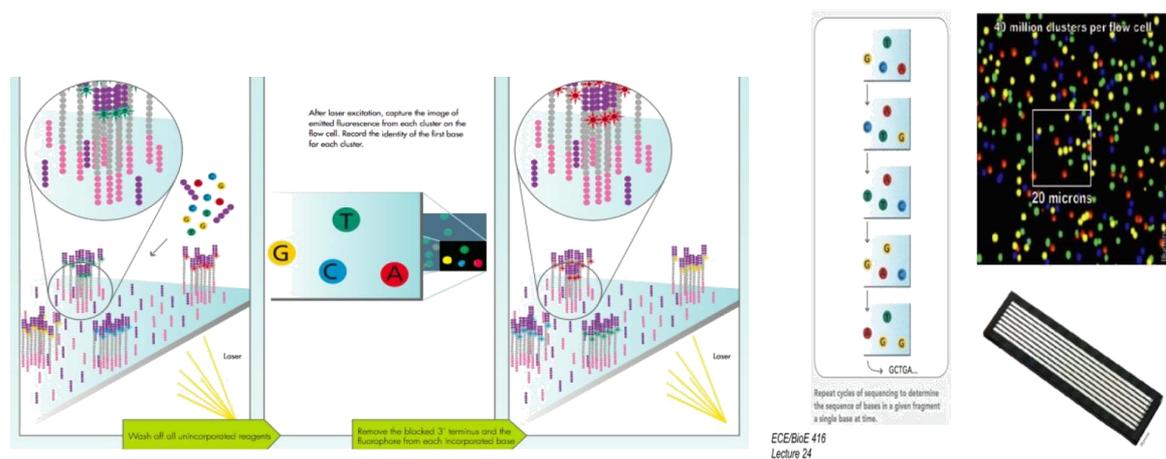


Fig.11: inserimento di nucleotidi fluorescenti ad ogni ciclo di amplificazione che lo strumento rileva e fotografa.

Ogni sequenziamento è stato ripetuto 2 volte e le differenze fra i valori ottenuti ha determinato una deviazione standard riportata su ogni istogramma.

Affinché i dati forniti dal sequenziamento possano essere validati si è proceduto a calcolare, per ogni miRNA, la significatività mediante il test statistico “*t* di Student”: ogni valore di CRT riscontrato in una determinata fase dell'intervento alimentare è stato comparato con il rispettivo valore di CRT ottenuto nella corrispondente fase T_0 , considerata come situazione basale. E' stato considerato significativo ogni comparazione che ha generato un valore di $p < 0.05$.

3.6 Determinazione diretta di profili espressione di miRNA attraverso Real-Time PCR Open Array

Alcuni campioni di sangue intero, sia provenienti da soggetti sani che da pazienti, sono stati analizzati, oltre che con la tecnica fino a qui descritta, anche tramite determinazione diretta con l'uso di piattaforma Real-Time PCR Open Array (Thermo Fisher) che fa uso di chimica Taqman. I profili di espressione dei miRNA sono stati in questo caso ottenuti tramite un kit che consente lo studio del profilo di espressione di oltre 800 miRNA umani, annotati in banca dati. Quest'ultima procedura prevede:

- la retrotrascrizione dei miRNA in cDNA con kit Megaplex RT primer e TaqMan microRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher);
- la pre-amplificazione dei cDNA con kit Megaplex PreAmp Primers e TaqMan PreAmp Master mix (Thermo Fisher);
- l'amplificazione Real Time dei cDNA con kit TaqMan microRNA Open Array Human Panel (Thermo Fisher).

Il vantaggio ottenuto con questa tecnica innovativa sta nella bassa quantità di RNA da utilizzare come input iniziale. Infatti, questa tecnica è stata da noi utilizzata come conferma di risultato solo per quei campioni che, analizzati con la tecnica convenzionale, avevano mostrato incertezza di risultato a causa dell'esiguità del materiale di partenza.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Espressione dei 20 miRNA

Nelle tabelle da II a V sono mostrati i valori di CRT relativi all'espressione dei 20 miRNA nel gruppo di soggetti sani (SS) in condizioni basali [(T₀) – Tab. II], dopo assunzione dell'olio LOW (Tab. III), dopo wash out (Tab. IV), dopo assunzione di olio HIGH (Tab. V).

Analogamente nelle tabelle da VI a VIII sono mostrati i valori di CRT relativi all'espressione dei 20 miRNA nei pazienti in condizioni basali [(T₀) – Tab. VI], dopo assunzione dell'olio LOW (Tab. VII), dopo assunzione di olio HIGH (Tab. VIII). Ricordiamo che la popolazione di pazienti che ha assunto olio LOW (CL) è composta da soggetti diversi rispetto alla popolazione di pazienti che ha assunto olio HIGH (CH). Tutte quelle caselle dove non è stato riportato un valore numerico si riferiscono a sequenziamenti che non hanno dato alcun risultato con nessuna delle due tecniche utilizzate.

Tab. II Valori di CRT determinati nei prelievi basali di soggetti sani (SS).

TAB. II	Valori di CRT (prelievo basale-T₀)																			
Soggetti sani	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
61	28,592	***	25,14	21,211	25,759	25,8	21,53	26,072	20,855	25,292	21,499	21,659	20,891	20,387	20,197	24,572	20,835	23,779	26,646	27,942
63	25,574	35,504	25,215	20,832	22,225	20,732	21,666	24,378	18,61	23,692	18,643	20,178	20,66	17,175	18,912	22,013	18,655	22,719	23,775	24,488
65	26,366	***	24,343	20,998	22,789	21,626	23,511	23,193	18,372	24,091	18,682	19,788	20,753	17,587	18,287	21,901	18,467	23,648	24,266	25,060
66	27,201	22,868	24,204	20,504	21,079	22,269	21,483	22,95	18,879	24,061	18,739	20,884	20,498	18,751	19,67	22,748	18,980	22,565	24,841	26,898
67	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
68	25,793	31,709	25,422	22,547	***	20,599	21,219	24,569	20,343	25,105	19,667	21,57	21,435	18,497	18,009	***	19,763	23,583	25,536	23,479
69	28,851	***	25,82	23,066	24,964	23,756	30,122	25,596	21,687	26,625	20,709	21,173	23,202	19,713	22,875	23,357	20,754	22,051	26,115	27,336
70	27,445	***	27,349	22,853	24,849	24,833	32,527	25,426	22,44	25,619	20,232	21,79	23,173	20,008	26,888	25,269	20,789	24,185	26,740	27,260
71	27,854	***	27,822	24,113	26,593	26,74	31,273	28,547	24,448	26,599	22,429	22,937	26,23	21,013	26,727	26,392	22,591	25,897	27,823	30,128
72	26,439	***	25,008	21,795	23,811	21,977	28,739	24,742	20,659	25,247	20,14	19,847	21,525	19,275	28,633	23,102	18,845	24,486	26,052	24,307
78	27,133	***	24,734	21,411	23,534	25,182	28,914	24,619	20,27	25,78	19,782	20,723	22,413	19,39	27,857	23,417	19,266	23,792	26,335	25,752
81	28,533	***	26,531	23,492	27,295	23,919	30,559	26,825	23,256	26,448	22,259	22,43	26,053	20,849	27,23	25,987	21,311	27,904	30,202	***
82	25,85	***	23,751	21,335	22,766	23,606	24,86	21,522	17,701	22,565	18,284	20,471	19,813	16,731	18,277	22,113	18,004	22,970	26,078	24,345
101	26,615	***	21,644	20,996	21,054	23,649	27,205	22,94	18,403	23,051	17,735	20,027	19,747	19,764	23,831	22,580	18,757	23,004	24,369	21,886
108	30,139	***	***	26,973	***	***	28,587	***	26,763	29,311	28,055	25,194	26,743	25,808	26,992	***	26,236	***	***	***
110	25,556	***	23,887	21,31	22,808	23,094	37,606	21,983	18,209	22,645	17,731	20,344	19,763	15,986	25,263	21,647	18,540	23,498	24,541	25,446
170	26,646	27,215	25,46	22,564	23,634	***	17,811	23,996	18,933	24,812	17,953	21,565	21,341	17,594	24,7	22,726	19,754	22,693	25,419	26,070
257	26,317	28,431	24,705	22,206	24,219	23,574	26,652	23,372	19,188	23,96	18,262	21,619	21,305	17,64	26,458	23,162	19,633	22,763	25,253	25,647

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. III Valori di CRT determinati nei prelievi di soggetti sani (SS) dopo assunzione di olio LOW.

TAB. III	Valori di CRT (prelievo dopo assunzione dell'olio LOW)																				
Soggetti sani	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a	
61	25,928	34,292	25,085	20,968	22,014	22,783	20,774	24,891	18,344	24,32	19,157	20,311	20,705	18,004	18,97	22,413	19,274	23,764	24,433	25,636	
63	25,877	28,326	25,761	21,466	22,477	27,427	23,591	24,236	19,449	24,775	19,738	18,094	20,821	18,306	19,721	22,775	18,826	22,648	25,786	24,688	
65	26,163	***	26,538	21,721	22,912	22,409	22,698	24,362	18,58	25,512	18,754	20,503	21,544	18,659	18,81	22,836	18,700	24,742	25,117	26,050	
66	25,971	20,96	24,331	20,743	21,703	22,751	19,939	22,81	18,501	24,149	18,323	19,902	20,678	17,839	17,906	22,411	18,691	21,973	24,486	25,806	
67	24,258	25,495	22,765	15,035	21,543	23,114	21,17	21,201	17,579	22,834	17,368	19,112	19,435	16,909	16,79	***	***	***	***	***	
68	25,818	***	24,195	20,795	22,345	21,833	23,94	23,427	19,25	23,585	18,811	20,305	20,75	17,856	19,835	22,998	17,324	20,700	24,648	***	
69	26,493	***	26,566	22,649	24,209	23,091	29,916	25,403	21,37	25,37	20,541	20,8	22,387	19,275	24,547	23,551	18,713	23,318	25,667	23,179	
70	***	***	***	***	***	***	32,538	***	27,119	***	27,835	***	28,881	30,405	27,055	***	20,736	21,762	25,888	26,874	
71	26,286	***	24,748	20,633	23,953	23,474	27,817	24,685	20,284	23,776	20,239	20,881	19,052	19,558	30,522	24,006	26,123	***	***	***	
72	26,923	***	24,322	22,442	24,288	21,977	29,16	25,02	20,727	25,92	20,428	20,783	22,052	19,539	26,801	23,522	19,764	21,579	25,956	25,827	
78	27,041	***	25,298	20,618	24,363	24,81	28,095	24,496	20,396	25,004	20,753	20,643	21,649	19,788	27,552	24,948	19,498	26,759	26,526	25,302	
81	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	19,764	24,136	26,817	24,809
82	25,81	***	24,031	21,713	21,594	22,286	24,488	21,648	17,989	23,614	18,495	20,789	20,461	17,103	18,799	22,282	18,956	22,986	25,493	24,782	
101	***	***	28,326	29,246	***	20,657	26,847	***	24,698	***	28,076	26,323	29,671	28,865	***	29,057	24,734	***	***	29,973	
108	26,093	***	25,762	22,284	23,289	22,487	33,191	26,168	20,996	25,768	18,708	21,243	21,226	18,646	26,988	23,299	19,752	22,614	24,752	26,251	
110	26,142	32,525	24,239	21,621	22,714	21,836	30,318	22,766	18,914	23,358	17,826	20,367	20,262	17,024	25,256	21,754	18,291	23,753	25,374	25,382	
170	27,649	***	24,945	22,375	24,114	23,945	29,521	23,437	19,079	24,726	18,545	21,261	21,592	17,598	25,228	22,664	19,782	22,864	24,771	25,242	
257	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. IV Valori di CRT determinati nei prelievi di soggetti sani (SS) dopo wash out.

TAB. IV Soggetti sani	Valori di CRT (prelievo dopo wash out)																			
	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
61	***	***	28,28	25,025	***	21,737	30,157	***	26,986	29,98	28,909	25,084	***	26,27	23,431	28,481	26,401	***	***	***
63	28,341	32,645	24,724	21,09	24,238	27,121	23,558	25,134	20,776	25,838	20,492	19,206	21,29	20,32	16,73	23,276	18,406	22,768	27,553	26,469
65	***	32,749	26,366	22,726	25,772	28,021	23,151	27,465	22,701	25,71	24,413	18,818	21,998	24,383	18,926	25,668	23,293	24,735	28,973	28,618
66	***	***	29,609	25,799	***	21,613	28,564	34,465	25,758	***	27,163	27,127	27,824	27,173	27,302	***	26,824	29,930	29,659	***
67	28,478	***	***	24,854	25,295	***	30,432	26,773	22,827	30,063	22,372	23,897	27,153	24,609	23,188	***	***	***	***	***
68	27,15	***	26,314	22,578	23,878	22,516	33,254	25,592	20,509	26,23	21,078	21,78	23,141	20,014	23,439	24,254	21,803	28,413	26,923	***
69	25,385	25,304	24,748	20,771	22,074	23,613	22,334	23,518	18,6	23,99	17,154	20,57	20,698	17,417	17,79	23,098	20,431	24,604	26,009	24,797
70	26,524	24,926	25,222	22,446	23,507	21,876	21,593	23,452	19,086	23,36	19,913	20,734	20,703	18,559	17,769	24,469	18,387	19,922	23,967	23,687
71	25,815	***	23,836	20,555	22,978	21,794	23,331	23,211	18,765	23,273	18,755	19,909	21,473	19,175	21,824	22,887	19,224	23,416	27,492	***
72	26,19	27,734	24,728	21,962	23,285	***	20,377	23,818	19,685	24,793	18,83	20,302	21,057	17,774	17,362	23,287	18,475	21,516	24,550	25,076
78	24,884	25,913	23,512	20,37	21,845	21,577	20,879	22,589	18,264	23,255	17,361	19,838	19,631	17,084	17,382	22,670	18,954	24,114	24,963	22,841
81	25,805	28,343	25,434	22,328	23,085	22,837	21,839	23,592	18,729	25,469	20,37	20,304	21,822	18,29	18,755	23,813	17,703	21,563	24,559	***
82	26,299	***	24,434	21,859	22,884	22,397	23,555	21,893	18,304	24,522	17,49	20,759	20,782	16,89	18,247	22,481	18,345	25,781	28,051	23,891
101	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	18,217	22,859	25,664	24,168
108	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
110	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
170	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
257	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. V Valori di CRT determinati nei prelievi di soggetti sani (SS) dopo assunzione di olio HIGH.

TAB. V	Valori di CRT (prelievo dopo assunzione dell'olio HIGH)																				
	Soggetti sani	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
61	28,966	***	26,993	22,124	24,839	***	24,152	26,234	22,801	27,273	22,39	22,49	23,048	22,301	19,647	26,462	21,673	26,878	***	30,465	
63	27,117	***	24,754	21,762	25,29	22,835	23,841	23,995	20,483	26,1	22,244	20,57	22,701	19,747	19,967	23,258	21,240	23,660	25,922	24,954	
65	27,774	***	23,905	20,697	23,804	24,713	25,038	24,337	18,773	24,107	18,815	19,772	20,901	20,767	17,121	24,209	17,992	24,746	24,685	24,459	
66	27,348	***	24,764	21,502	23,893	***	27,799	24,84	21,007	24,841	18,919	21,425	21,163	19,124	23,053	23,884	20,592	22,377	25,053	29,515	
67	25,811	36,379	23,664	20,468	23,517	29,366	28,516	23,517	19,564	24,597	17,95	19,826	20,679	19,528	24,376	***	***	***	***	***	
68	26,923	***	26,813	21,965	24,147	23,357	26,793	23,782	20,312	25,669	20,685	21,165	22,413	19,594	22,768	23,823	17,649	21,742	25,204	25,687	
69	26,111	35,092	24,349	21,789	22,598	21,884	22,503	24,478	19,719	25,598	17,835	21,076	21,082	17,83	19,246	23,371	19,581	24,643	27,622	24,362	
70	27,449	27,871	26,546	22,162	22,427	22,443	23,046	22,775	19,469	24,618	***	20,748	21,934	18,725	17,565	23,742	18,880	20,318	25,053	25,958	
71	26,108	27,806	24,316	21,253	21,567	21,76	20,968	23,529	19,262	23,521	18,771	20,17	20,334	17,596	17,862	23,357	19,524	22,820	25,921	***	
72	25,128	32,22	23,383	20,254	22,203	20,728	20,749	22,83	18,716	23,623	17,967	19,527	19,75	16,805	16,826	22,195	18,789	20,615	25,223	24,056	
78	26,38	25,487	24,988	20,904	21,835	28,895	20,539	23,002	18,664	24,558	18,67	20,609	20,908	17,743	17,745	22,929	17,744	23,209	23,980	***	
81	25,816	***	24,775	21,313	22,404	23,038	23,209	23,52	18,254	24,652	18,881	19,893	20,807	17,82	18,489	23,125	18,601	21,883	24,639	***	
82	25,735	***	23,732	21,16	22,65	22,773	25,794	21,511	17,834	23,604	17,857	20,793	19,721	16,636	20,152	21,873	17,571	24,001	25,757	22,734	
101	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	18,744	22,818	24,020	24,772
108	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
110	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
170	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
257	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. VI Valori di CRT determinati nei prelievi basali di pazienti con carcinoma mammario (CL/CH).

TAB. VI Pazienti con carcinoma	Valori di CRT (prelievo basale- T ₀)																			
	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
102	25,75	***	23,761	20,957	21,749	21,809	25,387	23,394	18,4	24,347	18,803	19,739	19,778	19,677	17,795	22,186	19,661	20,756	24,704	24,525
105	***	31,273	25,779	21,322	22,221	22,698	22,097	22,518	18,656	24,323	***	20,78	21,214	***	19,35	22,514	18,173	24,449	24,807	26,797
106	25,827	26,781	25,276	20,93	22,533	22,731	22,555	22,38	18,56	23,551	18,312	20,367	19,954	17,581	19,25	22,225	18,497	23,888	24,581	24,902
109	25,313	19,219	23,965	20,489	21,663	22,747	21,785	22,76	17,658	23,755	18,547	19,931	19,911	18,393	18,754	22,324	18,389	21,627	24,392	24,926
169	27,095	38,59	25,485	22,156	22,745	22	22,259	23,465	19,281	24,736	19,059	20,795	21,702	18,743	19,781	23,108	19,391	24,778	25,798	24,946
200	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
201	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
202	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
203	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
204	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
205	25,973	30,102	24,432	20,997	21,565	21,83	23,16	23,851	18,16	23,534	18,057	20,529	20,573	17,758	18,708	29,170	27,031	26,589	***	***
206	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
207	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
208	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
209	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
210	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
214	***	***	***	27,45	***	***	16,781	24,818	25,942	24,595	***	28,433	28,385	28,125	26,984	22,414	19,032	21,963	24,026	24,854

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. VII Valori di CRT determinati nei prelievi di pazienti con carcinoma mammario dopo assunzione di olio LOW (CL).

TAB. VII		Valori di CRT (prelievi dopo assunzione di olio LOW)																		
Pazienti con carcinoma	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
105	26,724	26,984	25,421	21,475	22,515	***	22,238	23,912	19,352	24,943	18,806	20,347	21,464	17,948	17,901	22,880	19,162	24,402	24,343	27,106
106	25,226	27,835	24,324	20,95	22,755	22,249	22,151	21,731	18,234	23,26	18,471	20,282	20,713	17,617	19,147	22,494	18,608	23,932	24,494	***
169	26,208	31,678	25,053	21,732	22,093	23,488	22,369	23,836	19,027	23,76	18,508	20,82	20,958	18,349	18,217	22,554	19,368	23,822	24,858	24,693
200	25,392	30,656	21,345	18,831	20,576	16,873	15,726	15,939	18,351	15,764	21,09	19,802	19,673	20,389	24,695	21,815	18,218	17,279	24,495	22,776
201	30,516	28,885	29,616	25,397	26,811	***	16,586	23,709	24,219	20,949	28,08	25,264	25,739	25,774	25,134	26,679	23,869	24,742	***	***
202	25,952	26,451	20,783	17,889	22,058	17,488	17,682	16,96	19,309	15,68	21,607	20,997	18,711	19,652	25,734	23,133	18,292	15,872	25,980	24,409
203	24,714	28,034	20,447	17,838	21,064	20,31	13,479	20,249	21,319	16,243	22,287	20,8	20,6	20,846	27,372	22,670	19,098	16,884	26,986	24,830
204	25,577	29,829	23,066	19,888	22,359	18,472	15,715	18,629	20,105	16,08	20,561	20,206	19,425	21,481	28,514	20,760	19,260	17,604	23,399	25,198

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

Tab. VIII Valori di CRT determinati nei prelievi di pazienti con carcinoma mammario dopo assunzione di olio HIGH (CH).

TAB. VIII		Valori di CRT (prelievi dopo assunzione di olio HIGH)																		
Pazienti con carcinoma	miR 18a	miR 206	miR 221	miR 222	miR 22	miR 181a	miR 1274a	miR 126	miR 16	miR 21	miR 25	miR 93	miR 106b	miR 15	miR 92a	let 7d	miR 106a	miR 125b	miR 128	miR 133a
102	***	***	***	25,18	***	22,438	25,927	27,577	22,748	28,926	24,965	20,596	25,018	24,257	25,189	***	24,774	25,191	28,295	29,464
109	24,723	35,503	24,283	20,349	21,997	22,418	21,657	22,828	18,769	23,836	17,495	19,825	19,629	18,051	18,514	22,047	18,794	20,554	24,394	25,435
205	26,097	37,841	24,976	20,762	21,726	23,892	21,692	23,586	18,902	24,888	18,432	20,302	20,724	17,512	19,331	22,456	18,575	17,794	25,123	24,157
206	25,352	27,187	23,251	19,457	21,528	19,748	15,693	17,898	18,983	15,441	21,38	21,56	19,938	20,446	26,403	22,437	22,987	22,027	***	***
207	29,966	***	29,037	24,507	26,079	20,578	21,806	23,647	24,572	20,63	29	25,593	26,57	26,762	27,799	26,756	27,378	26,291	***	***
208	***	***	28,675	26,83	28,94	21,79	17,958	26,893	26,681	24,26	***	29,734	28,508	28,423	26,585	***	18,857	15,826	25,034	24,439
209	24,626	31,89	20,554	17,56	21,385	18,567	15,64	18,726	19,943	13,355	21,156	21,144	17,999	20,771	26,628	21,848	19,414	22,343	25,058	24,727
210	22,964	26,682	21,214	16,123	19,806	15,602	15,804	14,607	15,806	14,052	18,18	16,73	16,493	18,435	21,016	18,561	14,774	17,143	21,499	21,768
214	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

***= mancata espressione del miR in quel determinato campione.

La figura 12 riproduce la raffigurazione grafica dei dati delle precedenti tabelle.

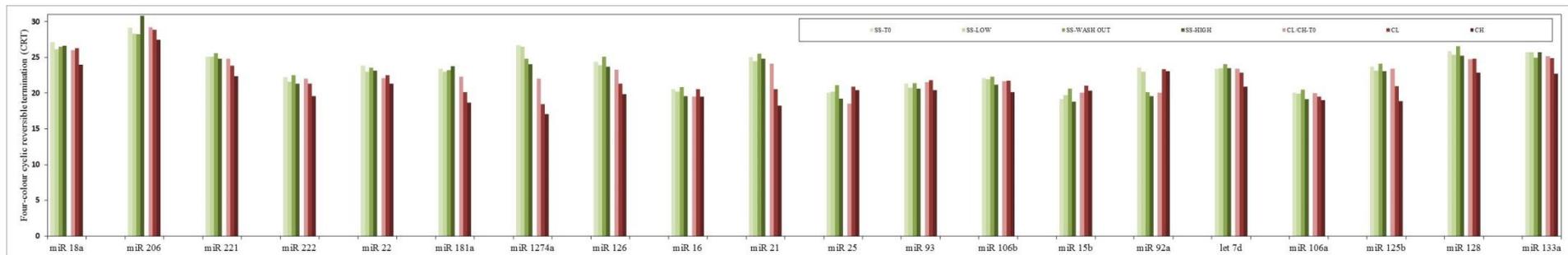


Fig.12 Istogramma complessivo sulla variazione di espressione dei 20 miRNA nei vari gruppi di soggetti studiati.

Al fine di ottenere una lettura comparativa e immediata dei dati, abbiamo normalizzato i valori di CRT ottenuti (fig.13). In particolare, nei soggetti sani (SS) la normalizzazione del dato “olio LOW” è effettuata contro T_0 e quella “olio HIGH” contro il valore di wash out. Nei pazienti affetti da carcinoma sia i dati di olio LOW che quello derivanti da olio HIGH sono stati normalizzati contro T_0 .

Pertanto, il valore 1 (vedi linea-soglia tratteggiata) corrisponde ad una non variazione fra il dato di riferimento e quello ottenuto dopo l'assunzione dei due oli; un valore maggiore di 1 indica che l'espressione di questi miRNA aumenta dopo l'assunzione ed un valore minore di 1 si riferisce ad una diminuzione.

Possiamo notare che due miRNA (miR 25 e miR 92a) superano il valore di 1 dopo assunzione degli oli nei pazienti. Mentre il valore più basso è quello relativo al miR 1274a.

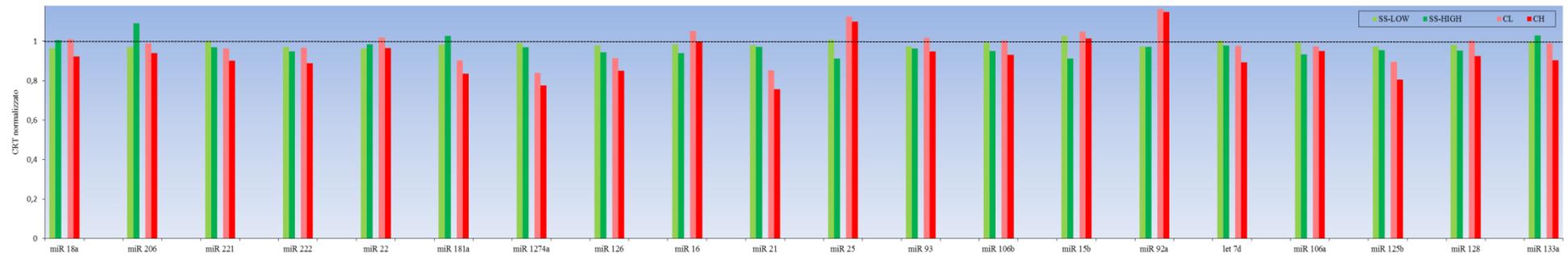


Fig.13 Istogramma comparativo sulla variazione di espressione dei 20 miRNA nei vari gruppi di soggetti studiati. La linea tratteggiata indica il valore 1.

4.2 Variazione di espressione di miRNA genericamente coinvolti nel cancro

L'importanza dei miRNA nel cancro, in generale, è evidenziata dalla constatazione che la metà di tutti i geni miRNA si trovano in regioni genomiche associate al cancro o a siti fragili, che sono spesso alterati in tumori (Savignani C et al., 2006; Calin GA et al., 2004).

Molti miRNA associati al cancro sono stati identificati negli ultimi dieci anni e la loro espressione, in relazione alla promozione o soppressione del cancro, ha generato una classificazione generica in miRNA onco-promotori e miRNA soppressori tumorali (Esquela-Kerscher A and Slack FJ 2006; Hwang HW and Mendell JT 2006; Calin GA and Croce CM 2006; Volinia S et al., 2006).

I primi miRNA ad essere stati identificati come correlati al cancro sono miR 15 e miR 16, dal momento che la loro down-regolazione è riportata in molti tipi di tumori umani (Sanchez-Beato M et al., 2003). Poiché questi due miRNA rispetto a tutti gli altri sono stati ritrovati come informativi anche in vari tipi di tumori, diversi dal carcinoma mammario, misurare la loro variazione in questo studio può dare indicazioni di relazione fra l'assunzione dell'alimento funzionale e variazione di miRNA genericamente implicati nella cancerogenesi. Nella prima parte di questo studio si è valutata, dunque, l'espressione di miR 15 e miR 16, per osservare la variazione della loro espressione in un gruppo di soggetti sani a cui sono stati somministrati i due oli (LOW e HIGH) e come potesse parallelamente variare in un gruppo di donne affette da carcinoma mammario soggette alla stessa somministrazione.

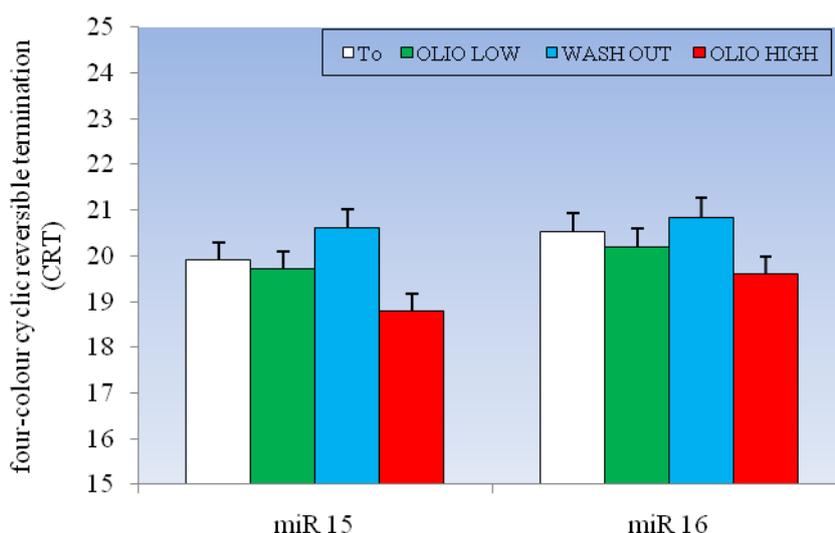


Fig.14: Variazione di espressione di miR 15 e miR 16 nel gruppo SS.

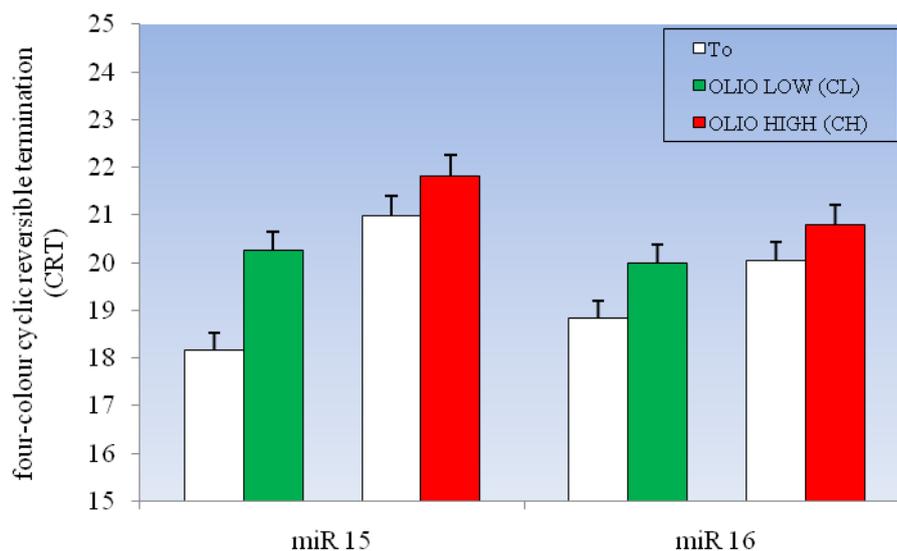


Fig.15: Variazione di espressione di miR 15 e miR 16 nel gruppo CL/CH.

Nella figura 14 relativa al gruppo di controllo, si può notare come l'espressione dei due miRNA diminuisca dopo l'assunzione dei due oli. E' da rilevare che il valore associato alla fase di wash out è il più alto della distribuzione.

Nella figura 15 invece si evince un piccolo aumento dell'espressione dei due miRNA sia nel gruppo CL che in quello CH: tale modesto aumento sembra essere in relazione al contenuto in polifenoli dell'olio assunto. Inoltre, comparando gli andamenti di questi 2 miRNA fra i gruppi SS e CL/CH, si può notare come siano opposti. Sembrerebbe quindi che ad una maggiore assunzione di polifenoli corrisponda un profilo di espressione dei 2 miRNA diverso in soggetti sani rispetto a pazienti oncologici. In particolare, un maggiore contenuto in polifenoli corrisponderebbe ad una diminuzione dell'espressione dei due miRNA in soggetti sani ma sarebbe anche associato ad un aumento nei pazienti oncologici.

La relazione generale fra miR 15 / miR 16 e cancro è anche dovuta al fatto che essi sono parzialmente complementari all'mRNA di BCL2, il che suggerisce che questi 2 miRNA reprimono post-trascrizionalmente questa oncoproteina (Cimmino A et al., 2005) svolgendo un ruolo importante anche nella regolazione dell'apoptosi: sono infatti entrambi classificabili come miRNA onco-soppressori. In molti studi è stato inoltre riscontrato che riattivando l'espressione di miR 15 e 16 nelle cellule cancerose, si ri-innesca l'apoptosi e si riduce il processo tumorale (Aqeilan RI et al., 2010; Cimmino A et al., 2005).

In base a quanto è riportato dalla letteratura, possiamo ipotizzare che l'assunzione di questo olio, alzando i livelli di questi due miRNA, possa avere degli effetti benefico-salutistici nei pazienti oncologici. Non siamo però in grado di comprendere il significato della diminuzione di questi stessi miRNA in soggetti sani che hanno assunto questi stessi oli.

Infine è da considerare che le variazioni di espressione qui ottenute non soddisfano la soglia di significatività statistica prevista.

4.3 Variazione di espressione di miRNA associati a tumori solidi

L'espressione di miR 21, di miR 92a e di miR 1274a è stata vista come aumentata in una vasta gamma di tumori solidi e la loro presenza è sempre correlata con la progressione e l'aggressività del tumore (Lu Z et al., 2008; Tsuchida A et al., 2011; Wang GJ et al., 2015).

MiR 128, invece, inibisce la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasività dei tumori solidi (Zhou XU et al., 2015).

Dunque, in questa ulteriore parte di studio, si è valutata l'espressione di miR 21, miR128, miR 92a e miR 1274a nel gruppo di soggetti SS e CL/CH al fine di valutare una correlazione, di ordine meno generico del precedente, in termini di variazione di espressione di miRNA, associati a tumori solidi, prima e dopo l'assunzione di oli.

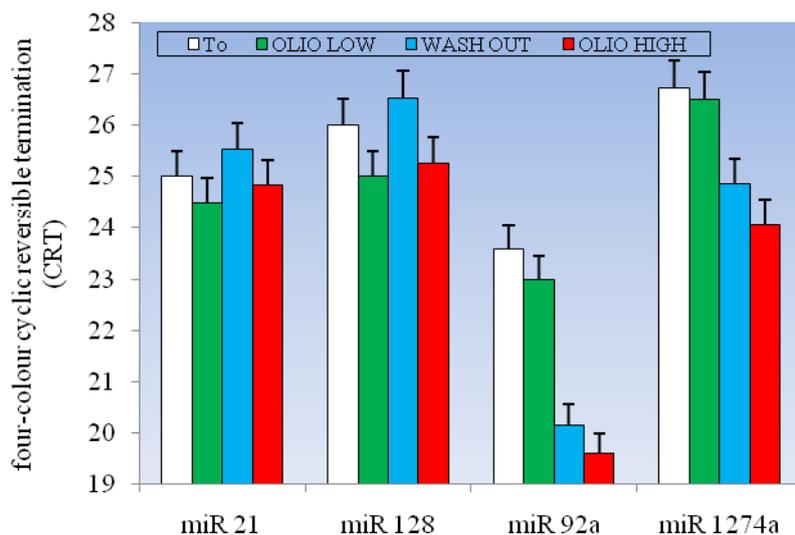


Fig.16: Variazione di espressione di miR 21, miR 128, miR 92a e miR 1274a nel gruppo SS.

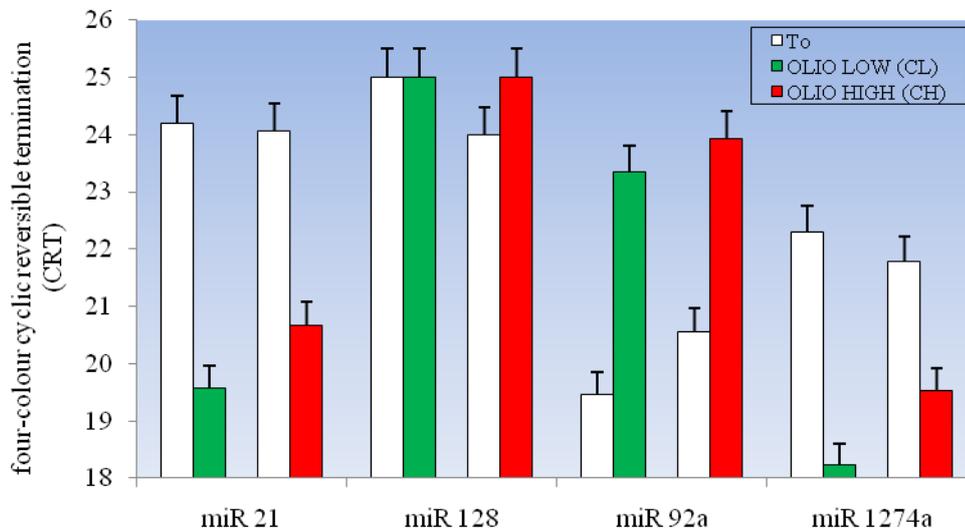


Fig.17: Variazione di espressione di miR 21, miR 128, miR 92a e miR 1274a nel gruppo CL/CH.

Nella figura 16 relativa al gruppo di controllo, si può notare una sostanziale non variazione del miR 21 e del miR 128 ma anche una più marcata diminuzione del miR 1274a ed ancor più evidente diminuzione del miR 92a.

La figura 17 evidenzia, nei soggetti CL e CH, una diminuzione dell'espressione del miR 21 e del miR 1274a, non mostra alcuna sostanziale variazione dell'espressione del miR 128 e rivela un aumento dell'espressione del miR 92a.

Recenti e svariati studi hanno identificato miR 21 come l'unico miRNA overespresso in nove tipi di tumori solidi (Diederichs S and Haber DA 2006; Roldo C et al., 2006; Volinia S et al., 2006; Chan JA et al., 2005; Iorio et al., 2005). Inoltre, l'aumentata espressione del miR 21 si riscontra in diversi processi che coinvolgono il processo di carcinogenesi tissutale (Si ML et al., 2007; Roldo C et al., 2006; Chan JA et al., 2005). Fra i geni target del miR 21, oggetto di intensi studi, è stato identificato il gene *PTEN* (Meng F et al., 2007; Meng F et al., 2006), un gene oncosoppressore che codifica per la fosfatasi del ciclo cellulare che inibisce la via di segnalazione di Akt (Li L and Ross AH 2007): una inibizione di questa fosfatasi, si inserisce nella deregolazione del ciclo cellulare prodromica alla trasformazione neoplastica. Inoltre, un altro gene oncosoppressore, down-regolato dal miR 21, è il *PDCD4* (programmed cell death

4), la cui proteina si oppone alla progressione tumorale (Asangani IA et al., 2008; Jansen AP et al., 2005).

MiR 128, invece, ha come target il gene *PFK* nel fegato e nel polmone. La sua proteina è la fosfofruttochinasi 1, enzima chiave della glicolisi, appartenente alla classe delle transferasi che catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato in fruttosio-1,6-bifosfato (Wegener G and Krause U 2002).

La sovra-espressione del miRNA 128, inibendo *PFK*, porta alla diminuzione dell'assorbimento del glucosio e della produzione di lattato mentre porta ad un aumento del contenuto di ATP cellulare mediando il passaggio dalla glicolisi alla fosforilazione ossidativa nelle cellule tumorali (Yang J et al., 2016). Questi studi suggeriscono che miR 128 svolge un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo del glucosio nelle cellule cancerose, nella crescita e proliferazione cellulare. È stato, di contro, dimostrato che la down regolazione di questo stesso miRNA è associato globalmente una scarsa sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma (Yang J et al., 2016). I molteplici effetti di questo miRNA sulle cellule tumorali dimostrano che miR 128 potrebbe essere un potente bersaglio per la terapia anti-cancro.

MiR 92a è uno dei 7 miRNA maturi (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, e miR-92a) codificati dal cluster miR 17-92 (Mendell JT, 2008). Tsuchida e il suo gruppo (2011) hanno riportato che miR 92a è up regolato in diversi adenomi e carcinomi ed ha come target, nel carcinoma del colon-retto, il gene *BCL-2*, che codifica per una proteina anti-apoptotica indicando così un ruolo fondamentale di tale miRNA nello sviluppo e progressione tumorale.

MiR 1274a risulta up regolato nel carcinoma gastrico, anche se ad oggi il suo ruolo rimane poco chiaro; come suo gene target è stato recentemente identificato *FOXO4*, la cui espressione proteica risulta significativamente inibita. Inoltre l'over-espressione di questo miRNA attiva il pathway PI3K/Akt e porta all'up-regolazione dell'espressione della ciclina D1, di MMP-2 e di MMP-9 (Wang GJ et al., 2015).

Essendo questi miRNA a diverso comportamento nei confronti della promozione del cancro, onco-promotori e onco-soppressori ci si aspetta, per essi, un comportamento diverso nei soggetti studiati. Osservando le figure 16 e 17 è evidente che questa coerenza è presente più nei gruppi CL/CH che non nel gruppo SS. Razionalmente, infatti, pazienti oncologici che hanno assunto oli arricchiti in polifenoli mostrano livelli espressivi minori del miRNA oncogenico 21 e del miRNA 1274a anche se questa riduzione di espressione non è coerente con la quantità di polifenoli aggiunti essendo questa diminuzione più contenuta in quei pazienti che hanno assunto olio a più ricco contenuto polifenolico.

Sembra invece poco informativo il miRNA 128 la cui espressione non varia nei gruppi CL/CH ed invece diminuisce nei soggetti SS dopo assunzione di oli.

La variazione del miR 92a, infine, non sembra sempre coerente con il suo ruolo di onco-promotore. Mentre, infatti, la sua espressione diminuisce visibilmente nel gruppo SS, aumenta invece nei gruppi CL e CH dopo assunzione dei due diversi tipi di olio.

Le variazioni di espressione qui ottenute non soddisfano la soglia di significatività statistica che abbiamo considerato.

4.4 Variazione di espressione di miRNA specifici per il carcinoma mammario

Secondo l'Associazione Italiana di Oncologia Medica, dopo i carcinomi cutanei, il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nelle donne sia nella fascia d'età 0-49 anni (41%), sia nella classe d'età 50-69 anni (35%), sia in quella più anziana ≥ 70 anni (21%) (www.aiom.it).

La malattia presenta un'ampia variabilità geografica, con tassi più alti, fino a 10 volte, nei paesi economicamente più avanzati. Dalla fine degli anni novanta si osserva una moderata, ma continua, tendenza alla diminuzione della mortalità per carcinoma mammario (-1,4%/anno), attribuibile ad una maggiore diffusione dei programmi di diagnosi precoce e quindi all'anticipazione diagnostica oltre che per i progressi terapeutici (Valachis A et al., 2010).

Diverse famiglie di miRNA sembrano avere una influenza positiva o negativa sullo sviluppo e progressione del carcinoma mammario (Usmani A et al., 2016; van Schooneveld E et al., 2015; Iorio MV et al., 2005) lasciando intendere che una riduzione o eliminazione di un miRNA soppressore del tumore o un'amplificazione o up-regulation di un miRNA oncogenico possa giocare un ruolo nell'esordio e progressione di questo carcinoma.

Una delle più antiche e altamente conservate famiglie di miRNA è la famiglia let 7 composta da miRNA onco-soppressori, regolatori dello sviluppo e del differenziamento di cellule staminali (Thornton JE et al., 2012). La famiglia di miRNA let 7 è altamente conservata in tutto il phyla animalia, e, per questo, è indicata come una famiglia "miRNA-fondatrice" con ruoli nello sviluppo, già accertati in *Caenorhabditis elegans* (Reinhart BJ et al., 2000). Nella specie umana, la famiglia let 7 comprende 12 membri (Pasquinelli AE et al., 2000; Johnson SM et al., 2005) ed otto di questi sono coinvolti nel carcinoma mammario: let 7c, let 7a, let 7f, let 7d, let 7e, let 7i, let 7g e let 7b (Oztemur Y et al., 2015). La maggior parte dei geni bersaglio di questi miRNA sono coinvolti nel ciclo cellulare, nell'apoptosi e nelle vie di segnalazione e comprendono *MAPK*, *p53*, *ERBB*, *WNT*, *JAK-STAT* e *TGF-beta*. In particolare, let 7d induce l'inibizione di Akt1 contribuendo alla repressione tumorale (Sun H

et al., 2016). La letteratura recente, infatti, riporta let 7d come potenziale marker prognostico validato in 2 datasets indipendenti di carcinoma mammario (Lee E et al., 2016).

La famiglia miR 125 raggruppa sia miRNA onco promotori che onco soppressori (Yin H et al., 2015; Banzhaf-Strathmann J and Edbauer D 2014).

In particolare, miR 125b è generato da due geni, miR 125b-1 (sul cromosoma 11 in posizione q24) e miR 125b-2 (sul cromosoma 21 in posizione q21). È stato dimostrato che entrambi i loci sono associati a siti fragili comunemente deleti nel carcinoma mammario (Calin GA et al., 2004).

Due target di miR 125b sono *ERBB 2* e *3*, notoriamente implicati nel carcinoma mammario: l'attivazione di *ERBB2/3*, dovuta alla down regolazione di miR 125b, induce la proliferazione cellulare inibendo la morte cellulare programmata (Scott GK et al., 2007).

Nel carcinoma mammario miR 25 inibisce ULK1 (UNC-51-like kinase1) che risulta avere un ruolo chiave nella regolazione del processo di autofagia cellulare (Wang Z et al., 2014).

Per questi motivi, in questa sezione dello studio, abbiamo valutato l'espressione di questi tre specifici miRNA: let 7d, miR 125b e miR 25 nei gruppi SS e CL/CH.

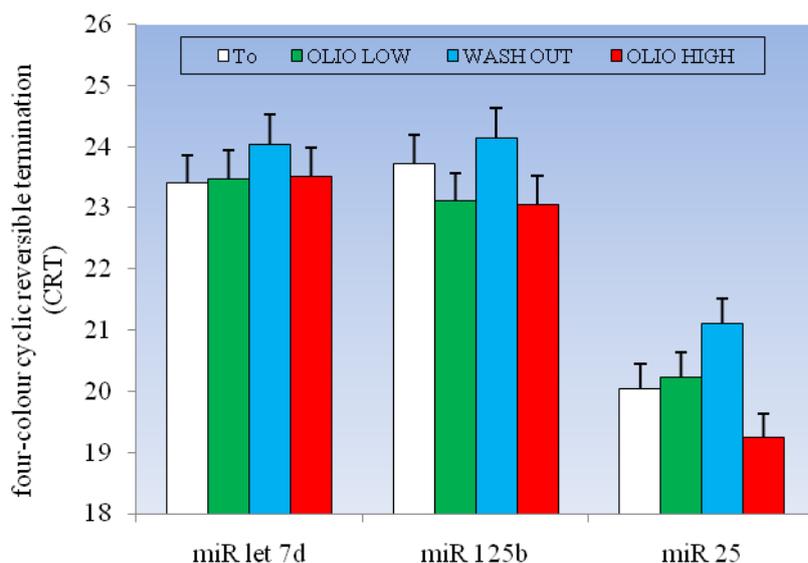


Fig.18: Variazione di espressione di miR let 7d, miR 125b e miR 25 nel gruppo SS.

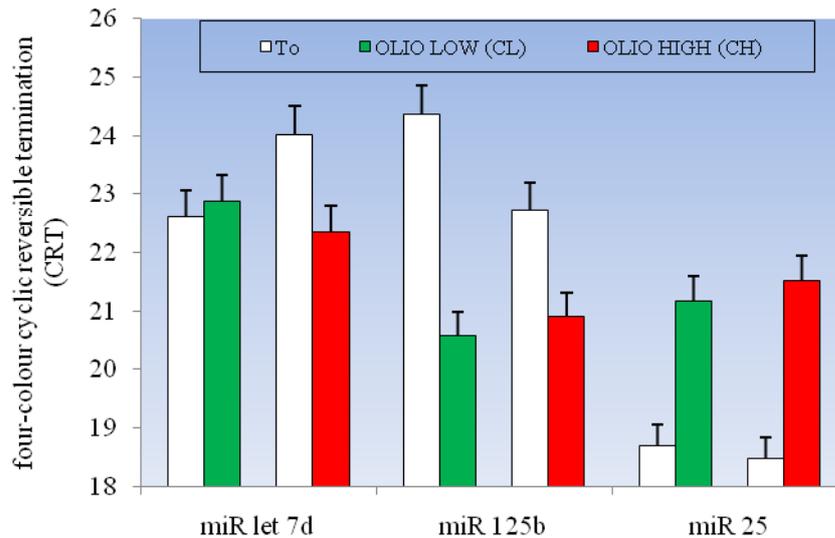


Fig.19: Variazione di espressione di miR let 7d, miR 125b e miR 25 nel gruppo CL/CH.

Nella figura 18 relativa al gruppo di controllo, si può notare come l'espressione di miR 125b diminuisca lievemente dopo l'assunzione sia dell'olio LOW che dell'olio HIGH; nessuna altra variazione di rilievo può essere notata.

Ancora una volta il dato di wash out dei soggetti di controllo rappresenta il dato modale della distribuzione.

Nella figura 19 relativa ai gruppi CL/CH, si evince un lieve aumento dell'espressione di let 7d dopo assunzione di olio LOW ma, stranamente, anche una sua apprezzabile diminuzione dopo assunzione di olio HIGH. L'espressione del miR 125b diminuisce apprezzabilmente sia nei soggetti che hanno assunto olio LOW sia in quelli che hanno assunto olio HIGH. Infine, è possibile notare che l'espressione di miR 25 aumenta dopo assunzione di entrambi gli oli.

Ricordando che let 7d è un miRNA onco-soppressore, è facile associare, nei soggetti di controllo, una sua variazione minima in funzione dell'assunzione degli oli. Risulta però assai difficile discutere il dato relativo alla diminuzione dell'espressione di questo miRNA nei pazienti che hanno assunto l'olio HIGH.

Razionalmente poco coerente sembra, inoltre, la variazione di espressione del miRNA onco-soppressore 125b nei gruppi CL/CH. Infatti, questo miRNA, specificatamente down-regolato nel carcinoma mammario, subisce nei pazienti qui studiati un'accentuata caduta di espressione dopo assunzione dei due tipi di oli. Sembrerebbe quindi che l'assunzione di polifenoli, indipendentemente dalla loro concentrazione, sia correlata, nei pazienti, alla forte

diminuzione di questo miRNA, indicando che il miR 125b non possa essere considerato un potenziale indicatore dell'effetto benefico-salutistico degli oli addizionati di polifenoli nei pazienti. Ulteriori studi sono, a questo punto, necessari per accertare che la diminuzione di questo miRNA, indotta dall'assunzione degli oli addizionati, sia accompagnata anche dalla corrispondente variazione di espressione dei geni target, con particolare riferimento ai geni *ERBB 2* e *3*.

Per gli stessi motivi risulta di difficile interpretazione il dato che indica l'aumento di espressione di miR 25 nei gruppi CL/CH. Infatti, essendo questo miRNA un onco promotore, non sembra coerente questo comportamento dopo assunzione dei due oli,

Tutte queste variazioni di espressione di miRNA, comunque, non soddisfano la soglia di significatività statistica prevista.

4.5 Variazione di espressione di miRNA caratteristici del carcinoma mammario triplo negativo

Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è una malattia eterogenea definita dalla mancanza d'espressione del recettore degli estrogeni (ER), del recettore del progesterone (PGR) e del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER-2).

Il TNBC rappresenta il 15-20% di tutti i tumori al seno, ed è sovra-rappresentato tra quelli con malattia metastatica (Griffiths CL and Olin JL 2012; El Sawaf Z et al., 2013).

Il TNBC presenta un fenotipo aggressivo con una prognosi infausta (Salami S et al., 2011; Steponaviciene L et al., 2011) e rimane una malattia difficile da trattare, con opzioni terapeutiche limitate (Griffiths CL and Olin JL 2012; Crown J et al., 2012). Ha quindi un senso studiare, come ultimo stadio di specificità crescente, miRNA coinvolti nella formazione di metastasi, nella resistenza farmacologica e nella crescita cellulare nel carcinoma triplo negativo: tra questi ci sono miR 221 e miR 222.

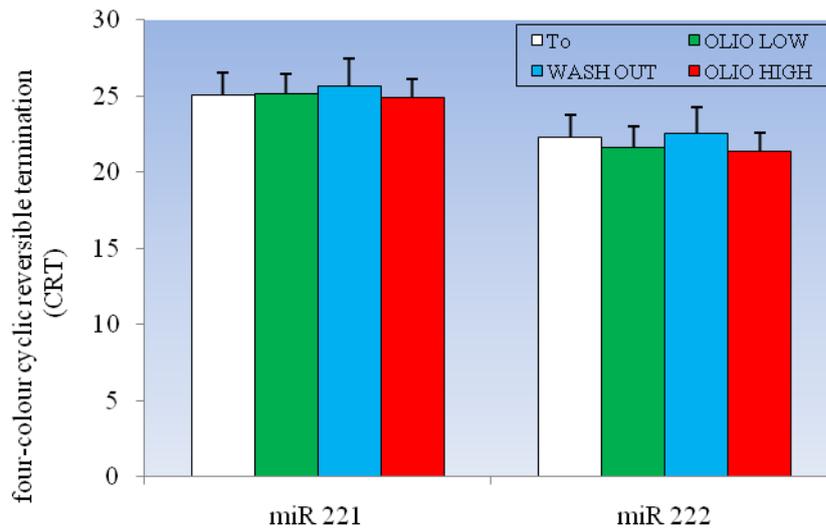


Fig.20: Variazione di espressione di miR 221 e miR 222 nel gruppo SS.

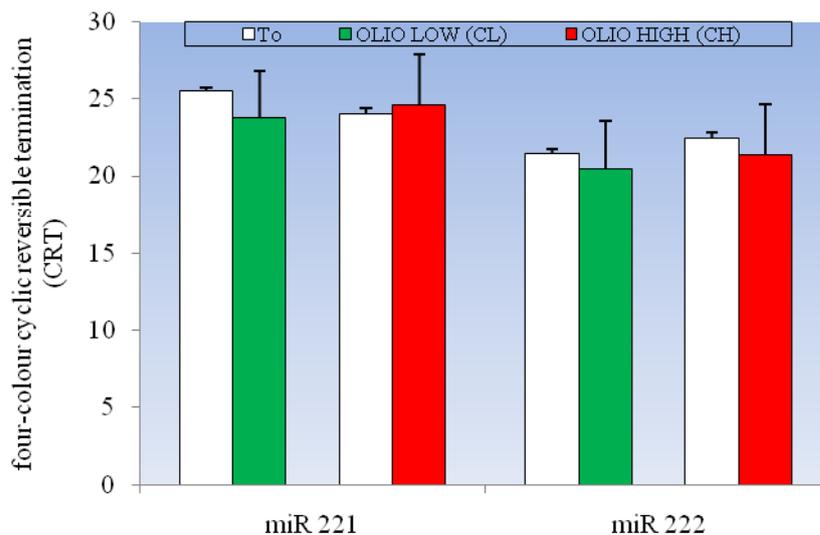


Fig.21: Variazione di espressione di miR 221 e miR 222 nel gruppo CL/CH.

Nella figura 20 relativa al gruppo di controllo, si può notare come l'espressione dei due miRNA non vari significativamente dopo l'assunzione di due tipi di olio.

Nella figura 21, relativa ai gruppi CL e CH, si evince invece una diminuzione dell'espressione del miR 222 sia nei soggetti che hanno assunto olio LOW sia in quelli che hanno assunto olio HIGH mentre l'espressione del miR 221 aumenta leggermente dopo assunzione dell'olio HIGH e diminuisce dopo assunzione di olio LOW. Tutte queste variazioni, comunque, non soddisfano la soglia di significatività statistica stabilita.

Il cluster dei miR 221/222 fa parte della grande famiglia dei miR 200. Un'elevata espressione del miR 221 e miR 222 è stata collegata con la proliferazione (Sage C et al., 2007), l'apoptosi (Garofalo M et al., 2008), e la migrazione metastatica (Garofalo M et al., 2009) di diverse linee cellulari di cancro. E' stato recentemente anche riportato che l'oncogene *MET*, che codifica per il recettore di fattori di crescita negli epatociti, attraverso l'attivazione trascrizionale di c-Jun, aumenta l'espressione dei miR 221 e 222; questi, a loro volta, regolando *PTEN* e *TIMP3*, aumentano la tumorigenicità delle cellule.

Il cluster dei miRNA 221/222 è sovraespresso nei TNBC ed è stato riportato essere cruciale nell'inizio e nella progressione tumorale di questo carcinoma mammario (Stinson S et al., 2011); è associato alla down regolazione del recettore per gli estrogeni (ER- α) e alla resistenza al tamoxifene (Shah MY and Calin GA 2011; Garofalo M et al., 2009; Miller TE et al., 2008; Sage C et al., 2007; Galardi S et al., 2007). Tutte queste condizioni lo rende un potenziale bersaglio terapeutico.

In un recente studio hanno dimostrato che questi miRNA sembrano agire anche a valle del pathway RAS- RAF- MEK (Stinson et al., 2011), mediano la formazione di metastasi favorendo combinazioni di espressioni geniche conferenti un maggior potere di invasione e migrazione cellulare. Il target sembra essere il gene codificante la proteina tricho-rhinophalangeal syndrome type 1 (*TRPS1*). Questi 2 miRNA, reprimendo *TRPS1* determinano un aumento di zinc finger E-box-binding homeobox 2 (*ZEB2*) (fig.22) incentivando la capacità metastatica delle cellule (Stinson et al., 2011).

Questo sottolinea che questi 2 miRNA specifici possono far assumere ad una cellula trasformata fenotipi tumorali fra i più aggressivi e contribuire alla prognosi infausta del soggetto affetto da neoplasia.

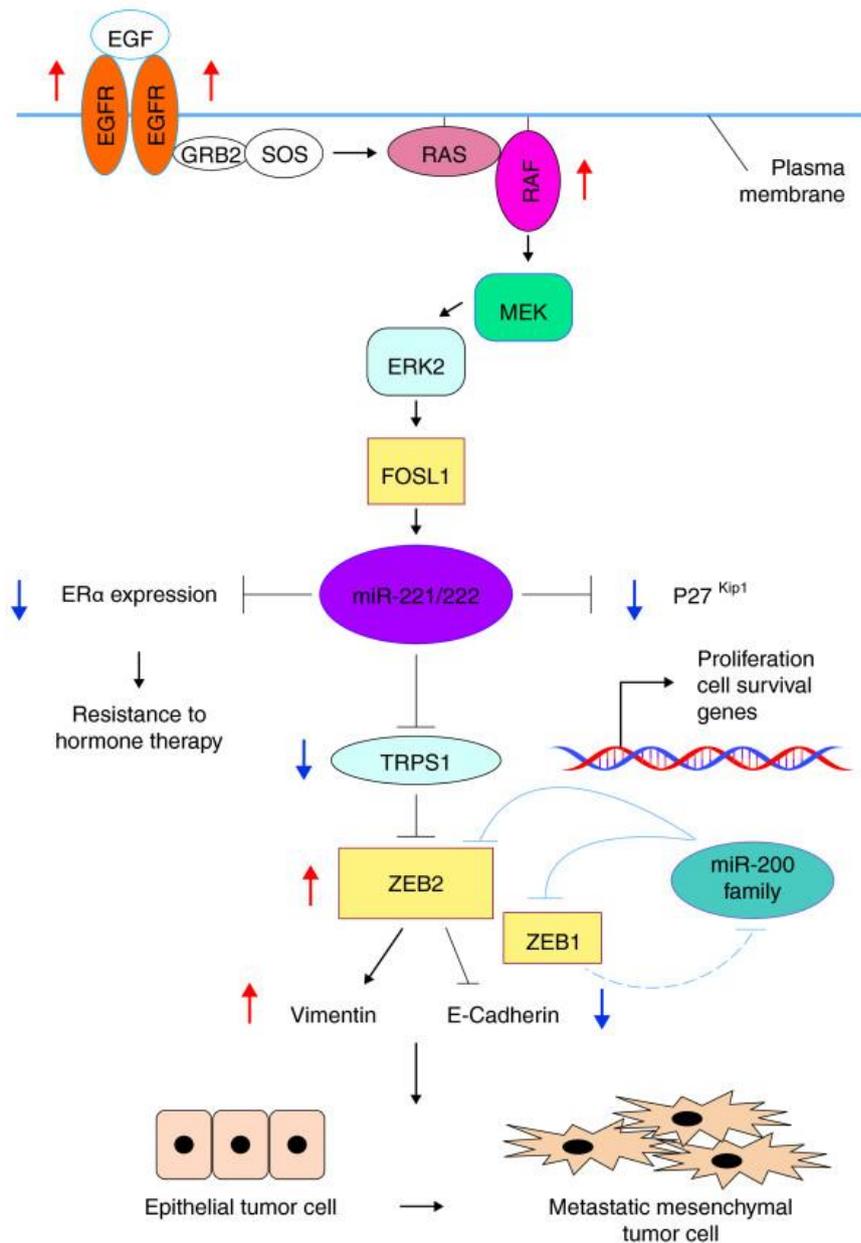


Fig.22: Coinvolgimento di miR 221/222 nella via EGFR- RAS-RAF- MEK nella progressione della trasformazione metastatica nei tumori del cancro a seno (Shah MY and Calin GA, 2011).

Correlando queste capacità ai dati sperimentali qui presentati può essere affermato che la componente bioattiva degli oli non è in grado di variare l'espressione di questi miRNA. Infatti, il fenomeno della metastatizzazione è un processo che deriva da una elevato grado di malignità della cellula cancerosa che, evidentemente, non può essere efficacemente contrastato da interventi alimentari di questo tipo.

5. CONCLUSIONI

Una nuova frontiera nella comprensione dei meccanismi tumorigenici è stata offerta dalla scoperta dei miRNA che ad oggi si ritiene possano avere un ruolo primario nello sviluppo di varie patologie e cancro in particolare. E' possibile trovare miRNA che possono agire da onco-promotori ed altri che possono fungere da onco-soppressori. I primi sono in grado di regolare gruppi di attività geniche con il risultato finale di promuovere l'oncogenesi; i secondi regolano diversi gruppi di geni al fine di opporsi alla trasformazione neoplastica della cellula (Palmero EI et al., 2011).

Sebbene sia recentissimamente oggetto di dibattito (O' Brien KP et al., 2017), la rivelazione delle variazioni di espressione di miRNA circolanti nel sangue intero, quindi risultanti dalla produzione e secrezione di varie cellule a differenti distretti, rimane attualmente la modalità più utilizzata e più facile da studiare. Inoltre, valutare i miRNA circolanti può essere una soluzione accettabile quando è necessario confrontare dati epigenetici provenienti da tessuti diversi di diverse categorie di soggetti; l'esempio più calzante è riferibile proprio allo studio qui presentato dove è richiesto di analizzare variazioni di miRNA in tessuti mammari tumorali che non potevano avere come controparte comparativa analoghi tessuti di soggetti sani. Alcuni dei miRNA da noi valutati in questo studio sono stati, infatti, recentemente indicati dalla letteratura come "indicativi di cancro alla mammella" sebbene analizzati come circolanti, cioè isolati da sangue intero (Hannafon BN et al., 2016).

Recentemente si sta sempre più confermando l'evidenza che cambiamenti epigenetici, alterazioni molecolari e componenti bioattivi della dieta possono genericamente modificare l'espressione genica attraverso la modulazione di specifici miRNA (Gavrilas LI et al., 2016).

Con lo scopo di evidenziare i miRNA che sono up- o down-regolati in pazienti con carcinoma mammario dopo che hanno assunto nella loro dieta due oli con un contenuto diverso di polifenoli, in confronto a soggetti sani che hanno assunto i medesimi oli, abbiamo analizzato l'espressione di un totale di 20 miRNA ed abbiamo operato confronti statistici sulle variazioni di espressione prima e dopo gli interventi alimentari di un loro sottoinsieme opportuno. In particolare, abbiamo scelto 8 miRNA suddivisi in 4 coppie a crescente coinvolgimento nel carcinoma mammario, dalla coppia genericamente coinvolta nel processo canceroso fino alla coppia di miRNA legati alla malignità e invasività maggiore.

Abbiamo utilizzato tecnologie avanzate, come il sequenziamento dell'RNA e l'Open array con chimica Taqman. Queste tecniche si stanno sempre di più affermando nella ricerca sul cancro con l'obiettivo di creare modelli di previsione per la diagnosi, prognosi e terapia, per identificare e caratterizzare circuiti di trasduzione del segnale e per identificare nuovi target molecolari per lo sviluppo di terapie mirate.

Ad una prima osservazione complessiva dei dati qui presentati, risalta subito che molte comparazioni hanno dato variazioni apprezzabili ma che nessuna sia risultata statisticamente significativa cioè soddisfacente la soglia di $p < 5\%$. Ricordiamo che queste variazioni sono state ottenute analizzando miRNA circolanti in sangue intero di soggetti che hanno assunto oli a diverso contenuto polifenolico durante un tempo stabilito. La sfida, obiettivo primo del progetto DIMESA, di cui questo studio è un sotto insieme, sarebbe stata quella di ottenere dei dati *in vivo* che potessero dare informazioni per l'identificazione di un *subset* di miRNA la cui espressione e/o funzione risulti significativamente modificata dall'intervento alimentare. E' nostra opinione, guardando all'evidenza dei dati, che le variazioni *in vivo* di miRNA circolanti non sono così facilmente ottenibili come fenomeni a sé stanti, così come si potrebbero ottenere *in vitro*, dove le influenze da altri fattori di disturbo e confusione sono assenti o classificabili. Forse, analizzando differenze *in vivo* è sufficiente ottenere variazioni numericamente apprezzabili anche se non significative, in quanto occorre fare la considerazione che si sta valutando il fenomeno come “uno fra tanti” e non come isolato determinato direttamente dal tessuto o dalla cellula sintetizzante *in vitro* in condizioni controllate e note. D'altro canto anche in letteratura sono noti casi di variazioni non significative di espressioni di miRNA in differenti soggetti affetti da carcinoma mammario (Zeng H et al., 2014).

Se può essere considerata accettabile questa lettura critica dei dati, possiamo proporre che le variazioni dei miRNA da noi riportate siano ugualmente valide come pista di lavoro per successivi studi di associazione. Ricordiamo infatti che questo studio rappresenta il primo tentativo di comparare variazioni di miRNA *in vivo* dopo assunzione di oli bioattivi da parte di soggetti sani e affetti da carcinoma mammario. Su questa base, è da segnalare l'aumento di espressione dei miRNA onco-soppressori miR 15 e miR 16 nei pazienti oncologici (figura 15) che, seppur di modesta entità, sembra essere in relazione al contenuto in polifenoli dell'olio assunto lasciando supporre che questo regime di dieta possa avere degli effetti benefico-salutistici nei pazienti. Inoltre, anche i miR onco-promotori 21 e 1274a mostravano una variazione razionalmente coerente presentando livelli espressivi minori nei pazienti (figura 17) che avevano assunto oli arricchiti in polifenoli.

E' infine anche da segnalare il fatto che le variazioni di espressione riscontrate nei soggetti sani durante il periodo di “wash out” si sono spesso rivelate come dato modale delle distribuzioni. Poiché questi valori venivano ritrovati genericamente aumentati sia in riferimento a miRNA onco-promotori che onco-soppressori, si potrebbe concludere che questo aumento non dipende dall'assunzione di oli.

Non accettando, invece, la premessa di validità dei dati prima formulata, si potrebbe soltanto concludere che l'assunzione di questi oli non è in grado di variare *in vivo* significativamente l'espressione di specifici miRNA e quindi che la strategia di fornire alimenti bioattivi e funzionali come adiuvanti in soggetti affetti da carcinoma mammario non sembri efficace, almeno per le variazioni di miRNA circolanti opportunamente qui scelti.

I dati da noi ottenuti e qui presentati sono unicamente un tentativo di descrivere variazioni di fenomeni nell'ambito delle scienze di base che mira a valutare modifiche epigenetiche non riconducibili in maniera diretta al miglioramento o allo stato stazionario dello stato di salute di pazienti né ai loro fenotipi patologici in quanto non sono correlati a parametri funzionali clinici o patogenetici. Forniscono, però, delle buone piste di lavoro per studi futuri in cui si potranno estendere le comparazioni ad altri miRNA ed ad un numero di soggetti maggiore per poter ottenere variazioni statisticamente significative. Questo potrebbe consentire molteplici strategie per l'uso di questi oli in campo terapeutico o nutraceutico.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM.
miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives.
Cell Death Differ. 2010 Feb;17(2):215-20
- Aragón F, Perdigón G, de Moreno de LeBlanc A.
Modification in the diet can induce beneficial effects against breast cancer.
World J Clin Oncol. 2014 Aug 10;5(3):455-64.
- Arts IC, Hollman PC.
Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.
Am. J. Clin. Nutr. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-325S.
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S et al.
MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4
and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer.
Oncogene. 2008 Apr 3;27(15):2128-36.
- Banzhaf-Strathmann Julia and Edbauer Dieter
Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer.
Cell Commun Signal. 2014;12:30.
- Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM.
Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes.
Biochim Biophys Acta. 2015 Jun 10;1856(1):73-85.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J, Bertoni GP.
Il mondo della cellula
PEARSON, Benjamin Cummings: 2013
- Brown KA, Simpson ER.
Estrogens, obesity, inflammation, and breast cancer-what is the link?
Semin Reprod Med. 2015 May;33(3):208-12.
- Calin GA and Croce CM.

- MicroRNA signatures in human cancers.
Nat Rev Cancer. 2006 Nov;6(11):857-66.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.
Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
 - Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS.
MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.
Cancer Res 65: 6029–6033. 2005.
 - Chang W. L., Chapkin R. S., Lupton J. R.
Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation.
J. Nutr. 1998 Mar;128(3):491-7.
 - Chen Q, Hu H, Jiao D, Yan J, Xu W, Tang X, Chen J, Wang J
miR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: The underlying molecular mechanisms.
Oncol Rep. 2016 Aug;36(2):909-17.
 - Choudhuri S.
From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research.
Toxicol Mech Methods. 2011 May; 21(4):252-74.
 - Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M et al.
miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.
Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.
 - Crown J, O'Shaughnessy J, Gullo G.
Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer.

- Damavandi Z, Torkashvand S, Vasei M, Soltani BM, Tavallaei M, Mowla SJ. Aberrant Expression of Breast Development-Related MicroRNAs, miR-22, miR-132, and miR-212, in Breast Tumor Tissues. *J Breast Cancer*. 2016 Jun;19(2):148-55.
- Davidson L. A., Wang N., Ivanov I., Goldsby J., Lupton J. R., Chapkin R. S. Identification of actively translated mRNA transcripts in a rat model of early-stage colon carcinogenesis. *Cancer Prev. Res.* 2009a; Nov;2(11):984-94.
- Davidson L. A., Wang N., Shah M. S., Lupton J. R., Ivanov I., Chapkin R. S. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*. 2009b; Dec;30(12):2077-84.
- Davis C. D., Ross S. A. Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr.* 2008 Aug;66(8):477-82.
- Diederichs S, Haber DA. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. *Cancer Res* 2006; 66: 6097–6104.
- Di Leva Gianpiero, Croce Carlo M. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Feb; 23(1): 3–11.
- Dimri M., Bommi P. V., Sahasrabudhe A. A., Khandekar J. D., Dimri G. P. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010 Mar;31(3):489-95.

- Elsawaf Z, Sinn HP, Rom J, Bermejo JL, Schneeweiss A, Aulmann S.
Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour.
Breast 2013;22:986–92.
- Emaus MJ, Bakker MF, Peeters PH, Loo CE, Mann RM, de Jong MD, Bisschops RH, Veltman J, Duvivier KM, Lobbes MB, Pijnappel RM, Karssemeijer N, de Koning HJ, van den Bosch MA, Monninkhof EM, Mali WP, Veldhuis WB, van Gils CH.
MR Imaging as an Additional Screening Modality for the Detection of Breast Cancer in Women Aged 50-75 Years with Extremely Dense Breasts: The DENSE Trial Study Design. Radiology. 2015 Nov;277(2):527-37.
- Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group
Sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: collaborative reanalysis of seven prospective studies.
Lancet Oncol. 2013 Sep; 14(10): 1009–1019.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ.
Oncomirs - miRNAs with a role in cancer.
Nat Rev Cancer. 2006;6:259–269.
- Fabiani R.
Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies.
Food Funct. 2016 Oct 12;7(10):4145-4159.
- Ford NA, Rossi EL, Barnett K, Yang P, Bowers LW, Hideka B, Kimler BF, Carlson SE, Shureiqi I, deGraffenried LA, Fabian CJ, Hursting SD.
Omega-3-Acid Ethyl Esters Block the Protumorigenic Effects of Obesity in Mouse Models of Postmenopausal Basal-Like and Claudin LOW Breast Cancer.
Cancer Prev Res (Phila). 2015 Sep;8(9):796-806.
- Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, Farace MG.

miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27^{Kip1}.

J Biol Chem. 2007 Aug 10;282(32):23716-24.

- Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankeu A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM.

miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation.

Cancer Cell. 2009 Dec 8;16(6):498-509.

- Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, Taccioli C, Liu CG, Croce CM, Condorelli G.

MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer.

Oncogene. 2008 Jun 19;27(27):3845-55.

- Griffiths CL, Olin JL.

Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. J Pharm Pract 2012;25:319–23.

- Gavrilas LI, Ionescu C, Tudoran O, Lisencu C, Balacescu O, Miere D.

The Role of Bioactive Dietary Components in Modulating miRNA Expression in Colorectal Cancer.

Nutrients. 2016 Sep 26;8(10).

- Golmard L, Delnatte C, Laugé A, Moncoutier V, Lefol C, Abidallah K, Tenreiro H, Copigny F, Giraudeau M, Guy C, Barbaroux C, Amorim G, Briaux A, Guibert V, Tarabeux J, Caputo S, Collet A, Gesta P, Ingster O, Stern MH, Rouleau E, de Pauw A, Gauthier-Villars M, Buecher B, Bézieau S, Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C.

Breast and ovarian cancer predisposition due to de novo BRCA1 and BRCA2 mutations. Oncogene. 2016 Mar 10;35(10):1324-7.

- Hallam S, Govindarajulu S, Hockett B, Bahl A.

BRCA1/2 Mutation-associated Breast Cancer, Wide Local Excision and Radiotherapy or Unilateral Mastectomy: A Systematic Review.

Clin Oncol (R Coll Radiol). 2015 Sep;27(9):527-35.

- Hannafon BN, Trigoso YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, Zhao ZJ, Blick KE, Dooley WC, Ding WQ.
Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer.
Breast Cancer Res. 2016 Sep 8;18(1):90.
- Hwang HW and Mendell JT.
MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis.
Br J Cancer. 2006. 94:776–780.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM.
MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.
Cancer Res. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.
- James E. Thornton, Richard I. Gregory
How does Lin28 let-7 control development and disease?
Trends Cell Biol. 2012 Sep; 22(9): 474–482.
- Jansen AP, Camalier CE, Colburn NH.
Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis.
Cancer Res. 2005;65: 6034–6041.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ.
RAS is regulated by the let-7 microRNA family.
Cell. 2005 Mar 11;120(5):635-47.
- Kachroo P., Ivanov I., Davidson L. A., Chowdhary B. P., Lupton J. R., Chapkin R. S.
Classification of diet-modulated gene signatures at the colon cancer initiation and progression stages.

Dig Dis Sci. 2011 Sep;56(9):2595-604.

- Kundu ST, Byers LA, Peng DH, Roybal JD, Diao L, Wang J, Tong P, Creighton CJ, Gibbons DL.
The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers.
Oncogene. 2016 Jan 14;35(2):173-86.
- Leaver H. A., Wharton S. B., Bell H. S., Leaver-Yap I. M., Whittle I. R.
Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology.
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2002 Nov;67(5):283-92.
- Lee E, Ito K, Zhao Y, Schadt EE, Irie HY, Zhu J.
Inferred miRNA activity identifies miRNA-mediated regulatory networks underlying multiple cancers.
Bioinformatics. 2016 Jan 1;32(1):96-105.
- Li L, Ross AH.
Why is PTEN an important tumor suppressor?
J Cell Biochem 2007.102: 1368–1374.
- Liu C, Li M, Hu Y, Shi N, Yu H, Liu H, Lian H
miR-486-5p attenuates tumor growth and lymphangiogenesis by targeting neuropilin-2 in colorectal carcinoma.
Onco Targets Ther. 2016 May 19;9:2865-71.
- Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y.
MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene.
Oncogene. 2008 Jul 17;27(31):4373-9.
- Mendell JT.

miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease.

Cell. 2008 Apr 18;133(2):217-22.

- Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T.
Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines.
Gastroenterology : 2006 Jun;130(7):2113-29.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T.
MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.
Gastroenterology 2007 Aug;133(2):647-58.
- Miller TE, K Ghoshal, B Ramaswamy, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, Majumder S
MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27^{Kip1}
J Biol Chem. 2008 Oct 31;283(44):29897-903.
- Moral R, Escrich R, Solanas M, Vela E, Ruiz de Villa MC, Escrich E.
Diets HIGH in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility.
Eur J Nutr. 2016 Jun;55(4):1397-409.
- Morris M, Woods LM, Rogers N, O'Sullivan E, Kearins O, Rachet B.
Ethnicity, deprivation and screening: survival from breast cancer among screening-eligible women in the West Midlands diagnosed from 1989 to 2011.
Br J Cancer. 2015 Jul 28;113(3):548-55.
- O'Brien KP, Ramphul E, Howard L, Gallagher WM, Malone C, Kerin MJ, Dwyer RM. Circulating MicroRNAs in Cancer.
Methods Mol Biol. 2017; 1509:123-139.

- Oztemur Y, Bekmez T, Aydos A, Yulug IG, Bozkurt B, Dedeoglu BG.
A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer.
PLoS One. 2015 May 15;10(5):e0126837.
- Palmero Edenir Inês, Silvana Gisele P de Campos, Marcelo Campos, Naiara C Nogueira de Souza, Ismael Dale C. Guerreiro, Andre L. Carvalho, Marcia Maria C. Marques. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression.
Genet Mol Biol. 2011 Jul-Sep; 34(3): 363–370.
- Parasramka M. A., Ho E., Williams D. E., Dashwood R. H.
MicroRNAs, diet, and cancer: new mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals.
Mol. Carcinog. 2012 Mar;51(3):213-30.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G.
Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.
Nature. 2000;408(6808):86–9.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.
The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM.
MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior.
J Clin Oncol 24: 4677–4684. 2006.

- Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafrè SA, Farace MG, Agami R.
Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation.
EMBO J. 2007 Aug 8;26(15):3699-708.
- Saini S., Majid S., Dahiya R.
Diet, microRNAs and prostate cancer.
Pharm. 2010 Jun;27(6):1014-26.
- Salami S, Ramezani F, Aghazadeh T, Afshin-Alavi H, Ilkhanizadeh B, Maleki D.
Impact of triple negative phenotype on prognosis and early onset of breast cancer in Iranian females.
Asian Pac J Cancer Prev 2011;12:719–24.
- Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA.
Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas.
Blood 2003 Feb 15;101(4):1220-35.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L.
Dietary polyphenols and the prevention of diseases.
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005;45(4):287-306.
- Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C. L., Hollenberg N. K., Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M.
(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006 Jan 24;103(4):1024-9.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC.
Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b.
J Biol Chem. 2007;282:1479–1486.

- Sevnigani Cinzia, George A. Calin, Linda D. Siracusa, Carlo M. Croce.
Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression.
Mamm Genome. 2006 Mar; 17(3): 189–202.
- Shah M.S., Schwartz S. L., Zhao C., Davidson L. A., Zhou B., Lupton J. R., Ivanov I, Chapkin RS.
Integrated microRNA and mRNA expression profiling in a rat colon carcinogenesis model: effect of a chemo-protective diet.
Physiol. Genomics. 2011 May 1;43(10):640-54.
- Shah M.S.; Davidson, L.A.; Chapkin, R.S.
Mechanistic insights into the role of microRNAs in cancer: Influence of nutrient crosstalk.
Front. Genet. 2012 Dec 28;3:305.
- Shah MY, Calin GA
MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer.
Genome Med. 2011 Aug 31;3(8):56.
- Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY.
miR-21-mediated tumor growth.
Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2799-803.
- Spencer J. P., Abd El Mohsen M. M., Minihane A. M., Mathers J. C.
Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research.
Br J Nutr. 2008 Jan;99(1):12-22.
- Steponaviciene L, Lachej-Mikeroviene N, Smailyte G, Aleknavicius E, Meskauskas R, Didziapetriene J.
Triple negative breast cancer: adjuvant chemotherapy effect on survival.
Adv Med Sci 2011;56:285–90.

- Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim HJ, O'Brien C, Spoerke J, Jhunjhunwala S, Boyd Z, Januario T, Newman RJ, Yue P, Bourgon R, Modrusan Z, Stern HM, Warming S, de Sauvage FJ, Amler L, Yeh RF, Dornan D.
TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer.
Sci Signal. 2011 Jun 14;4(177):ra41.
- Sun H, Ding C, Zhang H, Gao J.
Let-7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway.
Mol Med Rep. 2016 Oct;14(4):3285-92.
- Turk H. F., Barhoumi R., Chapkin R. S.
Alteration of EGFR spatiotemporal dynamics suppresses signal transduction.
PLoS One. 2012;7(6):e39682.
- Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M.
miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer.
Cancer Sci. 2011 Dec;102(12):2264-71.
- Usmani Ambreen, Amir Ali Shoro, Bushra Shirazi and Zahida Memon
Investigative and extrapolative role of microRNAs' genetic expression in breast carcinoma.
Pak J Med Sci. 2016 May-Jun; 32(3):766–772.
- Valachis A, Polyzos NP, Patsopoulos NA, Georgoulas V, Mavroudis D, Mauri D.
Bevacizumab in metastatic breast cancer: a metanalysis of randomized controlled trials. Breast Cancer Res Treat. 2010 Jul;122(1):1-7.
- Van Schooneveld Eleni, Hans Wildiers, Ignace Vergote, Peter B Vermeulen, Luc Y Dirix, and Steven J Van Laere.
Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management.

Breast Cancer Res. 2015 Feb 18;17:21.

- Visovsky C.
Treatment Considerations for the Management of Patients With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer.
J Adv Pract Oncol. 2014 Sep-Oct;5(5):321-30.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, et al.
A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.
Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:2257–2261.
- Wang GJ, Liu GH, Ye YW, Fu Y, Zhang XF.
The role of microRNA-1274a in the tumorigenesis of gastric cancer: accelerating cancer cell proliferation and migration via directly targeting FOXO4.
Biochem Biophys Res Commun. 2015 Apr 17;459(4):629-35.
- Wang Z, Wang N, Liu P, Chen Q, Situ H, Xie T, Zhang J, Peng C, Lin Y, Chen J.
MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquritigenin.
Oncotarget. 2014 Aug 30;5(16):7013-26.
- Wegener G, Krause U
Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle.
Biochem Soc Trans. 2002 Apr;30(2):264-70.
- Yang J, Li J, Le Y, Zhou C, Zhang S, Gong Z
PFKL/miR-128 axis regulates glycolysis by inhibiting AKT phosphorylation and predicts poor survival in lung cancer.
Am J Cancer Res. 2016 Jan 15;6(2):473-85.
- Yen CS, Su ZR, Lee YP, Liu IT, Yen CJ

miR-106b promotes cancer progression in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma.

World J Gastroenterol. 2016 Jun 14;22(22):5183-92.

- Yin H, Sun Y, Wang X, Park J, Zhang Y, Li M, Yin J, Liu Q, Wei M
Progress on the relationship between miR-125 family and tumorigenesis.
Exp Cell Res. 2015 Dec 10;339(2):252-60.
- Zeng H, Fang C, Nam S, Cai Q, Long X.
The clinicopathological significance of microRNA-155 in breast cancer: a meta-analysis.
Biomed Res Int. 2014;2014:724209.
- Zhou XU, Qi L, Tong S, Cui YU, Chen J, Huang T, Chen Z, Zu XB.
miR-128 downregulation promotes growth and metastasis of bladder cancer cells and involves VEGF-C upregulation.
Oncol Lett. 2015 Nov;10(5):3183-3190.

Sitografia

- www.aiom.it
Associazione Italiana di Oncologia Medica
Consultato a: settembre 2015.
- www.genscript.com
GenScript company
Consultato a: novembre 2016.

