

Scuola di Dottorato in Medicina Clinica e Sperimentale

XXX Ciclo

Università degli Studi di Milano

Tesi di dottorato

ESPRESSIONE DEI MICRORNA MIR-221 E MIR-222

NEL CARCINOMA EPATOCELLULARE

Significato Clinico e Prognostico

Dottorando: Dott.ssa Fiammetta Soggiu

Matricola: R11115

Tutor: Prof. Pier Maria Battezzati

Coordinatore: Prof.ssa Antonella D'Arminio Monforte

Anno Accademico: 2016/2017

## ***Indice***

<b>Introduzione.....</b>	<b>4</b>
<b>Il Carcinoma Epatocellulare .....</b>	<b>5</b>
Epidemiologia e fattori di rischio del carcinoma epatocellulare .....	5
Terapia e prognosi del carcinoma epatocellulare.....	6
Meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi.....	7
<b>MicroRNA.....</b>	<b>9</b>
Storia dei microRNA.....	9
Biogenesi dei microRNA .....	9
MicroRNA e carcinogenesi.....	11
MicroRNA miR-221 e miR-222 .....	11
<b>Studio iniziale di fattibilità e standardizzazione della tecnica di estrazione .....</b>	<b>14</b>
Risultati preliminari dello studio di fattibilità .....	15
<b>Studio prospettico: Materiali e Metodi .....</b>	<b>17</b>
Disegno dello studio.....	17
Criteri di inclusione ed esclusione .....	17
Protocollo .....	18
Dati clinici .....	19
Campioni di tessuto epatico .....	19
Analisi di laboratorio e estrazione dei microRNA.....	20
Approvazione etica .....	20
Analisi statistica .....	22
<b>Risultati .....</b>	<b>23</b>
Caratteristiche dei pazienti .....	23

<b>Espressione tissutale epatica dei microRNA miR-221 e miR-222 nell'HCC .....</b>	<b>25</b>
<b>Associazione dell'espressione di miR-221 e miR-222 con altri fattori prognostici.....</b>	<b>27</b>
<b>Sopravvivenza a lungo termine .....</b>	<b>29</b>
<b>Analisi univariata e multivariata per la sopravvivenza libera da malattia.....</b>	<b>29</b>
<b>Analisi con la curva ROC .....</b>	<b>30</b>
<b>Valore prognostico della sovraespressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico tumorale:</b>	
<b>Revisione della letteratura .....</b>	<b>33</b>
<b>Discussione.....</b>	<b>40</b>
<b>Conclusioni .....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>43</b>
<b>Ringraziamenti .....</b>	<b>49</b>

## ***Introduzione***

Il carcinoma epatocellulare è un tumore frequente e con alta mortalità, il cui trattamento è multidisciplinare. In base allo stadio di malattia, la terapia consiste in resezione chirurgica, trapianto di fegato, trattamenti radiologici loco-regionali o sistemici chemioterapici.

Molti score e protocolli, che combinano caratteristiche biologiche, radiologiche ed istopatologiche, sono stati studiati per implementare la capacità diagnostica e di predizione prognostica per l'epatocarcinoma. Tuttavia, al momento attuale, nessun marcatore biologico a parte l'alfafetoproteina, ha raggiunto un'evidenza tale da essere usato routinariamente come fattore prognostico nella pratica clinica.

Nell'era della medicina genetica e molecolare, i microRNA stanno assumendo un ruolo sempre più ampio anche nel carcinoma epatocellulare, con progetti di ricerca volti a identificare una *signature* di espressione di microRNA specifici a scopo diagnostico e prognostico e anche all'uso di tali microRNA come possibili target terapeutici.

Il presente studio ha per oggetto due microRNA, miR-221 e miR-222, che sono spesso sovraregolati nel carcinoma epatocellulare. Lo scopo dello studio è la valutazione dell'espressione di miR-221 e miR-222 a livello epatico in una serie di pazienti sottoposti a intervento chirurgico resettivo, per confermare la presenza di una loro alterata regolazione e l'eventuale correlazione con altri fattori prognostici e con la sopravvivenza a lungo termine. Una seconda fase dello studio, ancora in corso, è volta a studiare la correlazione tra l'espressione tissutale e circolante di questi due microRNA in pazienti affetti da carcinoma epatocellulare.

Inoltre la ricerca è stata approfondita con una revisione sistematica della letteratura riguardante l'espressione tissutale epatica di miR-221 e miR-222 nel carcinoma epatocellulare, allo scopo di

valutare l'evidenza della letteratura riguardo il loro possibile utilizzo a scopo diagnostico e prognostico e di inquadrare in prospettiva i risultati del presente studio.

## ***Il Carcinoma Epatocellulare***

### *Epidemiologia e fattori di rischio del carcinoma epatocellulare*

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta il quinto tumore più frequente nel mondo e la terza causa di morte per cancro, con più di 850 000 nuovi casi diagnosticati ogni anno<sup>1</sup>.

Nel 70-90% dei casi esso insorge in pazienti con malattia cronica del fegato, per cui tale neoplasia presenta marcate variazioni geografiche nei suoi tassi di incidenza e mortalità: in Asia e Africa Sub-Sahariana le incidenze annuali superano i 20 casi ogni 100.000 abitanti; tassi intermedi di incidenza si registrano nel Sud Europa e in Giappone mentre le regioni del Nord Europa e Nord America presentano incidenze ancora più basse con meno di 5 casi ogni 100.000 abitanti<sup>1,2</sup>.

A livello globale, l'infezione cronica da HBV è responsabile di circa il 50% di tutti i casi di HCC, con un rischio cumulativo dipendente dalla carica virale e dalla durata dell'infezione, mentre nei soggetti affetti da epatopatia cronica HCV-relata l'incidenza di HCC è del 3-5% annuo. Il consumo di alcool è un altro importante e frequente cofattore nell'eziopatogenesi di questo tumore, attraverso lo sviluppo di un'epatopatia cronica. Da ultimi, il fumo di sigaretta e l'ingestione di Aflatossina B1 sono fattori di rischio indipendenti per la genesi di HCC e possono agire in modo sinergico con i precedenti nello sviluppo di questa malattia

Negli ultimi anni l'incidenza dell'HCC è leggermente diminuita in seguito a misure di prevenzione quali le campagne vaccinali contro l'epatite B in aree endemiche ed il miglioramento degli standard sanitari<sup>3</sup>. Nonostante questo, la prevalenza di infezione cronica da HBV rimane elevata in alcune

aree geografiche, quali il Medio Oriente, Asia Centrale e Africa Occidentale, in cui è anche la causa principale di HCC.

Per quanto riguarda l'infezione cronica da HCV, la sua prevalenza è maggiore in Europa, USA e Giappone. Si stima che la recente introduzione nella pratica clinica di nuovi farmaci per il trattamento dell'epatite C cambierà ulteriormente il quadro di prevalenza con un'ulteriore diminuzione dei casi di HCC HCV-relate nei prossimi anni<sup>4</sup>.

Tuttavia nei paesi occidentali si è registrato negli ultimi anni un aumento di incidenza di HCC dovuto alla crescente prevalenza della sindrome metabolica e di alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico (NASH, obesità patologica, diabete mellito), e le epatopatie croniche ad origine metabolica rappresentano, tra le indicazioni al trapianto di fegato nei pazienti con HCC, quella in più rapida crescita negli ultimi decenni<sup>5-7</sup>.

In Italia la mortalità per HCC su base metabolica è incrementata dai 4,8 decessi ogni 100.000 abitanti nel 1969 ai 10,9 decessi nel 1994. Le stime per l'Italia indicano un totale di 8.267 e 3.699 nuovi casi diagnosticati nel sesso maschile e femminile<sup>8</sup>. Questo incremento potrebbe attribuirsi sia ad un reale aumento dei casi o piuttosto al miglioramento delle metodiche diagnostiche disponibili ed ai progressi nella terapia della cirrosi epatica con conseguente aumento dell'aspettativa di vita in questi pazienti.

### *Terapia e prognosi del carcinoma epatocellulare*

La prognosi dell'HCC è strettamente correlata con lo stadio della malattia al momento della diagnosi, con le condizioni cliniche e comorbidità del paziente e la funzionalità epatica. Tra i vari sistemi di classificazione e stadiazione, il più usato e validato attualmente è il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system, che permette di stratificare i pazienti in base all'estensione del tumore (numero e dimensione dei noduli), la funzione epatica e la presenza di sintomi tumorali,

espressi in termini di performance status<sup>9</sup>. La classificazione BCLC suggerisce un algoritmo terapeutico per ogni stadio di malattia. Ciononostante, esistono casi di “migrazione stadio/trattamento” per cui il trattamento finale scelto potrebbe essere quello corrispondente a un diverso stadio BCLC nel caso in cui quello indicato sia considerato non fattibile o non sicuro per il paziente<sup>10,11</sup>. Nei pazienti che si presentano con un singolo nodulo di HCC su un fegato non cirrotico, o in presenza di cirrosi ma con una funzione epatica ben conservata, il trattamento di scelta è la resezione epatica che permette ottimi risultati a breve e lungo termine con una sopravvivenza a 5 anni di circa 70%<sup>12</sup>. I pazienti con uno stadio iniziale (BCLC A) in cui la funzione epatica è compromessa possono beneficiare di un trapianto epatico o di terapie ablative in caso siano presenti importanti comorbidità. Secondo le linee guida attuali, trattamenti palliativi dovrebbero invece essere riservati a pazienti con uno stadio intermedio o avanzato.

### *Meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi*

L'epatocarcinogenesi è un processo complesso multi-step in cui risultano alterati diversi processi di attivazione cellulare, con conseguenti profili molecolari eterogenei. Le mutazioni principali riguardano il gene oncosoppressore TP53 (25-40% dei tumori) ed il gene della beta-catenina CTNNB1 (25% dei casi, in particolare in quelli insorti su cirrosi HCV-relata).

Altre mutazioni meno frequenti sono le amplificazioni di 6p21 (VEGFA) e 11q13 (D1 ciclina) nel 5-10% dei pazienti, la soppressione di RASSF1, SOCS1, E-caderina (CDH1) e la riattivazione di oncogeni come MYC.

Come verrà trattato ampiamente in seguito, alcuni microRNA, possono andare incontro a downregulation o overexpression, agendo in qualità di oncogeni o oncosoppressori nel meccanismo dell'epatocarcinogenesi.

Altri meccanismi che concorrono all'epatocarcinogenesi sono l'attivazione di EGFR e Ras (nel 50% degli HCC), un'alterazione della cascata di mTOR (nel 40-50%), un'inattivazione dell'oncosoppressore PTEN, un'attivazione del recettore del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1R) nel 20% dell'Early HCC, e una alterata regolazione del fattore di crescita epatocitario (HGF) e di c-MET.

Infine è da sottolineare come l'epatocarcinoma sia un tumore molto vascolarizzato, una caratteristica correlata a livello molecolare alla presenza di un'anomala attività angiogenetica, mediante l'attivazione di fattori quali, tra i molti segnalati, VEGFA, ANGPT2 e il fattore di crescita dei fibroblasti FGF<sup>13</sup>.

Ogni singolo step dell'epatocarcinogenesi, con i fattori deregolati implicati nella trascrizione, trasduzione del segnale, sopravvivenza e proliferazione cellulare, è stato suggerito come potenziale bersaglio delle cosiddette targeted therapies, attualmente in fase di studio, che permetteranno di usare farmaci mirati e adattare la terapia medica al singolo paziente.



## **MicroRNA**

### **Storia dei microRNA**

La prima descrizione dei microRNA risale al 1993 da parte di Lee, Wightman e colleghi, che scoprirono che il gene *lin-4*, deputato al controllo del timing dello sviluppo larvale di *C. elegans*, codifica per due piccoli RNA (uno più corto ed il suo precursore stem loop) anziché per una proteina<sup>14</sup>. In seguito essi osservarono che questi RNA svolgono una specifica funzione di repressione translazionale del messaggio di *lin-14* attraverso il legame della sequenza complementare in 3'UTR del gene *lin-14*, che porta a una ridotta traduzione della proteina LIN-14, stimolando la transizione della divisione cellulare dal primo al secondo stadio larvale<sup>15</sup>.

Oggi, il *lin-4* RNA corto è considerato il primo ed ufficiale componente della classe dei microRNA, i quali sono tuttora oggetto di studio.

### **Biogenesi dei microRNA**

I microRNA sono piccoli RNA non codificanti lunghi circa 19-23 nucleotidi che hanno la capacità di regolare l'espressione genica ad un livello post-trascrizionale, tramite la degradazione di RNA messaggero (mRNA) o la repressione della traduzione proteica. Questo è realizzato mediante il legame complementare alla regione 3' non tradotta (UTR) del trascritto genico target<sup>16</sup>. Inoltre, essi possono indurre il silenziamento trascrizionale attraverso modificazioni del DNA e/o della cromatina<sup>17</sup>.

La biogenesi dei microRNA attraversa diverse fasi: la trascrizione a livello nucleare di una breve sequenza genomica ad opera della RNA polimerasi II o III, che dà origine al microRNA primario (primiRNA), che a sua volta viene modificato a livello post-trascrizionale mediante la metilazione dell'estremità 5' e l'aggiunta della coda di poli(A) all'estremità 3' (Lee 2002). Nella seconda fase, i

pri-miRNA subiscono un ripiegamento a forcina detto stem-loop e si trasformano in pre-miRNA ad opera di un complesso multiproteico costituito dall'RNasi di tipo III Drosha e la proteina DGCR8, che li trasloca nel citoplasma. Qui, i pre-miRNA sono riconosciuti dal complesso multienzimatico Dicer, che li trasforma in microRNA maturi tagliandoli nella forma finale a doppio filamento, e sono incorporati nel cosiddetto complesso silenziatore indotto da RNA (RISC)<sup>18</sup>.

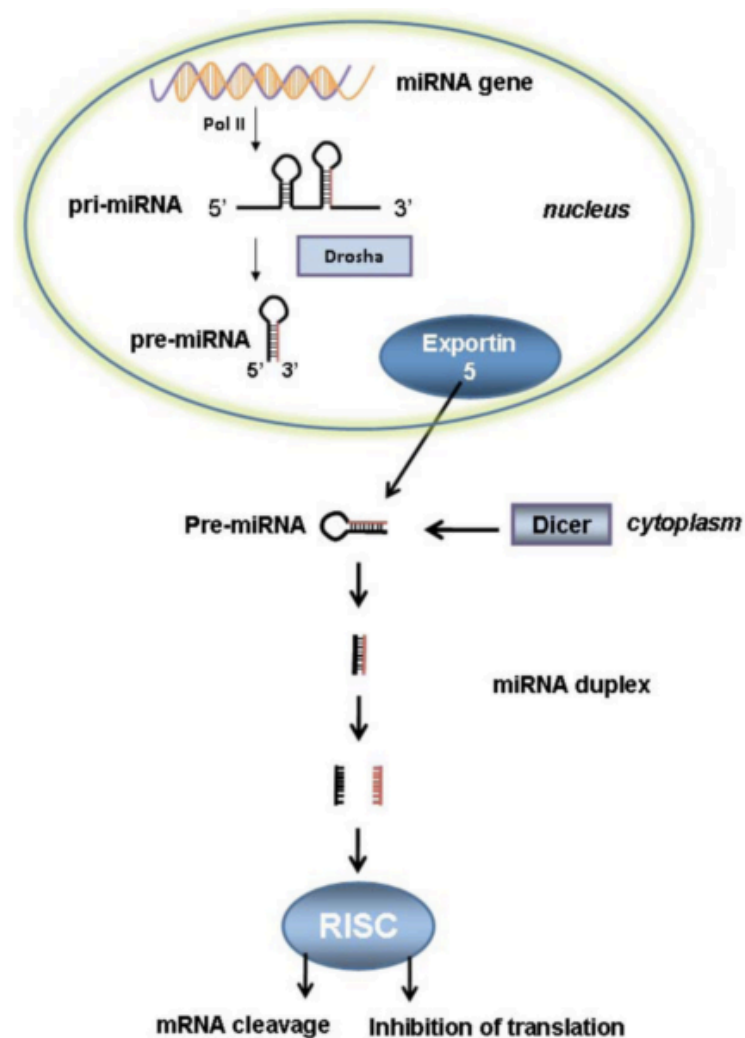


Figura 1. Biogenesi dei microRNA. Immagine tratta da Garofalo M. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. Curr Mol Med. 2012;12(January):27-33.

### *MicroRNA e carcinogenesi*

Oltre il 30% dei geni umani sono regolati dai microRNA<sup>19,20</sup>. Un'alterata espressione dei microRNA può far sì che essi agiscano come oncogeni o oncosoppressori, interferendo su diverse fasi della cancerogenesi, dalla proliferazione cellulare, all'invasione e infine alla metastatizzazione. Ognuna delle fasi di produzione dei microRNA può essere regolata. Il loro contributo in diverse fasi del processo tumorigenico è stato descritto in letteratura (REF) in diversi tipi di tumore, inclusi i tumori timici, tiroidei, polmonari, del seno, epatici e del tratto gastro-intestinale. In diversi tipi di cancro è stata dimostrata la presenza di una sovraregolazione o sottoregolazione di alcuni specifici microRNA, che nell'insieme formano una cosiddetta "signature" molecolare<sup>21,22</sup>.

### *MicroRNA miR-221 e miR-222*

I geni per MiR-221 miR-222 sono altamente conservati nei vertebrati: vengono codificati in tandem e sono localizzati in una regione intergenica del cromosoma X, contenenti sequenze identiche di nucleotidi separate da 727 basi. La loro espressione è stata descritta come disregolata in diversi tipi di cancro, tra cui il cancro prostatico, mammario, gastrico e nel HCC. Nel cancro dello stomaco promuovono la proliferazione e migrazione cellulare mediante l'inibizione di HAI-1 (Hepatocyte growth factor activator inhibitor 1)<sup>23</sup>.

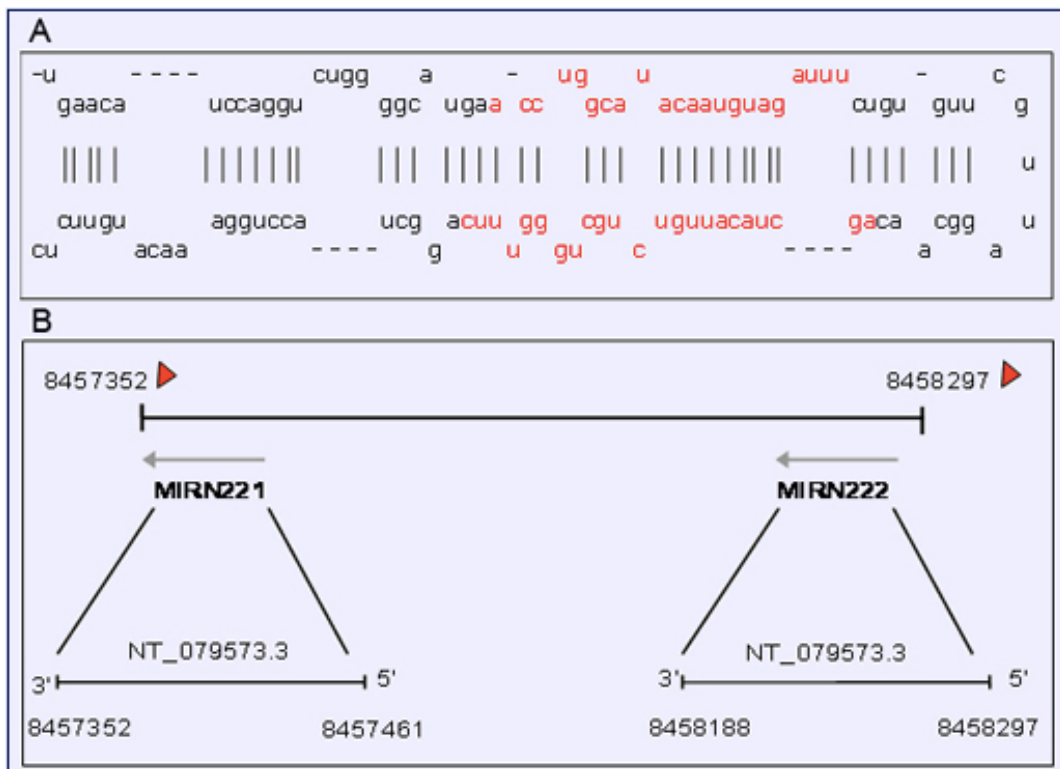


Figura 2. A: Struttura stem-loop di miR-221. B: Localizzazione genomica di miR-221 (MIRN221) and miR-222 (MIRN222) sulla banda cromosomica Xp11.3. Immagine tratta da Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_MIR221.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR221.html)

Diversi studi di microRNA profiling hanno mostrato che MiR-221, miR-222, miR-21, miR-224 e miR-210 sono sovraespressi nell'HCC in maniera ripetitiva e consistente (non casuale) e hanno una spiccata azione di oncogeni, anche detti "oncomir", In particolare i due paraloghi miR-221 e miR-222 possono stimolare l'epatocarcinogenesi mediante una azione di regolazione della crescita cellulare, del ciclo cellulare e dell'apoptosi agendo su alcuni target quali Ki67, NF-kB, p27, p57, CDKN1Bm, CDKN1C e PUMA<sup>24</sup>.

Una delle vie in cui è coinvolto l'oncogene miR-221 è l'angiogenesi tumorale, particolarmente importante nello sviluppo e progressione dell'HCC. In particolare, una proteina multifunzionale overespressa nell'HCC chiamata SND1 (staphylococcal nuclease domain-containing 1) attiva NF-kB il quale aumenta l'espressione di miR-221 mediante una induzione a livello trascrizionale. MiR-221, a sua volta, stimola la produzione di angiogenina e CXCL16, i quali sono noti fattori inducenti la

neovascolarizzazione nei tumori. Inoltre, i singoli componenti di questa via di trasduzione del segnale, interagiscono finemente tra loro, con meccanismi di feedback: per esempio miR-221 stimola l'espressione di PTEN e DDIT4, che a loro volta sono inibitori di mTOR; mentre CXCL16, legandosi al suo recettore CXCR6, può attivare mTOR e NF-κB. Questa complessa cascata, descritta per la prima volta da Santhekadur nel 2012, spiega in parte perché l'HCC, in cui si osserva una aumentata espressione sia di SND1 che di miR-221, sia un tumore altamente vascolarizzato.

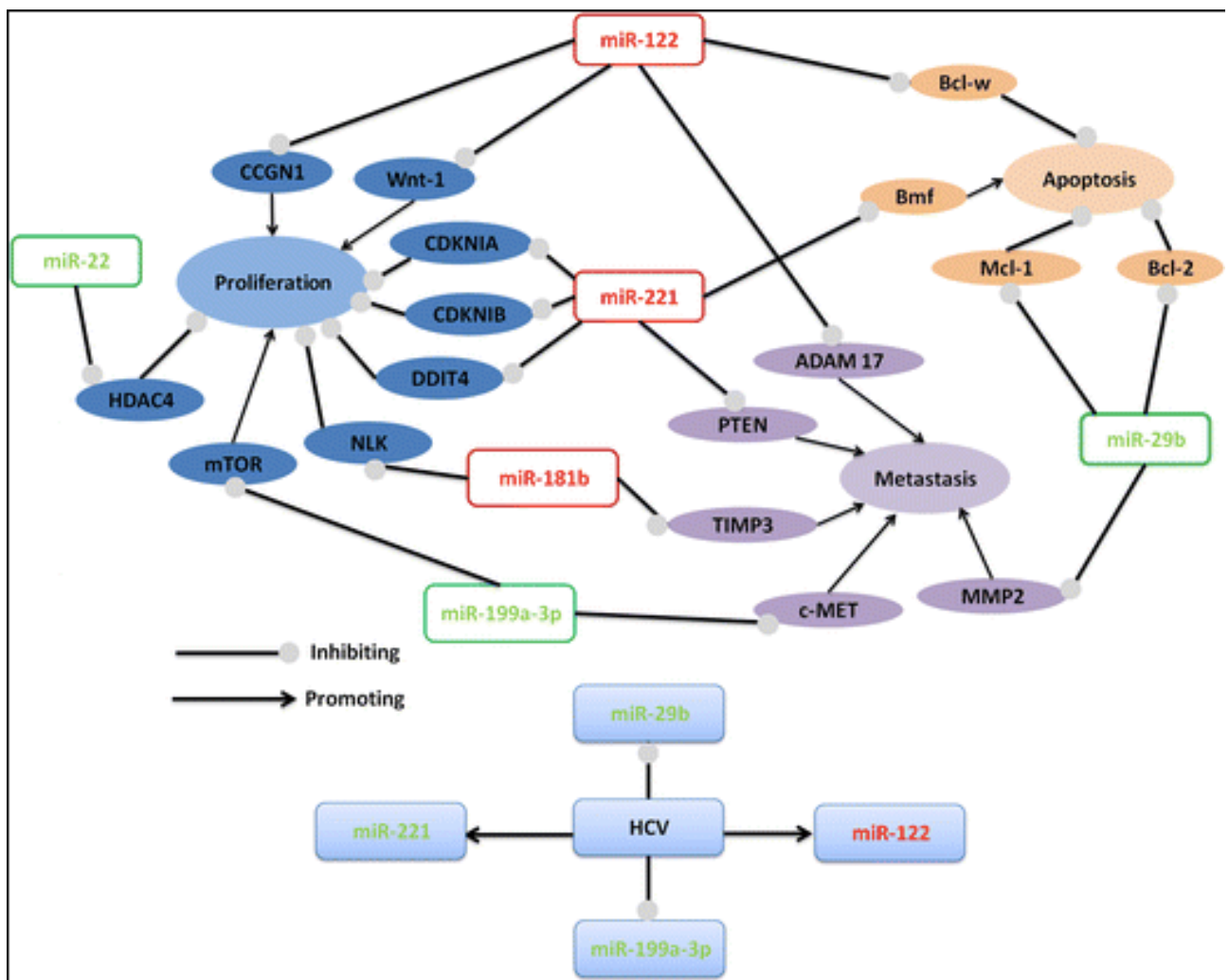


Figura 3. Rete di correlazione di vari microRNA implicati nell'epatocarcinogenesi, in cui si osserva che miR-221 svolge la sua azione su geni target quali quelli per il gruppo di chinasi ciclina-dipendenti (CDK), Bmf e PTEN, determinando un'aumentata proliferazione, l'inibizione dell'apoptosi e la metastatizzazione, rispettivamente. L'infezione da HCV inoltre può promuovere l'espressione di miR-221 attraverso NF-κB. Immagine tratta da Zekri AN et al. *Serum microRNA panels as potential biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma on top of HCV infection*. *Tumour Biol.* 2016 Sep;37(9):12273-12286.

## *Studio iniziale di fattibilità e standardizzazione della tecnica di estrazione*

Nella fase iniziale dello studio è stato eseguito uno studio di fattibilità analizzando l'espressione di microRNA miR-221 e miR-222 ottenuta da sezioni di tessuto epatico tumorale e non tumorale appaiato ottenuto retrospettivamente da campioni istologici di resezione epatiche per HCC su FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded).

Per l'analisi sono stati prelevati da ogni campione disponibile 3 strisce di tessuto epatico tumorale e 3 di tessuto epatico peritumorale appaiato, con uno spessore di 20 micron ciascuna, mediante microdissettore. Si è quindi proceduto all'omogeneizzazione enzimatica, lisi e purificazione del campione e estrazione di RNA con il kit Prelude FFPE RNA Isolation Module (NuGen).

Prima di procedere alla fase di estrazione di microRNA, è stata eseguita un'analisi della qualità del campione, valutando non solo la quantità totale di RNA estratto, ma anche la purezza e l'integrità. In particolare, l'integrità è stata valutata mediante elettroforesi con gel di agarosio: una buona qualità è indicata dalla presenza di due bande prominenti di rRNA 28S e 18S.

L'ottenimento di RNA di buona qualità da campioni di FFPE è risultato estremamente complesso, probabilmente a causa delle metodiche usate al momento della fissazione in formalina, trattandosi di campioni anche vecchi, prelevati tra il 2003 ed il 2014. Il protocollo è stato modificato utilizzando durante la fase di lisi enzimatica con Proteinase K a 50°C un ciclo lungo 40 minuti invece di 15, senza ottenere miglioramenti della qualità del RNA estratto.

I campioni non di buona qualità non sono stati ulteriormente analizzati per microRNA, poiché un'eventuale degradazione del campione potrebbe compromettere le successive reazioni di retro-trascrizione e amplificazione e quindi portare a dei falsi negativi (Figura 6).

## Risultati preliminari dello studio di fattibilità

In totale sono stati analizzati 69 campioni. Di questi, 44 campioni (64%) di tessuto tumorale/non tumorale appaiati hanno ottenuto un giudizio di “buona” qualità nella fase di estrazione del RNA e si è proceduto all’analisi di miR-221 e miR-222.

Di questi, 10 erano campioni provenienti da HCC in stadio BCLC 0-A e 34 da stadio più avanzato (BCLC B-C). Sui 10 campioni da BCLC 0-A, 8 (80%) hanno mostrato una sovraespressione di miR-221 e miR-222 (con fold change variabile) mentre sui campioni di tumore avanzato sono stati ottenuti solo 2 casi di sovraregolazione di miR-221 (6%) e uno (3%) di miR-222 (fold change da 1.2 a 12) (Figura 5).

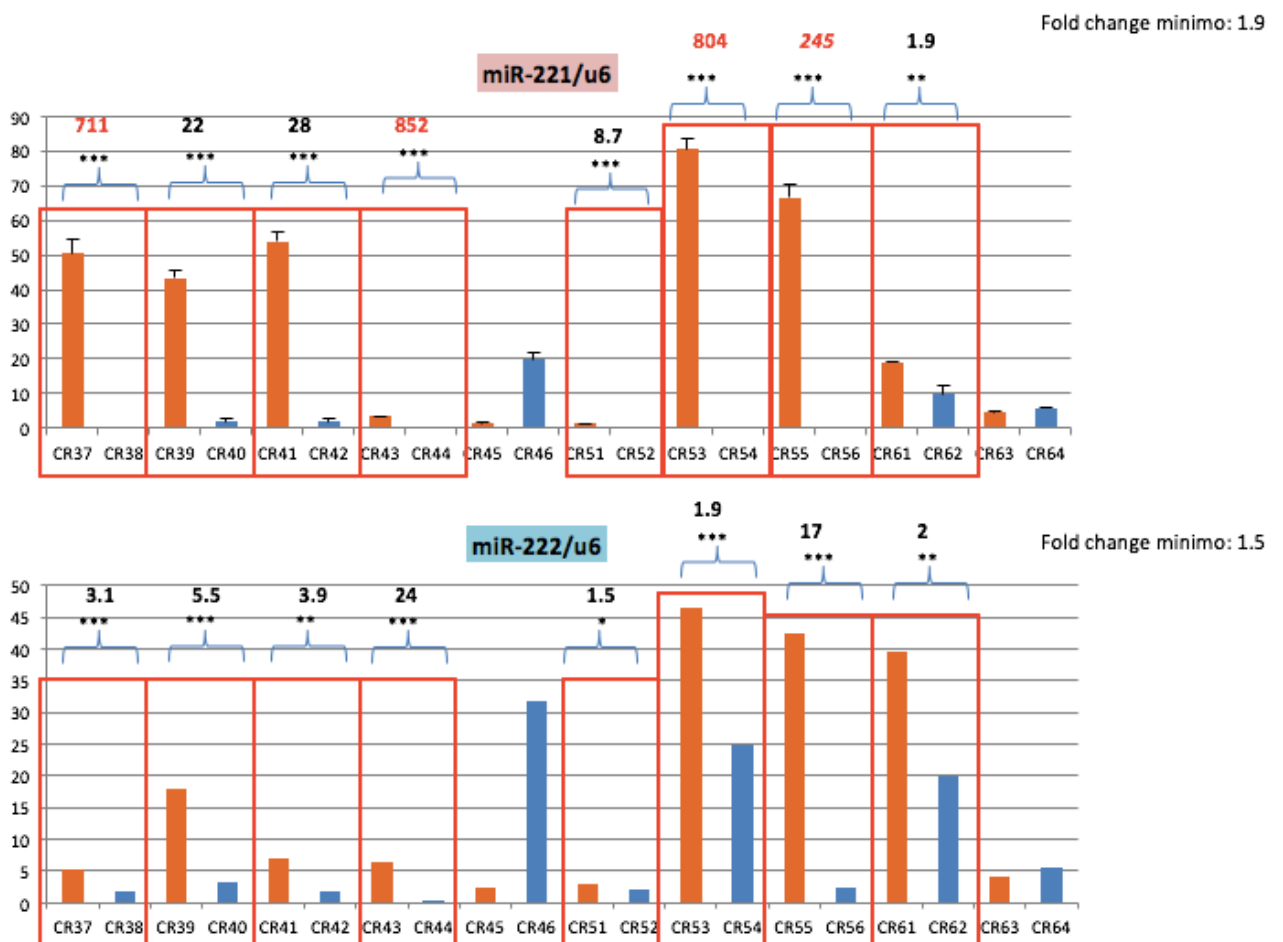


Figura 5. Grafico che mostra i risultati dello studio di fattibilità su campioni fissati in FFPE: in ascissa è riportata l’espressione di miR-221 e miR-222 per ognuna delle 10 coppie di tumore/non-tumore in stadio iniziale. L’espressione nel tumore è espressa dalle colonne arancioni per ogni campione, in blu l’espressione nel non-tumore.

Questo studio preliminare ha dimostrato che nei campioni di buona qualità era presente una sovraespressione relativa di miR-221/222 nei tessuti epatici tumorali rispetto ai corrispondenti non tumorali.

L'utilizzo di campioni FFPE ha reso l'estrazione complessa e la qualità del RNA estratto è stata non ottimale in 25 casi su 69 (36%), pertanto si è deciso di non proseguire con l'analisi da FFPE, nonostante la possibilità di valutare numerosi campioni con lungo follow up a disposizione. Si è quindi proceduto con lo studio prospettico con campionamento di tessuti congelati a fresco, già standardizzata.



## ***Studio prospettico: Materiali e Metodi***

### ***Disegno dello studio***

Si tratta di uno studio di popolazione prospettico monocentrico volto a valutare l'espressione di microRNA miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico tumorale e non tumorale in pazienti affetti da HCC sottoposti a resezione epatica a scopo curativo presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano in un periodo compreso tra gennaio 2012 e settembre 2015 e successivamente seguiti con follow up fino a settembre 2017.

### ***Criteri di inclusione ed esclusione***

I criteri di inclusione nello studio erano: nuova diagnosi di HCC confermata mediante biopsia epatica o riscontro del tipico aspetto in due esami radiologici quali tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto tripla fase (arteriosa, portale, tardiva) e risonanza magnetica nucleare (RMN) secondo i criteri diagnostici definiti dalle linee guida EASL (11), performance status ECOG (REF) pari a 0 o 1, età >18 anni, assenza di controindicazioni ad un intervento chirurgico di resezione epatica. La presenza di epatopatia cronica, cirrosi o di HCC su fegato sano non è stata considerata un fattore dirimente ai fini dell'ammissione o dell'esclusione dei pazienti.

I criteri di esclusione includevano: la presenza di gravi comorbidità tali da rendere il paziente non eleggibile ad intervento chirurgico, una precedente candidatura a trapianto di fegato, una diagnosi preoperatoria di HCC fibrolamellare, pregressi trattamenti locoregionali (quali chemioembolizzazione epatica e radiofrequenza) o sistemici, la presenza di malattia disseminata identificata prima o durante l'intervento.

## *Protocollo*

I pazienti eleggibili per lo studio, sottoposti a stadiazione completa con TC del torace e TC o RMN dell'addome con mezzo di contrasto, sono stati ammessi in ospedale il giorno precedente l'intervento chirurgico e, dopo aver firmato un consenso informato, sono stati sottoposti ad esame fisico completo, esami ematochimici (emocromo, funzione renale e epatica, albumina, coagulazione e alfafetoproteina (AFP)). Inoltre la funzione epatica è stata valutata mediante calcolo dello score di Child-Pugh e MELD (Model for End-stage Liver Disease).

Durante l'intervento chirurgico, sono state eseguite un'esplorazione addominale completa per confermare l'assenza di metastasi e un'ecografia epatica intraoperatoria per valutare le caratteristiche del tumore, escludere possibili lesioni aggiuntive, identificare l'anatomia vascolare e biliare e il piano di resezione epatica.

Al termine dell'intervento, il pezzo chirurgico è stato campionato per prelevare una porzione di tessuto tumorale ed una di tessuto peri-tumorale, i quali sono stati congelati a fresco e conservati per ulteriori analisi.

Tali campioni sono stati successivamente trasferiti presso il laboratorio deputato all'estrazione dei microRNA oggetto dello studio.

Durante il decorso postoperatorio sono state valutate e registrate eventuali complicanze e i pazienti sono stati seguiti al follow up mediante AFP, TC del torace e TC o RMN dell'addome con mezzo di contrasto ogni 4 mesi per i primi due anni e poi ogni sei mesi. In caso di recidiva, ogni caso è stato discusso in un meeting multidisciplinare riguardo l'indicazione di ulteriore trattamento (Figura 7).

### *Dati clinici*

Un database dipartimentale è stato usato per ottenere dati demografici, clinico-patologici, sul decorso postoperatorio e i risultati a lungo termine di sopravvivenza.

I dati demografici, anonimizzati, includono l'età, il sesso, peso, altezza e BMI, fattori di rischio quali fumo e consumo di alcool. I dati clinici includono la presenza di comorbidità quali obesità, malattie cardiovascolari o tumorali, diabete; la presenza di epatopatia cronica e la causa; lo score ASA, la presenza di ascite o di varici esofagee, i dati radiologici preoperatori (numero e dimensioni dei noduli di HCC, presenza di invasione vascolare, presenza di segni di ipertensione portale); i valori di laboratorio preoperatori (Bilirubina, Albumina, conteggio piastrinico, PT (rapporto) e lo score Child-Pugh; i dati intraoperatori (tipo di intervento, numero di segmenti resecati, resezione vascolare, manovra di occlusione ilare, durata dell'intervento, perdite ematiche stimate intraoperatorie); i dati postoperatori (complicanze, grado delle complicanze secondo Dindo-Clavien<sup>25</sup>, trattamento delle complicanze, durata di ospedalizzazione). I risultati a lungo termine includono dati sul follow up (sviluppo e tempo di recidiva, trattamento della recidiva, morte e causa del decesso).

### *Campioni di tessuto epatico*

Per ogni paziente arruolato nello studio, al termine dell'intervento chirurgico di resezione epatica sono stati raccolti due campioni di tessuto epatico: uno dal nodulo di HCC e uno dal parenchima non tumorale circostante. Tutti i campioni sono stati posti in azoto liquido immediatamente dopo il prelievo per mantenere l'integrità del RNA e migliorarne l'estrazione. Quindi, sono stati conservati in provette contenenti una soluzione RNA later (Ambion) in un frigo alla temperatura di -80°C fino alle analisi successive.

### *Analisi di laboratorio e estrazione dei microRNA*

I campioni sono stati omogeneizzati in tamponi di lisi ML (Macherey-Nagel) e particelle di carburo di Tungsteno (Qiagen) con un omogeneizzante Tissuelyser (Qiagen).

L'RNA totale è stato estratto con NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni del produttore e successivamente trattato con RNase-free DNasi.

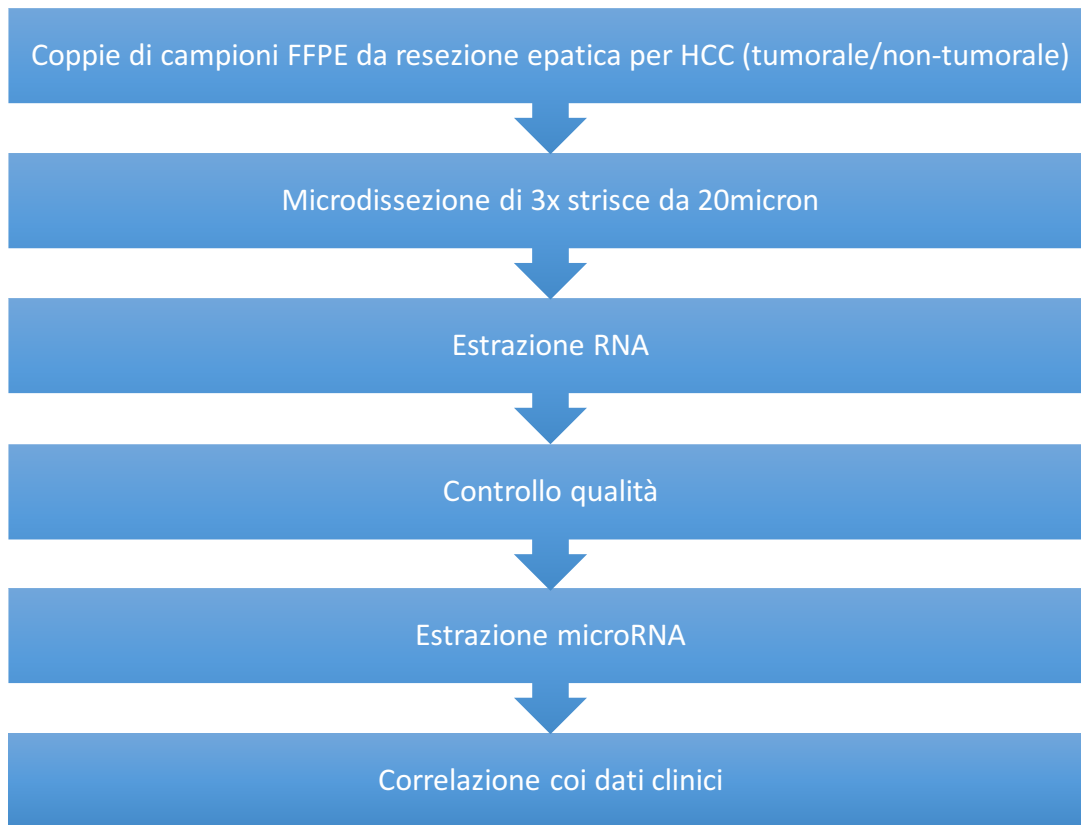
La purezza dei campioni di RNA è stata valutata misurando il rapporto tra i controlli OD260/OD280 con uno spettrometro Picodrop, ottenendo una ratio 1.80:2.00 in tutti i casi.

Per la quantificazione dei microRNA, si è proceduto alla sintesi di cDNA a partire da 50ng di RNA con il kit TaqMan miRNA Reverse Transcription (Life Technologies) seguendo le istruzioni del produttore. È stata eseguita la Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) in triplicato usando il TaqMan Essays per miR-221 e miR-222 umano (Life Technologies).

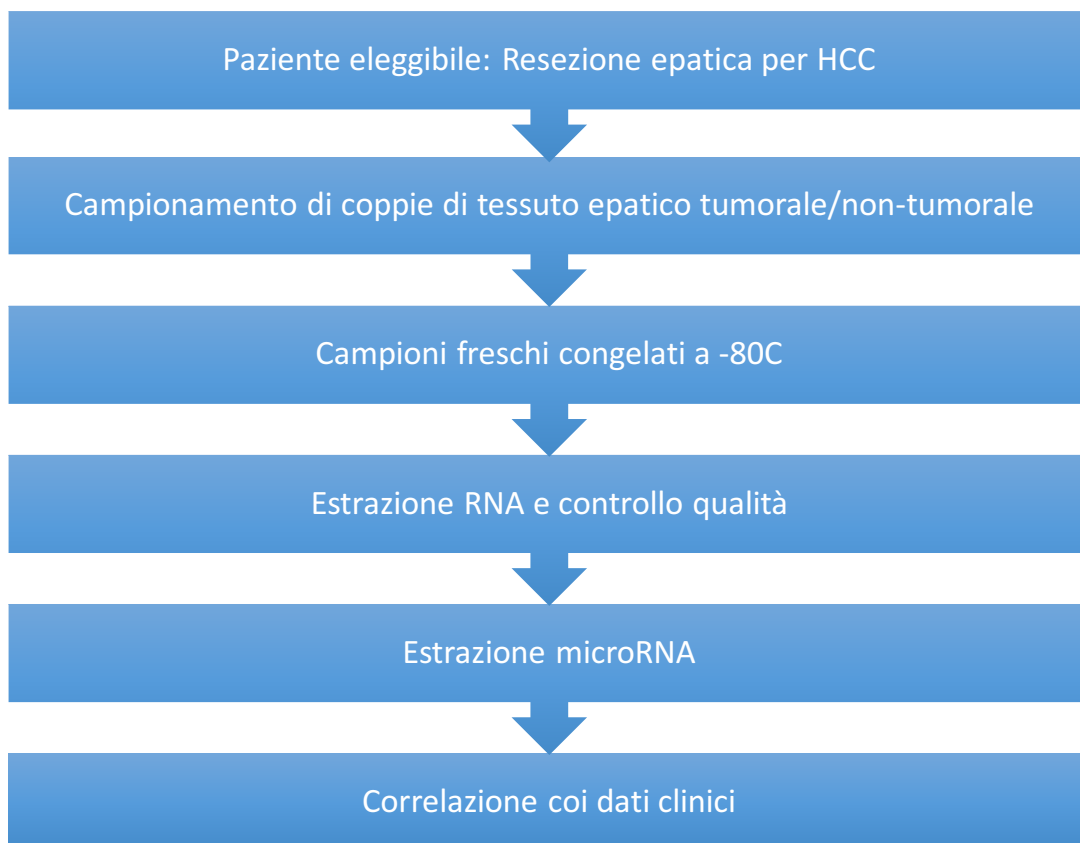
I livelli di microRNA ottenuti sono stati normalizzati usando il controllo endogeno U6 e la relativa espressione è stata calcolata mediante il metodo comparativo  $2^{-\Delta Ct}$ .

### *Approvazione etica*

Questo studio è stato approvato dal comitato etico locale per la ricerca sui tessuti biologici. Tutti i pazienti sottoposti a intervento chirurgico di resezione epatica presso l'Istituto Nazionale dei Tumori firmano un consenso informato per la ricerca prima dell'intervento chirurgico. Tutti i dati sono stati anonimizzati secondo le regolamentazioni etiche e legali dell'Istituto Nazionale dei Tumori.



**Figura 6. Protocollo dello studio di fattibilità per valutare l'espressione di microRNA miR-221 e miR-222 su tessuti epatici paraffinati fissati in formalina.**



**Figura 7. Protocollo dello studio prospettico di espressione di microRNA miR-221 e miR-222 su tessuti epatici freschi congelati.**

## *Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS versione 20.0 per computer Apple MacIntosh. Le variabili categoriche sono state riportate come numero di casi e percentuale mentre le variabili continue sono espresse come mediana e range.

La sopravvivenza totale (OS) è stata calcolata come intervallo tra data della chirurgia e data della morte, indipendentemente dalla causa. Nei pazienti in vita si è tenuto conto della data dell'ultimo follow up. La sopravvivenza libera da recidiva (RFS) è stata calcolata come intervallo tra la data della chirurgia e la data del riscontro di recidiva o, nei pazienti liberi da malattia, la data dell'ultimo follow up o del decesso.

Per l'analisi univariata di sopravvivenza è stato utilizzato il modello di Kaplan Meier e le differenze nelle curve sono state studiate con il log-rank test. Il modello della regressione di Cox è stato quindi usato per la successiva analisi multivariata, che includeva le variabili risultate significative ( $p < 0.05$ ) all'univariata.

L'area sotto la curva ROC (receiver operating characteristic) è stata usata per valutare la performance prognostica di miR-221 e miR-222 tissutale e la curva ROC per identificare un possibile livello di cut-off. Per tutte le analisi sono stati utilizzati test a due code (two-tailed) con un livello di significatività  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

### *Caratteristiche dei pazienti*

Presso l'Istituto Nazionale di Tumori di Milano, tra Gennaio 2012 e Settembre 2015, sono stati sottoposti a intervento chirurgico di resezione epatica 56 pazienti eleggibili, che sono stati quindi inclusi prospetticamente nello studio.

La Tabella 1 riassume le caratteristiche clinico-patologiche della popolazione in studio.

Quarantatré pazienti (76.8%) erano di sesso maschile e l'età mediana della popolazione era 68 anni (35 – 83). La maggior parte dei casi di HCC si è sviluppato su una epatopatia cronica di base HCV-relata (33.9%) o HBV-relata (25%). Sette pazienti (12.5%) hanno sviluppato un HCC su fegato sano ed i restanti 16 pazienti (28.6%) su epatopatia da altra eziologia (alcol, metabolica, genetica).

Lo stadio di malattia al momento della diagnosi, secondo la stadiazione di Barcellona BCLC, era precoce nella maggior parte dei casi: 35 (62.5%) BCLC A e 6 (10.7%) BCLC 0 e la AFP mediana alla diagnosi era 9.1 ng/mL (1.2 – 411400).

Al momento dell'intervento, il numero mediano di noduli di HCC era 1 (1 – 8), e 42 (75%) pazienti si presentavano con un nodulo singolo, 8 (14.3%) con 2-3 noduli e 6 (10.7%) con più di 3 noduli. La dimensione mediana del nodulo di maggiore dimensione era 4 cm (1 – 30 cm) e solo 7 pazienti (12.5%) avevano un diametro massimo  $\leq 2$  cm, mentre la maggioranza aveva un diametro tra 2 – 5 cm (34 pazienti, 60.7%) o  $>5$  cm (15 pazienti, 26.8%). Di conseguenza, 35 (62.5%) erano all'interno dei criteri di Milano di trapianto.

All'esame anatomo-patologico, il grado di differenziazione secondo Edmondson e Steiner era G1 in due pazienti (3.6%), G2 in 36 (64.3%) e G3 in 18 (32.1%) pazienti. Non si è osservata invasione

vascolare in un quarto dei casi, mentre 39 (69.6%) avevano invasione microvascolare e 3 (5.4%) invasione macrovascolare identificata all'esame istologico.

<b>Variabili</b>	<b>Mediana (intervallo) o N (%)</b>
Età (anni)	68 (35-83)
Sesso maschile	43 (76.8%)
Eziologia	
HCV	19 (33.9%)
HBV	14 (25.0%)
Altra eziologia	16 (28.6%)
Fegato sano	7 (12.5%)
AFP (ng/mL)	9.1 (1.2-411400)
Grado di differenziazione <sup>+</sup>	
G1	2 (3.6%)
G2	36 (64.3%)
G3	18 (32.1%)
Invasione vascolare	
Assente	14 (25%)
Micro	39 (69.6%)
Macro	3 (5.4%)
Numero di noduli	1 (1-8)
Singolo	42 (75%)
2-3 noduli	8 (14.3%)
> 3 noduli	6 (10.7%)
Diametro tumorale massimo (cm)	4 (1-30)
≤2 cm	7 (12.5%)
2-5 cm	34 (60.7%)
> 5 cm	15 (26.8%)
Stadio BCLC	
0	6 (10.7%)
A	35 (62.5%)
B	12 (21.4%)
C	3 (5.4%)
Criteri di Milano	
In	35 (62.5%)
Out	21 (37.5%)

<sup>+</sup> Secondo la classificazione di Edmondson and Steiner

**Abbreviazioni:** AFP, Alfafetoproteina; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer.

**Tabella 1. Caratteristiche della popolazione in studio**



### *Espressione tissutale epatica dei microRNA miR-221 e miR-222 nell'HCC*

I valori mediani (range) di espressione di miR-221 e miR-222 nei campioni di tessuto epatico tumorale e non tumorale sono riportati nella Tabella 2 e sono espressi in numero assoluto  $\times 10^3$ . I valori assoluti misurati nel tessuto tumorale sono risultati superiori a quelli del tessuto non tumorale circostante: rispettivamente, miR-221 6.7 (0-596.7) versus 4.2 (0.3-183.4) e miR-222 24.2 (1.84-403.7) versus 19.5 (1.1-605.7). Il valore mediano della ratio tra l'espressione tumorale e non tumorale era 1.47 (0.018 – 21.95) per miR-221 e 1.22 (0.165 – 8.221) per miR-222.

Il valore di cut-off = 1 è stato scelto per identificare una sovraespressione di miR-221 e/o miR-222. Una sovraespressione statisticamente significativa è stata osservata in 33 (59%) e 29 (52%) casi per miR-221 e miR-222, rispettivamente. In particolare, il fold-change era sensibilmente superiore nei pazienti sovraesprimenti rispetto ai non sovraesprimenti (ratio <1): *average fold-change* per miR-221 era 2.7 (range 0.02 - 21.9; n=56) nell'intera popolazione, e 4.1 (range 1.15 - 21.9; n=34) nei sovraesprimenti ( $p < 0.0001$ ); per miR-222 era 1.6 (range 0.16 - 8.2; n=56) e 2.52 (range 1.05 - 8.2; n=30) nell'intera popolazione e nei sovraesprimenti, rispettivamente ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8).

		<i>Mediana (intervallo)</i>
miR-221*	Fegato	4.2 (0.3-183.4)
	Tumore	6.7 (0-596.7)
	Ratio	1.475 (0.018-21.95)
miR-222*	Fegato	19.5 (1.1-605.7)
	Tumore	24.2 (1.84-403.7)
	Ratio	1.220 (0.165-8.221)

\* Numero assoluto x 10

Tabella 2. Valori assoluti di espressione dei microRNA miR-221 e miR-222 nei campioni appaiati di tessuto epatico tumorale e non tumorale e ratio tra le rispettive coppie (n=56), espressi come mediana (range).

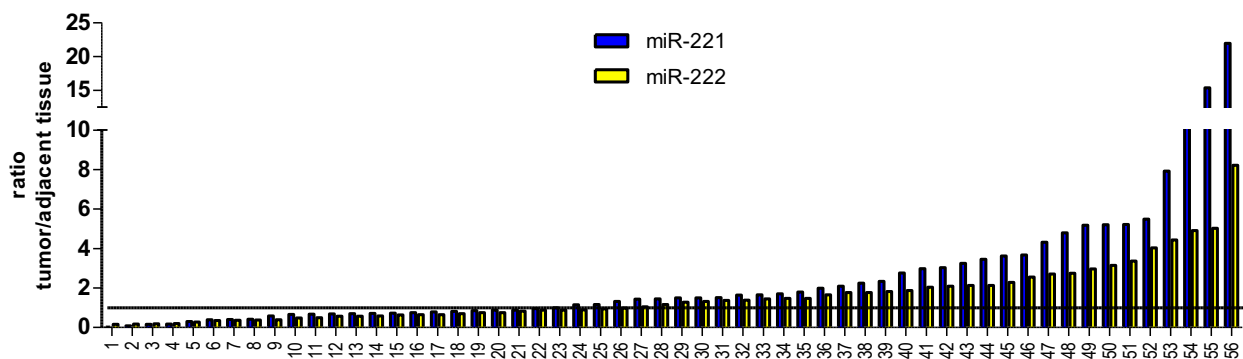


Figura 8. Istogramma che dimostra il rapporto tra l'espressione di miR-221 (blu) e miR-222 (giallo) nel tumore e nel tessuto non tumorale nei 56 campioni appaiati di tessuto epatico (linea nera indica il cut-off =1). I dati sono rappresentati come *fold-change* tra l'espressione media nel tessuto tumorale e peri-tumorale.

### *Associazione dell'espressione di miR-221 e miR-222 con altri fattori prognostici*

Mediante il test di correlazione di Spearman, è stata analizzata la relazione tra le diverse espressioni tissutali di miR-221 e miR-222 e alcuni parametri clinico-patologici noti per essere fattori prognostici negativi nell'HCC, quali l'AFP, il grado di differenziazione, la presenza di invasione microvascolare (mVI), il numero di noduli e lo stadio BCLC (Tabella 3).

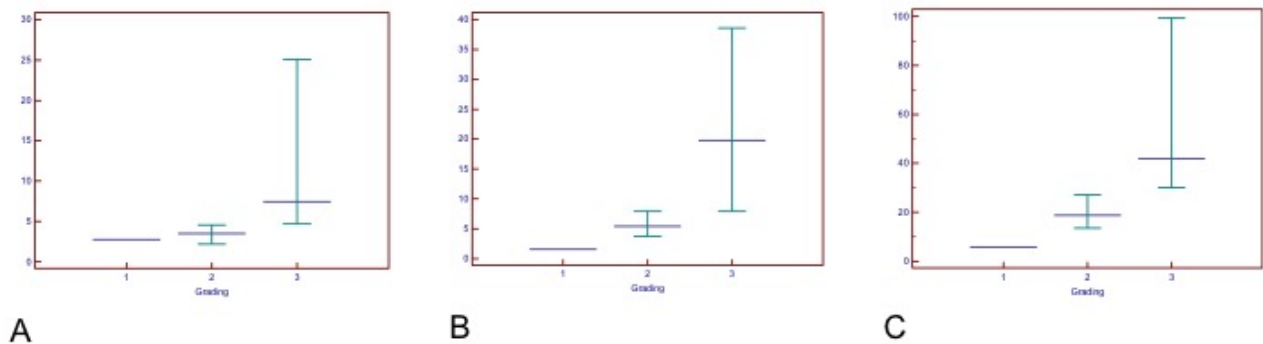
L'espressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto tumorale era associata con un più avanzato grado di differenziazione ( $p = 0.0012$ ), così come l'espressione di miR-221 nel tessuto epatico peritumorale. Questa associazione non è stata osservata per i valori di ratio (Grafico 1).

Non è stata osservata alcuna correlazione tra l'espressione di miR-221 e miR-222 e gli altri fattori prognostici.

Variabili	miR-221			miR-222		
	ratio	fegato	tumore	ratio	fegato	tumore
AFP	0.42	0.95	0.84	0.30	0.16	0.94
Grado diff.	0.43	<b>0,0065</b>	<b>0,0012</b>	0.17	0.06	<b>0,0012</b>
mVI	0.36	0.18	0.68	0.21	0.10	0.67
BCLC	0.30	0.54	0.33	0.16	0.09	0.10
N° noduli	0.55	0.30	0.60	0.73	0.46	0.53

Abbreviazioni: Alfafetoproteina (AFP); Grado di differenziazione; invasione microvascolare (mVI); Stadio Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC).

**Tabella 3. Associazione tra l'espressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico tumorale, non tumorale e loro ratio con alcuni noti fattori prognostici negativi per HCC. L'associazione è espressa come p value, considerato significativo se <0.05.**



**Grafico 1. Associazione tra i tre gradi di differenziazione di Edmondson e Steiner e l'espressione di miR-221 nel tessuto epatico non tumorale (A), miR-221 nel tessuto epatico tumorale (B) e miR-222 nel tessuto epatico tumorale (C). Valori di miR-221 e miR-222 in ordinate espressi come mediana e range.**

### *Sopravvivenza a lungo termine*

Il follow up mediano nell'intera popolazione era 38.3 mesi (95%IC 28.78-47.81). La sopravvivenza globale o OS (overall survival) a 1, 3 e 5 anni era 89.0%, 64.6% e 59.7%, rispettivamente. La sopravvivenza libera da malattia o RFS (recurrence free survival) a 1 e 3 anni era 67.9% e 34.6%, rispettivamente.

### *Analisi univariata e multivariata per la sopravvivenza libera da malattia*

All'analisi univariata, le variabili associate ad una peggiore RFS in maniera significativa erano l'età, il sesso maschile, il diametro massimo del tumore, il miR-221 ratio e miR-222 ratio. Questi fattori sono stati quindi utilizzati per l'analisi multivariata che ha identificato l'età (HR 0.42; 95% IC 0.18 – 0.96; p=0.042) e il miR-222 ratio (HR 1.56; 95% IC 1.21 - 2,01; p=0.0006) come fattori prognostici indipendenti di una peggiore sopravvivenza libera da malattia (Tabella 4).

	<i>Univariata</i>		<i>Multivariata</i>	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
Età	0.947 (0.911-0.986)	.0079		
Sesso (maschile)	0.366 (0.129-1.036)	.0137	0.419 (0.182-0.966)	.042
Eziologia (HCV)	1.102 (0.472-2.570)	.82		
AFP ng/mL	1.000 (1.000-1.000)	.567		
Grado di diff. (G3)	1.398 (0.560-3.487)	.440		
Invasione vasc. (si)	1.976 (0.805-4.846)	.201		
N° noduli (multiplo)	1.445 (0.549-3.803)	.411		
Diametro massimo	1.0065 (1.0005-1.0125)	.035		
Stadio BCLC (B-C)	1.999 (0.734-5.449)	.104		
Criteri Milano (Out)	1.260 (0.531-2.989)	.494		
miR-221 fegato	1.001 (0.989-1.013)	.844		
miR-221 tumore	0.997 (0.988-1.007)	.564		
miR-221 ratio	1.196 (1.075-1.330)	.001		
miR-222 fegato	0.996 (0.988-1.005)	.361		
miR-222 tumore	0.998 (0.991-1.005)	.523		
miR-222 ratio	1.576 (1.239-2.005)	.0002	1.5618 (1.214-2.009)	.0006

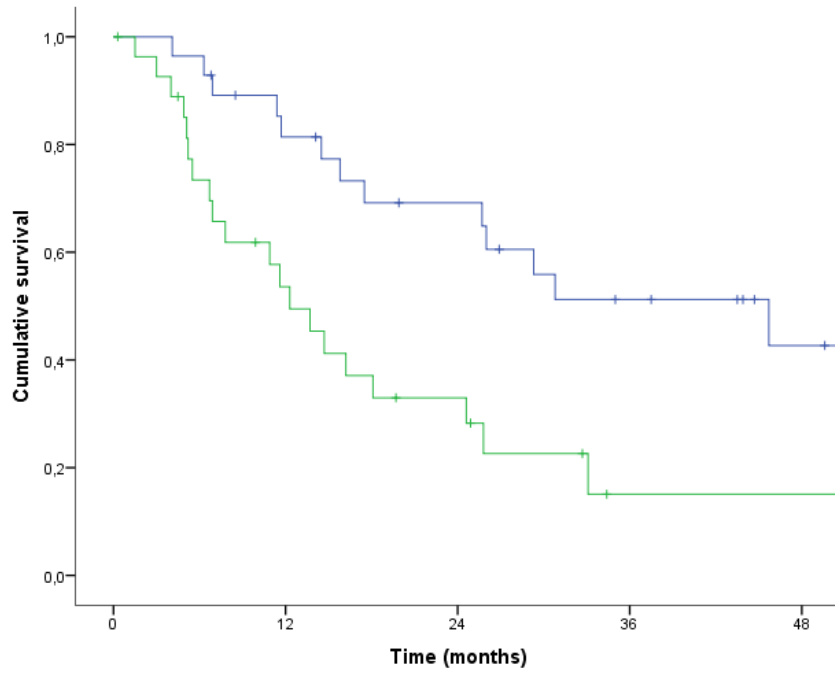
Tabella 4. Analisi univariata e multivariata per la sopravvivenza libera da malattia (RFS); Hazard Ratio (HR).

### *Analisi con la curva ROC*

Preso il miR-222 ratio come principale fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza libera da malattia, è stata costruita una curva ROC (receiving operating characteristic curve) allo scopo di identificare un cut-off predittivo del rischio di recidiva a due anni dalla resezione. L'area sotto la curva (AUC) ottenuta era 0.74 (95% IC 0.57 – 0.87) con una  $p = 0.005$  e il cut-off identificato per miR-222 era  $> 1.16$  (indice di Youden  $J = 0.61$ ). La sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con valori di miR-222 ratio al di sopra o al di sotto del cut-off è stata quindi studiata con le curve di Kaplan-Meier sia nella popolazione totale, sia suddividendo la popolazione in diversi gruppi in base allo stadio BCLC.

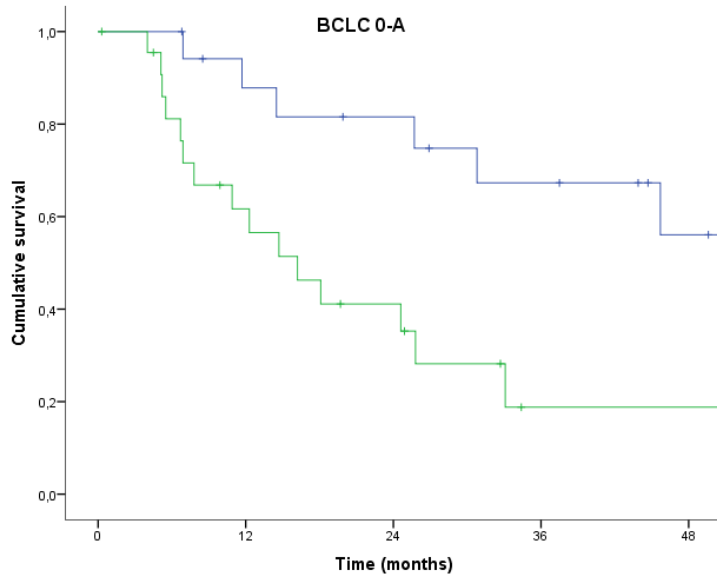
Nell'intera popolazione, miR-222 ratio  $>1.16$  è associato a una RFS più breve: RFS mediano 12.3 mesi versus 45.7 mesi (17.48-73.92) nel gruppo miR-222  $\leq 1.16$ . L'HR per miR-222  $>1.16$  era 4.54 (95% IC 1.95 - 10,5;  $p=0.0003$ ) (Grafico 2). La RFS a 1 e 3 anni per miR-222 ratio  $>1.16$  era 53.6% e 15.1%. La RFS a 1 e 3 anni per miR-222 ratio  $\leq 1.16$  era invece 81.4% e 51.2%, rispettivamente.

Una differenza significativa tra i sottogruppi miR-222 ratio  $>1.16$  e  $\leq 1.16$  è stata osservata anche dopo stratificazione dei pazienti in base allo stadio BCLC. Nei pazienti in stadio iniziale BCLC 0-A, la RFS mediana era rispettivamente 16,2 mesi (8.0 - 24.4) versus *NR* (not reached) con un HR = 5.11 (95% IC 1.84 - 14,17) e una  $p = 0.0038$ . Nei pazienti in stadio più avanzato BCLC B-C, la RFS mediana era rispettivamente 4.9 mesi (0.8 – 8.9) e 17.5 mesi (3.3 – 31.7) con un HR = 6.04 (95% IC 1.12 – 32.49) e una  $p = 0.0039$  (Grafici 3 e 4).

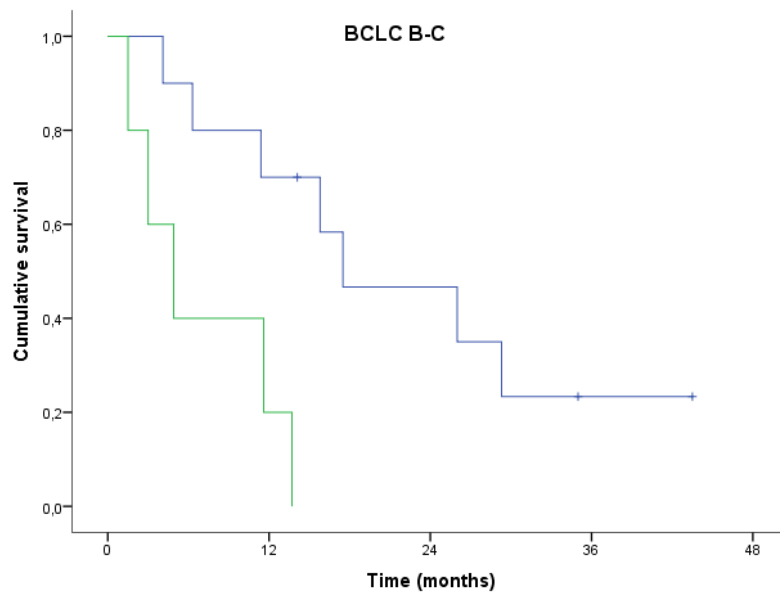


$\le 1.16$	28	21	16	10	5
$> 1.16$	28	13	7	1	1

**Grafico 2.** Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meyer che mostra la sopravvivenza libera da malattia (RFS) nei due sottogruppi miR-222 ratio  $> 1.16$  (linea verde) e  $\le 1.16$  (linea blu).



**Grafico 3.** Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier che mostra la sopravvivenza libera da malattia (RFS) nei pazienti in stadio iniziale (BCLC 0-A) nei due sottogruppi miR-222 ratio  $>1.16$  (linea verde) e  $\le 1.16$  (linea blu).



**Grafico 4.** Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier che mostra la sopravvivenza libera da malattia (RFS) nei pazienti in stadio più avanzato (BCLC B-C) nei due sottogruppi miR-222 ratio  $>1.16$  (linea verde) e  $\le 1.16$  (linea blu).



## *Valore prognostico della sovraespressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico tumorale: revisione della letteratura*

Allo scopo di inquadrare in prospettiva i risultati del presente studio, è stata eseguita una revisione sistematica della letteratura secondo le linee guida PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses)<sup>26</sup> dall'inizio fino a settembre 2017 usando i database Pubmed, Scopus e Embase.

Per ottenere articoli originali che analizzano l'espressione tissutale epatica o circolante nel sangue dei microRNA miR-221 e miR-222, sono stati usati i seguenti termini: [microRNA-221], [microRNA-222], [miR-221], [miR-222] e [liver cancer], [HCC], [hepatocellular carcinoma].

Sono stati esclusi: abstracts congressuali, commenti editoriali, studi senza dati completi, studi non riguardanti l'epatocarcinoma, studi non riguardanti i miR-221 e/o miR-222, studi su colture cellulari o modelli animali, studi duplicati, articoli non in lingua inglese. Le referenze bibliografiche sono inoltre state valutate per identificare eventuali ulteriori articoli non precedentemente inclusi.

Sono stati estratti i seguenti dati: autore, anno e paese di pubblicazione, microRNA studiato, tipo di campione per l'analisi e controlli, epatopatia di base, numero di pazienti, cut-off di sovraespressione, follow up mediano, eventi recidiva e RFS (con hazard ratio, 95% CI e p value).



## PRISMA 2009 Flow Diagram

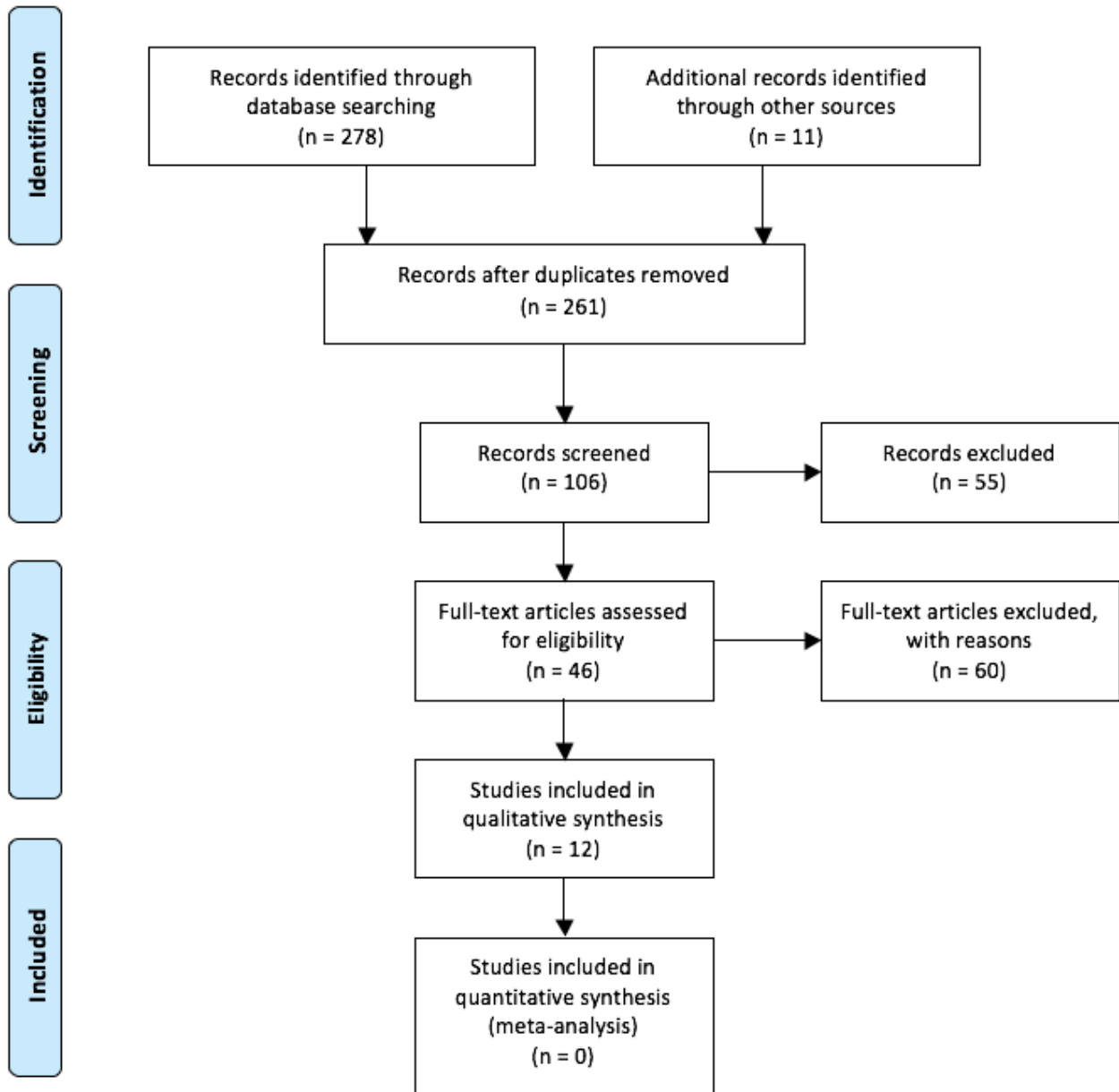


Figura 10. Diagramma di flusso della ricerca terminologica per lo studio del valore prognostico della sovraespressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico di pazienti con HCC, secondo le linee guida PRISMA per revisioni sistematiche e meta-analisi. Tratto da Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. Doi:10.1371/journal.pmed1000097.

Sono stati inclusi 12 articoli focalizzati sull'analisi di espressione di miR-221 e miR-222 o di una piccola serie di microRNA (Tabella 5) pubblicati nel corso degli ultimi dieci anni<sup>27-38</sup>. Wong et al. e Ladeiro et al. sono partiti dall'analisi rispettivamente di 156 e oltre 250 microRNA, per poi restringere il campo a pochi nella fase di studio su campioni di tessuto umano. In tutti i casi, il tumore epatico studiato era l'epatocarcinoma. Gao et al. si è focalizzato solamente sui noduli di HCC di meno di 2 cm (stadio BCLC 0). Inoltre alcuni studi hanno valutato la loro espressione anche nell'epatocolangiocarcinoma<sup>32</sup>, nei noduli displastici<sup>29</sup> e negli adenomi<sup>30</sup>.

La tabella 5 riporta alcuni dati estratti dai dodici protocolli: tutti gli studi hanno valutato sia l'espressione assoluta di microRNA su tessuto epatico tumorale e corrispondente non tumorale sia la loro espressione relativa. L'analisi è stata eseguita su tessuto fresco congelato (n=8) o su FFPE (n=3). Alcuni hanno eseguito ulteriori analisi di estrazione su controlli sani (n=4), su noduli displastici (n=1) e su fegato cirrotico (n=2). In nessun protocollo sono stati riscontrati problemi nella fase di estrazione o quantificazione relativi alla stabilità dei microRNA tissutali.

L'epatopatia di base era HBV-relata in 370 pazienti (42.6%) e HCV-relata in 77 (8.5%).

La sovraespressione di miR-221 era significativa nel 59 – 90% dei pazienti, con una media di 67.3% (SD +/-19.4) e una mediana di 67.1% (range 28.6 – 90.0)<sup>27-32,34,35,37,38</sup>. La sovraespressione di miR-222 era significativa in 52 – 85% dei casi, con una media di 61.2% (SD +/- 15.8) e una mediana di 54% (range 52.0 – 85.0)<sup>27,32,32,36,38</sup>.

<i><b>Autore</b></i>	<i><b>Paese</b></i>	<i><b>Anno</b></i>	<i><b>N° Pazienti</b></i>	<i><b>miRNA</b></i>	<i><b>Campione</b></i>	<i><b>Controllo</b></i>	<i><b>Eziologia</b></i>
Baek S. <sup>27</sup>	Korea	2015	20	221/222	.	non-T	HBV (18/20)
Fu X. <sup>28</sup>	Cina	2011	100	221	FF	non-T	HBV (83/100)
Gao P. <sup>29</sup>	Cina	2011	29	221	FFPE	non-T, ND	HBV (29/29)
Gramantieri L. <sup>30</sup>	Italia	2007	60	221	FF	non-T	HBV (11/60) HCV (44/60)
Gramantieri L. <sup>31</sup>	Italia	2009	51	221	FF	non-T	HBV (6/51) HCV (37/51)
Karakatsanis A. <sup>32</sup>	Grecia	2013	60	221/222	FFPE	controlli sani	HBV (26/60) HCV (4/60)
Ladeiro Y. <sup>33</sup>	Francia	2008	55	222	FF	controlli sani	.
Li W. <sup>34</sup>	Cina	2008	78	221/222	FF	non-T controlli sani	.
Rong M. <sup>35</sup>	Cina	2013	76	221	FFPE	non-T	.
Wong QW. <sup>36</sup>	Cina	2010	99	222	FF	non-T	HBV (99/99)
Xie D. <sup>37</sup>	Cina	2017	70	221	FF	non-T	.
Yoon SO. <sup>38</sup>	Cina	2011	115	221/222	FFPE	non-T controlli sani	HBV (101/115) HCV (7/115)
Presente Studio	Italia	2017	56	221/222	FF	non-T	HBV (14/56) HCV (19/56)

**Tabella 5. Tabella riassuntiva degli studi pubblicati sull'espressione di miR-221 e miR-222 nel tessuto epatico tumorale. Abbreviazioni: Fresh Frozen tissue (FF); Formaline Fixed Paraffin Embedded (FFPE); non-tumorale (non-T); noduli displastici (ND).**

La tabella 6 riporta il valore di significatività e il cut-off di sovraespressione identificati per ogni serie, con un range variabile da 1.16 a 6.37. Non è stato identificato un metodo comune di scelta del cut-off: la media o mediana di sovraespressione<sup>30,32,35</sup>, un valore di average fold change (AFC) =2<sup>27,36,38</sup>, oppure un valore ottenuto mediante curva ROC, come nel presente studio<sup>34,37</sup>.

<b>Autore</b>	<b>Sovraespressione miR-221 (%)</b>	<b>AFC miR-221</b>	<b>Sovraespressione miR-222 (%)</b>	<b>AFC miR-222</b>	<b>p</b>	<b>Cut-off</b>
Baek S. <sup>27</sup>	90.0	10.0 (±1.9)	85.0	5.6 (±1.0)	.	2.00
Fu X. <sup>28</sup>	83.0	.	n.v.	.	<0.01	.
Gao P. <sup>29</sup>	.	.	n.v.	.	0.006	.
Gramantieri L. <sup>30</sup>	83.0	.	n.v.	.	0.034	1.49
Gramantieri L. <sup>31</sup>	70.0	.	n.v.	.	.	.
Karakatsanis A. <sup>32</sup>	.	4.82 (±3.58)	.	3.01 (±2.01)	.	4.82
Ladeiro Y. <sup>33</sup>	n.v.	.	.	.	<0.01	.
Li W. <sup>34</sup>	.	.	.	.	<0.05	1.57 (miR221) 1.40 (miR222)
Rong M. <sup>35</sup>	.	1.86 (±0.39)	n.v.	.	0.001	1.86
Wong QW. <sup>36</sup>	n.v.	9.01 - 100	55.0	.	<0.0001	2.00
Xie D. <sup>37</sup>	64.3	.	n.v.	.	<0.01	1.80
Yoon SO. <sup>38</sup>	60.9	4.0	53.0	4.44	<0.001	2.00
Presente Studio	59.0	1.2 – 7.9	52.0	1.2 – 5.0	<0.05	1.16

**Tabella 6. Studi riportanti la % di sovraespressione, average fold change (AFC), p value e cut-off di miR-221 e miR-222. Abbreviazioni: Non valutato (n.v.); Average fold change (AFC).**

I risultati sulla sopravvivenza a lungo termine sono riportati nella tabella 7: i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi, ad alta o bassa espressione dei miR-221 o miR-222, sulla base del valore di cut-off precedentemente identificato. La presenza di un'elevata espressione di miR-221/222 è significativamente associata ad una prognosi peggiore: p tra 0.002 e 0.012<sup>32-38</sup>. La sovraespressione di miR-221 e miR-222 è inoltre associata a un RFS significativamente più breve, con una p tra 0.0003 e 0.011<sup>35,36,38</sup> similmente a quanto riscontrato nel presente studio.

<b>Autore</b>	Gramantieri L. <sup>31</sup>	Karakatsanis A. <sup>32</sup>	Rong M. <sup>35</sup>	Wong QW. <sup>36</sup>	Xie D. <sup>37</sup>	Yoon SO. <sup>38</sup>	Presente Studio
<b>Espressione Alta/Bassa (n)</b>	21 / 25	.	24 / 24	52 / 24	45 / 25	30 / 85	28 / 28
<b>OS a 5anni (Alta v. Bassa)</b>		28.6 v. 76.9			6.7 v. 24.0		
<b>P</b>		0.03 <sup>a</sup>			<0.05		
<b>HR</b>		0.58		3.12	1.74		
<b>(95% CI)</b>		(0.40-0.76)		(1.41-5.55)	(1.00-3.77)		
<b>P</b>		0.002		0.003	0.012		
<b>RFS mediana (Alta v. Bassa)</b>			5.55 v. 7.75				12.3 v. 45.7
<b>P</b>			0.129				<0.0001
<b>HR</b>				2.21		3.07	4.54
<b>(95% CI)</b>				(1.19-3.83)		(1.56-6.07)	(1.95-10.50)
<b>P</b>	0.0009			0.011		<0.001 <sup>a</sup>	0.0003

Tabella 7. Studi riportanti la correlazione significativa con altri fattori prognostici negativi e i risultati di sopravvivenza totale (OS) e libera da recidiva (RFS) nei pazienti con alta e bassa espressione di miR-221 e miR-222. Hazard Ratio (HR); Intervallo di confidenza (95% CI) e p value. <sup>a</sup>solo miR-221.

La tabella 8 riporta la correlazione tra la sovraespressione di miR-221 e miR-222 e alcuni noti fattori prognostici negativi: è stata riportata un'associazione con uno stadio più avanzato di malattia, con tumori di diametro >5 cm, multifocali, con la presenza di metastasi extraepatiche, di infiltrazione capsulare e cirrosi. Yoon et al. ed il presente studio hanno dimostrato invece la sola associazione con un crescente grado di differenziazione.

<b><i>Variabile</i></b>	<b><i>Correlazione con sovraespressione di miR-221/222 (p&lt;0.05)</i></b>
<b>tumore &gt;5cm</b>	Fu X. <sup>28</sup>
<b>metastasi</b>	Fu X. <sup>28</sup> ; Rong M. <sup>35</sup> ; Xie D. <sup>37</sup>
<b>multifocalità</b>	Gramantieri L. <sup>31</sup>
<b>Grado di diff.</b>	Yoon SO. <sup>38 a</sup> ; Presente studio
<b>Stadio BCLC</b>	Karakatsanis A. <sup>32</sup> ; Rong M. <sup>35</sup> ; Wong QW. <sup>36</sup> ; Xie D. <sup>37</sup>
<b>Infiltrazione capsula</b>	Rong M. <sup>35</sup>
<b>Cirrosi</b>	Karakatsanis A. <sup>32</sup>

**Tabella 8.** Studi che hanno dimostrato una correlazione tra la sovraespressione di miR-221/222 e alcuni fattori prognostici negativi clinicopatologici. <sup>a</sup>solo per miR-221.

## ***Discussione***

La serie presentata in questo studio prospettico monocentrico dimostra la presenza di una significativa sovraespressione di miR-221 e miR-222 rispettivamente nel 59% e 52% campioni appaiati di tessuto epatico tumorale/non tumorale prelevati da soggetti con HCC sottoposti a intervento chirurgico resettivo. Questi valori di espressione sono ai limiti inferiori di quelli riportati in letteratura che variano tra il 60-90% e tra il 53-85% per miR-221 e miR-222 rispettivamente.

Tali differenze potrebbero essere dovute alle ridotte dimensioni del campione di casi analizzati in ciascuna serie e a variazioni nelle metodiche di estrazione. Sono inoltre state ipotizzate variazioni inter-geografiche. La presente è una delle poche serie occidentali a valutare l'espressione di miR-221 e 222, dopo quella di Gramantieri et al. e Karakatsanis et al.<sup>30-32</sup> mentre sono stati pubblicati dati provenienti da Cina e Korea<sup>27,32,34,36,38</sup>. Uno studio francese pubblicato da Ladeiro et al. ha valutato miR-222 riportando una sovraespressione significativa, ma senza riportare dati precisi riguardo fold change e cut-offs<sup>33</sup>.

Tra le serie occidentali e orientali, appare evidente la differenza nell'epatopatia di base che è principalmente HCV-relata nelle prime e HBV-relata nelle seconde. Nonostante questo, la presenza di una sovraespressione significativa in tutti gli studi tuttavia fa pensare che una deregolazione di miR-221/222 sia uno step costante nell'epatocarcinogenesi indipendentemente dall'eziologia dell'epatopatia.

Nella nostra serie, all'analisi multivariata, soltanto la sovraespressione di miR-222 era correlata ad una prognosi peggiore in termini di RFS (HR 4.5), con una stratificazione dei pazienti anche nella subanalisi in base allo stadio BCLC. In letteratura altri 3 studi hanno valutato l'associazione con la sopravvivenza libera da malattia in pazienti con alta o bassa espressione: Rong et al. non hanno trovato una differenza significativa ma il campione era piccolo con un follow up molto breve<sup>35</sup>; Wong



et al. e Yoon et al. al contrario hanno confermato l'esistenza di una peggiore RFS in pazienti ad alta espressione con un HR rispettivamente di 2.2 e 3.0<sup>36,38</sup>.

Nel presente studio è stata utilizzata la curva ROC per identificare un cut-off di sovraespressione di miR-221, pari a >1.16. La sovraespressione di miR-222 era correlata al grado di differenziazione ma non ad altri noti fattori prognostici negativi. Questo è stato osservato anche da Yoon et al<sup>38</sup>, mentre gli altri studi identificati nella revisione sistematica hanno osservato una correlazione più frequente di miR-221/222 con lo stadio di malattia e la presenza di metastasi.

Nella presente serie, l'espressione di miR-221 (ma non di miR-222) nel tessuto peritumorale correla con il grado di differenziazione del tumore; ciò suggerisce che la modulazione di questo microRNA sia un evento precoce nel processo di epatocarcinogenesi e nell'acquisizione di un fenotipo indifferenziato delle cellule di HCC.

Questo studio prospettico suggerisce che la valutazione di miR-221 e miR-222 sul pezzo operatorio potrebbe fornire un dato utile a fini prognostici per identificare i pazienti a più alto rischio di recidiva. In questo modo si potrebbe identificare quali pazienti dovrebbero essere sottoposti a un follow up più stretto nell'ottica ideale e sempre più attuale dei trattamenti "personalizzati".

Questo studio presenta alcuni limiti. Il primo tra questi è la ridotta dimensione del campione, dovuta al fatto che i campionamenti di tessuto sono stati eseguiti solo su pazienti resecabili, i quali rappresentano una piccola porzione di tutti i malati di epatocarcinoma. Nei pazienti con stadio avanzato si potrebbe ottenere materiale per estrazione mediante biopsia epatica. Tuttavia, i criteri diagnostici attuali dell'HCC su cirrosi/epatopatia cronica non prevedono l'esecuzione di una biopsia epatica percutanea e l'esecuzione di una procedura invasiva a scopo di ricerca non è eticamente accettabile esponendo i pazienti a rischio inaccettabile di complicanze.

Ulteriori studi volti a confermare una correlazione tra l'espressione tissutale e circolante di miR-221 e miR-222 potrebbero fornire una base scientifica per utilizzare in futuro come alternativa meno invasiva la valutazione dei microRNA circolanti. Tale correlazione è stata studiata da Wen et al. per altri microRNA epatici<sup>39</sup> ma non è mai stata dimostrata in letteratura per miR-221 e miR-222. Questi microRNA epatici circolanti potrebbero quindi essere studiati come possibili biomarker surrogati dell'espressione tissutale.

## ***Conclusioni***

Una buona percentuale di pazienti affetti da HCC sottoposti a intervento chirurgico resettivo presenta una deregolazione di miR-221 e miR-222, con una sovraespressione di tali microRNA nel tessuto epatico tumorale rispetto al corrispondente tessuto non tumorale.

La sovraespressione di miR-222, con un cut-off  $>1.16$ , è un fattore prognostico indipendente per una peggiore sopravvivenza libera da recidiva, un fattore che si conferma sia nei tumori in stadio iniziale che in stadio avanzato. Tale sovraespressione è correlata al grado di differenziazione tumorale e potrebbe essere usata a scopo prognostico per identificare i pazienti a maggior rischio di recidiva dopo resezione.

Il presente studio e la revisione della letteratura hanno dimostrato il potenziale uso a scopo diagnostico e prognostico di miR-221 e miR-222 espressi a livello tissutale nell'HCC. Ulteriori studi prospettici su campioni più numerosi e su stadi più avanzati sono necessari per validare questi risultati.

## **Bibliografia**

1. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis. Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l.*; 2010 Jul;42 Suppl 3:S206–14
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132:2557–76
3. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*. *N Engl J Med*; 1997;336:1855–9.
4. Ryder SD. Chronic hepatitis C - what do the new drugs offer and who should get them first? *Clin Med* April 1, 2015 vol. 15 no. 2197-200. doi: 10.7861/clinmedicine.15-2-197
5. Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AET, Shih JW-K, Gojobori T, et al. A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov;99:15584–9.
6. Mizokami M, Tanaka Y, Miyakawa Y. Spread times of hepatitis C virus estimated by the molecular clock differ among Japan, the United States and Egypt in reflection of their distinct socioeconomic backgrounds. *Intervirology*. 2006 Jan;49:28–36.
7. Cholankeril G, Patel R, Khurana S, Satapathy SK. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. *World J Hepatol*. 2017 Apr 18;9(11):533-543. doi: 10.4254/wjh.v9.i11.533.
8. AIRTUM Working Group, Italian cancer figures--Report 2015: The burden of rare cancers in Italy. *Epidemiol Prev*. 2016 Jan-Feb;40(1 Suppl 2):1-120. doi: 10.19191/EP16.1S2.P001.035.
9. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging

- classification. *Semin Liver Dis.* 1999 Jan;19:329–38.
10. Forner A, Llovet JM, Bruix J Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012 Mar 31;379(9822):1245-55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0.
  11. Reig M, Darnell A, Forner A, Rimola J, Ayuso C, Bruix J. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: the issue of treatment stagemigration and registration of progression using the BCLC-refined RECIST. *Semin Liver Dis.* 2014 Nov;34(4):444-55. doi: 10.1055/s-0034-1394143.
  12. European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908-943.
  13. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008 Nov;359:1995–2004.
  14. Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T., and Jewell, D. (2003b). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13, 807–818.
  15. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
  16. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012 Mar;4(3):143-59. doi: 10.1002/emmm.201100209.
  17. Noma K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D., and Grewal, S.I. 2004. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat. Genet.* 36: 1174–1180.
  18. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA-and

- siRNA-induced RNA silencing. *Rna* 10 (3), 544-550.
19. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14. 10.1038/nrg2290.
  20. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009 Jan;19(1):92-105. doi: 10.1101/gr.082701.108.
  21. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008;47(6):1955–63.
  22. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese a, Sabbioni S, Calin G a, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2008;27(43):5651–61.
  23. Ning T, Zhang H, Wang X, Li S, Zhang L, Deng T, Zhou L, Wang X, Liu R, Bai M, Ge S, Li H, Huang D, Ying G, Ba Y. miR-221 and miR-222 synergistically regulate hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 to promote cell proliferation and migration in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2017 Jun;39(6):1010428317701636. doi: 10.1177/1010428317701636.
  24. Santhekadur PK, Das SK, Gredler R, et al. Multifunction protein staphylococcal nuclease domain containing 1 (SND1) promotes tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma through novel pathway that involves nuclear factor kappaB and miR-221. *J Biol Chem.* 2012;287:13952–13958.
  25. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004; 240(2): 205–13.

26. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097
27. Baek S, Cho KJ, Ju H-L, Moon H, Choi SH, Chung SJ, et al. Analysis of miRNA expression patterns in human and mouse hepatocellular carcinoma cells. *Hepatol Res*. 2015;45(13):1331–40.
28. Fu X, Wang Q, Chen J, Huang X, Chen X, Cao L, et al. Clinical significance of miR-221 and its inverse correlation with p27 Kip1 in hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2011;38(5):3029–35.
29. Gao P, Wong CCL, Tung EKK, Lee JMF, Wong CM, Ng IOL. Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2011;54(6):1177–84. doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.023
30. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a MicroRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007;67(13):6092–9.
31. Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5073-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0092.
32. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma

- or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog.* 2013 Apr;52(4):297-303. doi: 10.1002/mc.21864.
33. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology.* 2008 Jun;47(6):1955-63. doi: 10.1002/hep.22256.
34. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, Wu J, Guo Y, Ma X, Zhang P, Pan Z, Hu X, Zhao Y, Xie H, Jiang G, Chen T, Wang J, Zheng S, Cheng J, Wan D, Yang S, Li Y, Gu J. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 1616-1622. doi: 10.1002/ijc.23693
35. Rong M, Chen G, Dang Y. Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. *BMC Cancer.* 2013 Jan 16;13:21. doi: 10.1186/1471-2407-13-21.
36. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res.* 2010 Feb 1;16(3):867-75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1840. Epub 2010 Jan 26. PubMed PMID: 20103675.
37. Xie D, Yuan P, Wang D, Jin H, Chen H. Expression and prognostic significance of miR-375 and miR-221 in liver cancer. *Oncol Lett.* 2017 Aug;14(2):2305-2309. doi: 10.3892/ol.2017.6423. Epub 2017 Jun 20. PubMed PMID: 28781668; PubMed Central PMCID: PMC5530117.
38. Yoon SO, Chun SM, Han EH, Choi J, Jang SJ, Koh SA, Hwang S, Yu E. Deregulated expression of microRNA-221 with the potential for prognostic biomarkers in

surgically resected hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 2011 Oct;42(10):1391-400. doi: 10.1016/j.humpath.2010.12.010.

39. Wen Y, Han J, Chen J, Dong J, Xia Y, Liu J, Jiang Y, Dai J, Lu J, Jin G, Wei Q, Shen H, Sun B, Hu Z. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2015; 137: 1679-1690 doi: 10.1002/ijc.2954425845839.



## ***Ringraziamenti***

Ringrazio il Prof. Pier Maria Battezzati per avermi sostenuto dal primissimo giorno in cui ci siamo incontrati e per avermi accompagnato in qualità di tutor lungo tutto il percorso; la Prof.ssa Antonella d'Arminio Monforte e gli altri componenti del Collegio Docenti per avermi dato la possibilità di portare avanti un progetto di stampo chirurgico.

Ringrazio il Prof. Vincenzo Mazzaferro per avermi dato la possibilità di partecipare con autonomia crescente a tutte le fasi dello studio; il dott. Carlo Sposito per avermi aiutato nell'analisi dei dati e la dott.ssa Marilena Iorio per aver fatto da leader nell'estrazione di laboratorio, per il suo ruolo fondamentale nel risolvere i tanti problemi tecnici e l'aiuto nell'interpretazione dei risultati ottenuti; Il Prof. Irfan Ahmed per avermi incoraggiato e sostenuto nel portare avanti il progetto "scozzese".

Soprattutto ringrazio i miei genitori e Andrea per aver sempre creduto nelle mie potenzialità anche nei momenti più difficili.