



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI GENOVA

Tesi di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie in Medicina Traslazionale

XXXII ciclo

- Curriculum Chirurgia Traslazionale –

**Studio prospettico multicentrico traslazionale
di caratterizzazione dei miRNA
specificatamente espressi nel carcinoma colorettaie metastatico**

N. Registro CER Liguria: P.R. 098REG2017, approvato il 08.05.2017

N. Delibera Aziendale ASL n. 5 di La Spezia:576 del 27.06.2017

Candidata: Dr Elisa Francone

Tutor e Coordinatore del Dottorato: Chiar. mo Prof. Rodolfo Quarto

Tutor e Referente del Curriculum: Chiar. mo Prof. Marco Frascio

Università degli Studi di Genova
DIMES – Dipartimento di Medicina Sperimentale
DISC - Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate

Indice

Introduzione	4
Epidemiologia	4
Il carcinoma coloretale e le metastasi epatiche	5
<i>Il carcinoma coloretale metastatico, l'imaging e le "vanishing liver metastases"</i>	
Linee guida e pratica clinica: il sistema TNM	8
<i>Il sistema TNM e il "paradosso di sopravvivenza"</i>	
Biologia molecolare e biomarcatori	13
<i>I microsatelliti</i>	
<i>L'instabilità cromosomica</i>	
<i>La metilazione aberrante del DNA</i>	
<i>Antigeni tumorali nella pratica clinica</i>	
<i>Le vescicole extracellulari e l'environment tumorale</i>	
<i>I miRNA</i>	
Razionale e obiettivi del Progetto di Ricerca	22
Materiali e metodi	24
Protocolli di arruolamento	24
Protocolli di campionamento	27
<i>Biopsia liquida</i>	
<i>Biopsia solida</i>	
Protocolli di laboratorio	29
<i>Biopsia liquida</i>	
<i>Biopsia solida</i>	
Ricerca bibliografica e metodo statistico	31
Risultati	32
Risultati clinici	32
<i>Popolazione generale</i>	
<i>Popolazione suddivisa in gruppi</i>	
Risultati sperimentali	42
<i>Biopsia liquida</i>	
<i>Biopsia solida</i>	

Correlazione con la letteratura	55
<i>MiR-622</i>	
<i>MiR-4665-5p</i>	
<i>MiR-7109-5p</i>	
<i>MiR-7847-3p</i>	
<i>MiR-4778-5p</i>	
<i>MiR-3141</i>	
<i>MiR-7515</i>	
<i>MiR-6831-5p</i>	
<i>MiR-4669</i>	
<i>MiR-4800-5p</i>	
<i>MiR-4298</i>	
<i>MiR-4449</i>	
<i>MiR-324-3p</i>	
<i>MiR-22-3p</i>	
<i>MiR-155-5p</i>	
<i>MiR-150-5p</i>	
Discussione	62
Conclusioni	67
Prospettive future	68
Bibliografia	70

Introduzione e Razionale

Epidemiologia

Con oltre 1.8 milioni di nuovi casi per anno e una stima di 881.000 decessi nel 2018, il carcinoma coloretale (CCR) rappresenta la terza neoplasia maligna per incidenza nella popolazione maschile (circa il 10,9% del totale) e la seconda nella popolazione femminile (circa il 9,5% del totale), risultando la seconda causa di morte per cancro [1].

Prognosi, trattamento e follow-up dipendono dalla biologia del tumore e dallo stadio evolutivo al momento della diagnosi: nei pazienti con CCR in stadio iniziale e biologicamente poco aggressivi, la mera resezione endoscopica con eventuale dissezione mucosa o sottomucosa può essere risolutiva, con un overall survival a 5 anni (5y-OAS) vicino al 90%, mentre nei pazienti in stadio avanzato il 5y-OAS risulta ridotto al 12-17% [2] [3]. Quindi il riconoscimento e il trattamento precoci di questa patologia sono fondamentali al fine di ridurre la mortalità correlata.

Il carcinoma coloretale e le metastasi epatiche

Malgrado gli attuali protocolli di screening e di sorveglianza, approssimativamente il 50-60% dei pazienti con CCR sviluppa metastasi nel corso della propria malattia, più frequentemente epatiche (mCCR), [4] [5] [6] [7] [8] [9], nel 15-34% dei pazienti già presenti al momento della diagnosi (metastasi sincrone) [8] [10] [11]. Nei pazienti con metastasi epatiche e/o polmonari resecabili l'intervento chirurgico è considerato il trattamento di scelta [12] [13], restituendo un 5y-OAS superiore al 50% e una percentuale di "cura" - definita come sopravvivenza libera da malattia (DFS) - superiore a 10 anni che raggiunge il 35% [12] [14]. Sfortunatamente oltre l'80% delle mCCR non può essere resecato con intento curativo, con un 5y-OAS inferiore al 15% [8] [9]. D'altro canto, i pazienti affetti da mCCR sottoposti a sola chemioterapia presentano un OAS medio di 30 mesi, con DFS superiore a 10 anni eccezionale [14].

A riprova del potenziale di aggressività di questo tumore, la letteratura riporta che fino al 60-70% dei pazienti con mCCR sottoposti a resezione chirurgica sviluppa ripresa di malattia, più frequentemente entro due anni dall'intervento [15]. Tali recidive si manifestano solo nel 30% dei casi a livello epatico, e di questo piccolo gruppo di malati solo il 10-15% sarà candidato ad una nuova resezione chirurgica.

Visti gli importanti successi terapeutici dei moderni regimi chemioterapici e delle targeted therapies, solo il 10-25% dei pazienti con mCCR è candidato a

chirurgia immediata, nei restanti casi vengono applicati protocolli chemioterapici, neoadjuvanti nel caso di tumori resecabili d'emblée, o di conversione nel caso in cui l'intento sia tramutare pazienti inizialmente non operabili in potenziali candidati alla chirurgia [5] [12]. L'obiettivo cui tende la terapia sistemica neoadjuvante è ridurre le dimensioni delle lesioni per renderle aggredibili chirurgicamente, ma il ricorso alla multichemioterapia si associa a tossicità farmaco-indotta - steatoepatite per quanto riguarda l'utilizzo dello schema FOLFIRI e sindrome da ostruzione sinusoidale (nel 50-80% dei pazienti) con iperplasia nodulare rigenerativa per quanto riguarda l'utilizzo di FOLFOX - che può complicare gli outcomes postoperatori, e compromettere la capacità discriminatoria dell'imaging pre- ed intra-operatorio, andando a configurare il fenomeno radiologico delle "metastasi scomparse" [5] [16] [17], che si registra in oltre il 25% dei pazienti sottoposti a chemioterapia sistemica.

Il carcinoma coloretale metastatico: l'imaging e le "vanishing liver metastases"

Sebbene i protocolli di diagnosi e sorveglianza e gli avanzamenti tecnologici in ambito radiologico abbiano consentito un effettivo miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica, tuttavia questi soffrono di importanti limiti legati alla dimensione delle metastasi (cut-off discriminatorio 5mm) e alle caratteristiche del parenchima epatico che le ospita. Nei pazienti sottoposti a terapia neoadjuvante, l'epatotossicità indotta dai

chemioterapici, può determinare un insulto tale da condurre a steatosi e steatoepatite compromettendo l'uptake epatocitario del glucosio, con conseguente riduzione della sensibilità contrastografica di RMN, TC e PET, che ammonta rispettivamente al 85.5%, 69.9% e 54.5% [18] [19] [20].

Come risultato, ci troviamo a gestire lesioni più piccole in fegati meno indagabili, con un'incidenza di mCCR scomparse alla TC dopo chemioterapia vicina al 23-36% [5] [12] [14] [16] [18]. Di queste lesioni solo il 25-66% è identificabile all'esplorazione laparotomica con ecografia intraoperatoria [16]. Ma il tasso di remissione radiologica (che aumenta del 18% con ogni ciclo di chemioterapia) spesso non coincide con un'effettiva remissione patologica [5] [12] [18] e in alcune casistiche la persistenza patologica di malattia, micro e macroscopica, è stata dimostrata in oltre l'80% delle "metastasi scomparse", con un tasso di risposta effettiva del solo 9-17% [5] [21]. Pertanto, nel caso in cui la sede precedentemente occupata dalla metastasi non sia rimossa chirurgicamente o termoablata, si osserveranno percentuali di recidiva in situ a 1 anno di follow-up vicine al 78% [5].

Quindi le metodiche di imaging attualmente utilizzate nella pratica clinica possono concorrere a una diagnosi ritardata o alla sottostima della malattia, compromettendo lo scopo del regime di sorveglianza e fallendo nell'individuare i soggetti con celato ma effettivo rischio di sviluppare recidiva clinica di malattia.

Linee guida e pratica clinica: il sistema TNM

Il sistema TNM (tumor-node-metastasis) sviluppato dall'American Joint Committee on Cancer e dall'International Union Against Cancer [22] descrive la severità del CCR considerando la profondità di infiltrazione della parete del viscere da parte del tumore primitivo (T), la presenza di metastasi linfonodali (N) (il Panel raccomanda l'asportazione di almeno 12 linfonodi per poter allocare i pazienti nel corretto stadio) e la presenza di metastasi a distanza (M) (Tabella 1). Sulla scorta di questi tre parametri i pazienti vengono stratificati in differenti stadi prognostici.

Nell'ottava edizione del AJCC Staging Manual gli stadi I e II sono caratterizzati dall'infiltrazione localizzata della sola parete intestinale: entro la tonaca muscolare propria nello stadio I ($\leq T2$) e oltre la muscolare propria nello stadio II ($\geq T3$); nello stadio III e IV si osserva, rispettivamente, il coinvolgimento metastatico dei linfonodi locali (N+) e di organi a distanza (M+) (Tabella 2). In base alla severità dello stadio TNM i pazienti vengono inseriti in specifici protocolli terapeutici e schemi di sorveglianza clinico-strumentale [22] [23] [24].

Tabella 1. Classificazione TNM [22]

T	Tumore primitivo
TX	Tumore primitivo non definibile
T0	Tumore primitivo non evidenziabile
Tis	Carcinoma in situ: carcinoma intramucoso (coinvolge la lamina propria senza raggiungere muscolaris mucosae)
T1	Tumore che invade la sottomucosa (coinvolge la muscolaris mucosae senza raggiungere la muscolare propria)
T2	Tumore che invade la muscolare propria
T3	Tumore con invasione attraverso la muscolare propria nella sottosierosa o nei tessuti pericolici e perirettali non ricoperti da peritoneo
T4	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture e/o perfora il peritoneo viscerale
T4a	Tumore che perfora il peritoneo viscerale
T4b	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture
N	Linfonodi regionali
NX	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Non metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali
N1a	Metastasi in 1 linfonodo
N1b	Metastasi in 2-3 linfonodi
N1c	Depositi tumorali satelliti nella sottosierosa o nei tessuti non peritonealizzati pericolici e perirettali senza evidenza di metastasi linfonodali regionali
N2	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali
N2a	Metastasi in 4-6 linfonodi
N2b	Metastasi in 7 o più linfonodi
M	Metastasi a distanza
M0	M0 Assenza di metastasi a distanza
M1	M1 Metastasi a distanza
M1a	Metastasi confinate ad un organo (fegato, polmone, ovaio, linfonodi extraregionali) in assenza di metastasi peritoneali
M1b	Metastasi in più di un organo in assenza di metastasi peritoneali
M1c	Metastasi peritoneali

Tabella 2. Stadiazione TNM [22]

Stadio	Descrizione
Stadio 0	Tis, N0, M0
Stadio I	T1-2, N0, M0
Stadio IIA	T3, N0, M0
Stadio IIB	T4a, N0, M0
Stadio IIC	T4b, N0, M0
Stadio IIIA	T1-2, N1a-c, M0
	T1, N2a, M0
Stadio IIIB	T3-4a, N1a-c, M0
	T2-3, N2a, M0
	T1-2, N2b, M0
Stadio IIIC	T4a, N2a, M0
	T3-4a, N2b, M0
	T4b, N1-2, M0
Stadio IVA	Ogni T, ogni N, M1a
Stadio IVB	Ogni T, ogni N, M1b
Stadio IVC	Ogni T, ogni N, M1c

Il Sistema TNM e il “paradosso di sopravvivenza”

Per definizione, il sistema prognostico ideale dovrebbe comprendere una coorte omogenea di pazienti all'interno dello stesso stadio, garantendo una efficace discriminazione tra stadi diversi [25]. Tuttavia, sebbene il sistema TNM dell'AJCC sia da tempo universalmente riconosciuto ed adottato nella pratica clinica, l'osservazione che circa il 25-40% dei pazienti in stadio II (tumore confinato all'organo d'origine) sviluppa recidiva di malattia, più frequentemente nel primo anno dall'intervento chirurgico, e che alcuni pazienti con CCR in stadio II hanno prognosi peggiore rispetto ai pazienti in stadio III (tumori metastatici ai linfonodi regionali), ha fatto emergere non poche perplessità riguardo alla reale efficacia del sistema TMN nel predire

una corretta prognosi e quindi nel proporre un appropriato algoritmo terapeutico almeno per una certa popolazione di pazienti, delineando i fondamenti del cosiddetto “*paradosso di sopravvivenza*” [25] [26] [27] [28].

Il paradosso di sopravvivenza si configura per la considerazione che i pazienti con CCR T4N0 (stadio IIB/C) hanno prognosi peggiore rispetto ai T1-2N1 (stadio IIIA) ($p < 0.0001$), presentando maggior tendenza alla recidiva locale e a distanza e peggior 5y-OAS (rispettivamente 46-61% vs 70%) [27].

Non è ancora chiaro se tale paradosso possa essere spiegato dalla maggiore aggressività biologica dei CCR T4N0, oppure dall’appropriatezza della linfadenectomia effettuata durante l’intervento chirurgico con il possibile eventuale avanzamento di stadio, o ancora dall’esclusione della maggior parte dei pazienti in stadio <III ai regimi chemioterapici adiuvanti [28] [29] [30]. Infatti, mentre nei pazienti con stadio \geq III la chemioterapia è considerata il trattamento standard per ridurre l’incidenza di recidiva locale e a distanza, nei i pazienti in stadio \leq II veniva considerata curativa e quindi raccomandata la sola resezione chirurgica con linfadenectomia regionale.

Nel tentativo di ovviare a questo paradosso, gli aggiornamenti delle linee guida dell’AJCC hanno modificato le indicazioni alla terapia sistemica per i pazienti in stadio II che presentano fattori di rischio come: tumori T4 (stadi IIB/C), G3 (esclusi i tumori MSI-H), presenza di invasione linfovaskolare, occlusione e perforazione intestinale, margini di resezione positivi, linfadenectomia subottimale (< 12 linfonodi), per i quali, accanto ad un atteggiamento osservazionale, può essere considerata la chemioterapia

adjuvante, specie entro opportuni trials clinici [8] [22] [28] [29]. È ormai evidente però che stadio precoce non sempre significa migliori outcomes oncologici e che il sistema TNM è carente nel fornire informazioni esaustive riguardo alla biologia del tumore, chiave di volta nella comprensione delle dinamiche alla base della genesi e progressione tumorale.

Malgrado gli sforzi compiuti e i continui aggiornamenti delle linee guida, l'assenza di criteri semplici e affidabili che identifichino i pazienti con malattia precoce altamente suscettibili di recidiva rende difficile individuare i soggetti in cui la chemioterapia multifattoriale offrirebbe un beneficio di sopravvivenza [31].

La domanda è: il sistema TNM è fallace perché soffre di limiti legati all'imaging, al campionamento e all'analisi del pezzo operatorio oppure perché stima solo parzialmente la complessità biologica del tumore?

Biologia molecolare e biomarcatori

Secondo la definizione del National Institutes of Health Biomarker Definition Working Group, un marcatore biologico (biomarcatore) *“deve possedere la caratteristica di essere oggettivamente misurabile e utilizzabile come indicatore dei processi biologici, normali e patologici e/o come indicatore di risposta farmacologica a interventi terapeutici”* [32]. L’Organizzazione Mondiale della Sanità definisce come biomarcatore *“qualunque sostanza, struttura o processo che possa essere misurato nel corpo o nei suoi prodotti e che influenzi o predica l’incidenza degli outcomes della malattia”* [33]. Un biomarcatore prognostico influenza l’outcome del paziente indipendentemente dal trattamento, un biomarcatore predittivo identifica i pazienti che possono beneficiare di specifici trattamenti [34].

Il CCR è caratterizzato da alterazioni molecolari che coinvolgono svariati oncogeni e geni oncosoppressori responsabili della trasformazione neoplastica. Circa l’80% dei CCR è di tipo sporadico mentre il 20% è di tipo familiare o legato a sindromi genetiche [24].

Nella cancerogenesi del CCR si distinguono 3 principali vie di degenerazione: l’instabilità dei microsatelliti, l’instabilità cromosomica e la metilazione aberrante del DNA.

I microsatelliti

I microsatelliti sono brevi sequenze di DNA normalmente presenti nel genoma umano. In caso di stabilità dei microsatelliti (MSS) il gruppo di 5 marcatori dei microsatelliti (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) è regolarmente espresso. A causa di specifiche mutazioni i microsatelliti possono risultare più lunghi o più corti, rendendo il DNA instabile. L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è causata da un deficit del DNA mismatch repair ed è presente nel 15% dei CCR sporadici e in oltre il 95% dei casi di Lynch (CCR ereditario non poliposico). A seconda dell'estensione dell'instabilità, la MSI si distingue in: instabilità a bassa frequenza (MSI-L), in cui cambia un solo marcatore e instabilità ad alta frequenza (MSI-H), in cui cambiano più di due marcatori [28].

Una recente metanalisi condotta su 31 trials clinici comprensivi di 12782 pazienti con CCR in stadio I-IV mostra che la presenza di MSI-H correla con una prognosi migliore in termini di OAS (OR=0.6, 95% CI 0.53-0.69, $p<0.0001$) e DFS (OR=0.58, 95% CI 0.47-0.72, $p<0.0001$) [35], e che MSI-H è più frequente negli stadi precoci rispetto ai tardivi (stadio II 22%, stadio III 12% $p<0,001$, stadio IV 3.5%).

I pazienti con CCR in stadio II-III MSS o MSI-L beneficiano della terapia con 5-fluorouracile, al contrario i pazienti in stadio II-III MSI-H sottoposti allo stesso schema adiuvante presentano un 5y-OAS inferiore rispetto ad analogo popolazione di pazienti sottoposti a sola chirurgia [36].

Da notare che MSI-H correla significativamente con un basso grado di differenziazione tumorale (G3) ma con una minore incidenza di mCCR [8].

Instabilità cromosomica

La caratterizzazione molecolare è fondamentale nella programmazione dell'iter terapeutico dei pazienti con CCR IV stadio in quanto la presenza di mutazioni somatiche nei geni RAS rende inefficace l'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-EGFR, farmaci biologici ampiamente utilizzati nella pratica clinica.

KRAS

KRAS è una proteina GTP-asi codificata dalla famiglia dei geni RAS coinvolta nella trasduzione del segnale, nella crescita cellulare, nella differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. Mutazioni dell'esone 2 di KRAS (codoni 12 e 13) portano all'attività deficitaria della proteina GTPasi che causa iperattivazione dei segnali della cascata determinando l'attività incontrollata degli effettori a valle, come le proteine RAF e le MAP-chinasi. Mutazioni di KRAS si osservano nel 40-50% dei pazienti con mCCR, più frequentemente a livello dell'esone 2 e rappresentano un fattore predittivo indipendente di ridotto DFS (HR=1.60, 95% CI 1.60-1.83, p<0.0001) e OAS (HR=1.52, 95% CI 1.29-1.79, p<0.0001) tra i pazienti in stadio III con stabilità dei microsatelliti sottoposti a CT adjuvante. Inoltre la mutazione di KRAS si

associa a ridotto OAS (HR=2.24, 95% CI 1.76-2.85) e DFS (HR=1.89, 95% CI 1.54-2.32) anche nei pazienti sottoposti a resezione delle mCCR [24] [34].

I pazienti RAS wild-type beneficiano della terapia con anti-EGFR.

BRAF

BRAF è una proteina codificata dai geni della famiglia BRAF. È attivata da RAS e influenza la crescita, la proliferazione e la differenziazione cellulare attraverso l'attivazione della via MAPchinasi, ed è anche in grado di influenzare l'apoptosi, la migrazione e la sopravvivenza cellulare. La mutazione BRAFV600E è presente nell'8-10% dei pazienti con metastasi da CCR (più frequentemente in individui con scarso performance status e età avanzata) [34], e rappresenta un fattore prognostico negativo sulla sopravvivenza (OAS < 12 mesi), specialmente nei pazienti MSS. Altre caratteristiche associate a tale mutazione sono: età avanzata, genere femminile, localizzazione del primitivo nel colon destro, istologia mucinosa, instabilità dei microsatelliti, maggiore incidenza di metastasi peritoneali ed epatiche. Inoltre, laddove le mCCR vengano resecate, la presenza di mutazioni di BRAF è associata a recidiva di malattia, spesso in sede extraepatica, e ridotta sopravvivenza.

I pazienti BRAF mutati non dimostrano un chiaro beneficio alla terapia anti-EGFR; al contrario questi farmaci possono influenzare negativamente la qualità di vita a causa della tossicità che promuovono. Diversi trials hanno cercato di individuare possibili inibitori di BRAF efficaci per i pazienti con

mCCR ma i risultati, a differenza di quelli prodotti per lo studio del melanoma, non sono incoraggianti [34].

I tumori BRAF mutati con MSI sono caratterizzati da prognosi favorevole, e alcuni studi mostrano che la presenza della mutazione V600E rappresenta, nella popolazione di pazienti con MSI, un sottogruppo a prognosi relativamente favorevole [37] [38]. Mutazioni dei codoni 594 e 596 di BRAF sono associate a una migliore prognosi della malattia [39].

La metilazione aberrante del DNA

La trascrizione genica è regolata da sequenze promotrici che modulano il legame dei fattori di trascrizione al gene target. La metilazione delle sequenze promotrici è un fine meccanismo di regolazione della trascrizione genica, poiché altera la capacità dei fattori di trascrizione di legarsi ad esse e promuovere la trascrizione. L'ipermetilazione anomala delle sequenze nucleotidiche dei promotori è frequente nel DNA dei pazienti affetti da CRC.

Antigeni tumorali nella pratica clinica

L'antigene carboidratico 19-9 e l'antigene carcinoembrionale (CEA), sono da anni ampiamente utilizzati come marcatori tumorali in molti tipi di cancro, compreso il CCR. Tuttavia hanno bassa sensibilità, specialmente negli stadi iniziali [8] [24] [40] [41].

Le vescicole extracellulari e l'environment tumorale

La ricerca scientifica ha mosso passi fondamentali nell'identificazione di fattori che consentano di migliorare l'accuratezza e la sensibilità diagnostica. Tra i vari ambiti di interesse, godono di grande attenzione lo studio della comunicazione inter-cellulare e dell'influenza dell'environment tumorale nella creazione e nel sostentamento di microambienti che promuovono la genesi e lo sviluppo metastatico.

In particolare, per quanto concerne la comunicazione inter-cellulare basata sulla secrezione vescicolare, così come le cellule normali, anche le cellule tumorali secernono una quantità di vescicole provviste di un doppio strato lipidico a protezione del contenuto proteico, lipidico e genomico che veicolano. Le vescicole secrete dalle cellule nello spazio extracellulare prendono il nome di vescicole extracellulari (EV), hanno dimensioni che variano dai 70 ai 1000 nm e comprendono diverse tipologie, tra cui esosomi e microvescicole (anche note come ectosomi) [42].

In particolare, gli esosomi sono nano-vescicole circondate da doppio strato fosfolipidico con dimensioni variabili tra 30 e 120 nm secrete da tutti i tipi di cellule, che trasportano al loro interno materiale biologico funzionalmente attivo come proteine, mRNA e microRNA (miRNA) e sono quindi in grado di trasmettere segnali specifici da una cellula parentale a cellule circostanti o a organi a distanza, circolando attraverso il torrente circolatorio e linfatico [43]. Tali vescicole originano dal compartimento endocitico della cellula all'interno di corpi multivescicolari (MVB) e vengono rilasciate nell'ambiente

extracellulare in seguito a fusione del MVB con la membrana plasmatica della cellula genitrice. Durante questo processo di biogenesi sono coinvolti il complesso ESCRT (Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport), lipidi come la ceramide e le tetraspanine (CD63, CD9, CD81).

Per quanto riguarda poi l'influenza dell'environment tumorale sulla recidiva di malattia, è stato dimostrato come la formazione delle nicchie pre-metastatiche (che consiste in una sequenza di eventi che preparano la futura sede di recidiva promuovendo l'innesto e la sopravvivenza delle cellule metastatiche) possa essere mediato dal rilascio di EV rilasciate dalle cellule tumorali [44]. A livello epatico, l'uptake selettivo di esosomi da parte delle cellule di Kupffer innesca l'attivazione di processi fibrotici e lo stabilirsi di un ambiente pro-infiammatorio che, di nuovo, supporta lo sviluppo metastatico [44].

I miRNA

I miRNA sono piccoli RNA endogeni non codificanti lunghi 18-25 nucleotidi che regolano l'espressione genica a livello trascrizionale contribuendo al controllo di svariati processi biologici. La progressione tumorale correla con l'up-regolazione di onco-miRNA e con la down-regolazione di miRNA oncosoppressori, squilibrio che promuove, tra gli altri, la proliferazione cellulare incontrollata, la perdita dei meccanismi apoptotici di regolazione, l'acquisizione di fenotipi maggiormente invasivi e la neoangiogenesi [2] [9]

[40] [41] [45] [46] [47]. Addirittura è stato osservato che taluni miRNA sono responsabili della sensibilità o della resistenza ai chemioterapici [26] [48].

Per la loro stabilità intrinseca e per la loro rintracciabilità in svariati fluidi organici come il sangue, le urine, il latte, la saliva e le feci, i miRNA stanno riscuotendo interesse quali potenziali biomarcatori diagnostici non invasivi [26] [40] [49] [45].

I risultati delle più recenti metanalisi hanno evidenziato che alcuni miRNA sono frequentemente disregolati nei pazienti con CCR e che i livelli plasmatici di specifici miRNA contenuti nelle EV circolanti isolate da pazienti con CCR prima dell'intervento chirurgico sono più elevati rispetto al gruppo-controllo costituito da soggetti sani. A conferma di ciò, i livelli plasmatici di questi specifici miRNA si riducono dopo resezione chirurgica del CCR primitivo rispetto alla conta ottenuta al momento della diagnosi, con tumore in situ, a conferma che la loro espressione qualitativa indica la presenza del tumore, mentre la loro espressione quantitativa correla con il carico tumorale [49] [50] [51] [52] [52].

Come sottolineato dalle più recenti linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica [24], a parte MSI, KRAS, BRAF, Ca 19-9 e CEA, al momento non esistono altri rilevanti biomarcatori utilizzati nella pratica clinica dei pazienti con CCR. Ma i continui avanzamenti nella comprensione della complessità della biologia del CCR, lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento e l'avvento di nuovi farmaci biologici spingono clinici e

ricercatori a migliorare la qualità del campionamento e a ricercare nuovi biomarcatori che consentano una corretta stratificazione prognostica della malattia.

Razionale e obiettivi del Progetto di Ricerca

Non pochi dubbi sono stati sollevati in merito alla reale efficacia del sistema TNM nel predire la corretta prognosi dei pazienti con CCR, e, malgrado gli importanti progressi compiuti, una percentuale ancora troppo alta di pazienti sviluppa recidiva tumorale locale o a distanza nel corso della propria malattia, con evidenti ripercussioni sulla qualità di vita e sulle aspettative di sopravvivenza. Queste importanti limitazioni sono dettate fondamentalmente dalle caratteristiche multifattoriali che differenziano ciascun tumore e ciascun individuo. Per tali ragioni, la gestione dei pazienti oncologici si concentra sull'individuazione di caratteristiche biologiche che guidino correttamente e più specificamente le scelte terapeutiche e di sorveglianza, al fine di garantire la gestione personalizzata di ciascun paziente.

Considerando tali premesse, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di individuare miRNA capaci di discriminare tra pazienti con CCR metastatico e pazienti non metastatici, per fornire una stima quanto più precisa della severità della malattia al momento della diagnosi.

Per ottenere questo risultato abbiamo effettuato l'identificazione e la caratterizzazione dei miRNA estratti da campioni ematici e tissutali di pazienti selezionati sottoposti a resezione chirurgica di CCR primitivo e metastatico. Sui miRNA così individuati è stata condotta approfondita

ricerca bibliografica per individuare eventuali correlazioni con studi precedenti.

Materiali e Metodi

Questo studio prospettico multicentrico traslazionale ha previsto l'analisi di campioni ematici e tissutali di pazienti con CCR primitivo e metastatico sincrono afferenti all'U.O. di Chirurgia Generale dell'Ospedale S. Andrea di La Spezia.

Il Progetto ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico Regionale (N. Registro CER Liguria: P.R. 098REG2017, approvato il 08.05.2017) e della Direzione Sanitaria dell'ASL 5 "Spezzino" (N. Delibera Aziendale ASL n. 5 di La Spezia: 576 del 27.06.2017)

Protocolli di arruolamento

I criteri di inclusione allo studio hanno compreso: pazienti di qualunque genere e razza, di maggiore età, con diagnosi bioptica di CCR. In regime d'urgenza sono stati arruolati pazienti con diagnosi radiologica e clinica di malattia. Ogni paziente ha fornito il proprio consenso informato alla biopsia chirurgica ed al prelievo ematico, oltreché al trattamento dei dati sensibili in ottemperanza alle norme sulla privacy stabilite dalla legge. I criteri di esclusione hanno compreso: pazienti di minore età o che abbiano rifiutato il proprio consenso alla biopsia o al trattamento dei dati personali e pazienti con precedente o contemporanea diagnosi di altra patologia tumorale maligna. In una fase successiva abbiamo deciso di escludere anche i pazienti

sottoposti a terapia neoadjuvante, fattore che avrebbe potuto giocare un ruolo confondente sui risultati ottenuti.

Di ciascun paziente sono stati prospetticamente registrati i dati anagrafici, BMI (Body Mass Index), ASA score (American Society of Anesthesiologists classification) (Tabella 3), localizzazione del tumore, CA 19-9, CEA (antigene carcinoembrionario) ed emoglobina pre-operatori. Sono inoltre stati raccolti i dati intraoperatori (approccio laparoscopico vs open, tasso di conversione, sanguinamento intraoperatorio e durata dell'intervento) e le complicanze post-operatorie a 30 giorni dall'intervento.

Sono stati infine riportati la stadiazione secondo il sistema TNM e il grado di differenziazione tumorale.

Tabella 3. ASA score (American Society of Anaesthetics) classification

ASA class	Descrizione
I	Individuo sano, assenza di malattie sistemiche
II	Presenza di malattia sistemica lieve, non limitante le normali attività
III	Presenza di malattia sistemica grave, limitante le normali attività ma non invalidante
IV	Presenza di malattia sistemica invalidante, potenzialmente letale
V	Paziente moribondo, con aspettativa di vita < alle 24 ore, a prescindere dall'intervento chirurgico

Protocolli di Campionamento

Biopsia liquida

Per ciascuno dei pazienti arruolati, il protocollo ha previsto il prelievo di un campione ematico in provetta eparinata da 5 ml al momento del ricovero (il giorno precedente l'intervento chirurgico) e alla dimissione (o comunque 5 giorni dopo l'intervento chirurgico). Le provette sono state centrifugate presso il Servizio Trasfusionale dell'Ospedale S. Andrea di La Spezia (1500 rpm a 4°C per 10 minuti). Il plasma estratto è stato suddiviso in due provette e congelato a -78°C.

Biopsia solida

L'intervento chirurgico è stato effettuato secondo le procedure standard applicate dall'equipe della Chirurgia Generale di La Spezia per il trattamento del CCR e delle metastasi a distanza [10] [11] [13] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59].

Le biopsie degli asportati chirurgici (tumore primitivo e, ove applicabile, tumore metastatico) sono state effettuate su banco da tessuto fresco al termine della procedura chirurgica in associazione con la S.C. Anatomia Patologica dell'Ospedale S. Andrea di La Spezia. Qualora il Patologo non disponesse di una quantità di tessuto sufficiente per condurre le opportune indagini istologiche, necessarie per porre diagnosi di malattia secondo le vigenti linee guida in base alla classificazione TNM dell'AJCC [22], ci si è

astenuti dalla biopsia del tumore solido. I campioni tissutali associati all'identificativo anonimizzato del paziente sono conservati presso il Laboratorio di Medicina Rigenerativa del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Genova, dove è stata eseguita l'analisi biomolecolare con caratterizzazione qualitativa e quantitativa dell'RNA e dei miRNA in essi contenuti.

Protocolli di laboratorio

Biopsia liquida

L'isolamento dell'RNA esosomiale circolante a partire da 1 ml di plasma/paziente è stato effettuato utilizzando il kit exoRNeasySerum/Plasma Midi (Qiagen). L'analisi del profilo dell'RNA esosomiale circolante è stata ottenuta con kit Agilent Small RNA (Agilent Technologies) corso sullo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer secondo protocollo standard.

Biopsia solida

Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto dalle biopsie di tumore solido dei pazienti eligibili. Ogni frammento di campione biotico è stato lisato in QIAzol (Qiagen), soluzione monofasica di fenolo e guanidina tiocianato che facilita la lisi delle cellule, inibisce le RNasi e rimuove la maggior parte del DNA cellulare e delle proteine tramite estrazione organica.

In seguito alla centrifugazione con cloroformio ogni campione è stato separato in una fase acquosa contenente RNA, in una fase intermedia contenente DNA e in una fase organica contenente proteine. La fase acquosa, superiore, è stata raccolta e l'RNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale RNeasy Mini (Qiagen) seguendo il protocollo standard. Gli RNA di ogni campione biologico sono stati dapprima quantizzati tramite lettura

spettrofotometrica con Nanodrop e, successivamente, tramite l'utilizzo del fluorimetro Qubit (Invitrogen).

Analisi microarray

Ogni campione di RNA così quantizzato è stato diluito fino ad ottenere una concentrazione finale di 100 ng. I campioni sono stati quindi processati per essere sottoposti ad analisi microarray (miRNA Microarray System con miRNA Complete Labeling e Hyb Kit, Agilent Technologies), seguendo le indicazioni presenti nei protocolli associati ai kit commerciali utilizzati.

Ricerca bibliografica e metodo statistico

Di ciascuno dei miRNA disregolati identificati è stata condotta ricerca bibliografica su MEDLINE/PubMed e miRBase database (<http://www.mirbase.org/>) [60] al fine di identificare precedenti correlazioni CCR-specifiche.

Visto che lo scopo di questo progetto di ricerca è quello di investigare l'espressione differenziale tra miRNA nel CCR metastatico e miRNA nel CCR non metastatico, per poter lavorare su un numero significativo di campioni evitando di diluire i risultati, la comparazione dei risultati è stata dicotomizzata suddividendo la popolazione in studio in due gruppi secondo la stadiazione TNM dell'AJCC [22]: gruppo dei pazienti metastatici (GM), comprendente gli stadi III e IV e gruppo dei pazienti non metastatici (GnM), comprendente gli stadi I e II.

Le differenze cliniche osservate tra i due gruppi sono state ritenute statisticamente significative per p -value < 0,05.

I dati grezzi ottenuti dai campioni di laboratorio sono stati analizzati utilizzando il pacchetto LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis). La background correction e l'inter-array normalization sono state effettuate applicando rispettivamente normexp (offset=20) e metodi quantili. Per selezionare i miRNA espressi in modo differenziale tra i gruppi GM e GnM è stata utilizzata una soglia $|\text{LogFC}|$ maggiore di 0,38 e un p -value < 0,05 [61].

Risultati

Risultati clinici

Popolazione generale

In un periodo di 18 mesi (da agosto 2017 a febbraio 2019) secondo i criteri di inclusione previsti dal protocollo di ricerca, sono stati arruolati 27 pazienti. Tra questi, due pazienti sottoposti a terapia neoadjuvante sono stati esclusi dalle analisi per evitare possibili bias derivanti dagli effetti prodotti dalla chemioterapia sul tumore e sulle condizioni generali del paziente e quindi sugli outcomes.

Dei 25 pazienti inclusi nello studio sono stati effettuati i prelievi ematici previsti dal protocollo di ricerca al tempo 0 (ricovero) e a 5 giorni dall'intervento chirurgico; è stato possibile effettuare il campionamento di 24 pezzi operatori, di cui 23 biopsie di CCR primitivo una biopsia di mCCR sincrona. In due pazienti, successivamente allocati negli stadi I e IVA, non è stato possibile effettuare il campionamento del tumore primitivo per scarsa disponibilità di materiale nel primo caso (tumore troppo piccolo, incluso in toto per la valutazione anatomopatologica) e per l'assenza dell'Anatomopatologo in Istituto al momento dell'intervento chirurgico praticato in regime d'urgenza nel secondo caso.

Pertanto, la popolazione in studio è di 25 pazienti, di cui 13 maschi (52%), età media 71 anni (range 42 – 90 anni), BMI medio 24,5 kg/m² (range 19,9 – 31,6 kg/m²).

L'attribuzione dell'ASA class è stata I per un paziente (4%), II per 12 pazienti (48%), III per 11 pazienti (44%) e IV per un paziente (4%). Sedici pazienti presentavano comorbidità (64%).

Per l'assegnazione della localizzazione del tumore il colon-retto è stato suddiviso in 3 segmenti: 13 tumori localizzati nel colon destro (tratto compreso tra ceco e colon trasverso medio) (52%); 6 tumori localizzati nel colon sinistro (tratto compreso tra colon trasverso distale/flessura splenica e giunto sigma-retto) (24%); 6 tumori localizzati nel retto (24%).

I valori pre-operatori del CA 19-9 sono risultati over-range (≥ 37) in 4 pazienti (16%).

I valori pre-operatori del CEA sono risultati over-range (≥ 5 ng/mL) in 10 pazienti (40%).

In 12 pazienti (48%) è stata riscontrata anemia pre-operatoria (range di normalità per le donne 12.5-16 g/dl, per gli uomini 13-17 g/dl).

L'approccio chirurgico è stato videolaparoscopico nel 100% dei casi e il tasso di conversione laparotomica è stato dello 0%.

La media totale delle perdite ematiche intraoperatorie è stata 91 ml (range 10 - 300 ml).

La durata media dell'intervento chirurgico è stata 200 minuti (range 130 - 365 min).

Per quanto riguarda le complicanze post-operatorie a 30 giorni, in totale 3 pazienti hanno ricevuto un punteggio della scala Clavien-Dindo ≥ 3 [62] (Tabella 4), rispettivamente un paziente di 74 anni, ASA score II sottoposto a emicolectomia destra allargata al trasverso prossimale per tumore della flessura epatica in stadio IIA e concomitante resezione segmentaria di sigma per displasia di alto grado, è stato sottoposto in 5° giornata post-operatoria a resezione del blocco anastomotico e rianastomosi ileo-colica con confezionamento di ileostomia di protezione per deiscenza parziale dell'anastomosi. Un paziente di 74 anni, ASA score III sottoposto a resezione anteriore del retto con anastomosi colo-rettale e confezionamento di ileostomia di protezione per tumore del retto medio in stadio IIIB, è stato sottoposto in 13° giornata post-operatoria a resezione del blocco anastomotico colo-rettale, confezionamento di colostomia definitiva e ricanalizzazione ileale per parziale deiscenza anastomotica. Un paziente di 82 anni, ASA score III, sottoposto a procedura di Hartmann per tumore del retto basso IIIB, è deceduto in 7° giornata post-operatoria in seguito alle complicanze scatenate dall'insorgenza di polmonite ab ingestis.

Tabella 4. Classificazione Clavien-Dindo [62]

Grado	Descrizione
1	Ogni deviazione dal normale decorso post-operatorio, senza la necessità di trattamenti medici, chirurgici, endoscopici, radiologici. Terapie consentite: farmaci come antiemetici, antipiretici, analgesici, diuretici, elettroliti e fisioterapia. Questo grado include anche le infezioni di ferita aperte al letto del paziente.
2	Complicanza post-operatoria necessitante trattamenti medici diversi da quelli descritti per il Grado 1. Le trasfusioni ematiche e la nutrizione parenterale totale rientrano in questo Grado.
3	Complicanza post-operatoria necessitante trattamento chirurgico, endoscopico, radiologico:
3a	senza ricorso all'anestesia generale;
3b	in anestesia generale.
4	Complicanza post-operatoria potenzialmente letale, necessitante il trasferimento in Terapia Intensiva:
4a	disfunzione di organo singolo (compresa la dialisi);
4b	disfunzione multiorgano.
5	Morte del paziente.

In seguito alla valutazione anatomopatologica 4 pazienti sono risultati appartenere allo Stadio I (16%), 6 pazienti allo stadio II (24%), 8 pazienti allo stadio III (32%), 7 allo stadio IV (28%).

Il grado di differenziazione tumorale è risultato G1 (ben differenziato) in un paziente (4%), G2 (moderatamente differenziato) in 17 pazienti (68%), G3 (scarsamente differenziato) in 7 pazienti (28%).

Negli asportati chirurgici di tumore primitivo analizzati sono stati riscontrati 2 campioni con espressione di emboli neoplastici (8%), 3 campioni con infiltrazione perineurale (12%), 5 campioni con depositi tumorali satelliti (20%).

Il follow-up medio è stato 13 mesi (range 2-25 mesi). Il DFS medio è stato 9 mesi (range 0-21 mesi) e l'OAS medio è stato 14 mesi (range 3-25 mesi).

Le caratteristiche della popolazione generale suddivisa per stadi sono riassunte in Tabella 5.

Tabella 5. Caratteristiche popolazione generale suddivisa per stadi

Variabile	Stadio I	Stadio II	Stadio III	Stadio IV	Tot n	Tot %
Pazienti, n (%)	4 (16)	6 (24)	8 (32)	7 (28)	25	
Maschi, n (%)	1 (25)	2 (33,3)	5 (62,5)	5 (71,4)	13	52
Età media, aa(range)	76 (71-79)	76(58-90)	66(42-82)	68 (49-84)	71 (42-90)	
BMI medio, (range)	24,5 (19,9-31,6)	23,8 (22,3-25,5)	25,4 (22,8-28,7)	24 (22,5-25,5)	24,5 (19,9-31,6)	
ASA class, n pz						
I	0	0	1	0	1	4
II	3	3	3	3	12	48
III	1	2	4	4	11	44
IV	0	1	0	0	1	4
Comorbidità, n pz	4	6	2	4	16	64
Localizzazione primitivo, n pz						
Colon destro e trasverso prossimale	3	3	3	4	13	52
Trasverso distale-sigma	0	3	1	2	6	24
Retto	1	0	4	1	6	24
CEA pre-op ≥ 5 (ng/mL), n pz	0	1	4	5	10	40
CA 19-9 pre-op ≥ 37 , n pz	0	0	0	4	4	16
Anemia preoperatoria d (12.5-16 g/dl) u (13-17 g/dl), n pz	1	4	3	4	12	48
Approccio VL, n casi	4	6	9	6	25	100
Conversione, n casi	0	0	0	0	0	0
Perdite ematiche intraoperatorie,	86 (20-150)	83 (10-300)	81 (20-300)	114 (30-300)	91 (10-300)	

ml (range)						
Durata intervento, min (range)	180 (150-200)	195 (140-300)	191 (130-320)	225 (160-365)	200 (130-365)	
Morbilità CD ≥ 3 a gg, n casi	0	1	2	0	3	12
Grading						
1	1	0	0	0	1	4
2	3	5	6	3	17	68
3	0	1	3	3	7	28
Lymph node ratio (media per gruppo)	0/18,5	0/20,7	1,9/20	1,8/13		
Emboli neoplastici, n pz (%)	0	0	1 (12,5)	1 (14,3)	2	8
Infiltrazione perineurale, n pz (%)	0	0	1 (12,5)	2 (28,6)	3	12
Depositi tumorali satellite, n pz (%)	0	0	3 (37,5)	2 (28,6)	5	20
DFS (mesi)	12	15	11	13	13	
OAS (mesi)	15	16	12	14	14	

Note

ASA class: American Society of Anesthesiologists Classification

BMI: body mass index

CD: Clavien-Dindo classification of surgical complications (Dindo 2004)

CEA: antigene carcinoembrionario

CA 19-9: antigene carboidratico 19-9

Lymph node ratio n° linfonodi positivi/n° linfonodi totali

Popolazione suddivisa in gruppi: pazienti non metastatici vs pazienti metastatici

Nella popolazione totale in studio di 25 pazienti, 10 pazienti sono risultati appartenere al GnM (40%) e 15 al GM (60%). Tra i due gruppi non si sono rilevate differenze statisticamente significative per quanto riguarda età ($p=0,07$), BMI ($p=0,53$), CEA pre-operatorio ≥ 5 ng/mL ($p=0,20$) CA 19-9 pre-operatorio ≥ 37 ($p=0,28$).

Non si sono rilevate inoltre differenze significative tra i due gruppi nell'entità delle perdite ematiche intraoperatorie ($p=0,75$) né nella durata dell'intervento chirurgico ($p=0,52$).

Per quanto concerne gli outcomes oncologici, il follow-up medio è stato di 13,9 mesi nel GnM e di 12,1 mesi nel GM ($p=0,53$). Non si sono rilevate differenze significative tra i due gruppi nell'OAS ($p=0,20$) né nel DFS nei pazienti radicalizzati dopo intervento chirurgico ($p=0,26$).

Le caratteristiche della popolazione generale suddivisa per stadi sono riassunte in Tabella 6.

Tabella 6. Caratteristiche popolazione generale suddivisa in gruppi (GnM vs GM)

Variabile	GnM	GM	P value
Pazienti, n (%)	10 (40,0)	15 (60,0)	
Maschi, n (%)	3 (30,0)	10 (66,7)	
Età media, aa (range)	76 (58-90)	67 (42-84)	0,07
BMI medio, range	24,1(19,9-31,6)	24,8 (22,5-28,7)	0,53
ASA class, n pz (%)			
I	0 (0)	1 (6,7)	
II	6 (60,0)	6 (40,0)	
III	3 (30,0)	8 (53,3)	
IV	1 (30,0)	0 (0)	
Comorbilità, n pz (%)	10 (100)	6 (40,0)	
Localizzazione primitivo, n pz (%)			
Colon destro e trasverso prossimale	6 (60,0)	7 (46,7)	
Trasverso distale-sigma	3 (30,0)	3 (20,0)	
Retto	1 (10,0)	5 (33,3)	
CEA pre-op \geq 5 ng/mL, n pz (%)	1 (10,0)	9 (60,0)	0,20
CA 19-9 pre-op \geq 37, n pz (%)	0 (0)	4 (26,7)	0,28
Anemia preoperatoria d (12.5-16 g/dl) u (13-17 g/dl), n pz (%)	5 (50,0)	7 (46,7)	0,07
Approccio VL, n casi (%)	10 (100)	15 (100)	
Conversione, n casi (%)	0 (0)	0 (0)	
Perdite ematiche intraoperatorie,	84,5 (10-300)	96 (20-300)	0,75

ml (range)			
Durata intervento, min (range)	189 (140-300)	207 (130-365)	0,52
Morbilità CD \geq 3 a 30 gg, n casi (%)	1 (10,0)	2 (13,3)	
Grading, n (%)			
1	1 (10,0)	0 (0)	
2	8 (80,0)	9 (60,0)	
3	1 (10,0)	6 (40,0,0)	
Lymph node ratio (media per gruppo)	0/23,5	2/17	
Emboli neoplastici, n pz (%)	0 (0)	2 (13,3)	
Infiltrazione perineurale, n pz (%)	0 (0)	3 (20)	
Depositi tumorali satellite, n pz (%)	0 (0)	5 (33,3)	
FU medio, mesi (range)	13,9 (3-20)	12,2 (2-25)	0,53
DFS medio, mesi (range)	13,9 (3-20)	10,1 (1-21)	0,26
OAS medio, mesi (range)	15,6 (9-25)	11,5 (0-25)	0,20

Note

GnM: gruppo non metastatico (pazienti in stadio I e II)

GM: gruppo metastatico (pazienti in stadi III e IV)

ASA class: American Society of Anesthesiologists Classification

BMI: body mass index

CD: Clavien-Dindo classification of surgical complications [62]

CEA: antigene carcinoembrionario

CA 19-9: antigene carboidratico 19-9












Lymph node ratio n° linfonodi positivi/n° linfonodi totali

Risultati sperimentali

Biopsia liquida

L'analisi del profilo dell'RNA esosomiale delle biopsie liquide pre-operatorie ha consentito di ottenere una stima della concentrazione degli Small non-coding RNA, oltreché della percentuale di miRNA contenuti nei vari campioni. Di seguito gli elettroferogrammi derivanti dell'analisi condotta sul plasma pre-operatorio dei primi undici pazienti arruolati.

Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

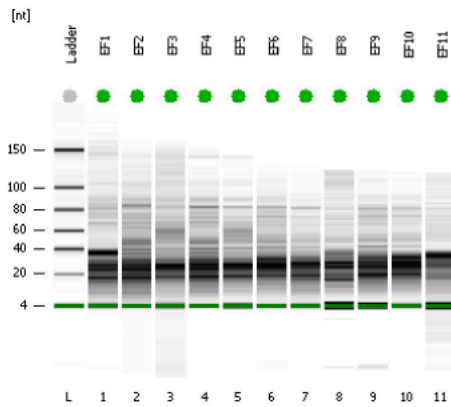
Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
EF1		✓	82 % miRNA; Concentration: 5390.10 pg/ul	
EF2		✓	77 % miRNA; Concentration: 14518.20 pg/ul	
EF3		✓	80 % miRNA; Concentration: 4188 pg/ul	
EF4		✓	78 % miRNA; Concentration: 11217.40 pg/ul	
EF5		✓	79 % miRNA; Concentration: 3016.90 pg/ul	
EF6		✓	82 % miRNA; Concentration: 9997.80 pg/ul	
EF7		✓	85 % miRNA; Concentration: 6508 pg/ul	
EF8		✓	59 % miRNA; Concentration: 775.70 pg/ul	
EF9		✓	78 % miRNA; Concentration: 2130.20 pg/ul	
EF10		✓	83 % miRNA; Concentration: 6096.60 pg/ul	
EF11		✓	75 % miRNA; Concentration: 1119.70 pg/ul	

Chip Lot #

Reagent Kit Lot #

Chip Comments :

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

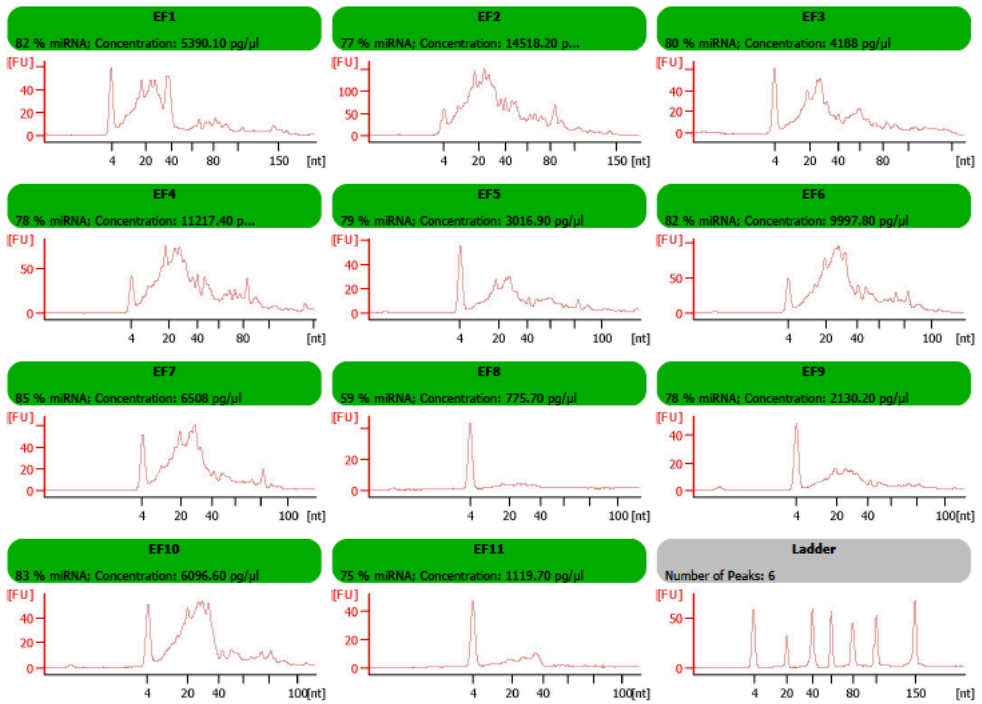
Instrument Name: G2946CA Firmware: C.01.069
 Serial#: DE34903371 Type: G2938C

Assay Information:

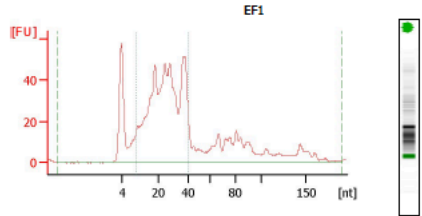
Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Small RNA Series II.xsy
 Title: Small RNA Series II
 Version: 1.1
 Assay Comments: © Copyright 2007 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
 Reagent Kit Lot:
 Chip Comments:



Electropherogram Summary

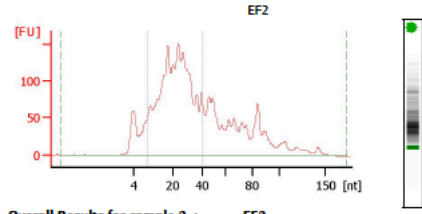


Overall Results for sample 1 : EF1

Small RNA Concentration [pg/μl]: 6,580.7
 miRNA Concentration [pg/μl]: 5,390.1
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 82
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 82 % miRNA; Concentration: 5390.10 pg/μl

Region table for sample 1 : EF1

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in CV [%]	Conc. in [pg/μl]	% of Total	Color
miRNA	10	40	25	34.1	5,390.1	82	████████
Small RNA	0	191	41	91.2	6,580.7	100	████████

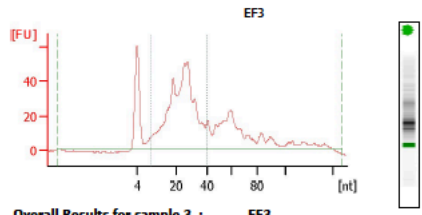


Overall Results for sample 2 : EF2

Small RNA Concentration [pg/μl]: 18,788.7
 miRNA Concentration [pg/μl]: 14,518.2
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 77
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 77 % miRNA; Concentration: 14518.20 pg/μl

Region table for sample 2 : EF2

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in CV [%]	Conc. in [pg/μl]	% of Total	Color
miRNA	10	40	23	34.1	14,518.2	77	████████
Small RNA	0	173	39	73.0	18,788.7	100	████████

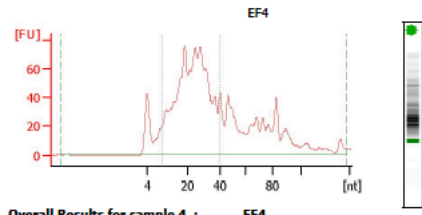


Overall Results for sample 3 : EF3

Small RNA Concentration [pg/μl]: 5,239.9
 miRNA Concentration [pg/μl]: 4,188.0
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 80
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 80 % miRNA; Concentration: 4188 pg/μl

Region table for sample 3 : EF3

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in CV [%]	Conc. in [pg/μl]	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	29.7	4,188.0	80	████████
Small RNA	0	160	37	79.7	5,239.9	100	████████



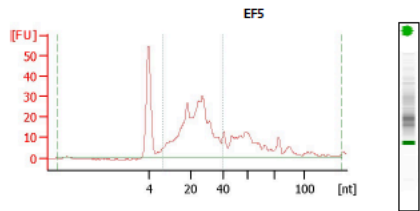
Overall Results for sample 4 : EF4

Small RNA Concentration [pg/μl]: 14,412.2
 miRNA Concentration [pg/μl]: 11,217.4
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 78
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 78 % miRNA; Concentration: 11217.40 pg/μl

Region table for sample 4 : EF4

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in CV [%]	Conc. in [pg/μl]	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	32.9	11,217.4	78	████████
Small RNA	0	147	40	73.9	14,412.2	100	████████

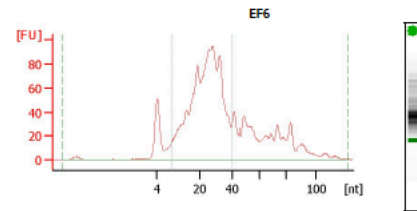
Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 5 : EFS
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 3,813.3
 miRNA Concentration [pg/μl]: 3,016.9
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 79
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 79 % miRNA; Concentration: 3016.90 pg/μl

Region table for sample 5 : EFS

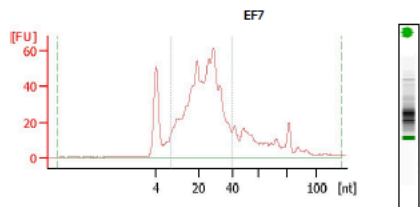
Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	30.7	3,016.9	79	████████
Small RNA	0	138	34	80.1	3,813.3	100	████████



Overall Results for sample 6 : EF6
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 12,256.4
 miRNA Concentration [pg/μl]: 9,997.8
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 82
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 82 % miRNA; Concentration: 9997.80 pg/μl

Region table for sample 6 : EF6

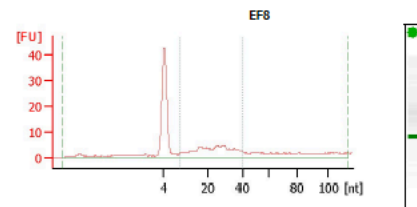
Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	25	30.2	9,997.8	82	████████
Small RNA	0	131	36	67.7	12,256.4	100	████████



Overall Results for sample 7 : EF7
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 7,623.2
 miRNA Concentration [pg/μl]: 6,508.0
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 85
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 85 % miRNA; Concentration: 6508 pg/μl

Region table for sample 7 : EF7

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	31.9	6,508.0	85	████████
Small RNA	0	125	31	74.4	7,623.2	100	████████

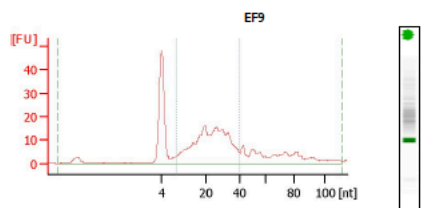


Overall Results for sample 8 : EF8
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 1,307.7
 miRNA Concentration [pg/μl]: 775.7
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 59
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 59 % miRNA; Concentration: 775.70 pg/μl

Region table for sample 8 : EF8

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	34.8	775.7	59	████████
Small RNA	0	119	28	100.0	1,307.7	100	████████

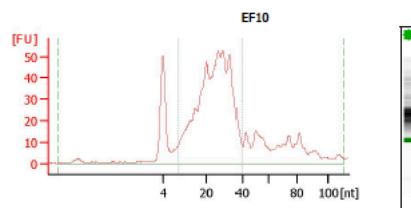
Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 9 : EF9
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 2,742.9
 miRNA Concentration [pg/μl]: 2,130.2
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 78
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 78 % miRNA; Concentration: 2130.20 pg/μl

Region table for sample 9 : EF9

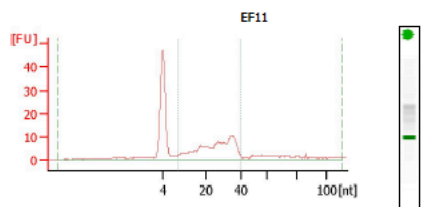
Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl] CV [%]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	24	32.1	2,130.2	78	████████
Small RNA	0	116	30	89.9	2,742.9	100	████████



Overall Results for sample 10 : EF10
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 7,319.5
 miRNA Concentration [pg/μl]: 6,096.6
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 83
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 83 % miRNA; Concentration: 6096.60 pg/μl

Region table for sample 10 : EF10

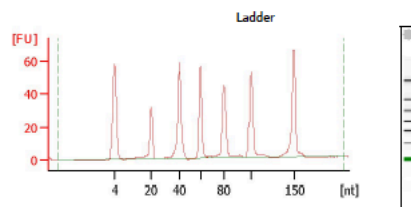
Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl] CV [%]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	25	30.5	6,096.6	83	████████
Small RNA	0	115	32	75.3	7,319.5	100	████████



Overall Results for sample 11 : EF11
 Small RNA Concentration [pg/μl]: 1,501.7
 miRNA Concentration [pg/μl]: 1,119.7
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 75
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: 75 % miRNA; Concentration: 1119.70 pg/μl

Region table for sample 11 : EF11

Name	From [nt]	To [nt]	Average Size [nt]	Size distribution in [pg/μl] CV [%]	Conc. Total	% of Total	Color
miRNA	10	40	26	32.5	1,119.7	75	████████
Small RNA	0	115	24	100.0	1,501.7	100	████████



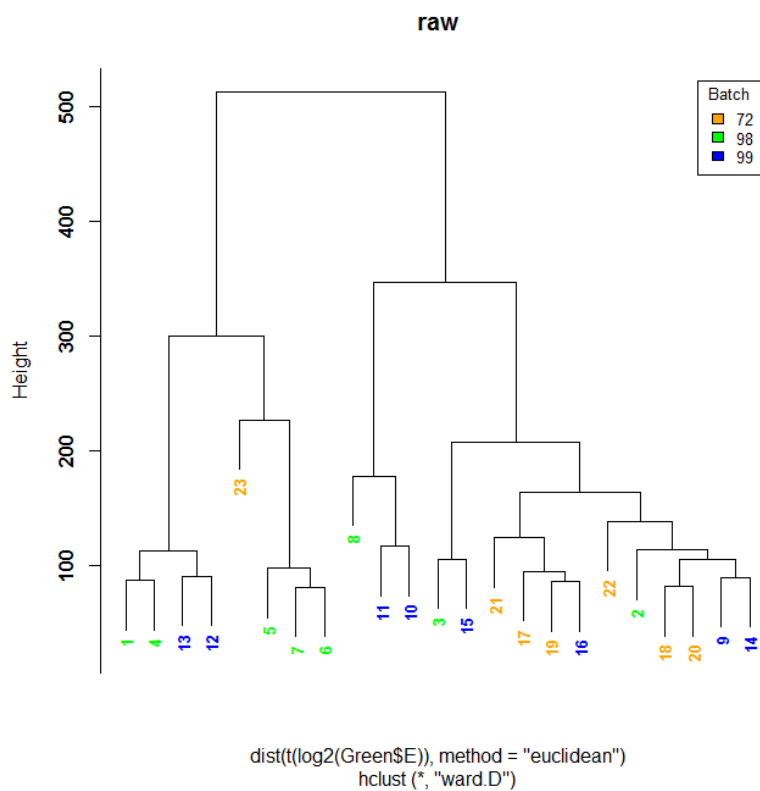
Overall Results for Ladder
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Number of Peaks: 6

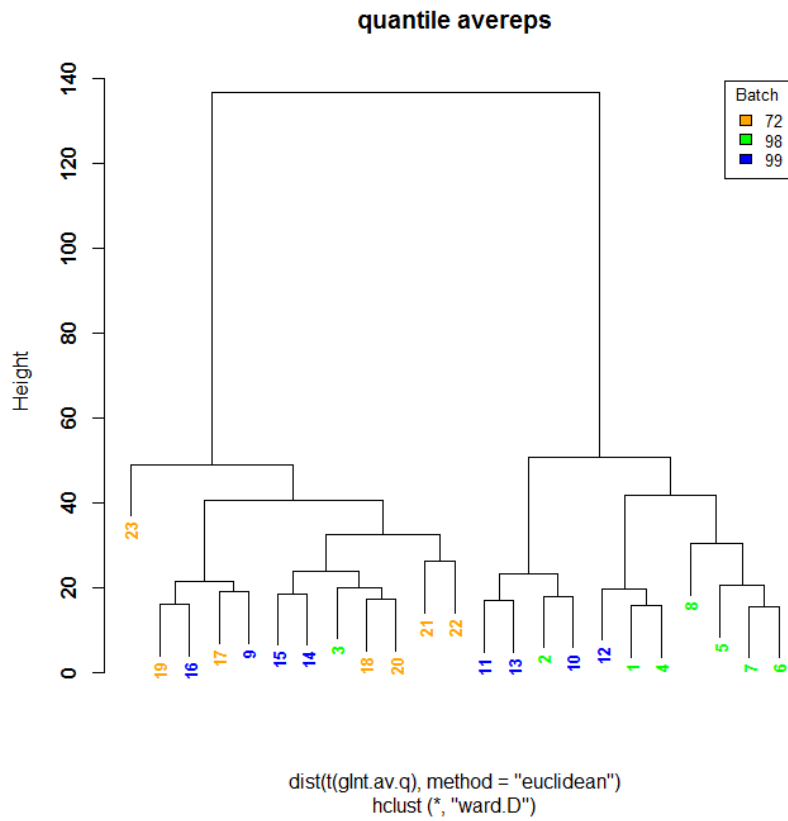
Biopsia solida

L'analisi microarray del profilo dei miRNA è stata condotta su tutti i 23 campioni di tumore primitivo disponibili, 9 appartenenti a pazienti con malattia confinata al colonretto (GnM) e 14 a pazienti con metastasi linfonodali e/o epatiche sincrone al tumore primitivo (GM).

L'analisi dei dati grezzi, così come l'analisi dei dati normalizzati non ha dimostrato batch effect tra i set (Figure 2 a, b), quindi la manipolazione dei campioni non ha introdotto modificazioni significative.

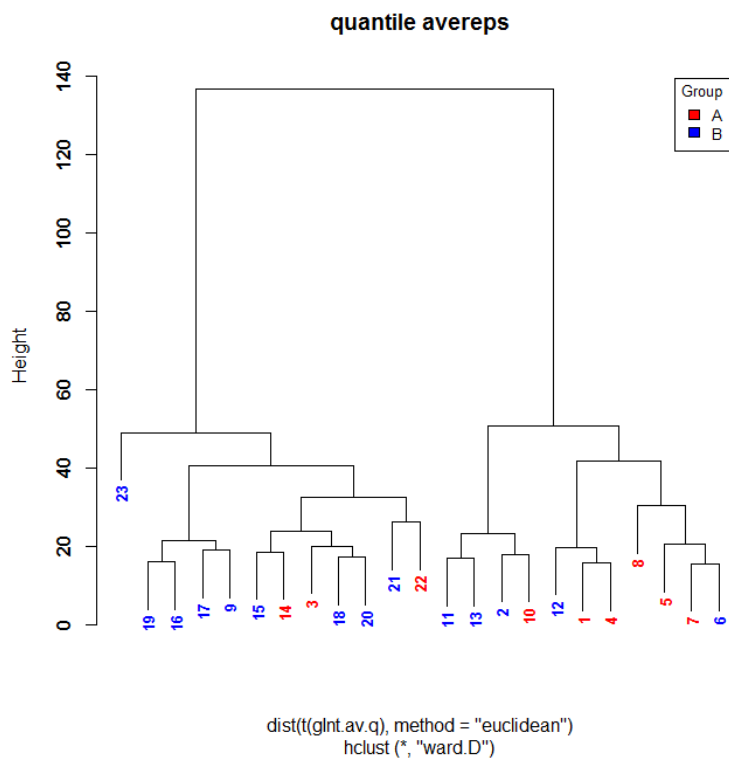
Figura 2 a; b: analisi dei dati grezzi e dopo normalizzazione ("batch effect" tra i campioni).

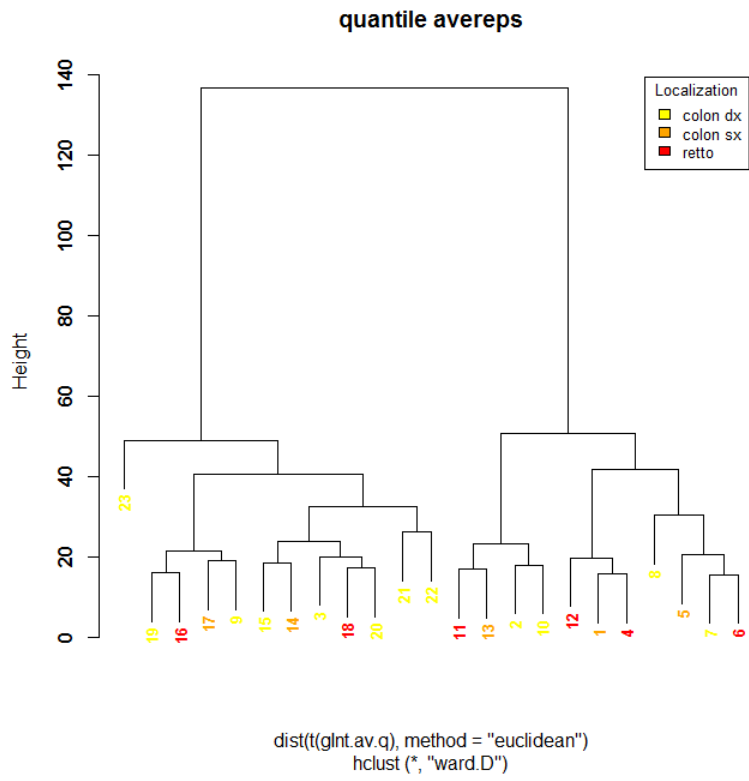
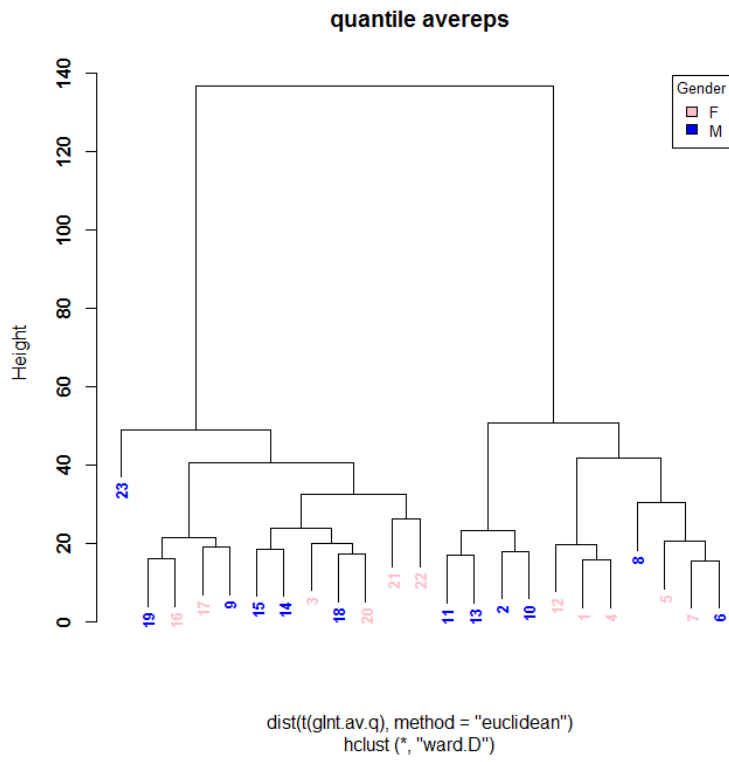


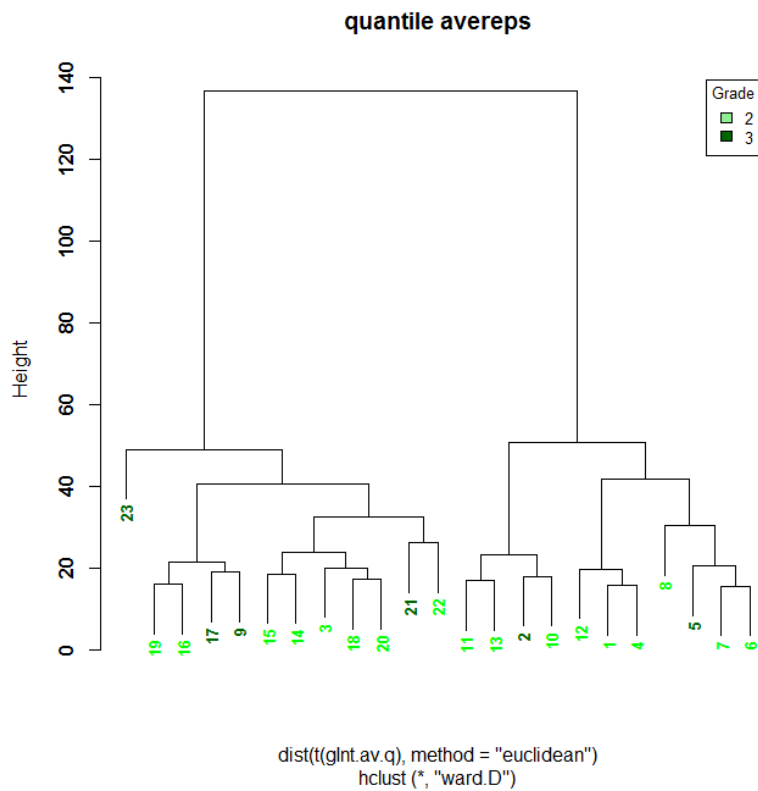


Analogamente, non si è osservato batch effect per quanto concerne la distribuzione per gruppi, genere, grado di differenziazione tumorale e localizzazione del tumore primitivo (Figura 3 a, b, c, d).

Figura 3 a; b; c; d: analisi dei dati normalizzati ("batch effect" tra i campioni) per suddivisione nei due gruppi, genere, localizzazione tumore primitivo e grading).







L'analisi bioinformatica condotta interrogando 5893 sonde per identificare espressioni differenziali tra i miRNA del GM rispetto al GnM ha prodotto l'identificazione di 16 miRNA significativamente disregolati (per $\log_{FC} > 0.38$ or < -0.38 and $p < 0.05$). Specificatamente gli individui appartenenti al GM esprimono 11 miRNA up-regolati e 5 down-regolati rispetto al GnM (Tabella 7, Figure 4 e 5).

Tabella 7. MiRNA disregolati in GM vs GnM (logFC > 0.38 or < -0.38 and pv<0.05)

Probe Name	miRNA	logFC	Fold Change	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
A_25_P00010807	hsa-miR-622	0.42002	1.337945906	5.817901	2.35863	0.027361	0.992912	-3.37583
A_25_P00010806	hsa-miR-622	0.419495	1.337459231	6.001034	2.338502	0.028568	0.992912	-3.40849
A_25_P00016953	hsa-miR-4665-5p	0.500607	1.414808649	5.873453	2.242364	0.035035	0.992912	-3.56237
A_25_P00018127	hsa-miR-7109-5p	0.585638	1.500702923	6.597143	2.198373	0.038418	0.992912	-3.63155
A_25_P00018783	hsa-miR-7847-3p	0.627512	1.544898293	7.109559	2.192815	0.038866	0.992912	-3.64023
A_25_P00016734	hsa-miR-4778-5p	0.602759	1.518617946	6.762403	2.189701	0.039119	0.992912	-3.64509
A_25_P00016952	hsa-miR-4665-5p	0.442203	1.358677113	5.752232	2.181071	0.039828	0.992912	-3.65854
A_25_P00015818	hsa-miR-3141	0.593391	1.508788963	6.910434	2.165465	0.041139	0.992912	-3.68277
A_25_P00016733	hsa-miR-4778-5p	0.567359	1.481808697	6.759077	2.126363	0.044598	0.992912	-3.74303
A_25_P00018880	hsa-miR-7515	0.488683	1.403163039	5.952368	2.125168	0.044708	0.992912	-3.74487
A_25_P00018717	hsa-miR-6831-5p	0.596462	1.512004338	6.495563	2.111974	0.045936	0.992912	-3.76504
A_25_P00016726	hsa-miR-4669	0.521254	1.435201774	7.101847	2.111674	0.045964	0.992912	-3.7655
A_25_P00017144	hsa-miR-4800-5p	0.590976	1.506265781	7.082159	2.108829	0.046233	0.992912	-3.76984
A_25_P00018716	hsa-miR-6831-5p	0.605196	1.521185402	6.570702	2.100449	0.047033	0.992912	-3.7826
A_25_P00015699	hsa-miR-4298	0.460764	1.376270132	6.692748	2.097144	0.047352	0.992912	-3.78763
A_25_P00017200	hsa-miR-4449	-0.43946	-1.35609741	5.808411	-2.76953	0.011	0.992912	-2.67966
A_25_P00010540	hsa-miR-324-3p	-0.47305	-1.388043928	6.863885	-2.72383	0.012205	0.992912	-2.75956
A_25_P00010539	hsa-miR-324-3p	-0.4537	-1.369548579	6.708142	-2.61911	0.015451	0.992912	-2.94048
A_25_P00010205	hsa-miR-22-3p	-0.58325	-1.498219281	8.475935	-2.53597	0.018588	0.992912	-3.08184
A_25_P00010204	hsa-miR-22-3p	-0.5101	-1.424153825	9.175568	-2.36464	0.027009	0.992912	-3.36605
A_25_P00012271	hsa-miR-155-5p	-0.55086	-1.464955178	6.553814	-2.23678	0.035449	0.992912	-3.57119
A_25_P00010490	hsa-miR-150-5p	-0.47635	-1.391223088	5.917043	-2.07643	0.049396	0.992912	-3.81902

Figura 4. miRNA up-regolati in GM (B) vs GnM (A)

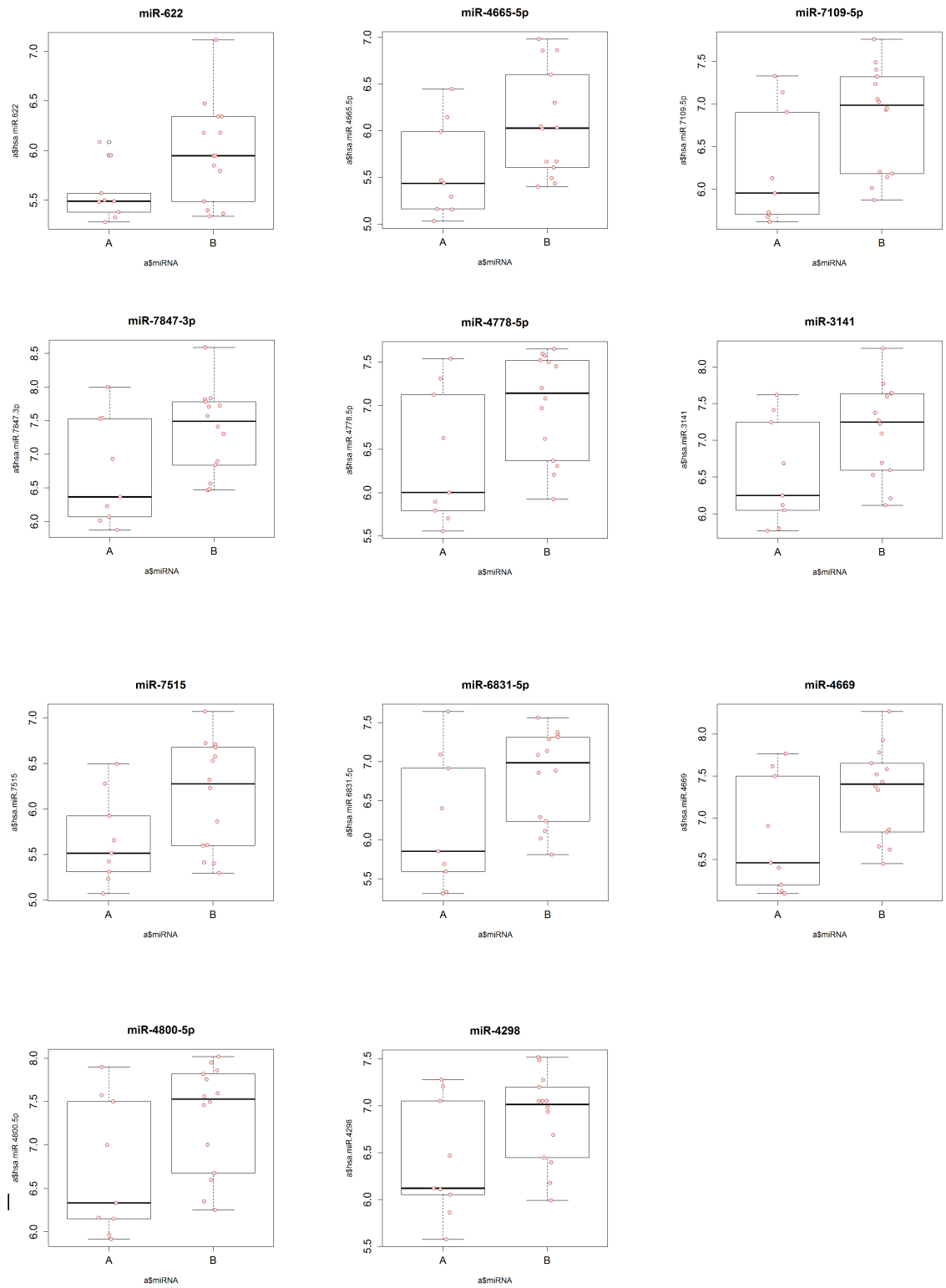
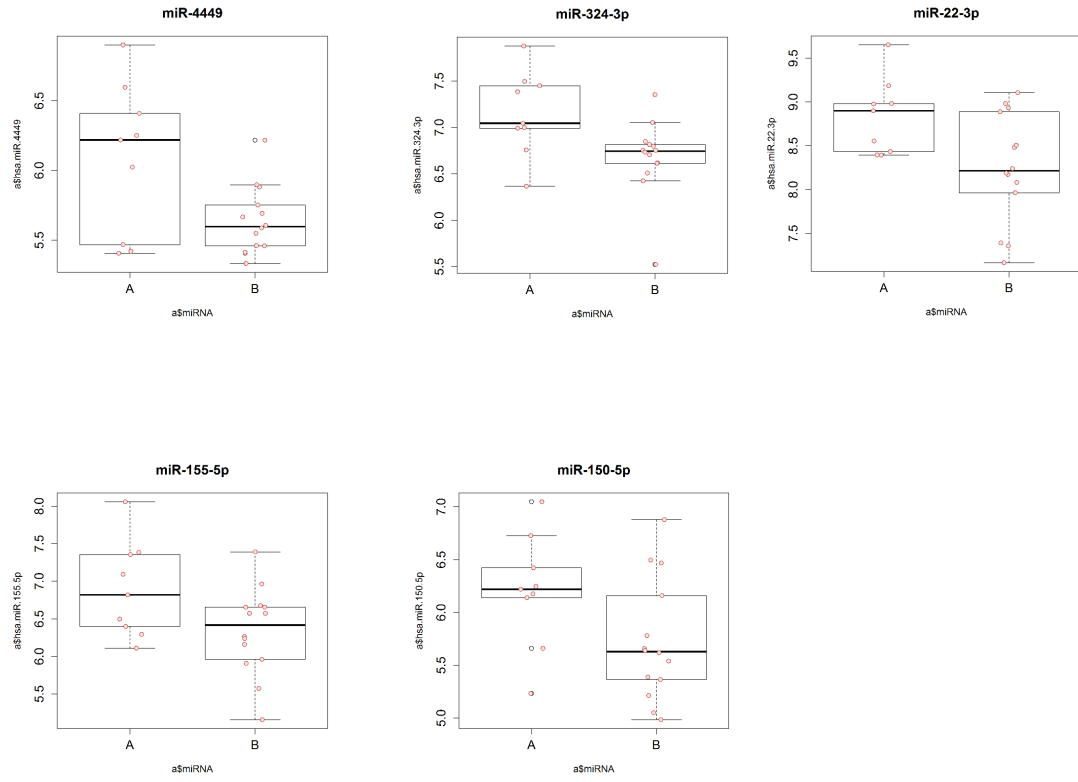


Figura 5. MiRNA down-regolati in GM (B) vs GNM (A)



Correlazione con la letteratura

Di ciascuno dei miRNA disregolati è stata condotta ricerca bibliografica mediante MEDLINE/PubMed e miRBase database (<http://www.mirbase.org/>) [60] al fine di identificare precedenti correlazioni CCR-specifiche (Tabella 8).

Tre miRNA up-regolati nella nostra casistica non hanno dimostrato precedenti correlazioni col CCR. L'associazione dei restanti miRNA col CCR ha invece trovato riscontro in letteratura. Nel dettaglio:

MiR-622 (up-regolato nella nostra casistica)

Balaguer e colleghi hanno osservato la up-regulation di miR-622 nei campioni di CCR rispetto alla mucosa colica normale, specialmente nel caso di CCR sporadico con MSI, concludendo che questo miRNA è in grado di discriminare tra individui sani e malati [63]. Al contrario, secondo le osservazioni condotte da Fang e colleghi, miR-622 risulterebbe down-regolato nei tessuti e nelle linee cellulari di CCR, e comunque meno espresso nel CCR metastatico rispetto al non metastatico, avendo come target la soppressione del gene K-Ras [64]. Lo stesso gruppo ha inoltre dimostrato che miR-622, sopprimendo il segnale CXCR4-VEGFA, inibisce l'angiogenesi tumorale [65].

MiR-4665-5p (up-regolato nella nostra casistica)

I gruppi di Ghanbari e Slattery hanno individuato la downregulation di miR-4665-5p rispettivamente nelle feci di soggetti con CCR e nella mucosa di carcinoma rettale in confronto al gruppo controllo costituito da soggetti sani, in quest'ultimo caso miR-4665-5p agisce sulla modulazione della cascata del segnale TGF- β mediata [66] [67].

MiR-7109-5p (up-regolato nella nostra casistica)

Non indagato il ruolo di miR-7109-5p nel CCR.

MiR-7847-3p (up-regolato nella nostra casistica)

Secondo Yan e colleghi, miR-7847-3p sarebbe downregolato in modo non significativo nel profilo d'espressione degli esosomi isolati dal siero di pazienti con CCR [41].

MiR-4778-5p (up-regolato nella nostra casistica)

Secondo Ghanbari e colleghi miR-4778-5p è down-regolato nelle feci dei soggetti con CCR rispetto ai soggetti sani [66].

MiR-3141 (up-regolato nella nostra casistica)

Nell'analisi condotta da Slattery e colleghi, miR-3141 risulta up-regolato nel carcinoma colico rispetto alla mucosa colica normale ed agisce modulando la cascata del segnale TGF- β mediata [67].

MiR-7515 (up-regolato nella nostra casistica)

Non indagato il ruolo di miR-7515 nel CCR.

MiR-6831-5p (up-regolato nella nostra casistica)

Non indagato il ruolo di miR-6831-5p nel CCR.

MiR-4669 (up-regolato nella nostra casistica)

Nello studio condotti da Wang e colleghi, miR-4669 risulta upregolato nel CCR stadi I e II, correlando inversamente con la presenza di metastasi linfonodali [68]. Secondo il gruppo di Iida invece, miR-4669 è downregolato nel CCR metastatico rispetto al non-metastatico [69].

MiR-4800-5p (up-regolato nella nostra casistica)

Secondo Zhang e colleghi, miR-4800-5p è up-regolato nel siero estratto da pazienti con CCR rispetto al gruppo controllo costituito da soggetti sani [70].

MiR-4298 (up-regolato nella nostra casistica)

Nell'analisi condotta da Slattery e colleghi, miR-4298 risulta up-regolato nel carcinoma colico rispetto alla mucosa colica normale ed agisce modulando la cascata del segnale TGF- β mediata [67].

MiR-4449 (down-regolato nella nostra casistica)

Secondo Slattery e colleghi miR-4449 è espresso sia nel tessuto colico normale sia in caso di degenerazione adenomatosa e carcinomatosa [71].

MiR-324-3p (down-regolato nella nostra casistica)

Il ruolo di miR-324-3p è significativamente associato al CCR con un ruolo di soppressione dell'invasività tumorale. Secondo altri sarebbe associato a una riduzione dell'OAS [72] [73] [74].

MiR-22-3p (down-regolato nella nostra casistica)

Secondo lo studio condotto da Schee e colleghi, miR-22-3p è uno dei cinque miRNA più frequentemente up-regolati nel CCR (insieme a miR-10a-5p, miR-21-5p, miR-143-3p e miR-192-5p) [75], anche se per alcuni autori sarebbe up-regolato ma con un ruolo cancerogenetico inconsistente [76] agendo anzi come oncosoppressore del CCR [77].

MiR-155-5p (down-regolato nella nostra casistica)

Il ruolo di miR-155-5p nel CCR è stato ampiamente indagato in letteratura. La sua up-regolazione è stata associata a MSI-H, tendenza alla migrazione e invasione tumorale, con conseguente metastatizzazione. Conferirebbe inoltre chemioresistenza [2] [47] [78] [79] [80] [81] [82] [46] [83] [84] [85] [86].

Secondo il gruppo di Ulivi e colleghi la down-regolazione plasmatica di miR-155-5p correla con ridotto OAS e progression free survival (PFS) [87].

MiR-150-5p (down-regolato nella nostra casistica)

Anche l'espressione di miR-150-5p si è dimostrata ampiamente disregolata nel CCR. Secondo alcuni autori miR-150-5p sarebbe coinvolto nei meccanismi di proliferazione cellulare e progressione tumorale [88] [89]

[90]. Anche in questo caso non è possibile osservare la piena concordanza tra le esperienze riportate in letteratura. Infatti, se per alcuni autori miR-150-5p risulta down-regolato nel CCR, agendo da soppressore tumorale [66] [91] [92], per altri la sua up-regolazione sarebbe associata a un miglioramento della prognosi [93] [94].

Tabella 8. Correlazione tra set miRNA disregolati e letteratura

miRNA	GM vs GnM	ruolo miRNA nel CCR in letteratura	reference
hsa-miR-622	↑	↑ in CCR vs soggetti sani;	[63]
		↓ in CCR; inibisce angiogenesi	[65] [64]
hsa-miR-4665-5p	↑	↓ in CCR vs soggetti sani	[66] [67]
hsa-miR-7109-5p	↑	non investigato	
hsa-miR-7847-3p	↑	↓ in CCR (siero)	[41]
hsa-miR-4778-5p	↑	↓ in CCR (feci)	[66]
hsa-miR-3141	↑	↑ in carcinoma colico vs mucosa normale	[67]
hsa-miR-7515	↑	non investigato	
hsa-miR-6831-5p	↑	non investigato	
hsa-miR-4669	↑	↑ in CCR in assenza di metastasi linfatiche	[68]
		↓ in CCR metastatico vs non metastatico	[69]
hsa-miR-4800-5p	↑	↑ in CCR vs soggetti sani (siero)	[70]
hsa-miR-4298	↑	↑ in carcinoma colico vs mucosa normale	[67]
hsa-miR-4449	↓	espresso sia in carcinoma colico e tessuto normale	[71]
hsa-miR-324-3p	↓	↑ in CCR; sopprime l'invasività cellulare; associato a < OAS in mCCR	[72] [73] [74]
hsa-miR-22-3p	↓	↑ in CCR, ruolo inconsistente	[75] [76]
		↓ in CCR vs soggetti sani (oncosoppressore)	[77]
hsa-miR-155-5p	↓	↑ in CCR, correla con mts e MSI-H, regola crescita, migrazione e invasione tumorale, conferisce chemioresistenza	[2] [47] [79] [78] [80] [81] [82] [46] [83] [84] [85] [86]
		↓ in plasma, correla con <OAS e PFS	[87]
hsa-miR-150-5p	↓	↓ in CCR, tumor suppressor	[91] [66] [92]
		associato a CCR; promuove proliferazione cellulare e progressione tumorale	[88] [89] [90]
		↑ miglior prognosi	[93] [94]

Discussione

Il CCR è una delle patologie maligne più frequenti ed aggressive, dovuta all'accumulo di mutazioni genetiche ed epigenetiche che conducono alla progressiva distruzione dei meccanismi regolatori dell'equilibrio tra oncogeni e oncosoppressori promuovendo la carcinogenesi [3] [8] [95]. L'osservazione della nostra casistica, con un follow-up medio di 13 mesi, non consente di apprezzare differenze statisticamente significative nell'OAS e DFS dei pazienti in stadio precoce rispetto ai pazienti in stadio tardivo ($p=0,20$ e $p=0,26$). Tuttavia l'esperienza ci insegna che, con un periodo di osservazione più ampio, i nostri risultati avrebbero confermato i dati della letteratura, secondo cui la prognosi dei pazienti con CCR avanzato è scarsa, mentre la malattia è curabile se diagnosticata in stadio iniziale. Da qui l'importanza della prevenzione e della diagnosi precoce [2] [3].

Grazie agli attuali protocolli di screening e alle nuove linee terapeutiche, tra il 2005 e il 2014 l'incidenza del CCR ha registrato un calo del 2.9% all'anno, con una riduzione della mortalità stimata del 35% dal 1990 al 2007 [8]. Malgrado questi importanti risultati, l'analisi retrospettiva condotta sui dati di 393 241 pazienti americani con diagnosi di CCR effettuata tra il 1975 e il 2010, ha dimostrato che il tasso di incidenza è ridotto solo per la popolazione di età superiore ai 50 anni, mentre è in aumento nei pazienti giovani. Secondo questo studio entro il 2030 l'incidenza di carcinoma colico e rettale aumenterà rispettivamente del 27.7% e 46.0% nei soggetti di età

compresa tra i 35 e i 49 anni e addirittura del 90.0% e del 124.2% nei pazienti di età compresa tra i 20 e i 34 anni [96]. La causa di questo trend è ignota ma è stato suggerito che il CCR che colpisce i soggetti più giovani sia patologicamente e geneticamente più aggressivo, per cui è necessario sviluppare specifici trattamenti che salvaguardino questa coorte di pazienti [8] [97].

Il trattamento standard del CCR prevede la resezione endoscopica o chirurgica negli stadi precoci (fatta eccezione per i pazienti in stadio II ad “alto rischio”, entro opportuni trials clinici [8]) con l’associazione di chemioterapici/farmaci biologici negli stadi avanzati. Tuttavia, come sottolineato dalle linee guida dell’NCCN, la definizione corrente di “tumori in stadio II ad alto rischio” è chiaramente inadeguata, dal momento che molti di questi pazienti non sviluppano recidiva di malattia, mentre altri sì. L’utilizzo di biomarcatori affidabili eviterebbe di esporre a chemiotossicità pazienti che non beneficiano della terapia adjuvante e al contrario sarebbe fondamentale per la prognosi dei pazienti che effettivamente hanno una maggiore probabilità di ripresa di malattia [8] [98].

Numerosi studi riportano che la disregolazione di determinati miRNA distingue gli individui sani da quelli affetti da CCR, nei quali l’espressione aberrante dei meccanismi coinvolti nell’inizializzazione e nella progressione tumorale determina la conversione dell’epitelio coloretale normale in adenoma prima e in carcinoma poi [3].

Appurato che determinati miRNA possono svolgere un ruolo diagnostico importante nel testimoniare l'esistenza della malattia, analogamente l'espressione anomala di specifici miRNA può segnalare la presenza di metastasi regionali e a distanza, a prescindere dalle valutazioni cliniche, laboratoristiche, anatomopatologiche e strumentali condotte, valutazioni per lo più macroscopiche, quindi per loro natura fallibili, ma ad oggi sostanziali per l'impostazione dell'iter terapeutico. Al contrario, l'identificazione di miRNA target consentirebbe di selezionare la popolazione di pazienti che può beneficiare dei trattamenti chemioterapici pre- e post-operatori secondo un criterio nanoscopico, estremamente più sensibile e specifico.

Inoltre, visto che l'espressione dei miRNA correla con la presenza e con il carico tumorale [49] [50] [51] [52], la sorveglianza qualitativa e quantitativa di specifici miRNA potrebbe rappresentare un metodo di monitoraggio sensibile ed affidabile per identificare precocemente la persistenza o la ripresa di malattia pazienti sottoposti ad intervento chirurgico con intento curativo nonché nei pazienti con metastasi radiologicamente scomparse dopo chemioterapia.

Non meno importante e certo non di minore interesse è lo sviluppo di terapie basate sulla modulazione dei miRNA, approccio che fonda la propria applicazione sulla premessa che l'espressione aberrante dei miRNA gioca un ruolo cruciale sia nello sviluppo del cancro sia nella risposta terapeutica:

correggendo l'espressione o ripristinando la funzione di specifici miRNA sarebbe possibile proporre terapie mirate per le caratteristiche del tumore e del paziente [3]. È questo il caso di miR-21, il cui inibitore è attualmente in fase di sviluppo dalla Regulus Therapeutics per la lotta all'epatocarcinoma [99], o di miR-101, la cui up-regulation farmacologica rappresenta una nuova strategia per prevenire la recidiva del CCR, in quanto compromette la localizzazione nucleare delle β -catenine inibendo i geni delle cellule staminali [100]. Anche gli inibitori di miR-135b e gli up-regolatori di miR-143 e miR-145 hanno dimostrato un ruolo inibitorio sulla cancerogenesi nel CCR, rispettivamente su modello murino e su linee cellulari in vivo e in vitro [101] [102].

Questo progetto di ricerca ha identificato di un set di 16 miRNA disregolati nel CCR metastatico rispetto al non metastatico, specificatamente 11 up-regolati e 5 down-regolati. Dal confronto con la letteratura, seppure esistano risultati uniformi, molto frequentemente gli autori riportano risultati discordanti, infatti la up- o down-regolazione di taluni miRNA correla con prognosi favorevole in alcune casistiche e con prognosi sfavorevole in altre (Tabella 8).

Questi miRNA con ruolo antitettico nella cancerogenesi provano che un solo miRNA può regolare i bersagli di diverse vie e che il suo effetto sull'espressione cancerogenica finale è molto complesso sia a livello cellulare sia a livello tissutale [76].

Per quanto riguarda la concordanza tra l'espressione dei miRNA identificati da questo progetto e l'espressione osservata da casistiche differenti, occorre ricordare che il set di miRNA da noi ottenuto deriva dalla ricerca di espressioni differenziali tra CCR metastatico e non, pertanto il confronto dei nostri risultati con la letteratura può essere fuorviante, visto che lo scopo degli studi già pubblicati su questi specifici miRNA è stato più frequentemente rivolto all'identificazione di biomarcatori capaci di distinguere i pazienti affetti da CCR dai pazienti sani.

Conclusioni

Al giorno d'oggi i protocolli di cura e di sorveglianza del paziente affetto da CCR sono basati sullo stadio più che sulle specifiche del tumore e dell'individuo che lo ospita.

Ma se la cellula tumorale racchiude in sé le caratteristiche che determinano l'aggressività del cancro e la sua tendenza alla metastatizzazione, le indagini cliniche e strumentali, che soffrono limiti dimensionali nell'ordine dei millimetri oltreché di bias legati al campionamento chirurgico e all'analisi dei pezzi operatori, possono fornire una stadiazione post-chirurgica della neoplasia suscettibile di maggior precisione e attendibilità.

Al contrario, lo studio della genomica tumorale e dei meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione e l'invasione cellulare consentono la magnificazione di processi nanoscopici, insondabili con le tecniche standard, offrendo un substrato diagnostico e prognostico amplificato e quindi più sensibile e specifico.

Prospettive future

Nel futuro prevediamo di confermare i risultati ottenuti dall'analisi delle biopsie solide mediante validazione con real-time PCR e di condurre la caratterizzazione approfondita dei miRNA estratti dalle EV plasmatiche provenienti dai campioni ematici ottenuti dalla stessa coorte di pazienti prima e dopo l'intervento chirurgico.

Se l'espressione dei miRNA circolanti sarà assimilabile a quella dei miRNA estratti da tumore solido, potremo aggiungere al pool di nozioni già acquisite nel campo delle biopsie liquide importanti informazioni prognostiche sulla propensione metastatica di una tra le più frequenti ed aggressive neoplasie maligne. Questo consentirebbe l'identificazione precoce e non invasiva dei pazienti che presentano un rischio aumentato di progressione/recidiva metastatica oltreché dei pazienti con early metastases o con metastasi misconosciute all'imaging. Ciò potrebbe permettere di inserire i pazienti affetti da CCR all'interno di protocolli di sorveglianza e di terapia personalizzati ed individuati in base al rischio stimato di sviluppare ripresa di malattia, ponendo le basi per una futura implementazione degli attuali criteri di eleggibilità all'applicazione di nuovi protocolli terapeutici. Questi dati potranno inoltre concorrere a fornire il substrato per terapie di silenziamento e ingegnerizzazione di farmaci o nanomecole che agiscano selettivamente sul microenvironment tumorale,

prevenendo la formazione di nicchie pre-metastatiche e quindi lo sviluppo delle metastasi a distanza.

Bibliografia

- [1] «Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CACancer J Clin.* 2018; 68:394-424».
- [2] «Min L, Zhu S, Chen L et al. Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived miRNAs as biomarkers of early colon cancer: a comparison with plasma total miRNAs. *J Extracell Vesicles.* 2019; 8(1):1643670».
- [3] «To KK, Tong CW, Wu M, et al. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol.* 2018 Jul 21;24(27):2949-2973.».
- [4] «Kuhlmann K, van Hilst J, Fisher S et al. Management of disappearing colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol.* 2016 Dec; 42(12):1798-1805».
- [5] «Benoist S et al. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol.* 2006 8; 24(24):3939-45.».
- [6] «Owen JW, Fowler KJ, Doyle MB et al. Colorectal liver metastases: disappearing lesions in the era of Eovist hepatobiliary magnetic resonance imaging. *HPB (Oxford).* 2016 Mar; 18(3):296-303».
- [7] «Passot G, Soubrane O, Giuliante F et al. Recent Advances in Chemotherapy and Surgery for Colorectal Liver Metastases. *Liver Cancer.* 2016; 6(1):72-79».

- [8] «National Comprehensive Cancer Network NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer (version 3.2019) and rectal cancer (version 3.2019)».
- [9] «Makondi PT, Wei PL, Huang CY, et al. Development of novel predictive miRNA/target gene pathways for colorectal cancer distant metastasis to the liver using a bioinformatic approach. PLoS One. 2019 Feb 26;14(2):e0211968.».
- [10] «Berti S, Francone E, Minuto M et al. Synchronous totally laparoscopic management of colorectal cancer and resectable liver metastases. Langenbecks Arch Surg. 2015 5; 400(4):495-503».
- [11] «Francone E, Muzio E, D'Ambra L et al. Precoagulation-assisted parenchyma-sparing laparoscopic liver surgery: rationale and surgical technique. Surg. Endosc. 2017 3; 31(3):1354-1360».
- [12] «Van Vledder MG et al. Disappearing colorectal liver metastases after chemotherapy: should we be concerned? J Gastrointest Surg. 2010, 11; 14(11):1691-700.».
- [13] «Sucameli F, Francone E, Dova L et al. Surgical treatment of metachronous rectal liver and lung metastases: a combined videolaparoscopic and videothoracoscopic approach. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2018 6; 17(3):280-281».
- [14] «Lucidi V et al. Missing metastases as a model to challenge current therapeutic algorithms in colorectal liver metastases. World J

Gastroenterol. 2016, 4; 22(15):3937-44.».

- [15] «Viganò L, Capussotti L, Lapointe R et al. Early recurrence after liver resection for colorectal metastases: risk factors, prognosis, and treatment. A LiverMetSurvey-based study of 6,025 patients. Ann SurgOncol. 2014 4; 21(4):1276-86».
- [16] «Sturesson C et al. Disappearing liver metastases from colorectal cancer: impact of modern imaging modalities. HPB (Oxford). 2015 11; 17(11):983-7».
- [17] «Tani K, Shindoh J, Akamatsu N et al. Management of disappearing lesions after chemotherapy for colorectal liver metastases: relation between detectability and residual tumors. J Surg Oncol. 2018 2; 117(2):191-197».
- [18] «Bischof DA, Clary BM, Maithel SK et al. Surgical management of disappearing colorectal liver metastases. Br J Surg. 2013 10; 100(11):1414-20».
- [19] «Sharma A, Houshyar R, Bhosale P et al. Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. Clin Mol Hepatol. 2014 9; 20(3):317-26».
- [20] «Torrise JM, Schwartz LH, Gollub MJ et al. HCT findings of chemotherapy-induced toxicity: what radiologists need to know about the clinical and radiologic manifestations of chemotherapy toxicity. Radiology. 2011 1; 258(1):41-56».
- [21] «Zalinski S et al. A marking technique for intraoperative localization of

small liver metastases before systemic chemotherapy. *Ann SurgOncol.* 2009 5; 16(5):1208-11».

- [22] «Amin MB, Edge S, Greene F et al. *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer Intl. Publishing: American Joint Commission on Cancer. 2017».
- [23] «Baguena G, Pellino G, Frasson M et al. Prognostic Impact of pT Stage and Peritoneal Invasion in Locally Advanced Colon Cancer. *Dis Colon Rectum.* 2019 1; 62(6):684-693».
- [24] «Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM): *Linee Guida neoplasie del retto e ano e tumori del colon.* Ed. 2018».
- [25] «Li J, Yi CH, Hu YT et al. TNM Staging of Colorectal Cancer Should be Reconsidered According to Weighting of the T Stage: Verification Based on a 25-Year Follow-Up. *Medicine (Baltimore).* 2016 2; 95(6):e2711».
- [26] «Sabarimurugan S, Kumarasamy C, Madurantakam Royam M et al. Validation of miRNA prognostic significance in stage II colorectal cancer: a protocol for systematic review and meta-analysis of observational clinical studies. *Medicine (Baltimore).* 2019 3; 98(12)».
- [27] «Lee JH, Yu M, Kim SH et al. Pathologic Staging Inconsistency Between ypT4N0 (stage II) and ypT1-2N1 (stage III) After Preoperative Chemoradiotherapy and Total Mesorectal Excision in Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2019 3; 18(1):e130-e139».
- [28] «Kim MJ, Jeong SY, Choi SJ et al. Survival paradox between stage IIB/C

- (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1) colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 2; 22(2):505-12».
- [29] «Andre T, Boni C, Navarro M et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27:3109-16».
- [30] «Chu QD , Zhou M, Medeiros KL et al. Poor survival in stage IIB/C (T4N0) compared to stage IIIA (T1-2 N1, T1N2a) colon cancer persists even after adjusting for adequate lymph nodes retrieved and receipt of adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2016 7; 16:460».
- [31] «Dalerba P, Sahoo D, Paik S et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2016 1; 374(3):211-22».
- [32] «Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69:89–95».
- [33] «WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.».
- [34] «Schirripa M, Lenz HJ. Biomarker in Colorectal Cancer. *Cancer J*. 2016 5-6; 22(3):156-64».
- [35] «Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010;

46:2788–98».

- [36] «Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349:247-257.».
- [37] «Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3664-3672».
- [38] «Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 890-900».
- [39] «Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol.* 2015; 26: 2092-2097».
- [40] «Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One.* 2014 4; 9(4):e92921».
- [41] «Yan S, Han B, Gao S et al. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017 7; 8(36):60149-60158».
- [42] «Garcia-Silva S, Peinado H. Melanosomes foster a tumour niche by activating CAFs. *Nat Cell Biol.* 2016 8; 18(9):911-3».

- [43] «Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015; 219:396-405.».
- [44] «Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015 6; 17(6):816-26».
- [45] «Carter JV, Galbraith NJ, Yang D et al. Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2017 3; 116(6):762-774».
- [46] «Al-Haidari AA, Syk I, Thorlacius H. MiR-155-5p positively regulates CCL17-induced colon cancer cell migration by targeting RhoA. *Oncotarget.* 2017 Feb 28;8(9):14887-14896.».
- [47] «Al-Haidari A, Algaber A, Madhi R, et al. MiR-155-5p controls colon cancer cell migration via post-transcriptional regulation of Human Antigen R (HuR). *Cancer Lett.* 2018 May 1;421:145-151.».
- [48] «Thomas MS, Margolin DA. Management of Colorectal Anastomotic Leak. *Clin Colon Rectal Surg.* 2016 6;29(2):138-44».
- [49] «Ostenfeld MS, Jensen SG, Jeppesen DK et al. MiRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. *J Extracell Vesicles.* 2016 8; 5:31488.».
- [50] «Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2015; 15:103-13».

- [51] «Du M, Liu S, Gu D et al. Clinical potential role of circulating microRNAs in early diagnosis of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. 2014; 35:2723-30».
- [52] «Rokkas T, Kothonas F, Rokka A et al. The role of circulating microRNAs as novel biomarkers in diagnosing colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J GastroenterolHepatol*. 2015; 27:819-25».
- [53] «Francone E, Bonfante P et al. Overcoming the concept of high and low vascular ligation in sigmoidectomy for cancer: is it possible? Introducing Laparoscopic Inferior Mesenteric artery Peeling (LIMP) into clinical practice. *Tech Coloproctol*. 2017; 21:79–89».
- [54] «Francone E, Bonfante P, Bruno MS et al. Laparoscopic Inferior Mesenteric artery Peeling: an alternative to high or low vascular ligation for sigmoid colon cancer resection. *World J Surg*. 2016 11; 40(11):2790-2795».
- [55] «Cipriani F, Shelat VG, Rawashdeh M, Francone E et al. Laparoscopic parenchymal-sparing resections for centrally located non-peripheral liver lesions, the diamond technique: technical aspects, clinical outcomes and oncological efficiency. *HPB*. 2016; 18:e84».
- [56] «Cipriani F, Rawashdeh M, Francone E et al. Laparoscopic liver resection of Segment 1 for malignant lesions in three different clinical settings. *HPB*. 2016; 18:e794».
- [57] «Cipriani F, Rawashdeh M, Francone E et al. Laparoscopic parenchymal-sparing resection of segment eight. *HPB*. 2016; 18:e807-e808».

- [58] «Cipriani F, Shelat VG, Rawashdeh M, Francone E et al. Laparoscopic Parenchymal-Sparing Resections for Non-Peripheral Liver Lesions, the Diamond Technique: Technical Aspects, Clinical Outcomes, and Oncologic Efficiency. *J Am Coll Surg*. 2015 8; 221(2):265-7».
- [59] «Berti S, Francone E, Gennai A et al. Incisionless combined total laparoscopic approach for hepatic and colorectal resection (TaTME): a case report. *Tech Coloproctol*. 2017; 21:79–89».
- [60] «Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004 32:D109-D111».
- [61] «Ritchie ME, Phipson B, Wu D et al. LIMMA powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43(7), e47».
- [62] «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 Aug;240(2):205-13.».
- [63] «Balaguer F, Moreira L, Lozano JJ et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display unique miRNA profiles. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(19): 6239-6249.».
- [64] «Fang Y, Sun B, Li Z, Chen Z et al. MiR-622 inhibited colorectal cancer occurrence and metastasis by suppressing K-Ras. *Mol Carcinog*. 2015.».
- [65] «Fang Y, Sun B, Wang J, et al. miR-622 inhibits angiogenesis by suppressing the CXCR4-VEGFA axis in colorectal cancer. *Gene*. 2019 May 30;699:37-

42.».

- [66] «Ghanbari R, Mosakhani N, Sarhadi VK, et al. Simultaneous Underexpression of let-7a-5p and let-7f-5p microRNAs in Plasma and Stool Samples from Early Stage Colorectal Carcinoma. *Biomark Cancer*. 2016;7(Suppl 1):39–48.».
- [67] «Slattery ML, Trivellas A, Pellatt AJ, et al. Genetic variants in the TGF β -signaling pathway influence expression of miRNAs in colon and rectal normal mucosa and tumor tissue. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):16765-16783.».
- [68] «Wang YN, Chen ZH, Chen WC. Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: a pilot study. *Eur J Med Res*. 2017 Nov 29;22(1):51.».
- [69] «Iida M, Hazama S, Tsunedomi R, et al. Overexpression of miR-221 and miR-222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2018 Sep;40(3):1621-1631.».
- [70] «Zhang Y, Li M, Ding Y, et al. Serum MicroRNA profile in patients with colon adenomas or cancer. *BMC Med Genomics*. 2017 Apr 20;10(1):23.».
- [71] «Slattery ML, Herrick JS, Pellatt DF, et al. MicroRNA profiles in colorectal carcinomas, adenomas and normal colonic mucosa: variations in miRNA expression and disease progression. *Carcinogenesis*. 2016 Mar;37(3):245-261.».
- [72] «Kuo WT, Yu SY, Li SC, et al. MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p

and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer.

Anticancer Res. 2016 Oct;36(10):5189-5196.».

- [73] «Schou JV, Rossi S, Jensen BV, et al. miR-345 in metastatic colorectal cancer: a non-invasive biomarker for clinical outcome in non-KRAS mutant patients treated with 3rd line cetuximab and irinotecan. PLoS One. 2014 Jun 18;9(6):e99886.».
- [74] «Yan D, Liu W, Liu YJ, et al. LINC00261 suppresses human colon cancer progression via sponging miR-324-3p and inactivating the Wnt/ β -catenin pathway. Cell Physiol. 2019 Dec;234(12):22648-22656.».
- [75] «Schee K, Lorenz S, Worren MM, et al. Deep Sequencing the MicroRNA Transcriptome in Colorectal Cancer. PLoS One. 2013 Jun 18;8(6):e66165.».
- [76] «Ardila HJ, Sanabria-Salas MC, Meneses X, et al. Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas. Mol Clin Oncol. 2019 Aug;11(2):201-207.».
- [77] «Sha QK, Chen L, Xi JZ, et al. Long non-coding RNA LINC00858 promotes cells proliferation, migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-22-3p in colorectal cancer. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019 Dec;47(1):1057-1066.».
- [78] «Qu YL, Wang HF, Sun ZQ, et al. Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015, 8, 6988–6994.».

- [79] «Yang L, Li L, Ma J, et al. miRNA and mRNA Integration Network Construction Reveals Novel Key Regulators in Left-Sided and Right-Sided Colon Adenocarcinoma. *Biomed Res Int.* 2019 Apr 3;2019:7149296.».
- [80] «Bao Y, Tang J, Qian Y, et al. Long noncoding RNA BFAL1 mediates enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-related carcinogenesis in colorectal cancer via the RHEB/mTOR pathway. *Cell Death Dis.* 2019 Sep 12;10(9):675.».
- [81] «Lan J, Sun L, Xu F, et al. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer. *Cancer Res.* 2019 Jan 1;79(1):146-158.».
- [82] «Yin Y, Yao S, Hu Y, et al. The Immune-microenvironment Confers Chemoresistance of Colorectal Cancer through Macrophage-Derived IL6. *Clin Cancer Res.* 2017 Dec 1;23(23):7375-7387.».
- [83] «Kara M, Yumrutas O, Ozcan O, et al. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma. *Gene.* 2015 Aug 1;567(1):81-6.».
- [84] «Dong Y, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer Manag Res.* 2014 Oct 14;6:405-22.».
- [85] «Motieghader H, Kouhsar M, Najafi A, et al. mRNA-miRNA bipartite network reconstruction to predict prognostic module biomarkers in colorectal cancer stage differentiation. *Mol Biosyst.* 2017 Sep 26;13(10):2168-2180.».

- [86] «Pathak S, Meng WJ, Nandy SK, et al. Radiation and SN38 treatments modulate the expression of microRNAs, cytokines and chemokines in colon cancer cells in a p53-directed manner. *Oncotarget*. 2015 Dec 29;6(42):44758-80.».
- [87] «Ulivi P, Canale M, Passardi A, et al. Circulating Plasma Levels of miR-20b, miR-29b and miR-155 as Predictors of Bevacizumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 307».
- [88] «Pellatt DF, Stevens JR, Wolff RK, et al. Expression Profiles of miRNA Subsets Distinguish Human Colorectal Carcinoma and Normal Colonic Mucosa. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;7(3):e152.».
- [89] «Liu F, Di Wang X. miR-150-5p represses TP53 tumor suppressor gene to promote proliferation of colon adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2019;9(1):6740.».
- [90] «Chen B, Xia Z, Deng YN, et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*. 2019;9(1):180212.».
- [91] «Falzone L, Scola L, Zanghì A, et al. Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: identification of microRNAs associated with tumor development. *Aging (Albany NY)*. 2018 May 18;10(5):1000-1014.».
- [92] «Chen X, Xu X, Pan B, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(11):3421–3437.».
- [93] «Slattery ML, Mullany LE, Sakoda LC, et al. Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. *Apoptosis*.

2018;23(3-4):237–250.».

- [94] «Slattery ML, Mullany LE, Wolff RK, et al. The p53-signaling pathway and colorectal cancer: Interactions between downstream p53 target genes and miRNAs. *Genomics*. 2019;111(4):762–771.».
- [95] «Wu HL, Tai YH, Lin SP et al. The Impact of Blood Transfusion on Recurrence and Mortality Following Colorectal Cancer Resection: A Propensity Score Analysis of 4,030 Patients. 2018 Sep 6;8(1):13345.».
- [96] «Bailey CE, Hu CY, You YN, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975- 2010. *JAMA Surg* 2014:1-6.».
- [97] «Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. *Oncology (Williston Park)* 2017;31:381-389.».
- [98] «Jacob H, Stanisavljevic L, Storli KE et al. A four-microRNA classifier as a novel prognostic marker for tumor recurrence in stage II colon cancer. *Sci Rep*. 2018 Apr 18;8(1):6157.».
- [99] «Wagenaar TR, Zabludoff S, Ahn SM, et al. Anti-miR-21 Suppresses Hepatocellular Carcinoma Growth via Broad Transcriptional Network Deregulation. *Mol Cancer Res* 2015; 13: 1009-1021.».
- [100] «Strillacci A, Valerii MC, Sansone P, et al. Loss of miR-101 expression promotes Wnt/ β -catenin signaling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. *J Pathol* 2013; 229: 379-389.».

[101] «Valeri N, Braconi C, Gasparini P, et al. MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. *Cancer Cell* 2014; 25: 469-483.».

[102] «Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, et al. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 398-408.».