



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Tecnologie Biomediche

Ciclo XXVII

**IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DI POTENZIALI
MARCATORI BIOLOGICI NELL'ADENOCARCINOMA
DUTTALE DEL PANCREAS**

Coordinatore: *Ch.ma Prof.ssa Marina Del Puppo*

Tutor: *Dott.ssa Cristina Bianchi*

Co-tutor: *Dott. Lorenzo Piemonti*

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa ERICA DUGNANI

Matr. 070174

Anno accademico 2013-2014

Indice

1. RIASSUNTO	6
2. INTRODUZIONE	8
2.1 Il pancreas: caratteristiche anatomiche e fisiologiche	8
2.1.1 Struttura e composizione del pancreas	8
2.1.2 Pancreas endocrino.....	9
2.1.3 Pancreas esocrino.....	10
2.2 Il carcinoma pancreatico	11
2.2.1 Epidemiologia del tumore pancreatico.....	11
2.2.2 Classificazione istologica dei tumori del pancreas	13
2.2.3 Anatomia patologica e stadiazione del carcinoma duttale pancreatico.....	14
2.2.4 Cause dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e fattori di rischio	16
2.2.4.1 Fattori di rischio genetici.....	17
2.2.4.2 Fattori di rischio ambientali e stili di vita	19
2.2.5 Patogenesi ed oncogenesi del carcinoma duttale del pancreas.....	21
2.2.5 Presentazione clinica.....	24
2.2.6 Trattamento del tumore pancreatico.....	26
2.2.6.1 Approccio chirurgico	26
2.2.6.2 Terapia medica.....	26
2.2.7 Diagnosi del tumore del pancreas	27
2.2.7.1 Tecniche di diagnostica per immagini.....	27
2.2.7.2 Marcatori sierici diagnostici.....	29
2.2.8 Prognosi del tumore del pancreas.....	30
2.2.8.1 Marcatori prognostici	31
3. SCOPO	34
4. MATERIALI E METODI.....	36
4.1 Linee cellulari umane immortalizzate	36
4.2 Mantenimento delle linee cellulari immortalizzate	37
4.3 Allestimento di colture primarie eterogenee di pancreas sano da donatori di organo a cuore battente	37
4.4 Determinazione della vitalità e conta cellulare mediante colorazione con Trypan blue	38
4.5 Saggio di clonogenicità <i>in vitro</i>	38

4.6 Saggio di quantificazione dell'apoptosi mediante citometria a flusso	39
4.7 Saggio di chemioresistenza	40
4.8 Saggio multiplo di misurazione della secrezione di fattori solubili tramite la tecnologia Luminex Xmap®	40
4.9 Isolamento di cellule tumorali da tumori primari pancreatici umani	41
4.10 Analisi citofluorimetrica dell'espressione di molecole di membrana	42
4.11 Estrazione di RNA con kit mirVana™	45
4.12 Retro trascrizione e Real time PCR	46
4.13 Inoculo sottocutaneo	47
4.15 Pazienti arruolati per gli studi di validazione	48
4.16 Analisi statistica	48
5. RISULTATI	50
5.1 Prima fase di caratterizzazione delle linee tumorali pancreatiche	50
5.1.1 Clonogenicità in vitro	50
5.1.2 Chemioresistenza alla Gemcitabina	51
5.1.3 Clonogenicità in vivo.....	52
5.2 Seconda fase di caratterizzazione delle linee tumorali pancreatiche	55
5.2.1 Espressione di recettori delle chemochine	55
5.2.2 Valutazione della secrezione di fattori solubili	61
5.2.3 Valutazione dell'espressione di marcatori di staminalità.....	63
5.2.3 Valutazione dell'espressione di fattori coinvolti nello sviluppo pancreatico	68
5.3 Fase di analisi di correlazione tra dati molecolari e caratteristiche di malignità delle linee tumorali pancreatiche	73
5.3.1 Descrizione della strategia statistica di analisi inter-linea per la ricerca e prioritizzazione di biomarcatori.....	73
5.4 Fase di validazione: fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico	77
5.4.1 Studio prospettico: descrizione della coorte in studio di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas	77
5.4.2 Analisi dell'espressione dei fattori molecolari di sviluppo pancreatico PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19 nella coorte dei 42 pazienti affetti da PDAC	81
5.4.3 Correlazione fra l'espressione dei fattori molecolari PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19 e l'esito clinico nei pazienti non metastatici alla resezione chirurgica.....	82
5.4.4 Correlazione fra PDX1, PAX6, KRT19 e le caratteristiche clinico-patologiche nei pazienti non metastatici alla resezione	86

5.4.5	Combinazione dei marcatori molecolari PDX1, PAX6, KRT19 e correlazione con la sopravvivenza nei pazienti non metastatici alla resezione	87
5.5	Fase di validazione: marcatori di staminalità	89
5.5.1	Studio prospettico: descrizione della coorte di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas.....	89
5.5.2	Valutazione dell'espressione dei marcatori staminali nella coorte dei 46 pazienti affetti da PDAC	93
5.5.3	Correlazione fra l'espressione dei putativi marcatori staminali e l'esito clinico nella coorte dei 39 pazienti affetti da PDAC.	96
5.6	Fase di validazione preliminare: recettori delle chemochine	100
5.6.1	Espressione di CCR5 e CXCR3 su tessuti processati a fresco di resezioni tumorali pancreatiche e pancreas sano di donatori	100
6.	DISCUSSIONE.....	101
7.	CONCLUSIONI	113
8.	BIBLIOGRAFIA.....	114

1. Riassunto

Introduzione. L'adenocarcinoma duttale (PDAC) rappresenta circa l'85% delle neoplasie maligne pancreatiche. È un tipo di neoplasia molto aggressiva e ha prognosi infausta. Il PDAC è una malattia con una elevata mortalità, spesso diagnosticata in uno stadio avanzato per il quale esistono poche e inefficaci terapie. L'alta incidenza di ricadute locali unita alla precoce metastatizzazione sono le caratteristiche cliniche più tipiche di questo tumore. Inoltre la nota resistenza del tumore alla chemio e alla radioterapia limita l'efficacia di questi approcci terapeutici.

Scopo. Identificare e validare nuovi marcatori biologici associati a caratteristiche di aggressività dell'adenocarcinoma pancreatico al fine di utilizzarli per comprendere proprietà biologiche del tumore stesso o in clinica per una corretta valutazione prognostica.

Metodi e risultati. Abbiamo studiato n=17 linee cellulari umane immortalizzate di PDAC per alcune caratteristiche di aggressività cellulare: per la clonogenicità e la chemioresistenza alla gemcitabina *in vitro* e, *in vivo*, per la capacità di crescita in topi immunocompromessi (CD1-nude). Tutte le 17 linee cellulari sono state caratterizzate per l'espressione di classi di marcatori molecolari: recettori delle chemochine (CCR1-CCR10; CXCR1-CXCR6; CX3CR1; XCR1) e putativi marcatori staminali tumorali (ESA+CD24+CD44+; CD133+, CXCR4+) mediante citometria a flusso, secrezione di fattori solubili (n=48) tramite la tecnologia luminex e l'espressione di geni (n=11) coinvolti nello sviluppo pancreatico con Real Time PCR. Usando l'analisi statistica inter-linea (regressione lineare o di cox) abbiamo cercato una correlazione tra i fenotipi biologici e le caratteristiche di malignità cellulare individuando nuovi marcatori. Questi marcatori sono stati validati su tessuti tumorali primari in casistiche di pazienti affetti da PDAC: l'espressione del marcatore identificato è stata correlata con l'esito clinico della neoplasia.

In una prima analisi inter-linea n=35 fattori sono risultati statisticamente associati ad una o più caratteristiche di aggressività. È seguita una classificazione per priorità che, avvalendosi della sola correlazione con la tumorigenicità *in vivo*, ha ridotto a n=20 i fattori di rischio da validare. Abbiamo quindi approfondito lo studio su 4 marcatori molecolari di sviluppo pancreatico (ISL1, PDX1, PAX6, KRT19), sui fenotipi staminali e su 2 recettori delle chemochine (CCR5, CXCR3).

L'espressione genica dell'mRNA di ISL1, PDX1, PAX6 e KRT19 è stata valutata in sezioni criostatiche di n=42 resezioni chirurgiche di pazienti affetti da PDAC. Non sono emerse correlazioni significative tra l'espressione di questi fattori e la sopravvivenza globale. Tuttavia alti livelli dell'mRNA di KRT19 predicono una progressione più precoce e di tipo metastatico. Più elevati livelli di PDX1 e PAX6 sono associati con una più alta probabilità di recidiva locale. Inoltre combinando i marcatori è stato individuato un fenotipo più aggressivo correlato con una minor sopravvivenza: si tratta dei pazienti che esprimono ad elevati livelli sia PDX1 che KRT19. La nostra strategia di screening ha mostrato essere fattori di rischio per lo sviluppo tumorale nel topo, non i classici fenotipi staminali descritti in letteratura (ESA+/CD24+/CD44+, CD133+, CD133+/CXCR4+) ma la combinazione ESA+/CD24-/CD44+ e la sola espressione di CXCR4 ed ESA: tuttavia la validazione clinica, condotta su una coorte di 39 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale, non ha confermato che questi marcatori, né i classici già descritti, correlino in maniera statisticamente significativa con la sopravvivenza o con la progressione nel tempo e nemmeno con il sito di recidiva. Il fenotipo ESA+/CD24+/CD44- è invece risultato un fattore di rischio prognostico indipendente sia per la sopravvivenza (HR=4,166 p=0,001) che per la progressione (HR=2,208 p=0,019).

CCR5 e CXCR3 sono risultati espressi su tessuti tumorali processati a fresco (n=6) ed analizzati in citometria a flusso a fronte di una negatività del pancreas di donatori d'organo (n=10). Essi sono espressi rispettivamente nell'11,9% e nel 17,6% delle cellule CA19.9+ del tumore, mentre solo nello 0,4% e il 0,34% nel tessuto sano. L'aumentata espressione di CCR5 e CXCR3 sembra essere una caratteristica tipica del PDAC.

Conclusioni. La nostra strategia ha identificato marcatori biologici capaci di distinguere differenti comportamenti clinici del tumore in termini di progressione e sede di recidiva. La differente espressione di questi predittori potrebbe essere la causa di differenze biologiche che hanno un effetto sui meccanismi di progressione e diffusione tumorale. Al fine di confermare i nostri risultati stiamo realizzando un tissue microarray di resezioni chirurgiche di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale. Inoltre in futuro il modello statistico sviluppato potrà essere applicato per testare ogni nuovo potenziale marcatore; caratterizzata la sua espressione sulle linee cellulari, si procederà con l'analisi inter-linea per verificare se sia un potenziale indicatore di aggressività *in vitro* o *in vivo* nel modello murino; quindi si potrà confermare il suo reale ruolo diagnostico, prognostico o predittivo in ambito clinico.

2. Introduzione

2.1 Il pancreas: caratteristiche anatomiche e fisiologiche

2.1.1 Struttura e composizione del pancreas

Il pancreas è un organo impari, ghiandolare e parenchimoso annesso all'apparato digerente. Si tratta di una ghiandola mista in cui coesistono una formazione ghiandolare esocrina e una parte endocrina. È localizzato nel retroperitoneo, all'altezza della prima e seconda vertebra lombare, e si estende dal duodeno all'ilo della milza. Proprio per questa sua localizzazione le patologie che lo interessano presentano solo sintomi e segni vaghi. Il risultato è che problemi di matrice pancreaticata rimangono non diagnosticati a lungo, dato che il loro riconoscimento richiede spesso un alto grado di esperienza e spirito di indagine. Il pancreas non presenta suddivisioni anatomiche ben definite, tuttavia i vasi e i legamenti adiacenti stabiliscono la suddivisione dell'organo in

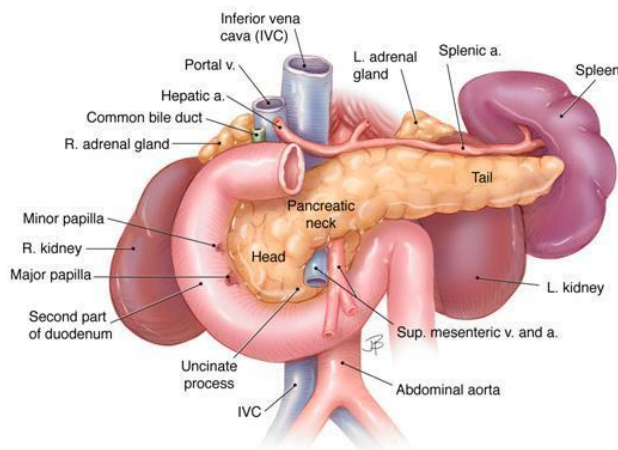


Figura 2.1. Relazione anatomiche del pancreas con organi e strutture circostanti².

testa, corpo e coda (Figura 2.1). Il pancreas presenta una voluminosa testa inserita nella concavità della C duodenale; dopo un breve restringimento (istmo), assume forma rettangolare prolungandosi verso sinistra (corpo) e termina assottigliandosi con la coda, che si dirige verso l'ilo della milza. L'asse dell'organo è leggermente obliquo dal basso in alto e da destra a sinistra. L'irrorazione del pancreas è garantita dalle arterie pancreatico duodenali superiori e inferiori, rami dell'arteria splenica,

dell'arteria epatica e dell'arteria mesenterica superiore. Le vene reflue sono tributarie del sistema della vena porta^{1,2}.

2.1.2 *Pancreas endocrino*

L'epitelio dei dotti pancreatici fetali è formato da potenziali cellule sia endocrine che esocrine. Durante lo sviluppo le cellule endocrine migrano dal sistema duttale e si aggregano intorno a capillari a formare isole di cellule disperse nel resto del tessuto esocrino; tali aggregati si svilupperanno a formare le isole di Langerhans che possono avere diversa dimensione e composizione³. La distribuzione delle isole di Langerhans non è omogenea, alcuni ne indicano maggior concentrazione nella testa, altri nella coda del pancreas. Esse contengono differenti tipi cellulari, ognuno responsabile della secrezione di uno specifico ormone peptidico. Ogni isola è circondata da una capsula di tessuto connettivo lasso. Le cellule endocrine sono piccole con un citoplasma granulare debolmente colorato. Le isole di Langerhans sono sprovviste di dotti e le loro cellule sono avvolte da una ricca rete capillare, entro cui sono riversati i prodotti di secrezione, che confluisce poi nella vena porta³.

All'interno delle isole si distinguono cinque tipi cellulari differenti:

- cellule β , che costituiscono il *core* dell'isola e producono insulina; rappresentano il 60-80% delle cellule endocrine;
- cellule α , che producono il glucagone e rappresentano il 15-20% delle cellule endocrine;
- cellule δ , che producono somatostatina e rappresentano il 5-10% delle cellule endocrine;
- cellule PP, che producono il polipeptide pancreatico e rappresentano meno del 2% delle cellule endocrine
- cellule ϵ , che producono grelina e rappresentano il 3-8% di tutte le cellule endocrine.

Nel pancreas questi ormoni influiscono reciprocamente per via paracrina sulla loro produzione e secrezione. Le isole di Langerhans giocano un ruolo fondamentale nel metabolismo dei carboidrati. Il principale stimolo per il rilascio dell'insulina, che avviene in modo pulsatorio, è l'aumento del livello di glucosio nel sangue. La secrezione di insulina è favorita soprattutto durante la digestione. L'insulina stimola l'ingresso di glucosio nel citoplasma delle cellule di organi insulino-dipendenti legandosi al suo recettore sulla membrana cellulare, in particolare nelle cellule del fegato, della muscolatura scheletrica e del tessuto adiposo; ciò ha come conseguenza la diminuzione della concentrazione ematica del glucosio stesso. L'insulina esercita dunque un'azione anabolica e lipogena favorendo l'immagazzinamento del glucosio, soprattutto

nel fegato. In tale sede l'insulina induce enzimi che favoriscono la glicolisi e la glicogenesi e inibisce gli enzimi coinvolti nella gluconeogenesi. In generale, il glucagone ha effetti metabolici opposti a quelli dell'insulina di cui è descritto come antagonista: il suo principale compito è quello di mantenere la glicemia sufficientemente alta anche tra i pasti o quando l'organismo consuma elevate quantità di glucosio ¹. Indipendentemente dal loro ruolo nel metabolismo dei carboidrati, questi ormoni hanno un'ampia varietà di altri effetti sul metabolismo energetico, sulla crescita e sullo sviluppo.

2.1.3 Pancreas esocrino

Gran parte della ghiandola è costituita dal pancreas esocrino che ha la funzione di secernere il succo pancreatico per riversarlo nel duodeno e permettere il completamento della digestione. Il succo pancreatico è un liquido incolore, nettamente alcalino perché ricco di bicarbonato di sodio; l'elevato pH è necessario per neutralizzare l'acidità del chimo. I costituenti organici del succo pancreatico comprendono un'elevata quantità di enzimi pancreatici che hanno la funzione di scindere proteine, glucidi e lipidi. La componente esocrina è costituita da adenomeri tubuloacinosi a secrezione sierosa (acini). Ogni acino è costituito da un aggregato di cellule secretorie di forma piramidale, i cui apici circondano un piccolo lume centrale che rappresenta la parte terminale dei dotti secretori. Gli acini sono separati fra loro da scarso tessuto connettivo lasso contenente numerosi capillari. Sono formati da cellule prismatiche con abbondante reticolo endoplasmatico rugoso ed uno sviluppato apparato di Golgi. La cellula acinare produce gli enzimi digestivi e li immagazzina in granuli di zimogeno. Quando le cellule vengono stimolate i granuli vengono fusi con la membrana apicale delle cellule e rilasciano il loro contenuto nel lume acinare. I principali enzimi prodotti dalle cellule acinari sono: tripsinogeno, chimotripsinogeno, elastasi, lipasi, amilasi, fosfolipasi e nucleasi pancreatiche. Tutti questi enzimi vanno a costituire il succo pancreatico. Gli enzimi proteolitici pancreatici, tripsina e chimotripsina, sono secreti in forma inattiva. L'enterochinasi, un enzima secreto dalla mucosa duodenale, li attiva e questo meccanismo previene l'autodigestione del pancreas e concentra la loro attività all'interno del duodeno. Gli altri enzimi pancreatici vengono secreti in forma attiva. La secrezione e la formazione dei granuli di zimogeno è sotto il controllo di ormoni quali la secretina e la pancreozimina-colecistochinina, prodotti dalle cellule del sistema endocrino diffuso a livello delle cripte intestinali del duodeno. La componente esocrina del pancreas è quindi formata da

acini secretori strettamente ammassati, i quali drenano in un sistema di dotti altamente ramificato. La maggior parte della secrezione confluisce nel dotto pancreatico principale, che si unisce al dotto biliare comune per riversarsi a sua volta nell'ampolla di Vater, che si apre nel duodeno in

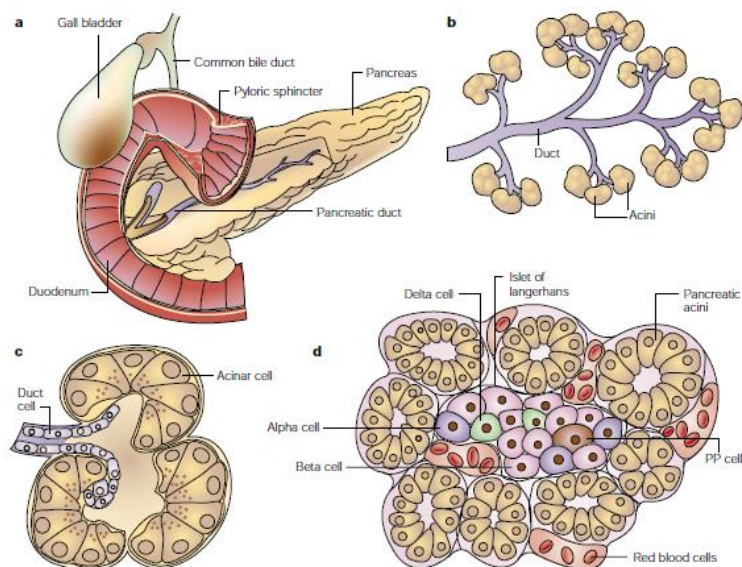


Figura 2.2 a) anatomia del pancreas; b) il pancreas esocrino; c) un singolo acino; d) isola pancreatica immersa nel tessuto esocrino⁵.

corrispondenza della papilla duodenale maggiore. Esiste anche un dotto accessorio, o di Santorini, che si trova nella porzione superiore della testa del pancreas, come ramo del dotto principale, e sbocca nella papilla duodenale minore. Le cellule epiteliali dei dotti partecipano attivamente alla secrezione pancreatico: le cellule epiteliali cuboidali dei dotti di circonferenza minore rilasciano secrezioni ricche di bicarbonato, mentre le cellule epiteliali cilindriche dei dotti

maggiori producono mucina, una glicoproteina che ha la funzione di proteggere l'epitelio pancreatico^{1,3-5}.

2.2 Il carcinoma pancreatico

2.2.1 Epidemiologia del tumore pancreatico

Il carcinoma pancreatico è una delle patologie neoplastiche più letali, con un tasso di mortalità inferiore solo ai più frequenti tumori ai polmoni, al colon e al seno⁶. In Italia il tumore del pancreas rappresenta la quinta causa di decesso sul totale dei decessi oncologici⁷.

È raramente diagnosticato in persone più giovani di 40 anni di età e la mediana di insorgenza è di 71 anni. Nel mondo, l'incidenza di tutti i tipi di tumore del pancreas è nell'intervallo da 1 a 10 casi per 100000 persone, ed è generalmente più alta nei paesi sviluppati e fra gli individui di

sesto maschile^{8,9}. Si tratta di una neoplasia in cui l'incidenza è quasi sovrapponibile al tasso di mortalità: nel 2012, negli Stati Uniti, sono stati diagnosticati 43'920 nuovi casi di carcinoma pancreatico e 37'390 sono state le morti legate a questa patologia¹⁰.

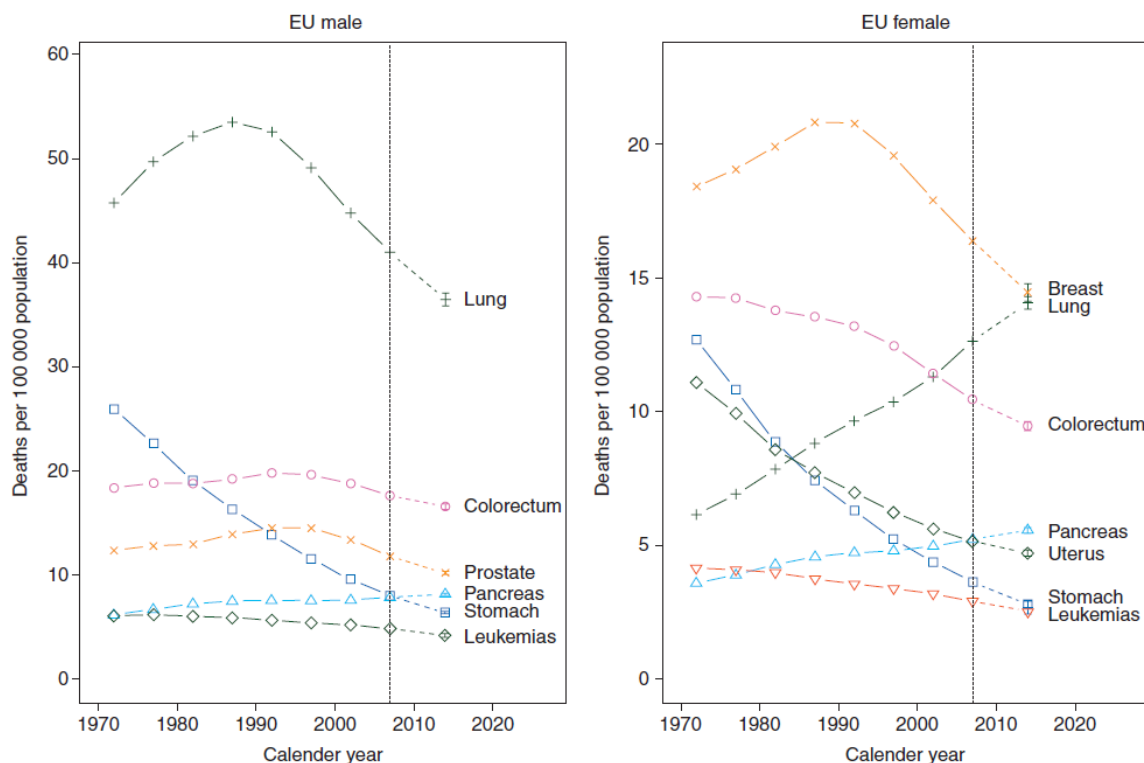


Figura 2.3 Tasso di mortalità europeo standardizzato per età nei due sessi dal quinquennio 1970-1974 al 2005-2009 e percentuali di predizione per il 2014¹⁴.

In meno del 20% dei casi si presenta come un tumore localizzato e potenzialmente curabile. Nonostante le terapie sistemiche adiuvanti la maggior parte dei pazienti presenta recidive, questo fa sì che la sopravvivenza a 5 anni nei pazienti sia minore del 5%¹¹. In Italia sulla base della casistica del pool Airtum nel periodo 2006-2009 solo il 7% degli uomini e il 9% delle donne risultano vivi a 5 anni, senza sensibili scostamenti di prognosi negli ultimi 20 anni⁷. Le previsioni per quanto riguarda il 2014 in Europa non indicano un miglioramento, dopo 36714 uomini e 36725 donne decedute nel 2009, si arriva a fare una previsione di più di 40'000 morti (per sesso) in seguito a tumore del pancreas¹². In Italia nel 2014 sono attesi 12700 nuovi casi, circa il 3% di tutti i tumori incidenti tra maschi e femmine¹³.

Si svela così un trend decisamente negativo (figura 2.3), dove, contrariamente agli altri tumori (es: tumori del colon-retto, della prostata e del seno), si va verso un aumento della mortalità invece che verso una diminuzione, con un'incidenza che rimane stabile da almeno 10 anni.

2.2.2 Classificazione istologica dei tumori del pancreas

La classificazione istologica si basa sulla classificazione di riferimento dell'organizzazione mondiale della salute (WHO) ¹⁴. I tumori del pancreas vengono distinti in gruppi sulla base di: 1) aspetto macroscopico (intraduttale, solido, cistico); 2) linea di differenziazione cellulare (acinare, duttale, endocrina); 3) profilo immunofenotipico se la linea differenziativa della neoplasia non è chiara dall'aspetto istologico (tipicamente i tumori acinari sono caratterizzati dalla produzione di enzimi quali tripsina, chimotripsina; i duttali per la positività a MUC1 e alle citocheratine 7,8,18,19; i neuroendocrini sono positivi per cromogranina e sinaptofisina).

La differenziazione di linea è l'elemento cruciale che determina sia le caratteristiche biologiche sia il comportamento clinico di una determinata neoplasia pancreatico.

I tumori dell'esocrino costituiscono circa il 95% dei tumori del pancreas.

Semplificando la classificazione WHO, l'entità nosografiche possono essere ridotte a otto tipologie ^{14,15}:

1. adenocarcinoma duttale e le sue varianti (carcinoma adenosquamoso, adenocarcinoma mucinoso non cistico, epatoide, midollare, a cellule ad anello con catone, anaplastico) che costituiscono circa l'85% di tutti i tumori del pancreas;
2. cistoadenoma sieroso (1%);
3. neoplasia mucinoso cistica (1%);
4. neoplasia intraduttale (5%);
5. carcinoma a cellule acinari (1%);
6. pancreatoblastoma (1%);
7. neoplasia solida-pseudopapillare (1%);
8. neoplasia neuroendocrina (5%).

Nonostante le cellule duttali rappresentino solo il 20-30% del normale parenchima pancreatico, l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) costituisce il più comune tumore del pancreas. Nel contesto della neoplasia del pancreas parlare di tumore pancreatico significa, nella maggioranza dei casi, riferirsi all'adenocarcinoma duttale. Il PDAC è stato definito il "killer silenzioso", poiché è caratterizzato dalla diagnosi tardiva per mancanza di sintomi specifici precoci, dall'assenza di approcci terapeutici efficaci e da una prognosi infausta.

2.2.3 Anatomia patologica e stadiazione del carcinoma duttale pancreatico

Nelle casistiche autoptiche il 60-70% dei PDAC si localizza a livello della testa, il 10-15% a livello della coda, il 5-10% a livello del corpo mentre il 10% coinvolge tutta la ghiandola. Nelle casistiche cliniche si conferma la maggior incidenza delle lesioni cefalopancreatiche delle quali gran parte si ritrova a livello della porzione superiore in prossimità del decorso del dotto biliare, seguite dalle localizzazioni nella regione retro papillare ed infine al processo uncinato^{9,16}.

L'aspetto macroscopico dell'adenocarcinoma è quello di una massa solida di consistenza dura a margini sfumati; al taglio presenta un colorito dal giallastro al brunastro, raramente sono presenti aree emorragiche o necrotiche, ma possono essere presenti aree microcistiche indicative di un tumore ben differenziato. Nei campioni chirurgici, le dimensioni sono comprese tra i 1,5 e i 5 cm, con un diametro medio di 2,5-3,5 cm. I carcinomi del corpo-coda sono solitamente più larghi alla diagnosi. Tumori con diametro inferiore ai 2 cm sono poco frequenti e solitamente coincidenti con gli incidentalomi^{14,17}.

L'aspetto microscopico più comune è quello di una struttura ghiandolare ricoperta da epitelio che, pur avendo diversi gradi di atipia, rispetta le normali caratteristiche dell'epitelio colonnare dei dotti pancreatici. La componente epiteliale è immersa in una marcata componente fibrotica (reazione desmoplastica) e l'infiltrazione neoplastica degli spazi perineurali è molto frequente (70-88% dei casi)¹⁷.

La presenza di un carcinoma *in situ*, nelle immediate vicinanze di un carcinoma invasivo, è stata riportata in una percentuale superiore al 24% e la presenza di foci multicentrici di carcinoma pancreatico invasivo primitivo in letteratura varia dallo 0%¹⁸ al 40%^{19,20}.

La diffusione linfatica è più precoce di quella ematica; i linfonodi più frequentemente coinvolti nel tumore della testa sono in ordine per frequenza: i linfonodi pancreaticoduodenali posteriori, i linfonodi superiori della testa, gli inferiori della testa, i linfonodi superiori del corpo, i pancreaticoduodenali anteriori e gli inferiori del corpo²¹. La via ematica di diffusione coinvolge fegato, polmone, surrene, rene, ossa, cervello e cute.

La classificazione di malignità è basata su criteri citoarchitetonici e rappresenta un fattore prognostico essenziale e indipendente. La sua determinazione è stata codificata in G1, G2, G3 dalla classificazione WHO prendendo in considerazione l'aspetto cito-istologico e l'attività mitotica. Il grading della neoplasia, basato su criteri citoarchitetonici, prevede tre gradi²²:

G1, presenza di strutture tubulari ben differenziate;

G2, strutture tubulari moderatamente differenziate;

G3, strutture ghiandolari scarsamente differenziate.

Per quanto riguarda la stadiazione esistono differenti sistemi ma il più diffuso è quello proposto dalla *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*²³ che utilizza i parametri del sistema internazionale TNM (Tumore/(linfo)Nodi/Metastasi)²⁴.

T (tumore primitivo)

- TX: tumore primitivo non definibile
- Tis: Tumore *in situ*, precocissimo stadio del carcinoma del pancreas che non ha ancora superato la lamina basale
- T0: nessuna evidenza di neoplasia primaria
- T1: Neoplasia che si dimostri < 2 cm in ogni direzione spaziale
- T2: Neoplasia che si dimostri > 2 cm in ogni direzione spaziale
- T3: Neoplasia che invade i tessuti peripancreatici o il duodeno e la via biliare
- T4: Neoplasia che invade gli organi vicini come milza, stomaco, colon

N (linfonodi regionali)

- NX: Linfonodi regionali non valutabili
- N0: Non si riscontra invasione linfonodale
- N1a: Si riscontrano cellule tumorali in un singolo linfonodo peripancreatico
- N1b: Si riscontrano cellule tumorali in più di un linfonodo

M (metastasi a distanza)

- MX: metastasi a distanza non accertabili
- M0: Assenza di metastasi a distanza
- M1: Presenza di metastasi a distanza

Definiti i parametri TNM, si individuano quattro stadi in ordine crescente di gravità, in alcuni casi suddivisi in sotto-stadi:

- Stadio 1A: T1, N0, M0
- Stadio 1B: T2, N0, M0
- Stadio 2A: T3, N0, M0
- Stadio 2B: T1-3, N1, M0
- Stadio 3: T4, qualsiasi N, M0

- Stadio 4: qualsiasi T, qualsiasi N, M1

A fianco della classificazione TNM, esiste una nomenclatura che viene utilizzata per identificare meglio il processo decisionale riguardante le opzioni di trattamento terapeutico e la prognosi. Nella pratica clinica si definiscono dei criteri di reseccabilità stabiliti dagli esami radiologici con identificazione dei seguenti tre gruppi (indirettamente connessi allo status TNM)²⁵:

- tumori locali o potenzialmente reseccabili; comprendono lo stadio 1 e 2 della classificazione AJCC; non si osserva coinvolgimento extra-pancreatico del tumore. Circa il 20% delle diagnosi sono tumori candidabili a resezione chirurgica.
- tumori localmente avanzati o non reseccabili; comprendono i tumori di stadio 3 e sono circa il 30% dei casi alla diagnosi. Si osserva invasione arteriosa (asse celiaco o dell'arteria mesenterica superiore) o occlusione venosa (mesenterica superiore/vena porta).
- tumori metastatici; comprendono i tumori di stadio 4 e coprono il 50% delle diagnosi. Si tratta di un tumore con diffusione metastatica (tipicamente al fegato, peritoneale o polmoni).

2.2.4 Cause dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e fattori di rischio

Le cause del carcinoma pancreatico sono poco conosciute. Sia predisposizioni genetiche che fattori di rischio ambientali contribuiscono allo sviluppo dell'adenocarcinoma duttale pancreatico. Nel 5-10% dei pazienti affetti da tumore pancreatico è presente una familiarità con la patologia legata ad alterazioni della linea germinale²⁶. Si tratta di alterazioni note legate a sindromi predisponenti a diversi tipi di tumore. Queste alterazioni possono essere la causa sia di PDAC familiari che sporadici. L'associazione fra tumore pancreatico con storia familiare e rischio di svilupparlo sembrerebbe essere dovuto sia alla componente genetica che ad altri fattori di rischio che i membri della stessa famiglia condividono: i soggetti con storia familiare di tumore pancreatico hanno un rischio relativo di svilupparlo aumentato di 2, 6 e 30 volte rispetto alla popolazione generale, a seconda che i parenti affetti siano rispettivamente uno, due o tre^{9,27}.

2.2.4.1 Fattori di rischio genetici

Esistono alcune patologie genetiche ereditarie che predispongono i soggetti allo sviluppo dell'adenocarcinoma duttale del pancreas. Alcune di queste patologie sono di seguito elencate:

- Carcinoma ereditario della mammella e dell'ovaio (HBOC); HBOC è caratterizzata dall'insorgenza precoce del tumore alla mammella e all'ovaio causato da mutazioni nella linea germinale dei geni BRCA1 o BRCA2. Sono entrambi geni oncosoppressori che codificano per proteine che riparano le rotture della doppia elica di DNA. Alcuni studi indicano un aumento del rischio di circa 2 volte nei pazienti con mutazioni BRCA1; la mutazione di BRCA2 è associata ad un aumento del rischio relativo di 3,5²⁸.
- Sindrome familiare dei nevi-melanomi atipici multipli (*Familial Atypical Mole-Multiple Melanoma*, FAMMM); è una sindrome caratterizzata dalla comparsa di nevi atipici e di melanomi multipli in uno o più parenti di primo o secondo grado. Nel 38% dei casi è stata trovata una mutazione del gene CDKN2A²⁹, il quale codifica per la proteina oncosoppressore p16 che normalmente blocca la crescita incontrollata della cellula e la sua proliferazione legandosi ai complessi delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK) 4, 6 e D. Questo legame inibisce l'attività delle chinasi, bloccando così il ciclo cellulare nella fase G1; se questo meccanismo regolatore viene alterato, la cellula accumula mutazioni durante la sua proliferazione aumentando il rischio di sviluppare patologie neoplastiche. I pazienti con la sindrome di FAMMM presentano un rischio di sviluppare PDAC 38 volte maggiore rispetto alla popolazione generale²⁹.
- Sindrome di Peutz-jeghers (PJS); PJS è caratterizzata da poliposi gastrointestinale e pigmentazioni muco-cutanee in prossimità delle labbra e della regione periorale. È associata alla mutazione del gene oncosoppressore STK11/LKB1 che codifica per una serin-treonin chinasi localizzata sia nel nucleo che nel citoplasma di tutti i tessuti umani. L'esatto meccanismo con cui LKB1 agisce come soppressore tumorale è sconosciuto. I pazienti affetti da questa sindrome presentano una predisposizione allo sviluppo di diversi tumori, tra cui quello del pancreas, il cui rischio di insorgenza all'età di 40 anni è del 5% e sale all'8% a 60 anni³⁰; inoltre i pazienti con PJS hanno un rischio 132 volte maggiore di sviluppare PDAC²⁸.

- Atassia-teleangectasia o sindrome di Louis-Bar (AT); è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da atassia cerebellare, teleangectasie oculo-cutanee e immunodeficienza. L'AT è causata dalla mutazione in omozigosi del gene ATM, che codifica per una serin/treonina coinvolta nella riparazione del DNA. È associata ad un aumento del rischio di sviluppare linfomi e leucemie e PDAC (di due volte rispetto alla popolazione generale) ²⁸.
- Pancreatite ereditaria (HP); è caratterizzata da ricorrenti attacchi di pancreatite acuta a partire dall'infanzia. L'80% dei soggetti affetti da HP hanno una mutazione del gene PRSS1, che codifica per il tripsinogeno cationico³¹. Mutazioni autosomiche dominanti di questo gene provocano una maggiore attività della tripsina all'interno del parenchima pancreatico, portando all'irritazione e all'autodigestione degli stessi dotti. La pancreatite è una patologia infiammatoria continuativa o recidiva del pancreas a cui è associato un aumento di 26 volte del rischio di sviluppare tumore al pancreas e molto spesso i casi familiari di tumore pancreatico sono una conseguenza di pancreatite ereditaria³². Secondo uno studio più recente l'incidenza dell'adenocarcinoma pancreatico nei pazienti affetti da pancreatite ereditaria è aumentata di 53 volte rispetto alla popolazione generale e ciò comporta che circa il 40% di essi sviluppano tumore del pancreas entro i 70 anni di età³³.
- Sindrome di Lynch (HNPCC); è la più comune sindrome del cancro ereditario del colon-retto. I soggetti affetti da questa patologia hanno una predisposizione a sviluppare cancro dell'endometrio, dell'ovaio, dello stomaco, del tratto urinario, del cervello e del pancreas. Hanno mutazioni dei geni MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 ed EPCAM che normalmente codificano per proteine coinvolte nelle vie di riparazione del DNA. I pazienti con la sindrome di Lynch hanno un rischio di 8,6 volte maggiore di sviluppare PDAC rispetto alla popolazione generale²⁸.
- Fibrosi cistica; mutazioni in omozigosi del gene autosomico recessivo CFTR causa la fibrosi cistica, che è associata sia a una minor età di insorgenza (mediana di 35 anni) che ad un aumentato rischio (di 5,3 volte) di sviluppare PDAC³⁴.

Tra i fattori genetici ci sono alcuni studi che dimostrano che avere un gruppo sanguigno non-0 è associata una maggior tendenza a sviluppare un tumore pancreatico^{35,36}. L'esatto meccanismo che collega il cancro del pancreas ai gruppi sanguigni non è ancora noto.

2.2.4.2 *Fattori di rischio ambientali e stili di vita*

Oltre ai fattori genetici prima descritti, esistono altri fattori di rischio predisponenti allo sviluppo del tumore in sede pancreatica. Recentemente è stato pubblicato uno studio del gruppo di Maisonneuve che ha riassunto la numerosa letteratura (86 meta analisi e 31 analisi di dati aggregati) presente fino al 31 ottobre 2014 per stimare il rischio relativo a ciascun fattore proposto³⁵. Di seguito ne sono riportati alcuni:

- Il tabacco conferma avere un ruolo causativo per il tumore al pancreas; i fumatori hanno un rischio aumentato da 1,5 a 2,2 volte rispetto ai non fumatori. Tale rischio aumenta con un consumo maggiore e prolungato⁶.
- In passato il consumo di alcool non era stato considerato un fattore di rischio. Tuttavia dalla revisione della letteratura è emerso che un consumo pari o superiore a 30g/die (corrispondenti a 3 bicchieri di qualsiasi alcolico) è associato ad un aumento del rischio fino al 20% rispetto alla popolazione generale³⁵.
- I dati riguardanti il consumo di caffè e tè non evidenziano un'associazione fra queste abitudini e il rischio di sviluppare tumore al pancreas³⁵.
- Numerosi studi indicano che alcuni aspetti nutrizionali e dietetici possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie al pancreas e per il cancro in generale; un aumento del rischio è stato rilevato per l'apporto di carne, prodotti caseari, uova, latte, fritti, uno scarso consumo di frutta fresca, verdura fresca e fibre³⁵;
- La pancreatite non familiare è anch'essa associata alla possibilità di sviluppare carcinoma pancreatico; si tratta di pancreatiti croniche legate a fattori tossico-metabolici (alcol, composti tossici, ipercalcemia, iperlipidemia), fattori autoimmuni (pancreatite cronica autoimmune isolata o legata ad altre sindromi come lo Sjogren o la cirrosi biliare primitiva), fattori ostruttivi (pancreas divisum, ostruzioni duttali, post-traumatiche) e clinici (pancreatite acuta ricorrente). La pancreatite cronica è una malattia fibro-infiammatoria coinvolgente il parenchima pancreatico che progressivamente viene distrutto e sostituito dai tessuti fibrotici. Un ampio studio caso-controllo ha mostrato che una storia di almeno 7 anni di pancreatite cronica è associata a un rischio aumentato di tumore pancreatico (RR = 2.04, 95% 1.53-2.72)³⁷. Uno studio più recente, basato sulla revisione critica della letteratura, ha valutato questo rischio essere di 13 volte superiore

alla popolazione generale³⁸. Nonostante il forte legame tra pancreatite cronica e cancro del pancreas, meno del 5% dei pazienti con pancreatite sviluppano il tumore³⁸. Lo studio di Maisonneuve ha identificato un rischio relativo compreso fra 2.7-5.1.

- **Obesità, BMI>30 e ridotta attività fisica.** Diversi studi epidemiologici dimostrano come tali fattori si associno con un aumento del rischio di sviluppo tumorale³⁹⁻⁴³, al contrario, è stata osservata una relazione inversa per soggetti che esercitavano una moderata attività fisica e con un BMI<25^{43,44}.
- **Diabete (DM).** È importante differenziare il diabete di lunga durata dal diabete di nuova insorgenza; il primo infatti sembra essere un fattore di rischio per il tumore del pancreas, mentre il secondo si è ipotizzato essere una manifestazione paraneoplastica del tumore stesso⁴⁵. Numerosi studi epidemiologici⁴⁶⁻⁴⁸ hanno mostrato un'associazione tra diabete mellito di tipo 2 di lunga data e carcinoma del pancreas. In una recente meta-analisi di 35 studi si è dimostrato che il rischio relativo di sviluppare una neoplasia pancreatica in pazienti con DM è aumentato di circa 2 volte (RR=1,94)⁴⁹. Un altro studio di meta-analisi ha identificato un aumento di 1,8 del rischio associato al diabete di tipo 2; tuttavia le stime del rischio diminuivano con l'aumentare del numero di anni per cui i soggetti erano affetti da DM (es: ≤2 anni di DM rischio stimato= 2.9; 11-15 anni di DM, rischio stimato= 1.3)⁵⁰. In entrambi i lavori il tipo di diabete non era stato chiaramente classificato (se di tipo 1, 2 o 3c)⁴³.

Altri fattori con il loro rischio relativo sono elencati nella figura 2.4, la quale suggerisce come il tumore del pancreas abbia un'eziologia multifattoriale: da una stima della percentuale della popolazione esposta a ciascun fattore di rischio (basata sui rapporti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità) e l'entità dell'associazione, si è quantificata la percentuale di tumori pancreatici la cui eziologia è imputabile ad un determinato fattore. Si noti che alcuni dei fattori di rischio individuati sono correlati: la resistenza insulinica è associata all'obesità, ai livelli di adiponectina, al diabete e alla sindrome metabolica, così come a fattori dietetici o a stili di vita (es: ridotta attività fisica). Altri fattori, come il tabacco, l'alcol, la pancreatite, la colecistectomia, l'infezione da *H. pylori* e l'infezione da virus dell'epatite sono noti *trigger* di infiammazione, una via di sostentamento della carcinogenesi³⁵.

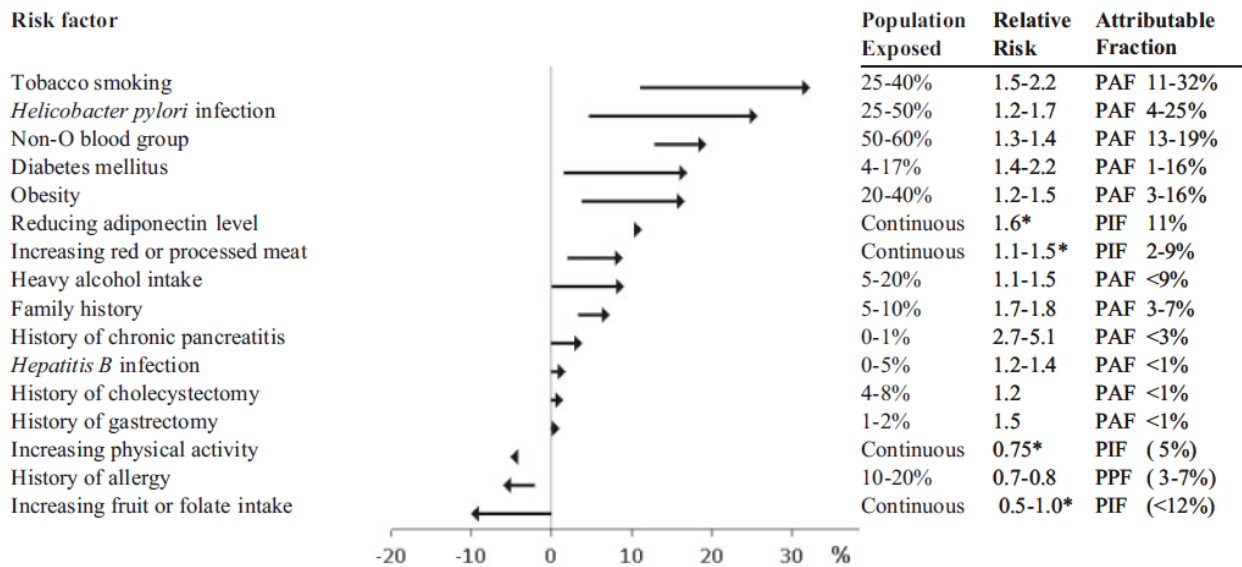


Figura 2.4 Rappresentazione dei fattori di rischio associati al tumore pancreatico. PAF (Population Attributable Fraction) è la percentuale dei tumori la cui causa potrebbe essere il relativo fattore di rischio³⁵

2.2.5 Patogenesi ed oncogenesi del carcinoma duttale del pancreas

La trasformazione della cellula carcinomatosa è il risultato di una graduale progressione nella quale sono coinvolte multiple e successive alterazioni molecolari come l'attivazione di oncogeni, l'inattivazione di geni oncosoppressori, mutazioni di geni preposti alla conservazione del genoma e famiglie complesse di fattori di crescita e loro recettori^{9,51,52}. La progressione da tessuto pancreatico normale ad adenocarcinoma pancreatico consiste in una sequenza ben descritta di eventi istopatologici e biologici. Sono state istologicamente definite distinte lesioni iniziali (pre-neoplastiche) nel tumore del pancreas; queste lesioni comprendono le neoplasie intraepiteliali pancreatiche (PanIN), la neoplasia intraduttale papillare mucinosa (IPMN) e la neoplasia cistica mucinosa (MCN)⁵¹. La maggioranza dei PDAC origina dalle lesioni PanIN, mentre sporadicamente dalle neoplasie IPMN e MCN. Le PanIN sono lesioni microscopiche (inferiori a 5 mm) dei dotti pancreatici più piccoli; possono essere papillari o piane e sono composte da cellule cuboidali o colonnari con varie quantità di mucina⁵³. Le lesioni PanIN sono sottoclassificate in PanIN-1, PanIN-2 e PanIN-3 in base al grado di atipia architetturale e citologica (Figura 2.5). Queste lesioni sono spesso presenti nel parenchima pancreatico adiacente

all'adenocarcinoma infiltrante e numerosi *case-reports* hanno documentato pazienti che da una lesione PanIN hanno successivamente sviluppato un carcinoma pancreatico infiltrante⁵³.

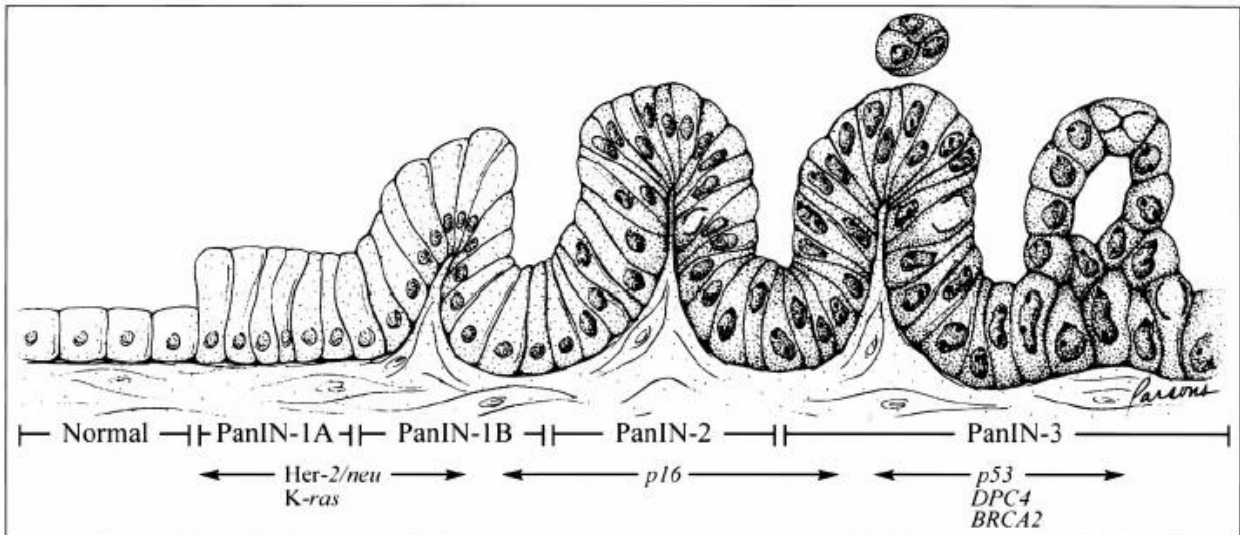


Figura. 2.5. Modello di progressione del tumore pancreatico⁵³

È stata documentata una correlazione tra l'intervento delle diverse mutazioni genetiche e le trasformazioni fenotipiche dell'epitelio dei dotti. La mutazione dell'oncogene KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) si è riscontrata tra il 75% e il 95% dei pazienti affetti da PDAC^{51,52}: è un evento precoce nel processo di tumorigenesi che porta ad un aumento della proliferazione, della differenziazione e della sopravvivenza. KRAS codifica per una piccola proteina GTPasica di 21 KDa. Fisiologicamente Kras si trova in uno stato quiescente legata alla GDP che sostituisce a GTP quando i fattori di crescita si legano ai propri recettori. Kras attivata ha numerosi effettori a valle che guidano la progressione tumorale. Mutazioni (che la rendono costitutivamente attiva) del codone 12 (in particolare G12, G13 e Q61) avvengono tipicamente nelle lesioni precoci di basso grado PanIN-1 e si associano ad una minima atipia citologica e architetturale. CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), conosciuta anche come p16 o INK4A è un gene oncosoppressore che inibisce la progressione del ciclo cellulare intervenendo durante il checkpoint G1-S. CDKN2A è inattivata nel 90% dei pazienti con PDAC ed è stata trovata nelle lesioni pre-neoplastiche PanIN-2⁵⁴. Mutazioni CDKN2A nella linea germinale sono associate con la sindrome di FAMMM, discussa precedentemente. p53 modula la risposta cellulare allo stress citotossico arrestando il ciclo cellulare e inducendo apoptosi; è un oncosoppressore. La perdita della funzione di p53 durante la carcinogenesi porta ad una

incontrollata crescita cellulare che aumenta l'instabilità genetica. Approssimativamente il 50-75% dei pazienti PDAC hanno una perdita della funzione di p53⁵⁵ e le sue mutazioni geniche sono state riscontrate nelle lesioni PanIN-3⁵². Nella lesione PanIN-3 si trovano anche mutazioni inattivanti a livello di SMAD4 e BRCA2. SMAD4 o DPC4 (*deleted in pancreatic cancer 4*) è inattivato in circa il 55% dei casi di PDAC; nel 30% dei casi è delecto in eterozigosi, nei restanti casi è mutato. Mutazioni della proteina SMAD4 ne causano una rapida degradazione⁵⁶. SMAD4 è un oncosoppressore, effettore a valle di TGF-beta ed agisce nel nucleo come fattore trascrizionale che promuove l'inibizione della crescita. La mutazione dell'oncosoppressore BRCA2 è associata con il carcinoma ereditario della mammella e dell'ovaio ma si riscontra al massimo nel 7-10% dei pazienti con adenocarcinoma duttale⁵². La riduzione della lunghezza dei telomeri è anch'essa un evento precoce che avviene nelle lesioni PanIN-1 e che potrebbe contribuire all'accumulo delle anomalie cromosomiche nelle lesioni PanIN⁵⁷.

Le lesioni IPMN sono un secondo tipo di precursore del tumore pancreatico. Sono neoplasie cistiche distinguibili radiologicamente e sono relativamente comuni (si riscontrano in circa il 2% degli adulti e in più del 10% delle persone con più di 70 anni): le IPMN sono lesioni producenti mucina e per definizione possono coinvolgere il dotto principale pancreatico e/o i dotti secondari. Gli IPMN del dotto pancreatico maggiore sono potenzialmente molto più maligni delle lesioni dei dotti secondari. Il gene SMAD4 è inattivato in una piccola percentuale delle lesioni IPMN^{58,59}. Tra il 40 e il 65% degli IPMN hanno mutazioni in KRAS⁹.

La terza lesione istologica iniziale nel pancreas è la neoplasia cistica mucinosa (MCN). La maggior parte delle lesioni MCN si sviluppa nelle donne. Le MCN sono grandi lesioni cistiche multiloculari che si formano nella coda del pancreas. A differenza dell'IPMN la MCN non comunica con i dotti pancreatici maggiori e, a differenza anche delle lesioni PanIN, possiede uno stroma peculiare di tipo ovarico. Le alterazioni genetiche nell'MCN non sono state ancora studiate estensivamente ma sembrerebbero possedere le stesse anomalie riscontrate nell'adenocarcinoma duttale del pancreas ma con una frequenza inferiore⁶⁰.

2.2.5 *Presentazione clinica*

La prima fase del tumore pancreatico è solitamente silente; la malattia diventa evidente solamente dopo che il tumore ha invaso i tessuti circostanti o ha metastatizzato in altri organi. La maggior parte delle persone che presentano dei sintomi vengono diagnosticate con la patologia già in stadio avanzato⁶¹. I pazienti affetti da carcinoma pancreatico non ancora diagnosticato, che sono stati sottoposti a CT per ragioni non inerenti al tumore, presentavano delle lievi anomalie che potevano far sospettare di un tumore pancreatico già da un anno prima dello sviluppo dei sintomi⁶². La diagnosi di tumore del pancreas è solitamente un sospetto che insorge sulla base della storia del paziente ma è sostenuta da pochi segni confirmatori. I sintomi sono dolore addominale o della schiena, ittero e cachessia.

Più dettagliatamente, la maggioranza dei pazienti che ne sono affetti si presenta con dolore, perdita di peso ed ittero; il dolore è presente nell'80-85% dei casi di una malattia avanzata o comunque localmente avanzata, è generalmente riferito alle regioni addominali superiori con irradiazione posteriore, spesso è intermittente e peggiora in seguito ai pasti. La perdita di peso è spesso consistente e si associa ad anoressia, sazietà precoce, diarrea e steatorrea; l'ittero è generalmente accompagnato da prurito, feci ipocoliche ed urine ipercromiche, è doloroso nella metà dei casi di pazienti affetti da malattia locale non resecabile. L'ostruzione del piloro, con nausea e vomito, può presentarsi nella malattia in stadio avanzato. La presentazione clinica varia con la localizzazione della massa tumorale; i tumori del corpo e della coda pancreatici generalmente si presentano con dolore e perdita di peso, mentre quelli della testa si manifestano con steatorrea, perdita di peso e ittero. Possono inoltre essere segni di questa patologia la comparsa di un diabete mellito, un'inspiegabile tromboflebite o un primo attacco di pancreatite acuta^{63,64}.

Fra le manifestazioni cliniche del tumore merita un approfondimento il diabete. In uno studio di popolazione su 2122 individui diabetici con un'età maggiore o uguale a 50 anni della contea di Olmsed, MN, USA, 18 soggetti (lo 0,85%) con diabete di nuova insorgenza hanno sviluppato carcinoma del pancreas entro 3 anni; nonostante il numero apparentemente ridotto di tali soggetti il risultato è statisticamente significativo, dimostrando che l'incidenza di carcinoma del pancreas in soggetti con diabete di nuova insorgenza è quasi 8 volte maggiore rispetto alla popolazione generale⁶⁵. Lo stesso gruppo ha poi presentato dei risultati interessanti: ha revisionato i dati di

736 pazienti affetti da carcinoma pancreatico (e 1875 controlli) concentrando l'attenzione sullo spazio temporale tra l'insorgenza del diabete e la diagnosi della neoplasia. L'analisi si è concentrata nei 60 mesi precedenti la diagnosi del carcinoma. La prevalenza di diabete mellito tre anni prima era simile nei pazienti e nei controlli. Avvicinandosi alla data della diagnosi di tumore la prevalenza del diabete mellito aumenta nei pazienti, mentre rimane stabile nei controlli. L'autore conclude che al momento della diagnosi di tumore il 40% dei pazienti è ammalato di diabete mellito, mentre nei controlli solo il 20%. Questo significa che la metà dei casi di diabete mellito diagnosticati in concomitanza con un carcinoma pancreatico sono di nuova insorgenza⁶⁶. In questa direzione recentemente il nostro gruppo di ricerca ha studiato una coorte con patologie esocrine pancreatiche eterogenee di 651 pazienti candidati a chirurgia pancreatica presso l'Ospedale San Raffaele. Dei 651 pazienti, il 38% è risultato essere diabetico di cui il 24% con diabete già noto e di lunga durata, il 37% con diabete di breve durata e il 29% con diagnosi concomitante alla diagnosi di patologia pancreatica. Con il termine breve durata abbiamo inteso quel diabete insorto 48 mesi prima della diagnosi di patologia pancreatica. Il 66% (37% + 29%) dei pazienti diabetici presentava dunque un diabete che abbiamo definito di nuova insorgenza. Nei pazienti con patologia maligna (469 soggetti di cui il 77,8% affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas), confrontando l'incidenza del diabete con quella di altri sintomi, si è osservato che l'incidenza del diabete di nuova insorgenza subisce un'impennata già 3 anni prima del ricovero e che gli altri sintomi compaiono solo pochi mesi prima della chirurgia. La causa dell'insorgenza del diabete non è ancora chiara, tuttavia la resezione del carcinoma pancreatico qualche volta porta alla risoluzione della patologia diabetica⁶⁷. In un pregresso studio retrospettivo, si è notato che l'intervallo medio tra la diagnosi di diabete e quella di tumore del pancreas era di circa 10 mesi (entro un range di 5-29 mesi)⁶².

Il diabete di nuova insorgenza, quindi, non solo potrebbe identificare un gruppo di soggetti ad alto rischio per lo sviluppo del tumore del pancreas, ma potrebbe anche rappresentare un marker precoce di tumore asintomatico e quindi ancora reseccabile. In futuro l'obiettivo dovrà essere quello di identificare quei fattori che siano in grado di distinguere il diabete associato al tumore dal più frequente diabete di tipo 2 (prevalenza in Italia, stimata su tutta la popolazione pari a 2-3,2%), in quanto sottoporre a indagini radiologiche approfondite tutti i pazienti con diabete di nuova insorgenza non è giustificabile data la rarità del tumore pancreatico.

2.2.6 *Trattamento del tumore pancreatico*

2.2.6.1 *Approccio chirurgico*

Il trattamento di resezione chirurgica è l'unica terapia potenzialmente curativa dell'adenocarcinoma pancreatico. Tuttavia i pazienti candidati alla chirurgia rappresentano solo il 15-20% e sono i pazienti in stadio 1 e 2. Per i tumori della testa del pancreas l'intervento standard è costituito dalla duodenocefalopancreasectomia radicale che prevede l'asportazione della colecisti, del dotto cistico, della via biliare principale, della testa del pancreas, dei linfonodi e in alcuni casi del terzo distale dello stomaco, del duodeno e della prima ansa digiunale. Per i tumori del corpo-coda l'approccio chirurgico consiste nella pancreasectomia distale associata a splenectomia⁶⁸. In entrambi i tipi di tumori può essere praticata la pancreasectomia totale che consiste nella rimozione di tutto il pancreas insieme al duodeno, via biliare, colecisti, prima ansa digiunale e milza. L'indicazione ad effettuare questo tipo di intervento è legata alla presenza di plurimi margini di resezione pancreatici positivi¹⁵.

Pazienti con malattia avanzata non resecabile o con malattia metastatica generalmente sono candidati a terapia medica adiuvante o neoadiuvante.

2.2.6.2 *Terapia medica*

Al momento non esistono marcatori biologici predittivi dell'efficacia della chemioterapia o della radioterapia. Alcuni studi di fase III hanno dimostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza globale per i pazienti trattati con chemioterapia post-operatoria rispetto a sola chirurgia con sopravvivenza mediana di 20-22 mesi contro 15-20 mesi e a 2 anni del 40-48% verso il 30-42%^{69,70}. Questi dati suggeriscono che un trattamento sistemico efficace potrebbe avere maggiori possibilità di modificare la storia naturale di questa neoplasia. Di fatto i farmaci oggi ritenuti lo standard nella malattia localmente avanzata o metastatica, cioè la gemcitabina (GEM) ed il 5-fluorouracile (5-FU) ottengono meno del 10% di risposte^{71,72}. Nonostante questa sostanziale equivalenza dal punto di vista terapeutico, la gemcitabina è considerata lo standard terapeutico in fase adiuvante anche in virtù del miglior profilo di tossicità extraematologica e della maggiore comodità di somministrazione. La gemcitabina è un analogo nucleosidico che, se incorporato nel DNA in sostituzione della citidina, induce l'apoptosi in seguito all'instabilità genomica. Secondo

le linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica, in pazienti resecabili, la radiochemioterapia può essere utilizzata dopo chirurgia con una dose di radioterapia di almeno 50 Gy in associazione a gemcitabina o a fluoropirimidina; pazienti con malattia localmente avanzata non resecabile potrebbero essere trattati con chemioterapia sistemica, seguita dalla radiochemioterapia concomitante a capecitabina o gemcitabina¹⁵.

I pazienti con ripresa di malattia possono ricevere un trattamento chemioterapico di seconda linea volto al prolungamento della sopravvivenza ed al controllo dei sintomi.

2.2.7 Diagnosi del tumore del pancreas

L'adenocarcinoma duttale del pancreas è tipicamente diagnosticato ad uno stadio avanzato e ciò contribuisce significativamente al suo elevato tasso di mortalità. Il ritardo nella diagnosi è dovuto sia all'assenza di metodi efficaci di screening sia perché, come descritto in precedenza, i suoi sintomi sono spesso vaghi e aspecifici. Ad oggi le tecniche di diagnostica per immagini sono il solo strumento utile a definirne la localizzazione, l'estensione della massa e determinarne la stadiazione clinica. Infatti l'importanza della diagnosi è riconducibile non solo alla definizione della presenza di un tumore pancreatico ma anche al problema di un corretto giudizio di resecabilità al fine di definire il corretto percorso terapeutico. Tuttavia l'identificazione di marcatori diagnostici sensibili e specifici è cruciale nell'individuare neoplasie pancreatiche pre-invasive, nel distinguere cellule reattive ma benigne da cellule maligne, nel discernere i differenti tipi tumorali, nella diagnosi precoce e nella predizione del tempo di recidiva. Fino a quando non saranno scoperti marcatori diagnostici molecolari più sensibili e più specifici i clinici dovranno fare affidamento alla combinazione delle analisi di diagnostica per immagini, citologia e ai biomarcatori disponibili per diagnosticare i carcinomi pancreatici.

2.2.7.1 Tecniche di diagnostica per immagini

La diagnosi del tumore del pancreas è generalmente basata sull'utilizzo di una delle metodiche disponibili nella diagnostica per immagini.

La tecnica di imaging di primo livello, utilizzata normalmente in primo impiego in un paziente che esordisce con ittero, è l'ecografia dell'addome con una sensibilità del 75-89% e una specificità del 90-99% in presenza di dotti biliari dilatati e di una massa visibile a livello della

testa del pancreas. La limitazione di questa tecnica è la sua dipendenza dall'esperienza dell'operatore, dalla costituzione del paziente e dalla dimensione del tumore⁷³: risulta essere una tecnica poco oggettiva con forti limiti per la stadiazione e la valutazione di resecabilità.

La TAC (tomografia assiale computerizzata) ha una maggiore sensibilità rispetto all'ecografia e una simile specificità per quanto riguarda l'individuazione del tumore del pancreas; è molto utile nei casi in cui il paziente non presenti ittero o si abbia una limitazione della visibilità dell'ecografia a causa di meteorismo e permette inoltre l'individuazione della presenza di eventuali metastasi a distanza al fegato o ai linfonodi^{74,75}.

I vantaggi della RM (risonanza magnetica) sono rappresentati dall'eccellente contrasto dato dal grasso peripancreatico, dalla evidenziazione dei vasi anche in assenza di mezzi di contrasto e dall'assenza di radiazioni; la scelta tra TC e RM in realtà dipende dall'esperienza dei vari centri e dalle preferenze del clinico verso l'una o l'altra metodica.

L'ERCP (colangiopancreatografia retrograda endoscopica) è considerata l'indagine con più alta sensibilità perché è in grado di rilevare alterazioni anche minime del decorso e del calibro del dotto di Wirsung ma, la sua non idoneità alla stadiazione e l'invasività intrinseca alla metodica non scevra da complicanze, hanno molto ridimensionato il suo ruolo nella diagnosi di tumore del pancreas.

Un buon compromesso tecnologico tra l'approccio endoscopico e la rilevazione ecografica, è l'ecografia endoscopica o ecoendoscopia (EUS); risulta utile nell'identificare tumori di piccole dimensioni che possono sfuggire all'ecografia trans-parietale e alla TC, presenta una bassa percentuale di complicanze e in centri di riferimento risulta possedere una maggiore sensibilità e specificità se confrontata con tutte le altre metodiche. A questa tecnica di imaging può inoltre essere associata una biopsia ecoendo-guidata che aumenta notevolmente l'accuratezza diagnostica^{76,77}.

Un'ulteriore possibilità nell'imaging del pancreas è l'utilizzo della PET; è una metodica molto sensibile e specifica, è in grado di distinguere una pancreatite cronica da un tumore del pancreas nella maggioranza dei casi. Nella realtà è una tecnica che viene prevalentemente utilizzata per la stadiazione, nella valutazione della risposta ai trattamenti chemioterapici e per la ricerca di eventuali recidive qualora vi sia un sospetto di ripresa con la negatività di TC o RM^{78,79}.

2.2.7.2 *Marcatori sierici diagnostici*

I marcatori sierici sono i biomarcatori più studiati per la loro praticità di analisi, data la disponibilità e sicurezza del prelievo venoso; inoltre sono la modalità più rapida per fare screening su larga scala. Tuttavia ad oggi non sono stati ancora identificati marcatori definitivi per la diagnosi pre-operatoria.

Numerosi marcatori sierici sono stati valutati per la diagnosi di carcinoma del pancreas; il più utilizzato è sicuramente l'antigene 19-9 (*Carbohydrate Antigen 19-9*, CA19-9) detto anche GICA (*GastroIntestinal Cancer Antigen*, antigene del cancro gastrointestinale).

Il CA19-9 è un antigene carboidrato tumore associato che ha come epitopo una forma sialilata dell'antigene Lewis^a (sialil Le^a) del sistema gruppo ematico di Lewis. Questo epitopo è il ligando per le selectine E e P presenti sulle cellule dell'endotelio. Il legame delle cellule tumorali a quelle endoteliali rappresenta uno dei meccanismi alla base del processo di extravasazione della neoplasia che porta poi alla diffusione sistemica e quindi alla metastatizzazione⁸⁰. L'espressione dell'antigene sialil Le^a dipende quindi dal fenotipo Lewis. Gli individui che sono fenotipicamente negativi per il Lewis (non hanno l'enzima Lewis fucosiltransferasi), il 5-10 % circa della popolazione, sono incapaci di sintetizzarlo e questo giustifica i falsi negativi (per il tumore pancreatico) riscontrabili nei soggetti Lewis negativi⁸¹. Il CA19-9, sintetizzato dalle cellule duttali pancreatiche e biliari e dagli epitelii gastrico, colico, endometriale e salivare, è normalmente presente nel sangue in quantità minime (maggiormente utilizzato un cut-off di normalità <37 U/ml). In corso di patologia neoplastica, le alterazioni di alcuni processi che regolano la produzione ed il passaggio in circolo delle mucine determinano un aumento dei suoi livelli sierici. La sensibilità per il test di misurazione del CA19-9 è riportata essere nell'intervallo dal 70% al 95% con una specificità compresa tra il 72% e il 90%⁸². Nello studio del gruppo di Ferrone si è dimostrato che i livelli pre-operatori del CA19-9 correlano con lo stadio della neoplasia e possono predire la sopravvivenza nei pazienti affetti da PDAC resecabile. La mediana del CA19-9 pre-operatorio è più bassa nei pazienti senza coinvolgimento linfonodale (9 vs 164 U/ml, p=0,06) e nei pazienti con stadio T1/2 rispetto a pazienti di stadio 3 (41 v 162 U/mL, p=0,03). Se il CA19-9 pre-intervento è minore di 1000 U/ml si ha un guadagno nella sopravvivenza di 16 mesi (p=0,01)⁸³. I livelli di CA19-9 potrebbero essere utili anche nel determinare quali pazienti hanno una malattia resecabile: secondo lo studio di Kilic, la media del

CA19-9 è di 68,8 U/ml nel gruppo di pazienti resecabili (n=18) e di 622 U/ml nel gruppo dei non resecabili (n=33)⁸⁴. Il CA19-9 è comunemente utilizzato per seguire l'andamento della neoplasia. Riduzioni dei valori di CA19-9 nel post-operatorio rispetto ai valori alla diagnosi di carcinoma del pancreas sono anche un fattore predittivo importante per la prognosi a lungo termine del paziente^{83,85}. Il CA19-9 è tuttavia frequentemente elevato anche in pazienti con disordini benigni a livello del pancreas e delle vie biliari (es: ittero) e viceversa non tutti i pazienti affetti da PDAC hanno un elevato CA19-9; questa caratteristica ne riduce fortemente l'accuratezza diagnostica^{82,86}.

2.2.8 Prognosi del tumore del pancreas

La prognosi varia a seconda dello stadio di malattia, della radicalità chirurgica, in particolare della presenza/assenza di malattia microscopicamente rilevabile nei margini di resezione, e dal grading istologico. La rapidità dell'evoluzione della malattia colloca la grande maggioranza degli esiti negativi entro i primi mesi dalla diagnosi. Per questo motivo è definito come un tumore con prognosi infausta. In generale la sopravvivenza a 5 anni raggiunge solo il 5%¹¹.

Questa cattiva prognosi è dovuta a diversi fattori tra cui: I) ritardo della diagnosi; II) veloce metastatizzazione; III) resistenza della patologia alle terapie sistemiche.

La prospettiva di sopravvivenza è migliore per quei pazienti che presentano la patologia localizzata nel pancreas. La resezione chirurgica rappresenta la migliore possibilità di cura poiché il tumore pancreatico risponde scarsamente alla maggior parte degli agenti chemioterapici. Purtroppo i pazienti che presentano alla diagnosi un tumore non resecabile e in stadio avanzato sono l'80-85%⁸⁷.

Per gli stadi 1 e 2, e quindi per i pazienti che sono stati sottoposti a chirurgia resettiva e molto probabilmente a terapia adiuvante, la sopravvivenza mediana è di circa 15-25 mesi, con una sopravvivenza a 5 anni che si attesta attorno al 10%⁸⁸. Pazienti sottoposti a chirurgia e risultati con radicalità R0 hanno una sopravvivenza mediana di 27,8 mesi; pazienti con margini positivi di 21,5 mesi⁸⁹. Importante è risultata essere la dimensione del tumore: pazienti con un tumore di dimensioni <30 mm hanno una sopravvivenza a 5 anni del 10-20%^{90,91}; pazienti con tumori ≤ 20 mm del 30-60%⁹²⁻⁹⁴ che sale al 75% per tumori ≤ 10 mm⁹²⁻⁹⁵.

Pazienti in stadio 3 hanno spesso una progressione di malattia a livello locale pochi mesi dopo il completamento degli schemi di radio-chemioterapia con scarsa sopravvivenza nei mesi successivi. Pazienti in stadio 4 hanno una sopravvivenza limitata da 3 a 6 mesi²⁵.

In ultimo dato che le resezioni dei tumori del pancreas consistono in una serie di operazioni chirurgiche complesse e con elevato rischio di mortalità per complicanze intra- e post-operatorie, anche il volume di operazioni specifiche che un centro ospedaliero sostiene può influire sull'esito clinico della patologia⁹⁶: maggiore è l'esperienza maturata minore è la mortalità osservata.

2.2.8.1 Marcatori prognostici

A fianco della continua ricerca di marcatori diagnostici sensibili e specifici, esiste una molteplicità di studi volti ad identificare marcatori prognostici e predittivi. Più in generale un marcatore è utile non solo ai fini di diagnosi/prognosi ma anche per meglio capire l'eziologia del tumore pancreatico. Una esaustiva identificazione di tutti i possibili biomarcatori fornirebbe informazioni a riguardo di tutti i meccanismi di azione della neoplasia, aprendo nuove vie di opzioni terapeutiche. In futuro potrebbero essere di utilità per discriminare i tumori responsivi da quelli non responsivi alle terapie biologiche. Vi è anche un grande interesse per l'identificazione di predittori di modelli di ricorrenza: i pazienti con ripresa di malattia locale hanno maggiori probabilità di beneficiare di terapie locali come la resezione e la radioterapia; i tumori con una tendenza biologica verso la diffusione a distanza sono meglio trattati con terapie sistemiche. Lo studio delle mutazioni degli oncogeni e dei geni oncosoppressori, pur consentendo di chiarire i meccanismi molecolari che sottendono lo sviluppo dell'adenocarcinoma pancreatico, sono generalmente di scarsa utilità nella pratica clinica per la diagnosi e/o la prognosi. Un'eccezione è costituita da SMAD4; alcuni lavori suggeriscono che la valutazione dell'espressione della proteina Smad4 (che riflette lo status genetico di SMAD4, vedi paragrafo 2.2.5) sia un indicatore prognostico del tipo di progressione⁵⁶. In uno studio di fase II, effettuato per testare l'efficacia e la sicurezza di una terapia combinata con cetuximab, oxaliplatino e gemcitabina in 41 pazienti con tumore pancreatico localmente avanzato, è stata valutata la correlazione tra l'espressione della proteina Smad4 e la diffusione sistemica o locale della malattia. Il 73,3% dei soggetti che presentavano recidiva locale avevano una espressione intatta di Smad4, mentre nel 71,4% dei soggetti con metastasi a distanza Smad4 non era espresso ($p=0,016$)⁹⁷. Questo risultato era già

stato osservato anche in un lavoro antecedente del 2009⁹⁸; 76 pazienti deceduti per tumore pancreatico erano stati sottoposti ad autopsia per constatare l'effettiva estensione della malattia. L'88% ha evidenziato presenza di metastasi. Sui campioni autoptici è stata valutata l'espressione della proteina Smad4. Nel 78% dei carcinomi con un numero di metastasi compreso tra 100 e 1000 si era osservata una perdita di Dcp4; l'associazione della perdita dell'espressione di Smad4 con i tumori metastatici rispetto ai tumori localmente avanzati è risultata fortemente significativa ($p=0,007$).

Esiste una vasta letteratura di studi volti all'identificazione di marcatori biologici che può essere classificata sulla base del metodo utilizzato per la loro analisi⁹⁹: 1) ricerca di marcatori sierici o tissutali mediante tecniche non-omics; 2) proteomica; 3) genomica; 4) metabolomica.

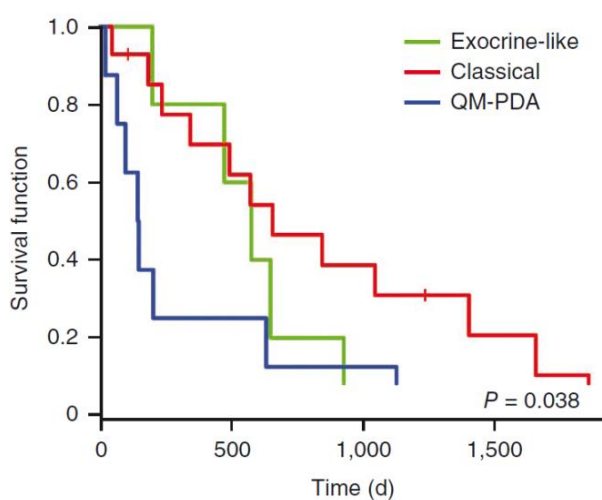


Figura 2.6. Analisi di Kaplan-Meier in cui vengono comparate le curve di sopravvivenza di individui con sottotipo tumorale classico (rosso), quasi-mesenchimale (blu) e simil-esocrino (verde)¹⁰⁰

Gli approcci *high-throughput*, per definizione, hanno un più elevato potenziale identificativo rispetto alle tecniche classiche. Un esempio in questa direzione è costituito dai risultati ottenuti dal gruppo di Hanahan e colleghi che hanno esaminato il profilo trascrizionale di 27 campioni di adenocarcinoma duttale pancreatico ma anche di linee immortalizzate di PDAC murine (n=15) e umane (n=19)¹⁰⁰. L'analisi del trascrittoma ha permesso di identificare tre sottotipi tumorali che differiscono per una *signature* di 64 geni: classico, quasi-mesenchimale (QM-PDA), e

simil-esocrino. Il sottotipo classico esprime principalmente geni implicati nei meccanismi di adesione cellulare e geni dell'epitelio; il sottotipo quasi-mesenchimale mostra un alta espressione di geni mesenchima associati; in ultimo il sottotipo simil-esocrino esprime geni coinvolti nella regolazione degli enzimi digestivi (es: ELA3A, CTFR). La stratificazione nei 3 gruppi si è rivelata avere un valore prognostico: in analisi multivariata, dopo la resezione chirurgica, i soggetti con sottotipo classico hanno avuto una migliore sopravvivenza rispetto ai pazienti portanti tumori QM o simil-esocrini ($p=0,038$) (figura 2.6). Questa suddivisione applicata alle linee umane immortalizzate si è rivelata essere anche predittiva della risposta ai chemioterapici

gemcitabina ed erlotinib *in vitro*. Le linee QM-PDA sono mediamente più sensibili alla gemcitabina rispetto alle linee con sottotipo classico; viceversa erlotinib è più efficace sulle linee con sottotipo classico.

La vastità della letteratura sui fattori prognostici/predittivi rende di difficile integrazione tutti i dati ottenuti nei vari studi e quindi ciò si riflette nel mancato effettivo utilizzo clinico: infatti la stragrande maggioranza di questi biomarcatori restano in fase di sperimentazione.

Recentemente è stato pubblicato uno studio con lo scopo di creare una scala di priorità fra i potenziali biomarcatori descritti e quindi generare un pool di fattori da considerare¹⁰¹. Sono stati analizzati 5200 lavori pubblicati e sono emerse un totale di 2516 molecole candidate, differenzialmente espresse nei tumori pancreatici rispetto a campioni di tessuto normale. Si tratta tuttavia di un numero cospicuo di marcatori con differente espressione a livello di mRNA e/o proteica, secreti o recettori di membrana, presenti solo in cellule tumorali e/o nello stroma ma che per arrivare ad essere usati nella pratica clinica devono necessariamente essere validati su ampi casistiche di pazienti e ricevere un *consensus*.

3. Scopo

Il carcinoma pancreatico continua a essere una malattia caratterizzata da decorso clinico molto aggressivo e da severa prognosi. È troppo spesso diagnosticato tardivamente, solitamente in presenza di una sintomatologia dolorosa, e quindi in uno stadio avanzato per il quale esistono poche e inefficaci terapie. La maggioranza dei pazienti alla diagnosi presenta una malattia localmente avanzata o addirittura già metastatica e non operabile tanto che, a 5 anni dalla diagnosi, la sopravvivenza globale risulta essere meno del 5%. Se si limita l'analisi a quei casi che hanno avuto successo alla resezione chirurgica radicale (ad oggi l'unico trattamento curativo) tale percentuale non supera comunque il 20%. L'esito clinico sfavorevole è dovuto sia all'aggressività delle cellule tumorali pancreatiche che sono in grado di invadere, disseminare e metastatizzare, che all'assenza di diagnosi precoce. Le recidive locali sono comuni, così come le metastasi epatiche e della cavità peritoneale. La più diffusa neoplasia maligna pancreatica è l'adenocarcinoma duttale (85% dei casi), la cui nota resistenza alla chemio e alla radioterapia limita l'efficacia degli approcci terapeutici.

Considerati questi fattori sussiste l'effettiva necessità di trovare marcatori biomolecolari attendibili utilizzabili in clinica per la segnalazione precoce, per una corretta valutazione prognostica e per il monitoraggio nel tempo dei pazienti portatori di questo tumore altamente aggressivo. La comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono l'aggressività delle cellule tumorali è importante per l'identificazione di nuovi approcci terapeutici, volti a interferire e bloccare i meccanismi di sviluppo, invasione e metastatizzazione tumorale.

Date queste premesse l'obiettivo di questo progetto di ricerca è stato quello di utilizzare un modello di analisi statistica applicabile a linee tumorali di adenocarcinoma pancreatico che, avvalendosi della correlazione tra fenotipo biologico e caratteristiche di aggressività cellulare, consenta di individuare nuovi marcatori molecolari candidabili ad una validazione, direttamente in ambito clinico, su pazienti affetti da patologia tumorale pancreatica.

Pertanto abbiamo caratterizzato un numero elevato di linee immortalizzate di adenocarcinoma duttale pancreatico (n= 17) *in vitro* per la clonogenicità e la chemioresistenza alla Gemcitabina e *in vivo* per la crescita tumorale in topi immunocompromessi (CD1-nude).

Abbiamo quindi determinato l'espressione di classi differenti di marcatori biologici in tutte le 17 linee. In particolare abbiamo valutato:

- l'espressione in membrana di recettori della chemochine, mediante citometria a flusso (CCR1-10; CXCR1-6; CX3CR1, XCR1). Numerosi dati evidenziano infatti che le cellule neoplastiche esprimono i recettori delle chemochine e suggeriscono che la loro capacità invasiva e metastatica sia potenzialmente regolata anche da queste molecole.
- la secrezione di fattori solubili (citochine, chemochine e fattori di crescita) tramite la tecnologia Xmap[®].
- l'espressione, in citometria a flusso, dei putativi marcatori delle cellule staminali tumorali pancreatiche già descritti in letteratura (ESA/CD24+/CD44+¹⁰²; CD133+/CXCR4+¹⁰³).
- l'espressione, mediante Real Time PCR, di fattori coinvolti nello sviluppo pancreatico (PDX1, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, NGN3, ISL1, PTF1 α , NEUROD1, PAX6, ONECUT1, KRT19).

In un secondo momento la nostra strategia è stata quella di utilizzare l'analisi statistica per individuare, nelle linee tumorali, fenotipi molecolari correlabili con le caratteristiche di aggressività, e per verificare direttamente nei pazienti se ci fosse una relazione tra l'espressione di tali marcatori biologi e l'esito clinico della neoplasia mediante studi prospettici usando metodiche di citometria a flusso o di Real Time PCR.

4. Materiali e metodi

4.1 Linee cellulari umane immortalizzate

Le linee di carcinoma utilizzate sono linee derivate da adenocarcinomi del dotto pancreatico, da metastasi epatiche, linfonodali e asciti dello stesso tipo di tumore. Nella tabella 4.1 sono riportate, quando reperibili, l'origine, l'autore della stabilizzazione, la provenienza delle linee e il grado di differenziazione del carcinoma da cui sono state derivate. In alcuni esperimenti è stata utilizzata una linea di cellule epiteliali del dotto pancreatico immortalizzata: HPDE6-E6E7¹⁰⁴.

Nome	Origine	Stabilizzata da	Fornita da	Grado di differenziazione
Panc-1	Tumore primario	M.Lieber (USA)	American Type Culture Collection	3
PT45	Tumore primario	H. Yamada (Japan)	N. Lemoine	3
MIAPaCa-2	Tumore primario	A. Yunis	American Type Culture Collection	3
SKPC-1	Tumore primario	M.R. Vila (Spain)	A. Scarpa	-
BI	Tumore primario	Andren-Sandberg	Andren-Sandberg	-
PC	Tumore primario	Andren-Sandberg	A. Scarpa	-
Panc-2	Tumore primario	M.v Bülow	A. Scarpa	-
PaCa-3	Tumore primario	M.v Bülow	A. Scarpa	-
PaCa-44	Tumore primario	M.v Bülow	M.v Bülow	2
BxPc-3	Tumore primario	Tan MH	-	-
Capan-1	Metastasi epatica	Kyriazis AP	A. Scarpa	1
CFPAC-1	Metastasi epatica	R.A. Schoumacher	N. Lemoine	1
Hst-766	Metastasi linfonodale	Smith HS	American Type Culture Collection	2
T3M4	Metastasi linfonodale	T. Okabe	N. Lemoine	2
A8184	Ascite	-	American Type Culture Collection	2
HPAF-II	Ascite	Metzgar RS	-	1
AsPC-1	Ascite	Chen and M.H. Tan	American Type Culture Collection	2

Tabella 4.1. Elenco delle linee cellulari immortalizzate utilizzate nello studio

4.2 Mantenimento delle linee cellulari immortalizzate

Tutte le operazioni effettuate sulle colture sono state condotte sterilmente sotto cappa a flusso laminare. Le linee cellulari sono state mantenute in coltura in fiasche di polistirene da 75 cm² e da 25 cm² (Costar) in un incubatore termostato a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ e coltivate in RPMI 1640 (Lonza) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS) (Lonza), 2 mM L-glutamina e 100 U/mL penicillina-streptomicina. Il terreno metabolizzato viene sostituito con terreno nuovo ogni volta venga ritenuto necessario. Raggiunta la confluenza dell'80%, dopo due lavaggi con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) per eliminare il siero e le cellule morte, le cellule sono state staccate dalle fiasche mediante incubazione con Tripsina-EDTA 0,25% w/v (Lonza), a 37°C per un tempo che varia a seconda della linea cellulare e che viene stabilito mediante osservazione al microscopio. L'effetto della tripsina-EDTA è stato bloccato con RPMI 10%. Infine le cellule sono state recuperate, centrifugate a 500 g per 8 minuti a temperatura ambiente, risospese in terreno e rimesse in coltura o usate per i differenti esperimenti previa conta cellulare con Trypan blue.

4.3 Allestimento di colture primarie eterogenee di pancreas sano da donatori di organo a cuore battente

Colture eterogenee di cellule normali pancreatiche sono state isolate da pancreas umano derivato da donatori in morte cerebrale e messe in coltura allo scopo di utilizzarle come campione di riferimento del tessuto pancreatico sano. L'isolamento della componente endocrina (Isole di Langerhans) a scopo di trapianto prevede la digestione del pancreas *in toto* ("Pancreatic Islet Processing Facility", Ospedale San Raffaele). Questa procedura genera del materiale cellulare non adeguato all'utilizzo clinico e che viene scartato. Nella parte di tessuto pancreatico digerito che non viene utilizzata per il trapianto sono presenti differenti tipi cellulari: la componente esocrina (cellule acinari e duttali), quella stromale (cellule mesenchimali), quella neurovascolare (cellule neurali ed endoteliali) e alcune cellule del sistema immunitario. È possibile isolare le differenti componenti con procedure sperimentali specifiche, per esempio tramite l'utilizzo di particolari terreni e condizioni di coltura.

Il materiale di scarto (pellet) prima di essere utilizzato come fonte di cellule primarie deve essere stabilizzato al fine di limitare l'azione litica degli enzimi prodotti dal pancreas esocrino e della collagenasi utilizzata durante il processamento: a questo scopo il pellet di digerito pancreatico, viene lavato tre volte con Ham'S F12 completo (Ham'S:F12 (Lonza) supplementato con 1% (w/v) di BSA (Sigma), 2 mM L-glutammina e 100 U/mL penicillina-streptomina). Il pellet stabilizzato viene poi piastrato in fiasche T175 per crescita in sospensione e quindi mantenuto overnight a 37°C e 5% di CO₂. Il giorno successivo le cellule sono state utilizzate per le analisi: si tratta di una coltura eterogenea costituita da circa il 15-20% di cellule duttali, il 70-75% di acinare e il resto dalle altre componenti.

4.4 Determinazione della vitalità e conta cellulare mediante colorazione con Trypan blue

Le cellule, dopo essere state staccate dalle piastre con tripsina, sono state risospese in RPMI 10%. Un'aliquota di sospensione cellulare è stata prelevata e diluita con un volume noto del colorante Trypan blue 0,4%. La sospensione cellulare colorata è stata posta nella camera di Burker e la conta è stata eseguita al microscopio ottico (ingrandimento 10X). La concentrazione di cellule per ml è stata determinata con il seguente calcolo:

$$\text{cellule per ml} = \text{conteggio medio per quadrante} * \text{fattore di diluizione} * 10^4$$

4.5 Saggio di clonogenicità *in vitro*

Al fine di valutare il potenziale di auto-rinnovamento delle differenti linee cellulari è stato fatto un saggio di clonogenicità *in vitro*. Si è testata l'abilità di una singola cellula di dare origine a una colonia e quindi a una progenie. Le cellule sono state tripsinizzate, contate e risospese in RPMI10% a differenti concentrazioni per essere piastrate nell'esatto numero di 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 100 cellule per pozzetto in 200ul di terreno, in una piastra di polistirene da 96 pozzetti per colture cellulari (Costar). Per ogni punto di diluizione sono stati fatti 24 replicati. Dopo dieci giorni, al microscopio ottico (ingrandimento 10X e 5X), sono stati contati i pozzetti dove si sono generati i cloni; considerando questi come positivi, si è calcolata la percentuale dei pozzetti

positivi sul totale dei 24 pozzetti. Si definisce clone una colonia formata da almeno 4 cellule. La clonogenicità è stata quindi valutata come clonogenicità IC50; IC50 è il numero medio di cellule, che devono essere seminate per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti, necessario per ottenere la formazione di un clone cellulare nella metà dei pozzetti seminati. L'IC50 è stata calcolata mediante la curva non lineare dei minimi quadratici utilizzando il programma CalcuSyn (Biosoft, Oxford, UK).

4.6 Saggio di quantificazione dell'apoptosi mediante citometria a flusso

Il propidio ioduro (PI, Cambrex Lonza) è un colorante fluorescente (eccitazione max 535nm, emissione massima 617nm) che si lega con elevata affinità al DNA delle cellule. La rilevazione della fluorescenza da esso emessa mediante citometria a flusso consente una quantificazione della percentuale di cellule in una data fase del ciclo cellulare, sfruttando il diverso contenuto di DNA delle cellule nelle fasi subG1, G1, S, G2/M. L'analisi, effettuata con l'ausilio del programma FCS express v3 (De Novo Software, CA) permette di dividere l'insieme dei segnali di fluorescenza in 4 parti fondamentali: due curve gaussiane, G1 e G2/M, una curva intermedia, costituente la fase S e un segnale presente prima del picco G1 (subG1). Per ogni segnale viene ricavata la percentuale di cellule in quella determinata fase del ciclo cellulare. La percentuale di cellule apoptotiche è rappresentata dal segnale in subG1.

Le cellule, tripsinizzate e contate, vengono fissate e permeabilizzate seguendo la procedura qui descritta: 10^5 cellule vengono lavate con soluzione fisiologica (sodio cloruro 0,9%) e risospese in 100 μ l della medesima soluzione, immediatamente si aggiungono goccia a goccia 900 μ l di etanolo al 70% (tenuto a -20°C). Il tempo di fissazione e permeabilizzazione può variare da un minimo di 30 minuti ad un massimo di 24 ore a -20°C. Si procede poi con un lavaggio in D-PBS iposmotico (0,8%) e la marcatura con propidio ioduro (soluzione di 1 μ l di PI alla concentrazione di 1 μ l/ml, 5 μ l RNasi alla concentrazione di 0,1mg/ml, 194 μ l PBS). La lettura del campione è stata fatta al citometro a flusso FACScalibur (Becton Dickinson).

4.7 Saggio di chemioresistenza

Le linee di adenocarcinoma duttale sono state seminate a una concentrazione di 10^5 cellule per ml per pozzetto, in una piastra di polistirene da 12 pozzetti per colture cellulari (Costar). Le cellule sono state trattate a differenti dosi del farmaco chemioterapico Gemcitabina (1, 10, 100, 1000 μM). Dopo 2 giorni, le cellule sono state tripsinizzate, lavate una volta con soluzione fisiologica e marcate con propidio ioduro secondo il protocollo precedentemente descritto (paragrafo 4.6), e il contenuto di DNA misurato in citometria a flusso. Sono state quindi tracciate delle curve di dose-risposta e sono state calcolate le concentrazioni di farmaci che avevano indotto il 50% di apoptosi, indicandola come IC50. L'IC50 è stata calcolata mediante la curva non lineare dei minimi quadratici utilizzando il programma CalcuSyn (Biosoft, Oxford, UK).

4.8 Saggio multiplo di misurazione della secrezione di fattori solubili tramite la tecnologia Luminex Xmap[®].

Le linee di adenocarcinoma duttale sono state seminate a una concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule per ml in una fiasca di polistirene da 25 cm^2 (Costar), per un totale di $5 \cdot 10^6$ cellule in 5ml di RPMI10%. Dopo 24 ore di coltura il medium viene raccolto, centrifugato a 500g per 8 minuti a temperatura ambiente e conservato a -80°C . I fattori secreti sono stati misurati usando un saggio in sospensione Luminex Xmap, seguendo le istruzioni del protocollo allegato. I saggi Luminex consentono di determinare la concentrazione di più analiti contemporaneamente in un piccolo volume di campione biologico. Il principio del saggio è simile a quello del saggio ELISA a “sandwich” (Figura 4.2).

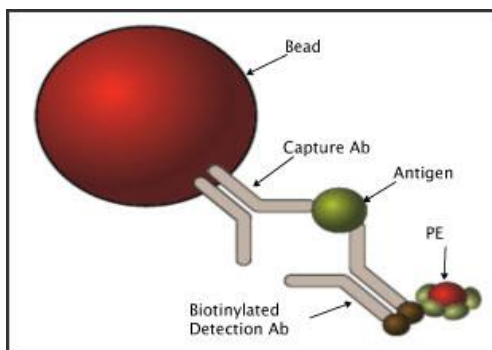


Figura 4.2. Principio del saggio Luminex

Diversi anticorpi di “cattura”, covalentemente legati a biglie di polistirene (ogni microsfera ha un codice colore fluorescente distinto per un determinato anticorpo e questo colore identifica una regione in uno spettro di fluorescenza), sono diretti verso i biomarcatori specifici presenti nel campione. Anticorpi biotinilati specifici per i medesimi analiti vengono aggiunti alla sospensione per

creare un complesso a “sandwich”. Il complesso viene poi legato dalla streptavidina portante il fluorocromo ficoeritrina. Lo strumento di lettura (Luminex X100, Bio-rad) sfrutta lo stesso principio del citofluorimetro per rilevare reazioni che avvengono sulla superficie delle microsferes fluorescenti. Le microsferes vengono aspirate da un ago e portate nella camere di lettura dove vengono fatte passare una ad una e colpite da due laser. Il laser rosso (636 nm) identifica la regione della microsfera e quindi il relativo analita riconosciuto dall'anticorpo ad essa legato; il laser verde (532 nm) eccita la ficoeritrina generando un segnale “reporter”. La concentrazione di un determinato analita è proporzionale alla mediana di intensità di fluorescenza del segnale emesso dalla ficoeritrina. Il software di elaborazione (Bio-plex Manager v4.1) fornisce come output la concentrazione di ogni analita espressa in pg/ml. Per le nostre quantificazioni abbiamo utilizzato due kit differenti (Bio-Plex, Bio-Rad Laboratories):

- (i) Bio-plex Pro Human Cytokine 21 plex assay, BioRad: IL-1 α , IL-2R α , IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL
- (ii) Bio-plex Pro Human Cytokine 27 plex assay BioRad: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, basicFGF, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF

4.9 Isolamento di cellule tumorali da tumori primari pancreatici umani

Il tessuto tumorale processato è stato prelevato dal pezzo operatorio ottenuto dalla resezione chirurgica di neoformazioni pancreatiche. Le operazioni in seguito descritte, se non diversamente specificato, sono state condotte sterilmente sotto cappa a flusso laminare mantenendo tutto il materiale, compreso il tessuto tumorale, ad una temperatura di 4°C al fine di limitare l'azione litica degli enzimi prodotti dal pancreas esocrino. La parte di tessuto prelevata è stata pesata, purificata il più possibile dal tessuto adiposo e successivamente sminuzzata in frammenti di circa 2mm³ mediante l'utilizzo di bisturi sterili in una petri da 100mm. Tali frammenti sono stati risospesi in 20ml di RPMI 1640 in assenza di siero (supplementato con 2mM L-glutamina e 100 U/ml penicillina-streptomomicina) e trasferiti in una provetta da 50ml per essere centrifugati a 1200 rpm per 6 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato, il pellet è stato risospeso in 5 ml di una

soluzione di digestione di cellule tumorali e incubato a 37°C in agitazione per un tempo variabile (da 30 a 200 minuti) necessario alla completa digestione dei frammenti. La soluzione di digestione utilizzata appartiene ad un kit per l'isolamento di cellule tumorali ("Cancer Cell Isolation Kit", Panomics Inc) a cui è stata aggiunta la DNaseI (Roche) alla concentrazione di 1µg/ml. La digestione è stata controllata ogni 10 minuti verificando al microscopio ottico la presenza di cellule singole e la loro vitalità mediante colorazione con trypan blue. La digestione è stata bloccata aggiungendo 10ml di soluzione di sospensione delle cellule tumorali, appartenente al kit sopra specificato. La sospensione ottenuta è stata poi filtrata attraverso un filtro da 100mm (BD bioscience) per rimuovere le porzioni di tessuto non digerite, raccolta in una nuova provetta da 50ml contenente 25ml di RPMI 10%, necessario per diluire ulteriormente la soluzione di digestione e centrifugata a 1200 rpm per 8 minuti a 4°C. In seguito il pellet è stato risospeso in 15ml di RPMI 10% e di nuovo centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C. Rimosso il surnatante, al pellet di cellule tumorali sono stati aggiunti 10ml di RPMI10%; le cellule sono state risospese meccanicamente e messe in termostato a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ per almeno 1 ora in modo da permettere alle cellule di ri-esprimere in membrana proteine eventualmente danneggiate durante la digestione. È seguita l'analisi citofluorimetrica previa conta cellulare.

4.10 Analisi citofluorimetrica dell'espressione di molecole di membrana

L'espressione di molecole di membrana è stata valutata mediante citometria a flusso. Per ogni campione da marcare vengono utilizzate $2-4 \cdot 10^5$ cellule per le linee cellulari che vengono staccate dalle fiasche secondo il protocollo precedentemente descritto (paragrafo 4.2) e lasciate in incubatore con RPMI 10% per un'ora in modo da permettere alle cellule di esprimere nuovamente in membrana proteine eventualmente danneggiate dall'azione della tripsina. Per quanto riguarda invece le cellule tumorali ricavate dal processamento dei tumori primari, per ogni campione sono state utilizzate almeno $5 \cdot 10^4$ cellule. Le cellule sono state lavate con FACS Buffer, una soluzione di Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) contenente lo 0,2% (w/v) di albumina supplementato con l'1% (v/v) di siero umano AB scomplementato (Sigma) per saturare i siti di legame aspecifici. Dopo centrifugazione a 500g per 5 minuti, le cellule sono state incubate per 30 minuti a 4°C con l'anticorpo primario di interesse diluito opportunamente in

FACS buffer. Infine si effettuano due lavaggi in FACS buffer freddo (4°C), si risospendono le cellule in 300 µl di FACS buffer e si procede con la lettura al citometro a flusso. I citometri a flusso utilizzati sono stati BD FACSCanto II (software DiVa) o BD FACScalibur (software CellQuest) (Becton Dickinson, New Jersey, USA). I risultati sono espressi come percentuale di cellule positive.

I recettori chemochinici vengono downregolati dalle cellule in coltura attraverso il rilascio di chemochine, questo è sicuramente valido per alcuni tipi cellulari quali le cellule dendritiche ¹⁰⁵. In base a questa conoscenza è stato ritenuto necessario, per non incorrere in falsi negativi, utilizzare un protocollo per ovviare al problema della downregolazione dei recettori chemochinici. Il terreno di coltura delle cellule è stato cambiato due ore prima di iniziare il distacco con Tripsina-EDTA per favorire l'espressione in membrana dei recettori. Dopo aver staccato le cellule, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 4.2, le cellule vengono risospese in terreno (RPMI 10%) e lasciate 1 ora a temperatura ambiente al fine di favorire la rigenerazione degli epitopi. Si prosegue successivamente con la marcatura come descritto precedentemente.

Per le analisi le cellule sono state marcate utilizzando anticorpi primari direttamente coniugati a differenti fluorocromi e che hanno specificità per l'uomo. L'elenco completo degli anticorpi è riportato nella tabella 4.2.

L'unico anticorpo non coniugato direttamente ad un fluorocromo è l'anticorpo anti CA19-9. Prima dell'immunodecorazione delle cellule è stata utilizzata la tecnologia Zenon® (Life Technologies) per legare non covalentemente all'anti CA19-9 il fluorocromo Alexa-488. La procedura seguita è quella descritta seguendo le istruzioni del protocollo allegato dalla casa produttrice.

¹PE = ficoeritrina

²APC = allofocianina

³FITC= isotiocianato di fluoresceina

Nome	Specificità	Clone	Clonalità e fonte	Isotipo	Fluorocromo	Casa produttrice
Anti CA19-9	Sialylated Lacto-N-Fucopentose II	241	Monoclonale di topo	IgG1	Non coniugato	GeneTex, Inc., Irvine CA, USA
Anti CD133/1	CD133	AC133	Monoclonale di topo	IgG1	PE ¹	Miltenyi Biotec,

						Germany
Anti ESA	Epitelian Surface Antigen	9C4	Monoclonale di topo	IgG	FITC ³	Abcam, Cambridge, USA
Anti CD24	Glicoproteina a due catene, superficie cellule B e granulociti	ML5	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	BD Bioscience, CA
Anti CD44	Recettore dell'acido ialuronico(Pgp-1)	G44-26	Monoclonale di topo	IgG2b	APC ²	BD Bioscience, CA
Anti CCR1	Recettore per le chemochine, CCR1	53504	Monoclonale di topo	IgG2b	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR3	Recettore per le chemochine, CCR3	61828	Monoclonale di ratto	IgG2a	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR4	Recettore per le chemochine, CCR4	205410	Monoclonale di topo	IgG2b	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR5	Recettore per le chemochine, CCR5	CTC5	Monoclonale di topo	IgG1	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR6	Recettore per le chemochine, CCR6	53103	Monoclonale di topo	IgG2b	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR7	Recettore per le chemochine, CCR7	150503	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR8	Recettore per le chemochine, CCR8	191704	Monoclonale di ratto	IgG2b	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR9	Recettore per le chemochine, CCR9	112509	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CCR10	Recettore per le chemochine, CCR10	314305	Monoclonale di ratto	IgG2a	APC ²	R&D Systems,Minneapolis,MN
Anti CXCR1	Recettore dell' IL-8	42705	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	R&D Systems,Minneapolis,MN

Anti CXCR2	Recettore per le chemochine, CXCR2	48311	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti CXCR3	Recettore per le chemochine, CXCR3	49801	Monoclonale di topo	IgG1	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti CXCR4	Recettore per le chemochine, CXCR4	12G5	Monoclonale di topo	IgG2a	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti CXCR5	Recettore per le chemochine, CXCR5	51505	Monoclonale di topo	IgG2b	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti CXCR6	Recettore per le chemochine, CXCR6	56811	Monoclonale di topo	IgG2b	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti CX3CR1	Recettore di fractalkine (FKN)	2A9-1	Monoclonale di ratto	IgG2b	PE ¹	MBL, Japan
Anti XCR1	Recettore per le chemochine, XCR1	AAIL01	Policlonale di capra	IgG	PE ¹	R&D Systems, Minneapolis, MN

Tabella 4.2. Anticorpi primari utilizzati per l'analisi citofluorimetrica dell'espressione di molecole di membrana.

4.11 Estrazione di RNA con kit mirVana™

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata sia dalle linee cellulari che da sezioni criostatiche di resezioni chirurgiche di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico utilizzando il kit mirVana (miRNA isolation kit, Ambion):

- Le linee cellulari sono state staccate con tripsina, lavate con D-PBS e il pellet è stato quindi risospeso in 600 µl di una soluzione di lisi (Lyse solution, Ambion);
- Le sezioni criostatiche sono state ricavate dal pezzo operatorio conservato in O.C.T. Previa valutazione dell'anatomopatologo sull'effettiva presenza del tumore, dieci sezioni per ogni paziente sono state immerse nella soluzione di lisi (Lyse solution, Ambion) ed omogenate meccanicamente con l'utilizzo del TissueRuptor (Qiagen)

Entrambe le tipologie di materiale, conservate in soluzione di lisi, sono state mantenute a -80°C fino alla procedura di estrazione.

L'estrazione dell'RNA viene effettuata mediante l'utilizzo del kit mirVana (miRNA isolation kit, Ambion) seguendo le istruzioni del protocollo allegato dalla casa produttrice.

La qualità e la quantità dell'mRNA estratto sono state valutate mediante lettura allo spettrofotometro (strumento Epoch, BioTek, software Gen5) e corsa elettroforetica a 100 volts per 30 minuti su gel all'1,5% di agarosio in 1x TAE (concentrazione madre 50X: 40 mM Tris, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA, pH 8,4)

4.12 Retro trascrizione e Real time PCR

Cinque microgrammi di RNA di ogni campione vengono retrotrascritti con il kit Superscript III RT (Invitrogen) seguendo il protocollo consigliato per la produzione di cDNA da utilizzare per la real time PCR con sonde Taqman FAM, che viene eseguita su 7900HT Real-Time PCR system (AppliedBiosystems) alle seguenti condizioni di temperatura:

- 50°C per 2 minuti;
- 95°C per 10 minuti;
- 50 cicli di: 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Ogni campione è stato analizzato in duplicato con degli assays pre-disegnati forniti dalla ditta Applied Biosystems per i geni elencati nella tabella 4.3.

Gene	Proteina	ID assay
PDX1	Pancreas/duodenum homeobox protein 1	Ha00426216_m1
NGN3	Neurogenin-3	Hs00360700_g1
NEUROD	Neurogenic differentiation factor 1	Hs00139598_m1
PAX4	Paired box protein Pax-4	Hs00927346_g1
PAX6	Paired box protein Pax-6	Hs00242217_m1
NKX2.2	Homeobox protein Nkx-2.2	Hs00159616_m1
NKX6.1	Homeobox protein Nkx-6.1	Hs00232355_m1
ISL1	Insulin gene enhancer protein ISL-1	Hs00158126_m1
PTF1 α	Pancreas transcription factor 1 subunit alpha	Hs00603586_g1
ONECUT	Hepatocyte nuclear factor 6	Hs00413554_m1
KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19	Hs00761767_s1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1

Tabella 4.3. Elenco dei geni e delle sonde utilizzate in real time PCR

Il gene endogeno gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi è stato utilizzato come housekeeping per normalizzare le differenze nella quantità di cDNA e nell'efficienza della retrotrascrizione.

Per l'analisi di espressione genica, i valori dopo amplificazione sono stati calcolati utilizzando il metodo dei C_T comparativi. Questa tecnica utilizza la formula del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ per calcolare l'espressione del gene target normalizzata secondo un calibratore. Il ciclo soglia (C_T) indica il ciclo al quale il gene target amplificato raggiunge una threshold fissata. Il valore medio del C_T del gene GAPDH è stato sottratto dal valore medio del gene target allo scopo di ottenere il corrispondente valore di ΔC_T che è ricavato dalla formula $\Delta(C_{T_{\text{gene target}}} - C_{T_{\text{GAPDH}}})$. Sono state poi determinate le differenze ($\Delta\Delta C_T$) tra i valori di ΔC_T dei trascritti target nei diversi casi e il valore del corrispettivo trascritto nel calibratore e queste differenze sono state poi espresse come $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Questo valore, espresso come unità arbitrarie (AU) rappresenta la quantità di espressione del gene target rispetto ad un calibratore considerato uguale ad 1 (metodo del $\Delta\Delta C_t$).

Per le analisi di correlazione statistica abbiamo utilizzato i valori di Fold change (FC) rispetto all'espressione di GAPDH, ovvero il $2^{-\Delta(C_{T_{\text{gene target}}} - C_{T_{\text{GAPDH}}})}$.

4.13 Inoculo sottocutaneo

Per valutare la tumorigenicità *in vivo* delle linee cellulari è stato utilizzato il topo *outbreed* di ceppo CD1-Nude. Si tratta di un topo atimico e quindi immunodeficiente perché incapace di produrre cellule T. Per questo motivo è uno dei modelli animali utilizzato per gli xenotrapianti.

Le cellule vengono staccate dalle fiasche di coltura secondo protocollo precedentemente descritto, contaminate e lavate 3 volte con D-PBS per eliminare tracce del siero presente nel terreno di coltura. Le cellule sono state infine risospese a diverse concentrazioni in D-PBS. La sospensione è stata tenuta in ghiaccio fino all'inoculo. La chirurgia viene effettuata su topi maschi di 8 settimane, forniti da Charles River (Calco, Italia); l'inoculo è stato effettuato sottocute e consiste di un volume di 100 μL contenenti diverse dosi ($1 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$) di cellule in una soluzione finale di D-PBS. Per tutte le 17 linee tumorali sono stati inoculati tre topi per ogni dose. I topi sono stati monitorati per l'eventuale formazione del tumore e il tempo trascorso dal momento dell'inoculo all'avvenuta formazione tumorale.

4.15 Pazienti arruolati per gli studi di validazione

Sono stati arruolati pazienti, che in seguito a riscontro di neoformazione pancreatico ed in particolare di adenocarcinoma duttale pancreatico, sono stati sottoposti ad intervento di chirurgia resettiva presso l'unità di Chirurgia Pancreatica dell'Ospedale San Raffaele, previa firma del consenso informato allo studio. Nella sezione Risultati sono descritte in dettaglio le coorti di pazienti (paragrafi 5.4.1 e 5.5.1).

Di ogni paziente sono stati raccolti una serie di dati clinico-patologici ed antropometrici, quali: data di nascita, sesso, CA19.9 pre-intervento, dimensioni anatomico-patologiche della neoformazione, diagnosi istologica, grading tumorale (G1, G2, G3), classificazione e stadiazione TNM, presenza o meno di metastasi al momento dell'intervento ed eventuale sede, effettuazione di una resezione chirurgica radicale o presenza di malattia residua (R0, R1), eventuale esecuzione di trattamento adiuvante (specificato il tipo di terapia se chemioterapia, radioterapia, o chemio-radioterapia) ed eventuale terapia neoadiuvante. I pazienti sono stati seguiti fino all'exitus clinico della malattia ed è stata registrata l'eventuale progressione in termini di recidiva. Si è dichiarato concluso il follow up a dicembre 2014. Per ogni popolazione in studio è stata quindi valutata la sopravvivenza globale (OS), la ripresa di malattia e se questa si fosse presentata come recidiva locale o a distanza.

4.16 Analisi statistica

Le variabili sono mostrate come medie \pm deviazioni standard (S.D) o come mediane e minimo-massimo o range interquartili, in accordo alla loro distribuzione. Le variabili sono state confrontate con il test di Anova o con il test di Mann-Whitney per quelle che non presentavano una distribuzione gaussiana. Le correlazioni tra i marcatori biologici e le caratteristiche clinico-patologiche sono state valutate con il test esatto di Fisher. Le curve di sopravvivenza e progressione sono state costruite con il metodo di Kaplan-Meier. L'Odds ratio è stato calcolato utilizzando la regressione logistica binaria, l'Hazard ratio (HR) mediante la regressione lineare di Cox. Odds ratio, Hazard ratio e intervalli di confidenza del 95% (indicati come limite inferiore e superiore) sono riportati. La regressione di COX è stata utilizzata per predire l'associazione tra una variabile e la sopravvivenza globale o la progressione. L'associazione di una variabile con la

presenza o assenza di una caratteristica (es: recidiva locale, recidiva metastatica, progressione ad un anno dall'intervento) è stata stimata con la regressione logistica binaria. Le analisi multivariate sono state effettuate includendo nel modello tutte le variabili risultate statisticamente significative ($p \leq 0,05$) nell'analisi univariata. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS 16.0 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. Risultati

5.1 Prima fase di caratterizzazione delle linee tumorali pancreatiche

Le 17 linee tumorali pancreatiche sono state caratterizzate *in vitro* e *in vivo* per alcuni parametri associabili a caratteristiche di aggressività cellulare: la capacità clonogenica, la chemioresistenza alla Gemcitabina e la tumorigenicità nel topo.

5.1.1 Clonogenicità *in vitro*

Mediante il saggio di clonogenicità si è analizzata la capacità di auto-rinnovamento, ovvero l'abilità di una singola cellula di dare origine a una colonia e quindi ad una progenie. In una coltura cellulare solo una frazione di cellule seminate conserva la capacità di produrre colonie, e si tratta della componente con un fenotipo più aggressivo. La clonogenicità è stata valutata mediante l'IC50 (numero medio di cellule da seminare in un pozzetto di una piastra da 96 per ottenere la crescita di un clone cellulare nella metà dei pozzetti seminati).

Nome	Origine	clonogenicità IC50
Panc-1	Tumore primario	25,19
PT45	Tumore primario	0,27
MIAPaCa-2	Tumore primario	0,02
SKPC-1	Tumore primario	2,79
BI	Tumore primario	24,38
PC	Tumore primario	3,15
Panc-2	Tumore primario	724,5
PaCa-3	Tumore primario	0,14
PaCa-44	Tumore primario	1,4
BxPc-3	Tumore primario	207,75
Capan-1	Metastasi epatica	10,6
CFPAC-1	Metastasi epatica	6,07
Hst-766	Metastasi linfonodale	30,35
T3M4	Metastasi linfonodale	0,61
A8184	Ascite	0,79
HPAF-II	Ascite	5,82
AsPC-1	Ascite	1,25

Tabella 5.1. Tabella descrittiva della clonogenicità IC50 nelle diverse linee immortalizzate di adenocarcinoma duttale

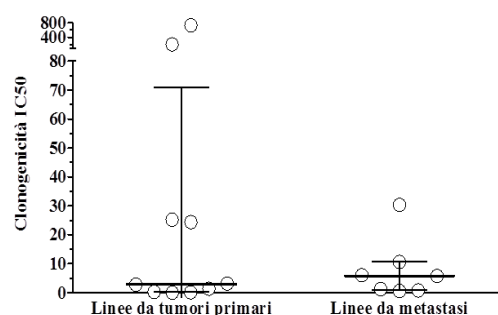


Figura 5.1. Scatter dot rappresentativo della clonogenicità IC50 nelle 17 linee tumorali, suddivise in base all'origine (tumore primario vs metastasi). Sono rappresentati la mediana e i percentili (25°-75°)

Non c'è differenza statisticamente significativa tra la clonogenicità di linee derivate da tumori primari (n=10) e linee derivate da metastasi (n=7) (p=1,000, test di Mann-Whitney) (Figura 5.1). La linea maggiormente clonogenica è la MiaPaCa-2 (clonogenicità IC50: 0,02), la meno clonogenica la linea Panc-2 (clonogenicità IC50: 724,5).

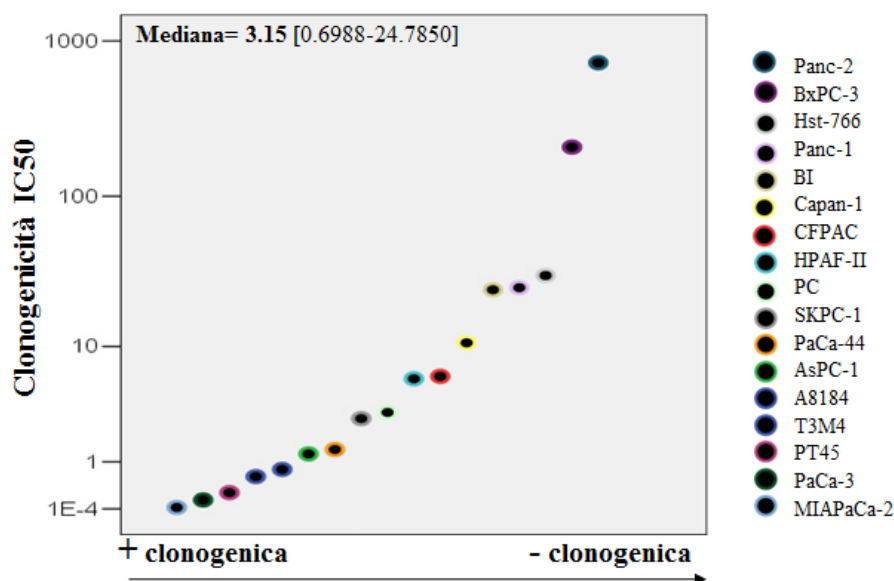


Figura 5.2. Immagine rappresentativa della clonogenicità IC50 nelle diverse linee immortalizzate di adenocarcinoma duttale.

5.1.2 Chemioresistenza alla Gemcitabina

Per valutare la chemioresistenza, le linee sono state messe in coltura per 2 giorni con gemcitabina (1-1000 μM) e ne è stata valutata l'apoptosi. Mediante curve dose-risposta è stata calcolata la concentrazione di farmaco necessaria a ottenere il 50% di morte cellulare. Tutte le linee, ad eccezione delle CFPAC-1 e Panc-1, si sono rivelate resistenti all'apoptosi anche alla dose più elevata del chemioterapico. Abbiamo definito sensibili alla gemcitabina quelle linee che avevano un IC50 compreso nell'intervallo delle dosi testate ($<1\text{E}+03\mu\text{M}$). La linea più sensibile all'azione della gemcitabina è la Panc-1 (IC50 158 μM), la più resistente è la linea Hst-766. Solo 11,8% delle linee (2 su 17) è sensibile all'azione del farmaco.

Non c'è una correlazione lineare statisticamente significativa tra la clonogenicità e la resistenza alla gemcitabina ($R=0,177$, $p=0.497$; analisi di regressione lineare), ovvero linee più

clonogeniche non sono né le più resistenti (correlazione diretta) né le più sensibili (correlazione inversa).

Nome	Origine	IC50 (μM)	chemiosensibilità
Panc-1	Tumore primario	1,58E+02	Sensibile
PT45	Tumore primario	8,68E+09	Resistente
MIAPaCa-2	Tumore primario	4,98E+06	Resistente
SKPC-1	Tumore primario	5,08E+09	Resistente
BI	Tumore primario	2,12E+73	Resistente
PC	Tumore primario	3,76E+24	Resistente
Panc-2	Tumore primario	1,28E+04	Resistente
PaCa-3	Tumore primario	5,78E+12	Resistente
PaCa-44	Tumore primario	9,41E+06	Resistente
BxPc-3	Tumore primario	1,48E+08	Resistente
Capan-1	Metastasi epatica	4,30E+22	Resistente
CFPAC-1	Metastasi epatica	4,18E+02	Sensibile
Hst-766	Metastasi linfonodale	9,98E+211	Resistente
T3M4	Metastasi linfonodale	3,46E+64	Resistente
A8184	Ascite	1,48E+12	Resistente
HPAF-II	Ascite	6,91E+08	Resistente
AsPC-1	Ascite	3,94E+30	Resistente

Tabella 5.2. Tabella descrittiva della chemioresistenza/chemiosensibilità nelle diverse linee immortalizzate di adenocarcinoma duttale.

5.1.3 Clonogenicità *in vivo*

Come altra caratteristica associabile alla malignità è stata valutata la capacità clonogenica *in vivo* o tumorigenicità. Si definisce tumorigenicità *in vivo* l'abilità delle linee tumorali di generare tumore in topi immunocompromessi se trapiantate a diluizione limite. In particolare, tutte le 17 linee tumorali sono state inoculate a dosi crescenti ($1 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ cellule per topo) in sede eterotopica sottocutanea in topi nudi di ceppo CD1-Nude (n=3 topi per ogni linea cellulare). L'eventuale sviluppo dello xenotrapianto è stato osservato per un tempo massimo di 196 giorni. La curva di Kaplan-Meier mostra il rischio di comparsa della neoplasia nel tempo in relazione alla dose (figura 5.3). L'inoculo di $1 \cdot 10^6$ cellule ha portato alla formazione del tumore, con differente penetranza (tabella 5.3), in tutte le 17 linee con un tempo medio di comparsa di 10.5 giorni. Il tempo trascorso dall'inoculo alla formazione tumorale è uguale nelle linee derivate dalle metastasi rispetto alle linee derivate da tumori primari (mediana di 5 vs 5 giorni; p=0.765 test di Mann-Whitney). Alla dose di $1 \cdot 10^5$ cellule in 4 delle linee cellulari tumorali pancreatiche (Panc-1, PT45, MIAPaCa-2, T3M4) non si è assistito alla formazione di una massa, mentre nelle restanti linee, il tempo mediano trascorso dall'inoculo alla formazione del tumore è stato di 21

giorni. Inoltre, a questa dose, i tumori generati da linee derivate da metastasi compaiono più precocemente (mediana di 10 vs 34 giorni; $p=0.028$ test di Mann-Whitney). Alla dose di 1×10^4 cellule solo 2 linee derivate da metastasi, le T3M4 e le AsPc-1, sono in grado di generare una massa, mentre alle dosi di 1×10^3 e 1×10^2 solo la linea AsPc-1 ha generato tumore con una penetranza del 33% e con un tempo dall'inoculo di 33 e 26 giorni rispettivamente. Nella tabella 5.3 sono descritte la penetranza e i tempi di comparsa di una massa misurabile.

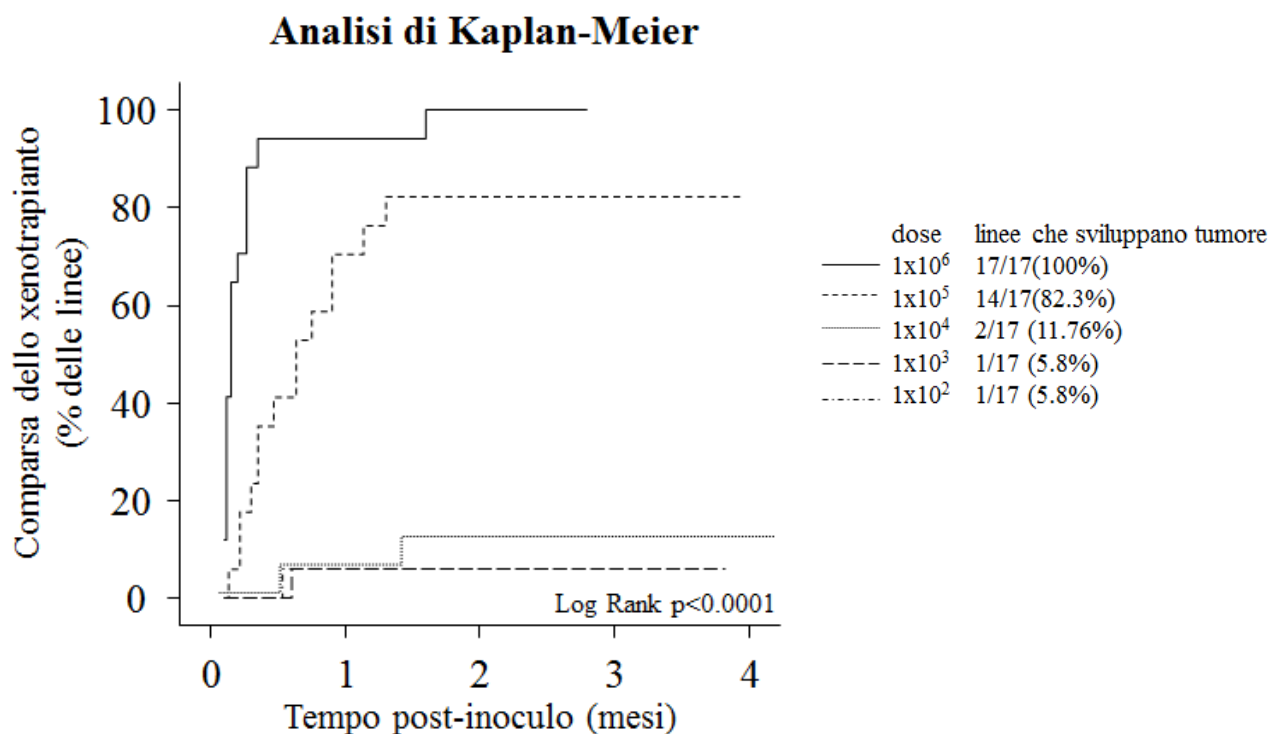


Figura 5.3. Curva di rischio di comparsa del tumore nel tempo in relazione alla dose di cellule inoculate per topo CDI-nude, calcolata mediante analisi di Kaplan-Meier. Le curve sono state confrontate con il test di significatività statistica log-rank test.

Clonogenicità *in vivo*

Linea	Origine	10⁶ cellule	Tempo (giorni)	10⁵ cellule	Tempo (giorni)	10⁴ cellule	Tempo (giorni)	10³ cellule	Tempo (giorni)	10² cellule	Tempo (giorni)
Panc-1	Tumore primario	2 su 3	5	0 su 3	65	0 su 3	65	0 su 3	65	0 su 3	65
PT45	Tumore primario	1 su 3	84	0 su 3	196	0 su 3	196	0 su 3	196	0 su 3	196
MIAPaCa-2	Tumore primario	1 su 3	9	0 su 3	133	0 su 3	133	0 su 3	133	0 su 3	133
SKPC-1	Tumore primario	2 su 3	9	1 su 3	38	0 su 3	189	0 su 3	189	0 su 3	189
BI	Tumore primario	2 su 3	12	1 su 3	40	0 su 3	105	0 su 3	105	0 su 3	105
PC	Tumore primario	3 su 3	3	2 su 3	21	0 su 3	105	0 su 3	105	0 su 3	105
Panc-2	Tumore primario	3 su 3	4	2 su 3	30	0 su 3	77	0 su 3	77	0 su 3	77
PaCa-3	Tumore primario	3 su 3	5	3 su 3	11	0 su 3	130	0 su 3	130	0 su 3	130
PaCa-44	Tumore primario	3 su 3	4	3 su 3	17	0 su 3	180	0 su 3	180	0 su 3	180
BxPc-3	Tumore primario	3 su 3	3	3 su 3	21	0 su 3	140	0 su 3	140	0 su 3	140
Capan-1	Metastasi epatica	3 su 3	4	2 su 3	24	0 su 3	133	0 su 3	133	0 su 3	133
CFPAC-1	Metastasi epatica	3 su 3	5	2 su 3	8	0 su 3	130	0 su 3	130	0 su 3	130
Hst-766	Metastasi linfonodale	2 su 3	9	1 su 3	10	0 su 3	133	0 su 3	133	0 su 3	133
T3M4	Metastasi linfonodale	3 su 3	4	0 su 3	119	1 su 3	30	0 su 3	119	0 su 3	119
A8184	Ascite	3 su 3	5	3 su 3	8	0 su 3	112	0 su 3	112	0 su 3	112
HPAF-II	Ascite	3 su 3	7	3 su 3	11	0 su 3	105	0 su 3	105	0 su 3	105
AsPC-1	Ascite	3 su 3	4	3 su 3	5	1 su 3	57	1 su 3	33	1 su 3	26

Tabella 5.3. Nei topi nudi in sede eterotopica sottocutanea sono state inoculate cellule tumorali a dosi crescenti ($1 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ cellule). Per tutte le 17 linee tumorali sono stati inoculati tre topi per ogni dose. È stata valutata l'eventuale formazione del tumore (espressa in numero di topi presentanti il tumore su numero totale di topi inoculati) e il tempo trascorso dal momento dell'inoculo all'avvenuta formazione tumorale (espresso in giorni).

5.2 Seconda fase di caratterizzazione delle linee tumorali pancreatiche

In tutte le 17 linee tumorali è stata descritta l'espressione/secrezione di quattro differenti classi di fattori molecolari che hanno un ruolo sul comportamento biologico delle cellule tumorali: recettori delle chemochine, fattori solubili secreti, marcatori di staminalità e fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico.

5.2.1 Espressione di recettori delle chemochine

L'espressione dei recettori per chemochine nei tumori è correlata con differenti tipi di recidive o esiti clinici più o meno favorevoli^{106,107}. Abbiamo analizzato in citometria a flusso l'espressione in tutte le 17 linee tumorali di alcuni rappresentanti delle 4 famiglie di recettori: 10 recettori della famiglia CCR (CCR1-10), 6 recettori CXCR (CXCR1-CXCR6) e i recettori CX3CR1 e XCR1. Nella figura 5.4 sono mostrati, a titolo esemplificativo, i dot plot relativi all'espressione dei recettori nella linea CFPAC-1. Nella tabella 5.4 è riportata la percentuale delle cellule positive per ogni recettore in ogni linea cellulare. L'espressione dei differenti recettori risulta eterogenea fra le differenti linee. Si osserva che, per ogni recettore, l'espressione è limitata in ogni linea a una sottopopolazione più o meno ampia e che quindi non è comune a tutte le cellule di una determinata linea. Nello scatter dots in figura 5.5 abbiamo ricavato un pattern di espressione dei recettori chemochinici dell'adenocarcinoma pancreatico in base alla mediana delle percentuali di positività entro le linee: i recettori che risultano maggiormente presenti, con mediane di espressione superiori al 10% sono CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR3 e CXCR6; mentre CCR2, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR2, CXCR5, CX3CR1 risultano i meno espressi con mediane inferiori al 3% (Tabella 5.4).

Pannello A

Pannello B

Pannello C

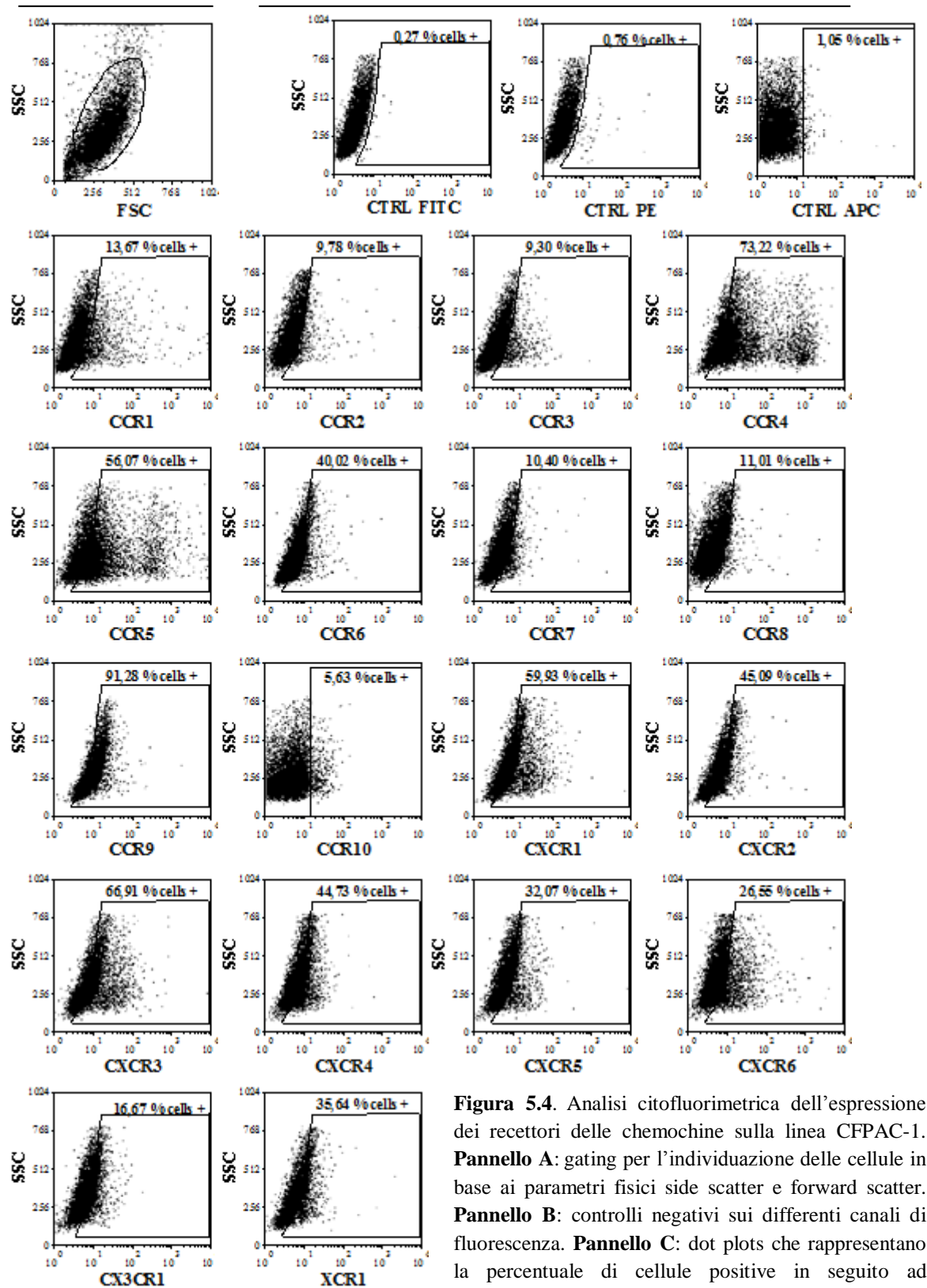


Figura 5.4. Analisi citofluorimetrica dell'espressione dei recettori delle chemochine sulla linea CFPAC-1. **Pannello A:** gating per l'individuazione delle cellule in base ai parametri fisici side scatter e forward scatter. **Pannello B:** controlli negativi sui differenti canali di fluorescenza. **Pannello C:** dot plots che rappresentano la percentuale di cellule positive in seguito ad immunocolorazione con anticorpi specifici per i recettori delle chemochine.

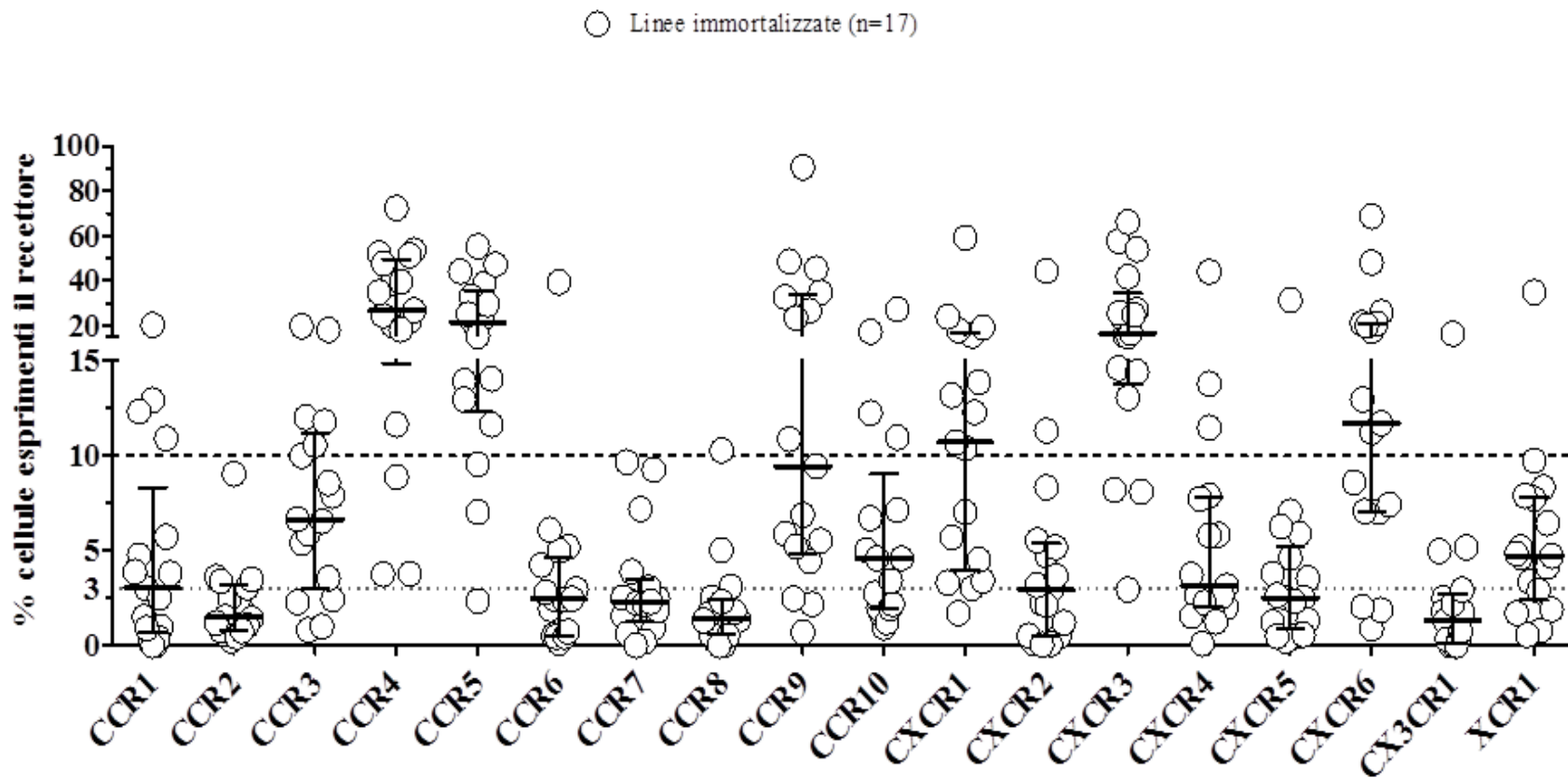


Figura 5.5. Grafico rappresentativo della % di espressione di ogni recettore delle chemochine nelle 17 linee tumorali. Le 17 linee cellulari sono considerate come categorie di una variabile, dove il termine variabile si riferisce alla % di cellule positive per l'immunocolorazione con l'anticorpo specifico per un recettore. Sono rappresentati la mediana e i percentili (25°-75°). Sono indicate le soglie di espressione del 10% (linea tratteggiata nera) e del 3% (linea punteggiata grigia)

Linea	Origine	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	CCR10	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CXCR6	CX3CR1	XCR1
Panc-1	Tumore primario	4,74	3,61	12	39,15	21,5	5,18	2,46	1,46	32,67	5,01	15,53	11,3	15,55	3,14	3,78	11,21	2,5	9,72
PT45	Tumore primario	0,04	0,27	0,82	3,77	2,33	0,54	0,92	0,27	10,84	0,96	1,7	0,13	2,95	0,11	0,48	0,89	0	0,8
MIAPaCa-2	Tumore primario	5,73	1,85	7,88	22,09	38,7	4,99	2,31	1,15	2,17	1,62	3,3	2,91	13,03	2,02	7,05	17,48	5,16	3,35
SKPC-1	Tumore primario	3,8	2,32	9,96	20,26	14,02	1,91	1,59	2,51	34,8	12,23	13,15	2,23	15,16	7,88	2,51	7,02	0	1,7
BI	Tumore primario	3,03	2,47	5,4	8,86	7,02	2,96	3,89	1,44	4,45	1,98	5,69	4,73	8,08	7,72	3,53	7,07	1,77	4,65
PC	Tumore primario	0,2	0,59	1,02	26,8	11,62	0,33	0,21	0,6	0,69	1,24	3,03	0,51	23,56	2,63	1,24	1,87	0,28	0,56
Panc-2	Tumore primario	2,52	3,38	5,9	39,47	13,9	2,45	2,51	3,1	45,42	2,73	17,86	8,32	14,58	13,76	2,51	21,02	1,79	5,16
PaCa-3	Tumore primario	20,26	1,51	2,45	3,74	12,94	2,42	0,63	1,35	2,48	1,96	3,43	2,13	57,73	2,13	1,33	48,09	1,32	2,87
PaCa-44	Tumore primario	3,88	3,05	6,64	53,54	23,1	2,46	3,04	5,01	26,65	2,19	10,38	5,54	14,39	5,83	2,31	11,69	2,18	4,83
BxPc-3	Tumore primario	0,4	0,46	11,77	18,07	15,26	0,46	2,23	0,52	5,52	6,7	12,27	0,53	16,56	2,25	0,49	12,94	4,97	6,43
Capan-1	Metastasi epatica	0,97	0,8	2,28	11,62	9,54	0,15	0	0,01	5,87	7,12	4,52	0,07	8,18	1,55	0,26	2,03	0	1,89
CFPAC-1	Metastasi epatica	12,91	9,02	8,54	72,46	55,31	39,26	9,64	10,25	90,52	4,58	59,17	44,33	66,15	43,97	31,31	25,79	16,4	34,88
Hst-766	Metastasi linfonodale	12,31	1,42	17,94	24,41	47,23	6,08	9,25	1,64	9,43	10,94	23,79	5,17	26,85	2,63	5,88	68,68	0,33	8,32
T3M4	Metastasi linfonodale	0	1,19	19,59	52,15	32,85	0,48	2,18	0	48,59	27,29	19,07	0,05	25,56	11,47	2,65	20,92	0,3	7,73
A8184	Ascite	1,51	1,05	3,53	47,68	24,97	2,81	1,86	1,78	23,42	4,59	7,01	3,16	53,94	5,8	4,62	7,41	2,95	4,14
HPAF-II	Ascite	0,91	0,76	6,53	51,33	29,41	0,74	2,3	1,31	5,21	17,17	13,86	1,2	24,78	3,72	0,57	8,58	0	4,71
AsPC-1	Ascite	10,9	3,48	10,54	34,88	44,06	4,22	7,18	2,28	6,89	3,4	10,68	3,64	41,69	1,25	6,25	19,97	0,77	7,87

Tabella 5.4. Espressione dei recettori delle chemochine nelle 17 linee di adenocarcinoma duttale pancreatico. I numeri sono espressi in percentuale (%) di cellule positive sul totale delle cellule analizzate al citofluorimetro con morfologia tipica del tipo cellulare analizzato (criterio di selezione basato su side scatter e forward scatter). Ogni percentuale è stata sottratta alla % di cellule risultate positive nel controllo negativo (cellule analizzate in assenza dell'anticorpo primario coniugato al fluorocromo).

Recettori	Mediana	Minimo	Massimo
CCR1	3,03	0	20,26
CCR2	1,51	0,27	9,02
CCR3	6,64	0,82	19,59
CCR4	26,8	3,74	72,46
CCR5	21,5	2,33	55,31
CCR6	2,45	0,15	39,26
CCR7	2,3	0	9,64
CCR8	1,44	0	10,25
CCR9	9,43	0,69	90,52
CCR10	4,58	0,96	27,29
CXCR1	10,68	1,7	59,17
CXCR2	2,91	0,05	44,33
CXCR3	16,56	2,95	66,15
CXCR4	3,14	0,11	43,97
CXCR5	2,51	0,26	31,31
CXCR6	11,69	0,89	68,68
CX3CR1	1,32	0	16,4
XCR1	4,71	0,56	34,88

Tabella 5.5. Valori mediani con minimo e massimo delle percentuali di espressioni dei recettori delle chemochine nelle 17 linee cellulari. I numeri sono espressi in %.

Un marcatore di aggressività può essere più o meno espresso dalle metastasi rispetto al tessuto neoplastico originario. Abbiamo quindi analizzato il pattern di espressione dei recettori chemochinici classificando le linee in base al tessuto d'origine (figura 5.6). Solo CCR5, CXCR10 e CXCR3 sono significativamente più espressi sulle linee derivate da metastasi che su quelle derivate da tumore primario (rispettivamente $p=0,019$, $p=0,019$ e $p=0,032$; test di Mann-Whitney) (tabella 5.6).

Recettori	Origine	Mediana	p Value
CCR1	Tumore primario	3,415	0,922
	Metastasi	1,51	
CCR2	Tumore primario	2,085	0,922
	Metastasi	1,19	
CCR3	Tumore primario	6,27	0,329
	Metastasi	8,54	
CCR4	Tumore primario	21,175	0,079
	Metastasi	47,68	
CCR5	Tumore primario	13,96	0,019
	Metastasi	32,85	
CCR6	Tumore primario	2,435	0,626
	Metastasi	2,81	
CCR7	Tumore primario	2,27	0,435
	Metastasi	2,3	
CCR8	Tumore primario	1,395	1
	Metastasi	1,64	
CCR9	Tumore primario	8,18	0,329
	Metastasi	9,43	
CCR10	Tumore primario	2,085	0,019
	Metastasi	7,12	
CXCR1	Tumore primario	8,035	0,079
	Metastasi	13,86	
CXCR2	Tumore primario	2,57	0,77
	Metastasi	3,16	
CXCR3	Tumore primario	14,87	0,032
	Metastasi	26,85	
CXCR4	Tumore primario	2,885	0,807
	Metastasi	3,72	
CXCR5	Tumore primario	2,41	0,283
	Metastasi	4,62	
CXCR6	Tumore primario	11,45	0,329
	Metastasi	19,97	
CX3CR1	Tumore primario	1,78	0,556
	Metastasi	0,33	
XCR1	Tumore primario	4	0,118
	Metastasi	7,73	

Tabella 5.6. Tabella riassuntiva delle mediane (esprese in %) di espressione dei recettori delle chemochine in relazione all'origine delle linee cellulari. $n=10$ linee derivano da tumori primari e $n=7$ linee derivano da metastasi. p-Value calcolato mediante test non parametrico di Mann-Whitney

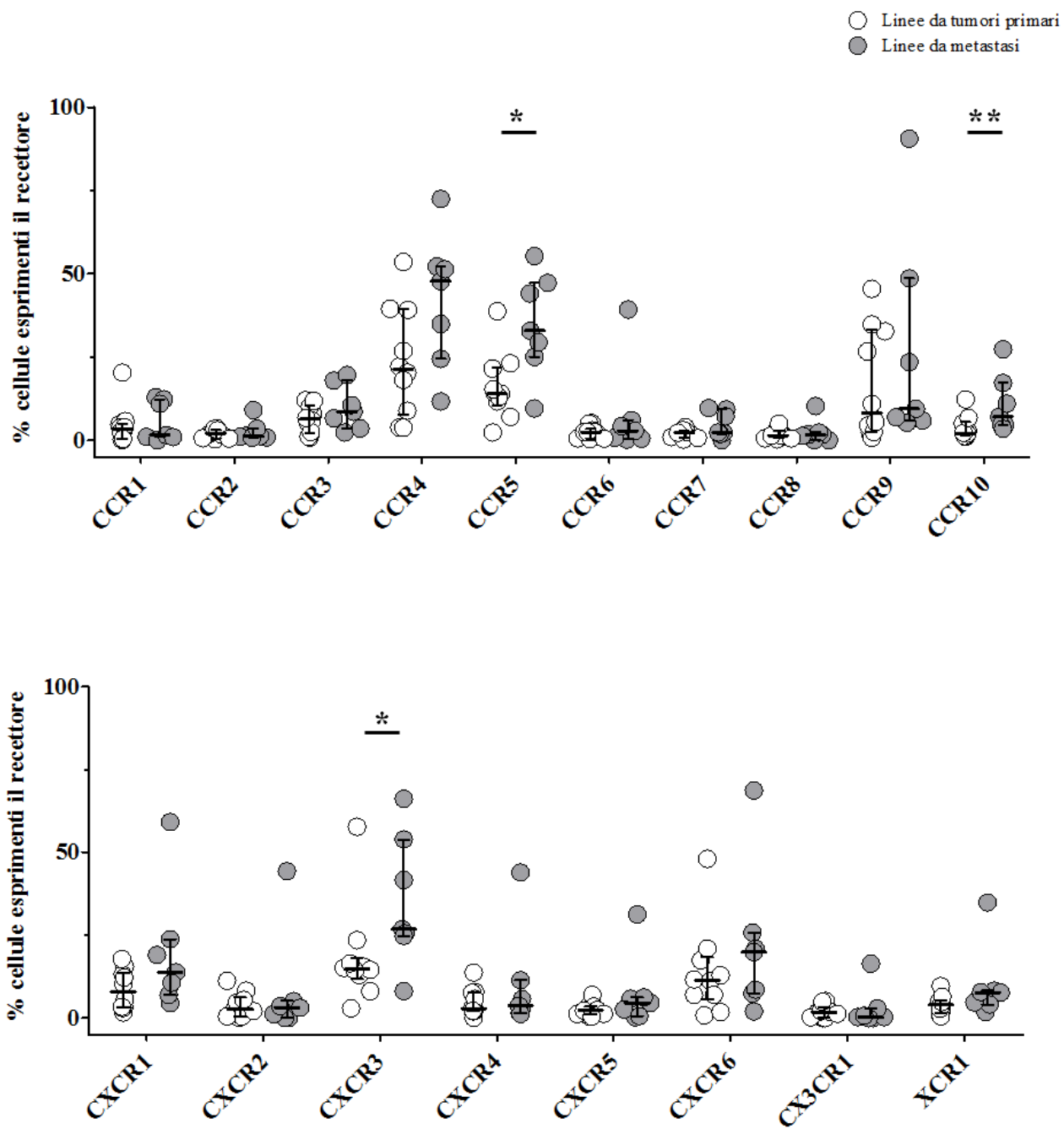


Figura 5.6. Grafici rappresentativi della % di espressione di ogni recettore delle chemochine nelle 17 linee tumorali, suddivise in base all'origine (tumore primario vs metastasi). Sono rappresentati la mediana e i percentili (25°-75°). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Test di Mann-Whitney.

5.2.2 Valutazione della secrezione di fattori solubili

Il terreno di coltura (RPMI 10%) condizionato in 24 ore di tutte le 17 linee cellulari è stato caratterizzato per la tipologia e la quantità di fattori solubili in esso secreti. Tali analiti sono stati dosati mediante la tecnologia Luminex xMAP. Utilizzando dei saggi commerciali abbiamo valutato l'abbondanza di alcune chemochine, citochine e fattori di crescita, in particolare:

- **Chemochine**, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, eotaxin/CCL11, CTACK/CCL27, GRO- α /CXCL1, IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12;
- **Citochine**, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN- α 2, IFN- γ , M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF, MIF, LIF, TNF- α , TNF- β , TRAIL;
- **Fattori di crescita**, HGF, β -NGF, SCGF- β , basicFGF, PDGF-BB, VEGF.

Le concentrazioni di ogni analita vengono fornite dal software di analisi dello strumento in pg/ml. Nella tabella 5.7 sono riportate per ogni analita le mediane delle quantità secrete dalle 17 linee cellulari. Gli analiti sono stati mostrati in ordine decrescente di abbondanza.

Possiamo dividere le proteine secrete in tre gruppi: il primo gruppo è rappresentato da fattori che hanno una mediana di secrezione inferiore a 50 pg/ml/10⁶/24h e pertanto biologicamente poco rilevanti; un secondo gruppo comprende quei fattori che sono mediamente secreti, tra i 50 e i 1000 pg/ml/10⁶/24h; l'ultimo gruppo è costituito da quelle proteine altamente secrete (>1000 pg/ml/10⁶/24h) e comprende VEGF, Gro α , IL-8, PDGF-BB e MIF (tabella 5.7). Nessun analita è risultato differenzialmente secreto da linee derivate da tumori primari rispetto a linee derivate da metastasi (tabella 5.7 e figura 5.7).

Analita	n=17 linee		n=10 linee derivate da primario		n=7 linee derivate da metastasi		p-Value
	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max	
>1000 pg/ml							
VEGF	13749,86	4445,75-36740,53	14906,44	6828,88-36740,53	13749,86	4445,75-36740,53	0,92
GRO α	7264,85	302,89-32340,36	7982,24	865,26-18335,41	1579,57	302,89-32340,36	0,63
IL-8	6917,52	559,39-10769,7	6554,17	1389-10621,65	6917,52	559,39-10769,7	0,77
PDGF-BB	1700,64	43,95-7165,4	1903,65	95,17-5290,25	1055,75	43,95-7165,4	0,70
MIF	1637,73	259,49-4626,92	1405,18	287,02-4626,92	2546,15	259,49-3505,65	0,85
1000 - 50 pg/ml							
SDF-1 α	964,88	7,34-2062,52	926,78	379,63-1659,48	975,36	7,34-2062,52	1,00
SCGF- β	821,29	216,6-24327,88	961,10	216,6-24327,88	542,98	455,93-1925,53	0,28
IP-10	619,69	9,51-38932,98	232,86	9,51-38932,98	2479,44	9,51-13956,84	0,37
IL-6	372,01	8,04-8644,5	260,35	8,04-1344,48	745,86	8,04-8644,5	0,49
IFN- γ	328,90	6,45-1229,97	279,09	6,45-733,1	500,71	6,45-1229,97	0,55
RANTES	325,95	42,23-18463,28	299,75	42,23-2998,32	325,95	115,05-18463,28	0,63
IL-12(p70)	325,61	148,87-690,69	379,31	190,36-635,37	325,61	148,87-690,69	0,85
LIF	108,32	21,18-1079,99	135,68	63,47-1079,99	101,07	21,18-533,04	0,38
M-CSF	90,15	7,57-2227,05	104,27	7,57-2227,05	90,15	7,57-1011,22	1,00
SCF	85,39	18,99-1240,83	88,30	18,99-303,85	82,49	19,26-1240,83	0,56
IL-7	78,45	32,09-546,39	71,92	32,09-243,1	216,79	36,82-546,39	0,24
IL-1R α	59,33	19,9-6174,86	57,14	19,9-6174,86	67,81	19,9-396,21	0,69
IL-13	58,74	34,48-82,84	59,29	34,48-82,84	58,74	39,9-70,41	0,56
<50 pg/ml							
G-CSF	44,98	5,24-6718,07	36,93	5,24-709,91	87,97	5,24-6718,07	0,62
MIP-1 α	37,92	5,68-97,41	34,65	5,68-60,62	40,36	5,68-97,41	0,92
IL-10	30,06	7,11-852,47	32,06	7,11-852,47	29,79	7,11-386,77	1,00
MCP-1	26,53	7,23-8976,94	16,88	7,23-8976,94	594,00	7,23-8263,25	0,38
IL-4	13,20	1,26-40,12	13,20	1,26-21,92	8,03	1,26-40,12	1,00
IL-1 β	10,68	10,68-142,39	10,68	10,68-74,58	10,68	10,68-142,39	0,69
IL-5	10,03	10,03-12,3	10,03	10,03-11,21	10,03	10,03-12,3	0,88
TNF- α	9,73	9,73-57,17	9,73	9,73-26,27	15,44	9,73-57,17	0,25
TNF- β	9,13	9,13-38,19	9,13	9,13-33,1	9,13	9,13-38,19	0,82
IL-1 α	8,75	6,43-1043,25	12,09	6,43-883,15	7,41	6,43-1043,25	0,52
HGF	8,32	8,32-105,35	9,85	8,32-105,35	8,32	8,32-44,31	0,31
IL-12p40	8,19	8,19-180,5	8,19	8,19-180,5	8,19	8,19-8,19	0,07
Eotaxin	7,98	7,98-339,48	7,98	7,98-213,95	7,98	7,98-339,48	0,48
IL-3	7,96	7,96-81,11	7,96	7,96-81,11	7,96	7,96-7,96	0,12
IL-17	7,46	7,46-7,46	7,46	7,46-7,46	7,46	7,46-7,46	1,00
IL-15	7,27	6,77-39,03	7,27	6,77-35,02	7,27	7,27-39,03	0,25
CTACK	6,94	6,94-168,79	10,78	6,94-168,79	6,94	6,94-25,41	0,53
TRAIL	6,28	6,28-92,97	6,28	6,28-92,97	6,28	6,28-6,28	0,40
MIG	6,14	1,9-168,65	4,59	1,9-168,65	18,61	1,9-37,63	0,49
IL-18	6,07	3,41-354,52	7,04	3,41-354,52	4,35	3,41-9,15	0,08
IL-9	5,70	5,7-131,37	5,70	5,7-119,09	93,22	5,7-131,37	0,25
IL-2	5,68	5,68-29,92	5,68	5,68-5,68	5,68	5,68-29,92	0,08
MIP-1 β	5,64	5,64-106,25	8,42	5,64-106,25	5,64	5,64-65,85	0,92
FGF basic	4,84	4,84-52,29	4,84	4,84-6,97	4,84	4,84-52,29	0,27
MCP-3	4,81	4,15-270,37	33,19	4,15-270,37	4,81	4,81-108,15	0,63
β -NGF	4,11	4,11-41,19	4,50	4,11-41,19	4,11	4,11-34,88	0,79
IL-16	3,77	3,77-129,88	3,77	3,77-129,88	3,77	3,77-80,72	0,77
GM-CSF	2,98	2,98-1105,09	2,98	2,98-1105,09	2,98	2,98-475,1	0,73
IL-2R α	2,36	2,36-125,05	6,46	2,36-125,05	2,36	2,36-80,08	0,75
IFN- α 2	0,86	0,86-174,67	0,86	0,86-174,67	0,86	0,86-0,86	0,22

Tabella 5.7. Rilascio basale di chemochine, citochine e fattori di crescita in n=17 linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico. Le mediane sono espresse in pg/ml/10⁶/24h, ovvero per ogni analita si è misurata la concentrazione in pg/ml nel medium condizionato per 24 ore di 1*10⁶ cellule. Min rappresenta il più basso valore osservato; max rappresenta il più alto valore osservato. p-Value calcolato tra le mediane delle linee derivate da tumori primari e quelle derivate da tumori metastatici (test di Mann-Whitney)

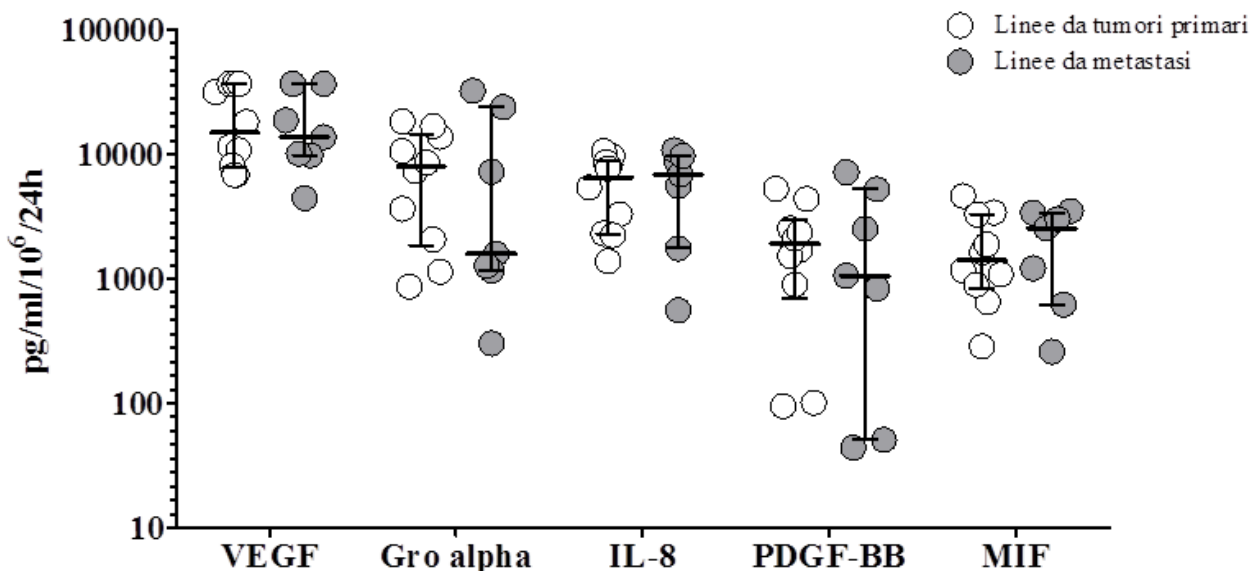


Figura 5.7. Rilascio basale dei fattori maggiormente secreti dalle n=17 linee tumorali suddivise in base all'origine. Sono rappresentati, per ogni gruppo di dati, le mediane e gli interquartili (25°-75°).

5.2.3 Valutazione dell'espressione di marcatori di staminalità

È ormai riconosciuto che l'aggressività tumorale possa essere anche dovuta a una piccola subpopolazione di cellule all'interno del tumore stesso definite cellule staminali tumorali. Secondo la teoria delle cellule staminali tumorali un piccolo numero di cellule è responsabile della crescita e metastatizzazione tumorale¹⁰⁸ e, in quanto più resistenti agli agenti chemioterapici standard, in seguito alla terapia queste cellule sopravviverebbero e rigenererebbero il tumore¹⁰⁹. Recenti evidenze supportano l'esistenza delle cellule staminali tumorali pancreatiche. In letteratura uno studio identifica le staminali come cellule CD44+/CD24+/ESA+¹⁰², un altro studio come cellule CD133+, con proprietà metastatiche se esprimono anche il recettore chemochinico CXCR4¹⁰³. Noi abbiamo valutato la presenza nelle diverse linee cellulari tumorali pancreatiche dei due putativi fenotipi staminali CD44+/CD24+/ESA+ e CD133+/CXCR4+ mediante analisi in citometria a flusso. L'immunofenotipizzazione è stata fatta mediante la marcatura simultanea delle cellule con anticorpi direttamente coniugati a fluorocromi differenti che riconoscono le molecole sopra citate. La distribuzione dei fenotipi staminali è risultata abbastanza eterogenea fra le differenti linee cellulari. Nella Tabella 5.8 e nella Figura 5.8 è riportata l'espressione delle

molecole di membrana ESA, CD24 e CD44, analizzata in citofluorimetria nelle 17 linee cellulari tumorali pancreatiche ed espressa in percentuale. Le cellule con fenotipo triplo positivo CD44+/CD24+/ESA+ rappresentano dallo 0 al 99.35% di tutte le cellule delle linee con una mediana del 3.46% (tabella 5.8). Le linee in cui è maggiormente espresso sono le A8184 (99.35%), CFPAC-1 (97.97%), PaCA-3 (93.6%), e BxPc-3 (89.73%). Non ci sono differenze, in termini di mediana di espressione, tra le linee classificate sulla base del tessuto d'origine.

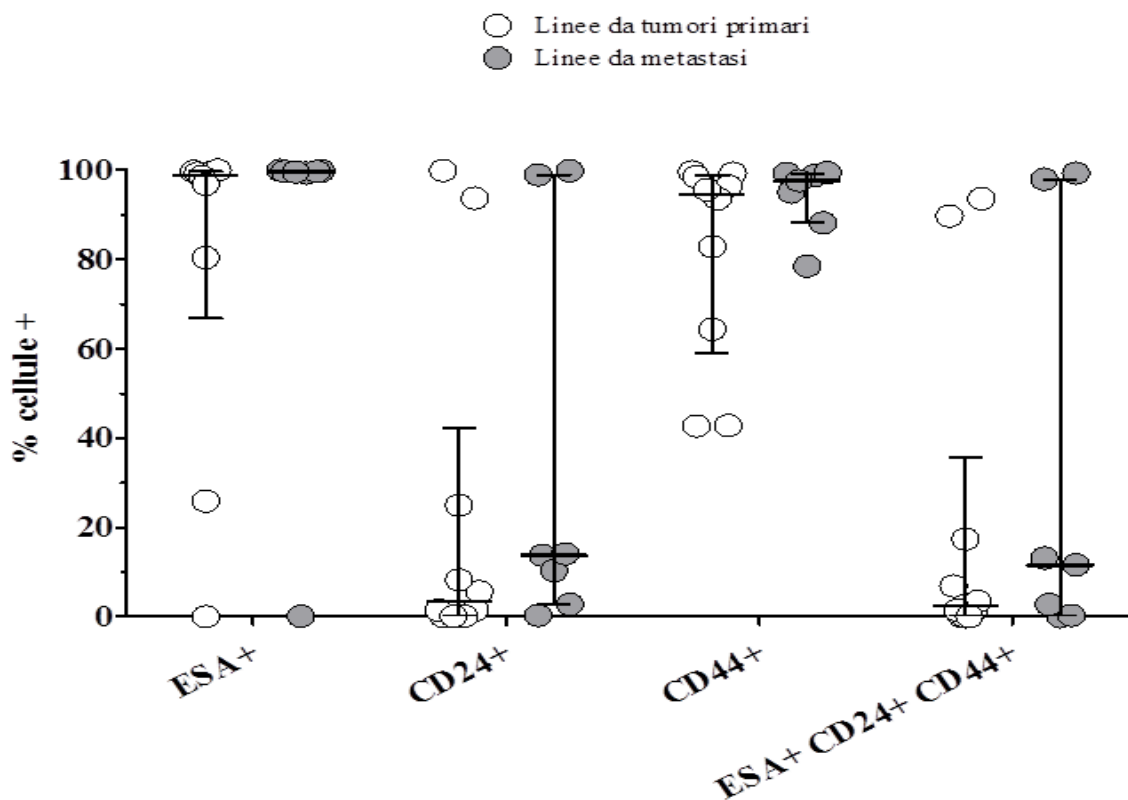


Figura 5.8. Espressione del fenotipo staminale ESA+/CD24+/CD44+ nelle n=17 linee tumorali suddivise in base al tessuto d'origine. Sono rappresentati, per ogni gruppo di dati, le mediane e gli interquartili (25°-75°).

Linea	Origine	ESA+ CD24+ CD44-	ESA+ CD24+ CD44+	ESA+ CD24- CD44-	ESA+ CD24- CD44+	ESA- CD24+ CD44-	ESA- CD24+ CD44+	ESA- CD24- CD44-	ESA- CD24- CD44+	ESA+	CD24+	CD44+
Panc-1	Tumore primario	0	0,13	16,43	82,71	0	0	0,73	0	99,27	0,13	82,84
PT45	Tumore primario	0	1,3	0,02	24,6	0	0,19	0,31	73,57	25,92	1,49	99,66
MIAPaCa-2	Tumore primario	0	0	0,01	0	0	0,16	0,73	99,13	0,01	0,12	99,29
SKPC-1	Tumore primario	0	17,43	0,8	62,14	0	7,57	0,65	11,41	80,37	24,99	98,55
BI	Tumore primario	2,17	3,46	54,79	39,36	0	0	0,23	0	99,77	5,63	42,82
PC	Tumore primario	0	1,5	2,96	94,91	0	0	0,61	0,03	99,36	1,5	96,43
Panc-2	Tumore primario	0,04	0,08	56,91	42,67	0	0	0,29	0	99,71	0,13	42,75
PaCa-3	Tumore primario	6,33	93,6	0,06	0,01	0	0	0	0	100	99,93	93,61
PaCa-44	Tumore primario	1,29	6,91	32,9	57,45	0,02	0,04	1,4	0	98,54	8,26	64,39
BxPc-3	Tumore primario	1,97	89,73	0,91	4,25	0,38	1,64	1,13	0	96,85	93,72	95,63
mediana	primari	0,02	2,48	1,935	41,015	0	0,02	0,63	0	98,905	3,565	94,62
Capan-1	Metastasi epatica	2,09	11,64	18,74	66,89	0	0	0,64	0	99,36	13,73	78,53
CFPAC-1	Metastasi epatica	0,95	97,97	0,16	0,81	0	0,02	0,09	0	99,89	98,95	98,8
Hst-766	Metastasi linfonodale	0	0,01	0	0,12	0	10,29	0,74	88,84	0,13	10,31	99,26
T3M4	Metastasi linfonodale	0,97	13,15	10,54	75,05	0	0	0,3	0	99,7	14,12	88,19
A8184	Ascite	0,49	99,35	0,04	0,07	0	0,02	0,02	0	99,96	99,87	99,44
HPAF-II	Ascite	0	0,31	4,6	94,78	0	0	0,31	0	99,69	0,31	95,09
AsPC-1	Ascite	0,06	2,78	1,84	94,91	0	0	0,42	0	99,58	2,83	97,68
mediana	metastasi	0,49	11,64	1,84	66,89	0	0	0,31	0	99,69	13,73	97,68
mediana	totale	0,06	3,46	1,84	42,67	0	0	0,42	0	99,36	8,26	95,63
p-Value		0,84	0,43	0,56	0,59	0,61	0,60	0,35	0,33	0,26	0,24	0,38

Tabella 5.8. Espressione dei putativi marcatori staminali ESA, CD24, CD44 nelle 17 linee di adenocarcinoma duttale pancreatico. I numeri sono espressi in percentuale (%) di cellule positive sul totale delle cellule analizzate al citofluorimetro con morfologia tipica del tipo cellulare analizzato (criterio di selezione basato su side scatter e forward scatter). Sono rappresentate le mediane di espressione nelle linee derivate da tumori primari e nelle linee derivate da metastasi e confrontate con p-Value calcolato mediante test non parametrico di Mann-Whitney.

Nella tabella 5.9 e nella figura 5.9 è riportata l'espressione delle molecole di membrana CXCR4 e CD133. Per la marcatura del CD133 è stato usato l'anticorpo clone AC133/1 che è noto riconoscere l'epitopo 1 della Prominina 1, marcatore che si trova frequentemente sulle cellule progenitrici multipotenti, comprese le cellule staminali e progenitrici ematopoietiche immature. Nelle linee cellulari l'espressione di CD133 è eterogenea: n=3 linee (CFPAC-1, Capan-1, PaCa-3) presentano una elevata espressione (>80% di tutte le cellule); n=2 linee (BI, A8184) hanno espressione intermedia (20-40%), mentre le restanti n=12 linee mostrano percentuali più basse di espressione del CD133 (<6%). Considerando tutte le 17 linee il fenotipo CD133 positivo rappresenta dallo 0 al 98,47% di tutte le cellule con una mediana di 0,34%. Il fenotipo descritto come metastatico, CD133 positivo e CXCR4 positivo, è il meno rappresentato e varia dallo 0 al 1.94 % con mediana di 0.13%. Come per il precedente fenotipo triplo positivo non ci sono differenze statisticamente significative in termini di mediana di espressione di CD133+ o di CD133+/CXCR4+ tra le linee classificate sulla base del tessuto d'origine.

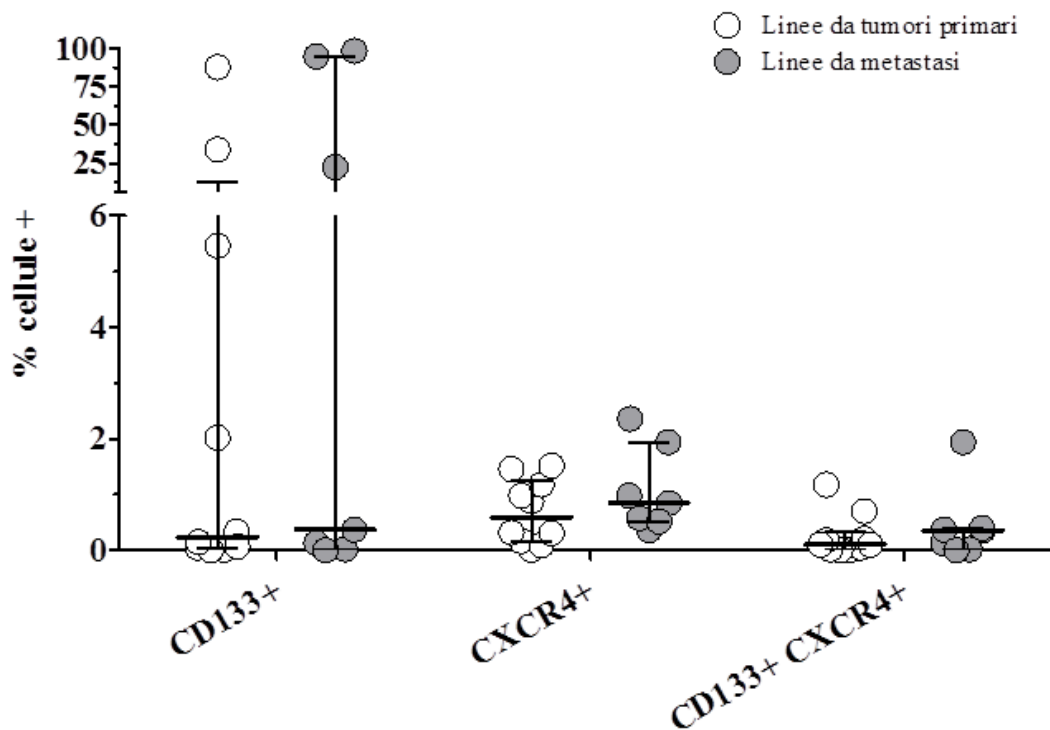


Figura 5.9. Espressione del fenotipo staminale CD133+ e CD133+/CXCR4+ nelle n=17 linee tumorali suddivise in base al tessuto d'origine. Sono rappresentati, per ogni gruppo di dati, le mediane e gli interquartili (25°-75°).

Linea	Origine	CXCR4+ CD133-	CXCR4+ CD133+	CXCR4- CD133-	CXCR4- CD133+	CXCR4+	CD133+
Panc-1	Tumore primario	0	0,01	99,99	0	0,01	0,01
PT45	Tumore primario	0,12	0,05	99,83	0	0,17	0,05
MIAPaCa-2	Tumore primario	0,09	0	99,91	0	0,09	0
SKPC-1	Tumore primario	0,67	0,21	98,99	0,13	0,88	0,34
BI	Tumore primario	0,76	0,7	65,23	33,31	1,46	34,01
PC	Tumore primario	0,29	0,02	99,64	0,05	0,31	0,07
Panc-2	Tumore primario	0,8	0,18	97,18	1,84	0,98	2,02
PaCa-3	Tumore primario	0	1,18	12,22	86,6	1,18	87,78
PaCa-44	Tumore primario	0,22	0,1	94,31	5,37	0,32	5,47
BxPc-3	Tumore primario	1,42	0,1	98,43	0,05	1,52	0,15
mediana	primari	0,26	0,10	98,71	0,09	0,60	0,25
Capan-1	Metastasi epatica	0	0,36	5,07	94,57	0,36	94,93
CFPAC-1	Metastasi epatica	0	1,94	1,53	96,53	1,94	98,47
Hst-766	Metastasi linfonodale	0,56	0,02	99,42	0	0,58	0,02
T3M4	Metastasi linfonodale	2,23	0,13	97,64	0	2,36	0,13
A8184	Ascite	0,58	0,4	77,02	22	0,98	22,4
HPAF-II	Ascite	0,48	0,37	99,15	0	0,85	0,37
AsPC-1	Ascite	0,52	0	99,48	0	0,52	0
mediana	metastasi	0,52	0,36	97,64	0	0,85	0,37
mediana	totale	0,48	0,13	98,43	0,05	0,85	0,34
p-Value		0,92	0,43	0,28	0,92	0,26	0,59

Tabella 5.9. Espressione dei putativi marcatori staminali CD133, CXCR4 nelle 17 linee di adenocarcinoma duttale pancreatico. I numeri sono espressi in percentuale (%) di cellule positive sul totale delle cellule analizzate al citofluorimetro con morfologia tipica del tipo cellulare analizzato (criterio di selezione basato su side scatter e forward scatter). Sono rappresentate le mediane di espressione nelle linee derivate da tumori primari e nelle linee derivate da metastasi e confrontate con p-Value calcolato mediante test non parametrico di Mann-Whitney.

Nell'analisi statistica inter-linea, l'espressione di CD133 è correlata ma non completamente sovrapponibile all'espressione di ESA+/CD24+/CD44+ (R=0.543, p=0.024; analisi di regressione lineare).

5.2.3 Valutazione dell'espressione di fattori coinvolti nello sviluppo pancreatico

Abbiamo valutato, a livello molecolare, l'espressione di alcuni marcatori coinvolti nello sviluppo pancreatico che possono essere importanti per lo sviluppo dell'adenocarcinoma. Durante l'organogenesi pancreatica e il successivo mantenimento delle cellule terminalmente differenziate molteplici geni vengono modulati. I fattori di trascrizione, che modulano l'espressione genica sia nella componente esocrina che endocrina della ghiandola pancreatica, svolgono un ruolo certamente essenziale: i loro pattern di espressione determinano i programmi di differenziazione dei singoli *lineage* cellulari. Gli studi effettuati utilizzando modelli murini di *knocking out*¹¹¹ hanno permesso una dettagliata conoscenza del processo di differenziazione del pancreas in termini di espressione di fattori di trascrizione permettendo di ricostruire nel roditore una gerarchia temporale e funzionale molto chiara (figure 5.10 e 5.11)¹¹².

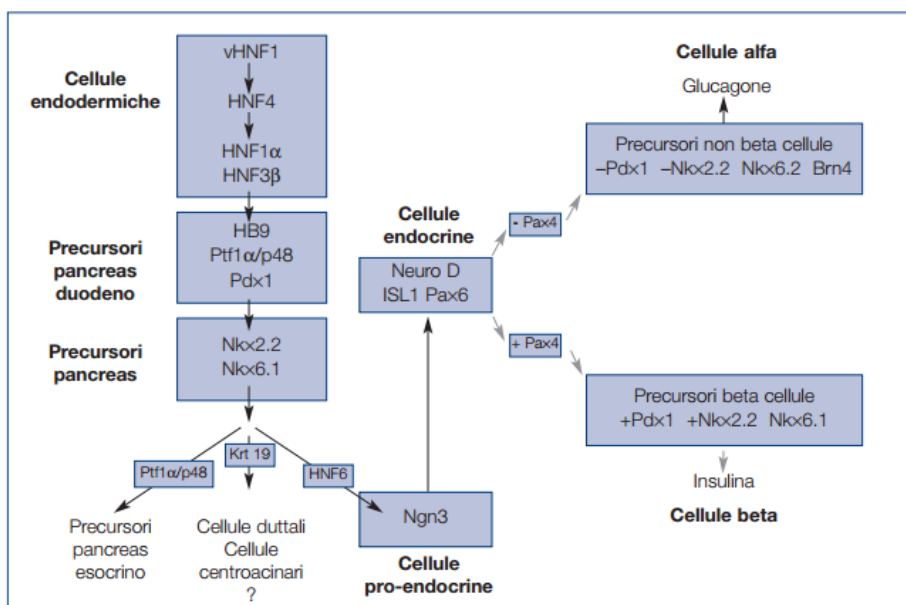


Figura 5.10. Gerarchia e tempistica di espressione dei fattori trascrizionali coinvolti nello sviluppo embrionale del pancreas¹⁰⁷.

Abbiamo deciso di analizzare nelle 17 linee tumorali pancreatiche l'espressione di 10 fattori trascrizionali coinvolti nello sviluppo del pancreas (PDX1, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, NGN3, ISL1, PTF1α, NEUROD1, PAX6, ONECUT1/HNF6α) e il gene della citocheratina 19, come marcatore di differenziamento cellulare della cellula duttale pancreatiche.

Fattore di trascrizione	Espressione nel pancreas adulto	Fenotipo in topo KO
PDX-1/IPF-1	Cellule β	Agenesia pancreas
HNF6	Tutte le cellule	Riduzione cellule endocrine alla nascita con architettura insulare perturbata
PTF1 α -p48	Acinare	Agenesia pancreas esocrino con allocazione errata dell'endocrino
Pax4	Bassa nelle isole	No cellule β e δ , aumento cellule α
Pax6	Cellule endocrine	No cellule α
Isl-1	Isole	Agenesia mesoderma del pancreas dorsale e delle isole
Nkx2.2	Cellule α , β , PP	No cellule β mature, diminuzione α e PP
Nkx6.1	Cellule β	Diminuzione cellule β
Ngn3	Non espresso	Assenza cellule endocrine, polarità acinare perturbata
β 2/neuroD	Isole	Diminuzione di tutte le cellule endocrine

Figura 5.11. Localizzazione nell'adulto e fenotipo KO dei fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo embrionale del pancreas¹⁰⁷.

L'analisi quantitativa è stata condotta mediante metodica di Real-Time PCR, usando la chimica Taqman, su tutte le 17 linee tumorali. Nella figura 5.12 e nella tabella 5.10 sono mostrati i livelli di espressione dell'mRNA di ciascun fattore molecolare nelle 17 linee cellulari. I livelli di mRNA sono espressi come unità arbitrarie (AU) riferite all'espressione del gene nel campione calibratore di riferimento. Abbiamo utilizzato come calibratore di espressione, per ogni fattore analizzato, la media di n=4 preparazioni di isole di Langerhans umane (fornite dalla "Pancreatic Islet Processing Facility", Ospedale San Raffaele). I livelli di espressione di ogni singolo fattore sono stati anche confrontati con quelli presenti in una linea stabilizzata di dotto pancreatico normale immortalizzato, le HPD6E-E6E7. Confrontando le mediane di espressione, PDX1, NGN3, PAX4, PAX6, ISL1, ONECUT risultano maggiormente espressi nelle linee tumorali rispetto alle cellule duttali non neoplastiche, mentre NKX2.2, NKX6.1 e PTF1 α sono meno espressi. Dodici linee (70,5% del totale) non esprimono NEUROD1 che è normalmente presente nell'adulto in tutte le cellule endocrine¹¹³; 11 su 17 (64,7%) non hanno NKX2.2 (espresso nell'adulto dalle cellule α , β e PP¹¹³) e 10 su 17 (58,8%) non esprimono PTF1 α (nell'adulto presente nelle cellule acinari normali¹¹³).

Inoltre è evidente che l'espressione è eterogenea ma non dipendente dall'origine primaria o metastatica della linea tumorale (figura 5.13, tabella 5.10). Si evidenzia tuttavia una trend di significatività statistica che mostra che linee derivanti da metastasi hanno più alti livelli di NKX6.1 (p=0,051), espresso normalmente dalle cellule β ¹¹³ (analisi di Mann-Whitney).

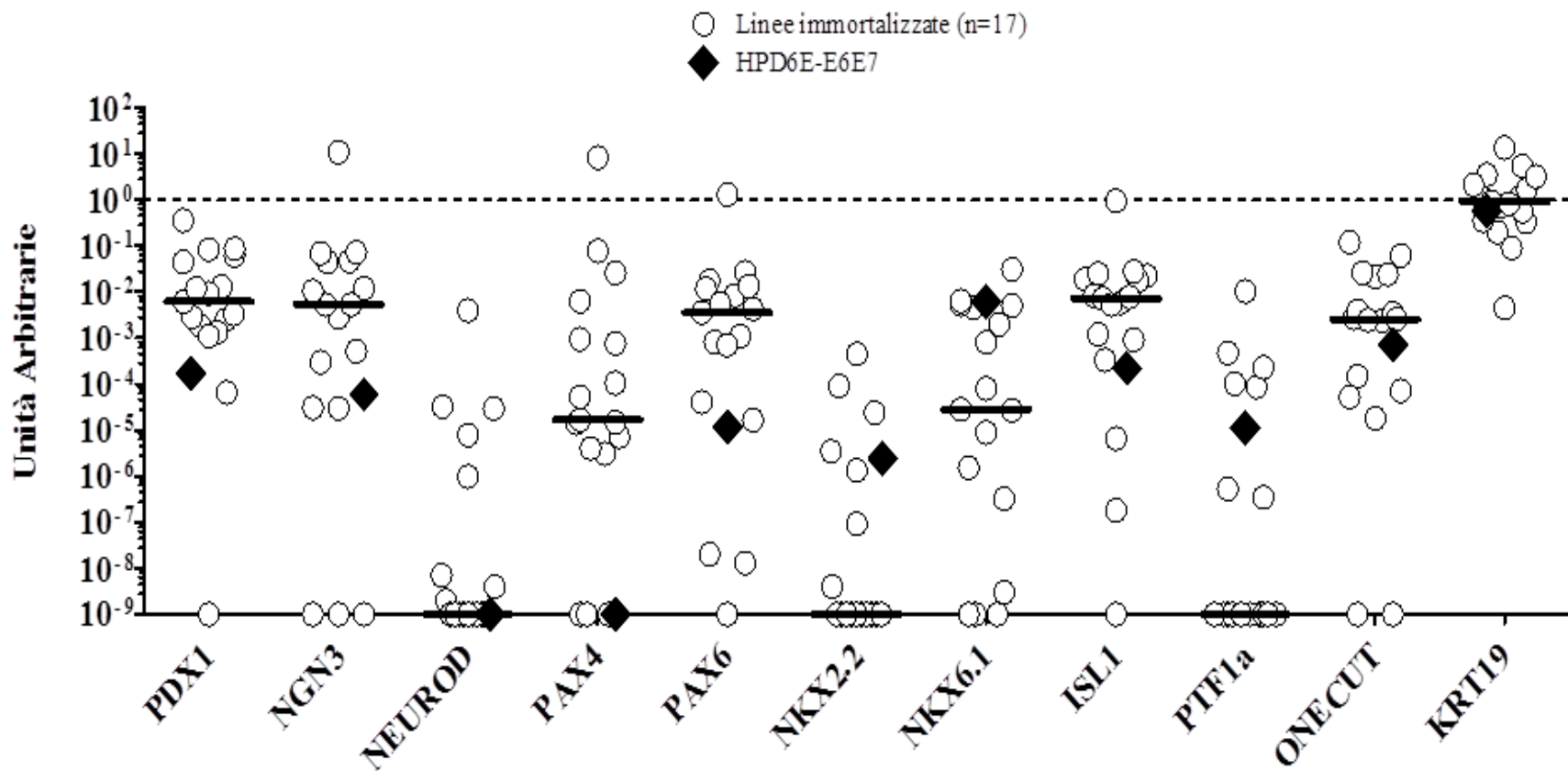


Figura 5.12. Espressione di fattori molecolari implicati nel differenziamento pancreatico. La quantità di cDNA amplificato è stata normalizzata all'espressione del gene costitutivo GAPDH ($\Delta Ct_{\text{geneX}} = Ct_{\text{geneX}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) e di seguito riferita al calibratore che assume valore 1. L'espressione è riportata come Unità Arbitrarie (AU) riferite all'espressione del gene nel campione calibratore (isole di Langerhans) indicata con la linea tratteggiata, secondo la formula: $\text{Unità arbitrarie}_{(\text{lineaY})} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{geneX}} \text{ nella linea Y} - \Delta Ct_{\text{geneX}} \text{ nelle isole})}$. Il rombo colorato di nero rappresenta il valore in AU dell'espressione genica nella linea di dotto normale immortalizzata. Le barre orizzontali nere sono le mediane di espressione nelle 17 linee tumorali.

Linea	Origine	PDX1	NGN3	NEUROD	PAX4	PAX6	NKX2.2	NKX6.1	ISL1	PTF1 α	ONECUT	KRT19
Panc-1	Tumore primario	0,00246	0,0121	0,000000002	8,28	0,00356	0,00009	0,00000154	0,000336	0,0000869	0,0213	0,197
PT45	Tumore primario	0,000000001	0,0000298	0,000000001	0,000106	0,00000002	0,000000001	0,002	0,00000653	0,000229	0,12	0,0912
MIAPaCa-2	Tumore primario	0,00184	0,000000001	0,000000001	0,00628	0,000000001	0,000449	0,000000001	0,000000182	0,0103	0,000000001	0,00453
SKPC-1	Tumore primario	0,00133	0,047	0,0000299	0,0000142	1,29	0,000000092	0,00465	0,0175	0,000000348	0,0619	0,717
BI	Tumore primario	0,013	0,000301	0,000000001	0,00000727	0,00081	0,000000001	0,000000003	0,00582	0,000000001	0,00238	1,05
PC	Tumore primario	0,00929	0,00535	0,0000324	0,000000001	0,00429	0,000000001	0,000000001	0,000000001	0,000000001	0,0034	3,51
Panc-2	Tumore primario	0,00331	0,00535	0,000000004	0,00094	0,0135	0,00000134	0,000000323	0,0012	0,000102	0,00389	0,354
PaCa-3	Tumore primario	0,355	10,8	0,000000001	0,000000001	0,0000166	0,000000001	0,000000001	0,0274	0,000000001	0,000000001	13,5
PaCa-44	Tumore primario	0,00289	0,0684	0,00399	0,0000148	0,0117	0,0000237	0,00000898	0,000918	0,000477	0,0259	0,563
BxPc-3	Metastasi linfonodale	0,0011	0,000518	0,000000007	0,026	0,0173	0,000000001	0,0053	0,00711	0,000000001	0,00258	0,331
mediana	primari	0,002675	0,00535	0,000000003	0,0000604	0,003925	0,000000046	0,000000931	0,001059	0,000043624	0,003645	0,4585
Capan-1	Metastasi epatica	0,0447	0,00281	0,000000001	0,00000305	0,0268	0,000000004	0,031	0,0189	0,000000001	0,00276	5,41
CFPAC-1	Metastasi epatica	0,0623	0,0443	0,000000098	0,000769	0,00846	0,000000001	0,000802	0,0224	0,000000001	0,0243	1,09
Hst-766	Metastasi linfonodale	0,083	0,0718	0,000000001	0,0000533	0,000000013	0,000000001	0,0000283	0,00852	0,000000527	0,000149	1,66
T3M4	Metastasi linfonodale	0,00613	0,000000001	0,0000079	0,0000168	0,00111	0,000000001	0,00637	0,00532	0,000000001	0,00245	3,18
A8184	Ascite	0,0863	0,000000001	0,000000001	0,000000001	0,00556	0,000000001	0,0051	0,953	0,000000001	0,0000522	0,895
HPAF-II	Ascite	0,0000659	0,0000308	0,000000001	0,00000406	0,0000404	0,00000344	0,0000797	0,00773	0,000000001	0,0000718	0,829
AsPC-1	Ascite	0,0118	0,0104	0,000000001	0,0778	0,0007	0,000000001	0,0000269	0,025	0,000000001	0,000018	2,14
mediana	metastasi	0,0447	0,00281	0,000000001	0,0000168	0,00111	0,000000001	0,000802	0,0189	0,000000001	0,000149	1,66
mediana	totale	0,00613	0,00535	0,000000001	0,0000168	0,00356	0,000000001	0,0000283	0,00711	0,000000001	0,00258	0,895
p-Value		0,696	0,922	0,673	0,434	0,922	0,493	0,051	0,118	0,063	0,172	0,143

Tabella 5.10. Espressione di fattori molecolari implicati nel differenziamento pancreatico. I numeri sono espressi in AU riferite alle isole di Langerhans. Sono rappresentate le mediane di espressione nelle linee derivate da tumori primari e nelle linee derivate da metastasi e confrontate con p-Value calcolato mediante test non parametrico di Mann-Whitney.

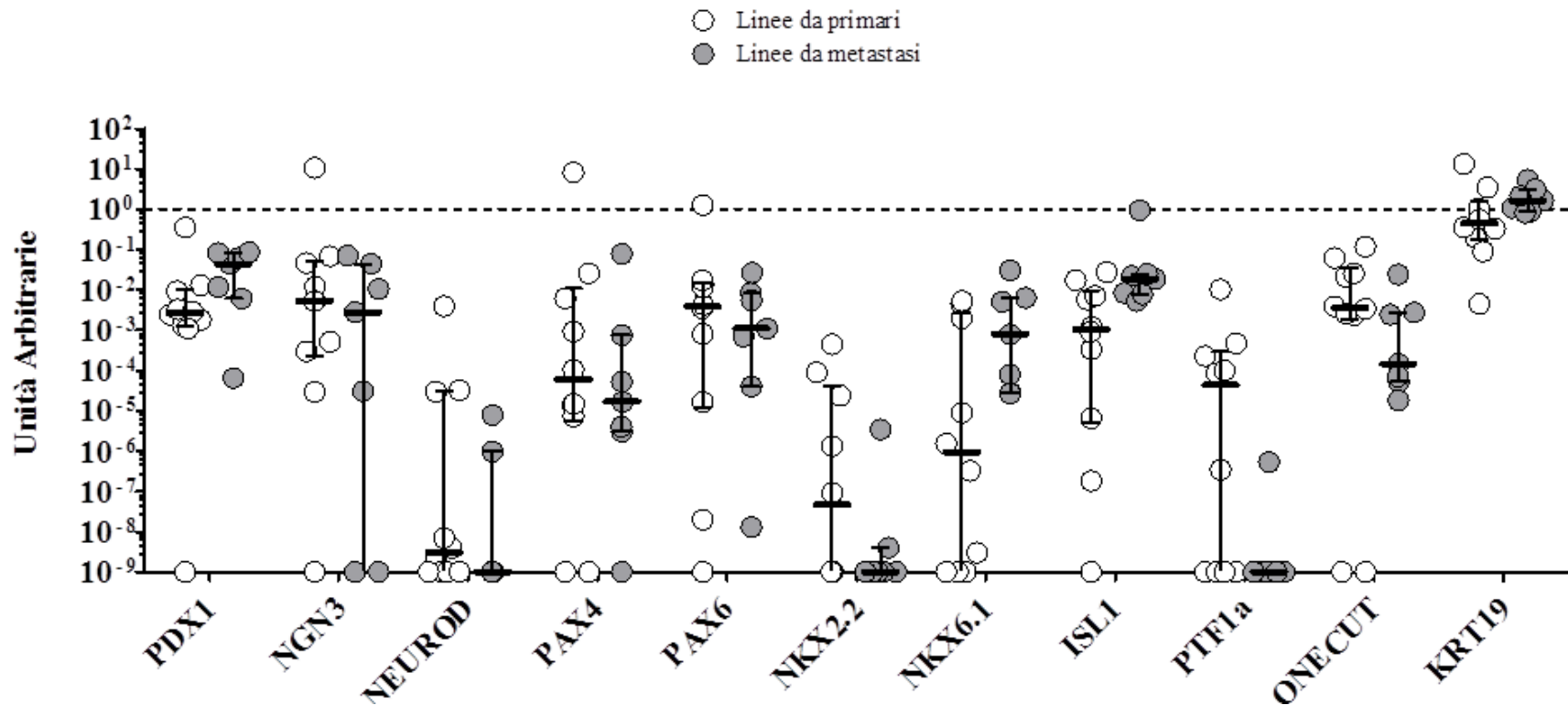


Figura 5.13. Espressione di fattori molecolari implicati nel differenziamento pancreatico nelle n=17 linee tumorali suddivise in base al tessuto d'origine. Sono rappresentati, per ogni gruppo di dati, le mediane e gli interquartili (25°-75°). *p<0,05; Test di Mann-Whitney.

5.3 Fase di analisi di correlazione tra dati molecolari e caratteristiche di malignità delle linee tumorali pancreatiche

5.3.1 Descrizione della strategia statistica di analisi inter-linea per la ricerca e prioritizzazione di biomarcatori

Terminata la caratterizzazione delle linee abbiamo proceduto con un approccio statistico usando il programma di calcolo SPSS 16.0 per correlare i dati molecolari con le caratteristiche di aggressività delle linee stesse. Prima di effettuare i test statistici abbiamo valutato la distribuzione delle diverse variabili. La valutazione della distribuzione è stata effettuata graficamente (Q-Q plot) e mediante il test statistico di Shapiro-Wilk: nel grafico Q-Q se la distribuzione non è normale i punti non si pongono sulla diagonale; nel test di Shapiro-Wilk se la significatività risulta essere maggiore di 0,05 i valori della variabile in esame hanno una distribuzione normale. Le variabili con distribuzione non gaussiana sono stati trasformati con la funzione logaritmica (alcuni esempi riportati in figura 5.14).

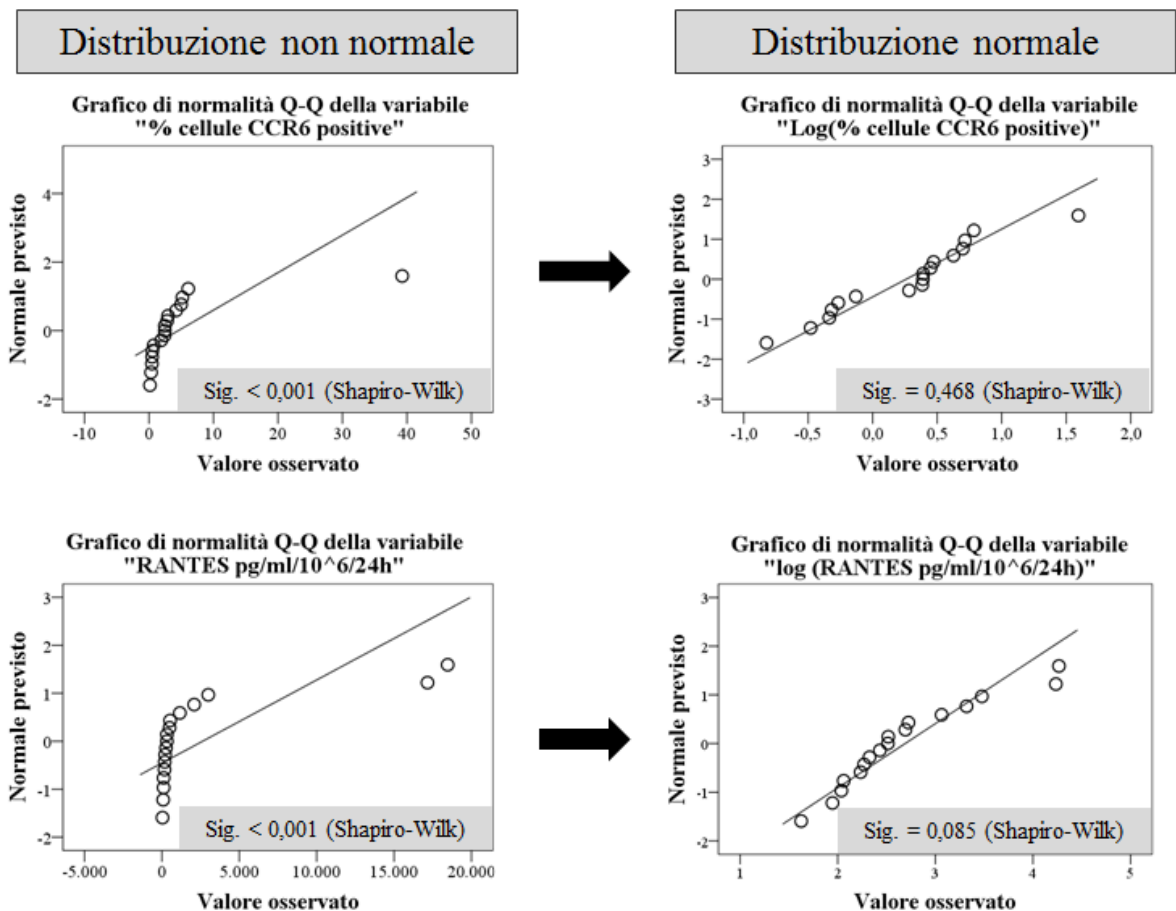


Figura 5.14. Grafici di normalità Q-Q prima e dopo trasformazione logaritmica delle variabili mostrate.

La strategia (Figura 5.15) che abbiamo utilizzato è stata quella di correlare nelle 17 linee tumorali pancreatiche l'espressione di ogni fattore molecolare con le caratteristiche di malignità *in vitro* (clonogenicità e chemioresistenza alla gemcitabina) mediante regressione lineare, e con la tumorigenicità *in vivo* utilizzando la regressione di cox.

Abbiamo ritenuto rilevanti quei marcatori molecolari che correlavano in maniera statisticamente significativa ($p\text{-Value} \leq 0,05$) con uno o più parametri di aggressività biologica. Da questa prima analisi sono emersi $n=35$ fattori molecolari da validare; il numero era abbastanza elevato e per questo motivo abbiamo utilizzato un ulteriore approccio di prioritizzazione. Abbiamo escluso dalle successive analisi i marcatori risultati statisticamente correlati con le caratteristiche di aggressività *in vitro*; questo perché abbiamo ritenuto biologicamente più rilevante il modello di tumorigenicità nel topo *in vivo* e quindi i marcatori risultati significativi con la regressione di cox. In questo modo i biomarcatori sono stati ridotti a $n=30$. Nella zona rossa del grafico di prioritizzazione (figura 5.16) sono mostrati i fattori di rischio ($n=20$) per lo sviluppo del tumore nel modello animale; nella zona verde i fattori protettivi ($n=10$). Nella tabella 5.11 sono indicati per tutti e 30 i biomarcatori la significatività, l'hazard ratio (HR) e i limiti di confidenza al 95% dell'HR risultati dall'analisi di regressione.

Nella successiva fase del lavoro abbiamo effettuato una scelta dei marcatori da validare sulla base di considerazioni teoriche e pratiche. In particolare tutti i fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico e risultati statisticamente significativi nel predire rischio o protezione nel modello tumorale murino sono stati validati in una casistica di 42 pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico. Nessuno di questi fattori di sviluppo pancreatico è stato escluso per la relativa disponibilità di sonde Taqman e materiale biologico.

Anche tutti i fenotipi individuati con le marcature anticorpali per i putativi fattori staminali sono stati validati direttamente in ambito clinico con la medesima metodologia di citometria a flusso utilizzata per la caratterizzazione delle linee. In questo caso la casistica comprendeva 47 soggetti affetti da PDAC.

In ultimo tra i recettori delle chemochine abbiamo scelto di validare CCR5 e CXCR3 perché risultano tra i più espressi dalle linee immortalizzate e sono presenti in misura maggiore e statisticamente significativa sulle linee derivate da metastasi.

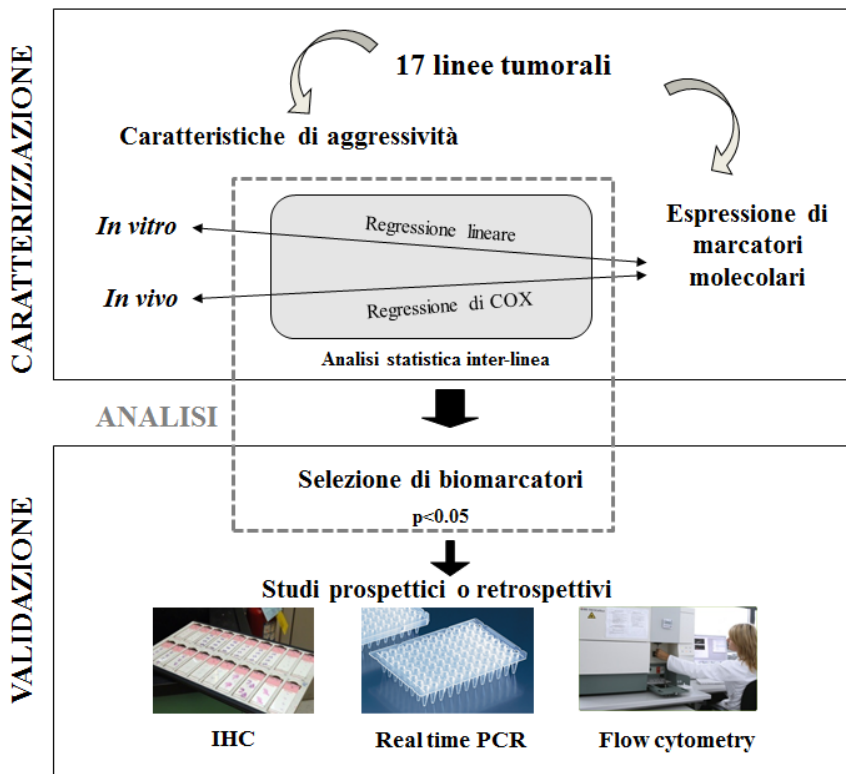


Figura 5.15. Rappresentazione della strategia per l'identificazione e validazione di marcatori biologici

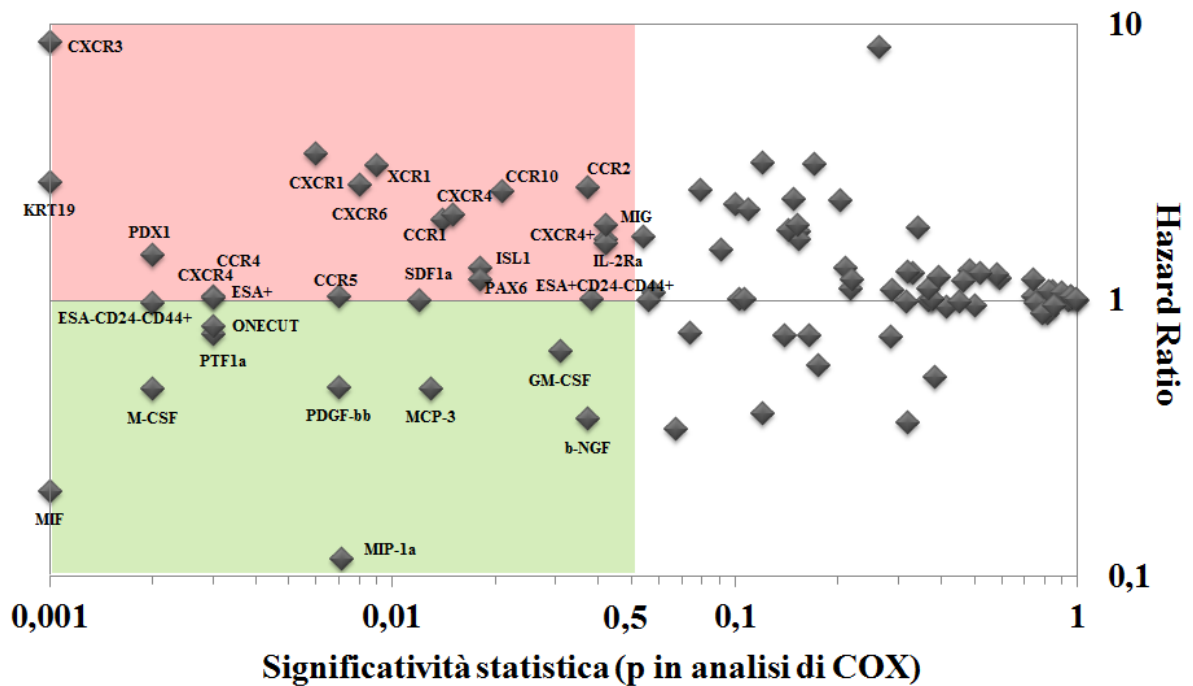


Figura 5.16. Rappresentazione grafica della prioritizzazione dei marcatori biologici sulla base della significatività e dell'hazard ratio in analisi di regressione di COX. Nella zona rossa sono visibili i fattori di rischio e nella zona verde i fattori protettivi. Il cut-off di significatività scelto è $p\text{-Value} \leq 0,05$.

Fattori di rischio					
Marcatori	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
Recettori delle chemochine					
CCR1	0,014	1,946	1,144	3,312	
CCR2	0,037	2,563	1,058	6,21	
CCR4	0,003	1,027	1,009	1,046	
CCR5	0,007	1,03	1,008	1,052	
CCR10	0,021	2,482	1,147	5,371	
CXCR1	0,006	3,397	1,427	8,089	
CXCR3	0,001	12,741	3,911	41,506	
CXCR4	0,015	2,029	1,145	3,597	
CXCR6	0,008	2,613	1,29	5,292	
XCR1	0,009	3,081	1,325	7,164	
Fattori secreti					
IL-2Ra	0,042	1,608	1,018	2,539	
MIG	0,042	1,872	1,022	3,431	
SDF-1 α	0,012	1,001	1	1,002	
Fenotipi staminali					
CXCR4+	0,042	1,658	1,019	2,697	
ESA+/CD24-/CD44+	0,038	1,011	1,001	1,022	
ESA+	0,003	1,022	1,008	1,037	
Fattori molecolari di sviluppo pancreatico					
PDX1	0,002	1,455	1,154	1,834	
KRT19	0,001	2,687	1,531	4,715	
ISL1	0,018	1,309	1,047	1,637	
PAX6	0,018	1,182	1,03	1,356	
Fattori protettivi					
Marcatori	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
Fattori secreti					
MCP-3	0,013	0,479	0,267	0,859	
M-CSF	0,002	0,476	0,298	0,76	
MIF	0,001	0,204	0,079	0,527	
b-NGF	0,037	0,371	0,146	0,941	
PDGF-bb	0,007	0,485	0,288	0,817	
MIP-1a	0,011	0,047	0,004	0,497	
GM-CSF	0,031	0,653	0,444	0,961	
Fenotipi staminali					
ESA-/CD24-/CD44+	0,002	0,977	0,963	0,992	
Fattori molecolari di sviluppo pancreatico					
PTF1 α	0,003	0,75	0,622	0,905	
ONECUT	0,003	0,805	0,698	0,927	

Tabella 5.11. Elenco dei biomarcatori risultati fattori di rischio o protettivi per lo sviluppo del tumore nel topo e suddivisi in base alle classi di appartenenza.

5.4 Fase di validazione: fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico

5.4.1 Studio prospettico: descrizione della coorte in studio di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas

Al fine di dare una rilevanza clinica ai dati relativi ai geni risultati statisticamente significativi per lo sviluppo o il ritardo di crescita dello xenograft nel topo abbiamo analizzato una coorte di 42 pazienti che in seguito a riscontro di neoformazione pancreatica sono stati sottoposti a chirurgia resettiva presso l'Ospedale San Raffaele tra gennaio 2008 e novembre 2009. Un paziente si presentava con malattia già metastatica e pertanto è stato incluso nell'analisi di espressione dei fattori molecolari ma escluso nell'analisi di correlazione con l'esito clinico della malattia (figura 5.17). Nel gruppo di 41 pazienti non metastatici alla diagnosi, la media dell'età era di $65,4 \pm 10,7$ anni, il 48,8% dei pazienti era di sesso maschile e il 51,2 % femminile. Per quanto riguarda la stadiazione tumorale (secondo la classificazione AJCC), il 63,4% dei pazienti presentava uno stadio 2B, il 34,1% uno stadio 2A e il 2,4% uno stadio 1; il T tumorale era nel 97,6% dei casi un T3 e in un unico caso (2,4%) un T1; la positività per il linfonodi è stata riscontrata nel 63,4% dei linfonodi analizzati. Nel 36,6% dei pazienti si aveva un grading tumorale di 3 (G3), nel 53,7% un grading tumorale di 2 (G2) e nel restante 9,8% di 1 (G1). Per quanto riguarda la radicalità chirurgica è stata raggiunta una resezione radicale (R0) nel 51,2% dei pazienti, mentre nel 48,8% dei casi era presente malattia residua dopo l'intervento (R1). Nel 12,2% dei pazienti era stata fatta terapia neoadiuvante e nella maggioranza dei casi è stata fatta una terapia adiuvante con chemioterapia (87,8%) e/o radioterapia (56,1%) (Figura 5.18, pannello A).

Nel corso del follow-up (mediana di 1030 giorni, minimo 118 e massimo 2479 giorni) 31 dei 41 pazienti (il 75,6%) sono deceduti per la malattia e 33 hanno progredito (Figura 5.18, pannello B).

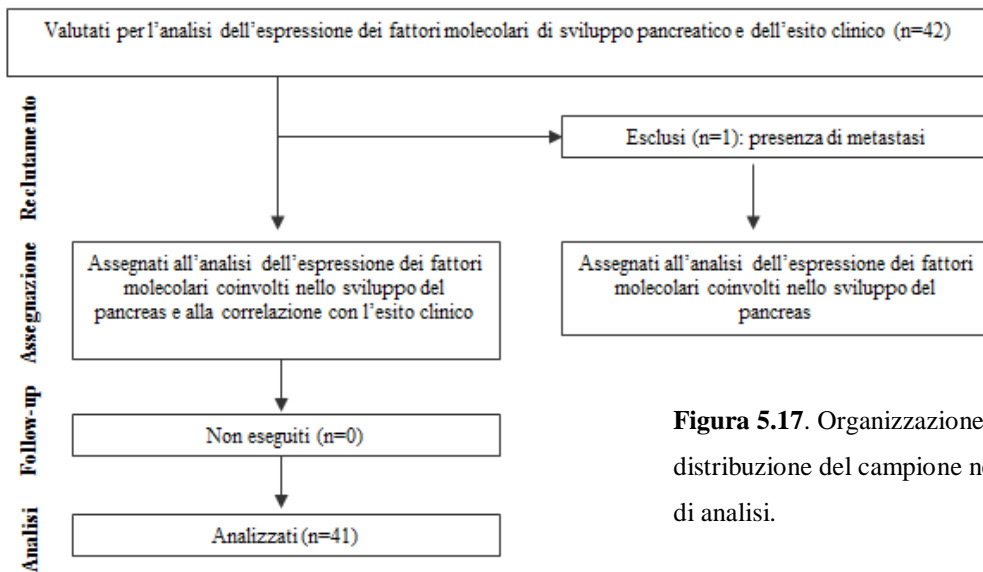


Figura 5.17. Organizzazione dello studio e distribuzione del campione nei diversi gruppi di analisi.

A)

	Totale n= 41 (%)
Età (anni)	
Media ± s.d.	65,4 ± 10,7
Sesso	
Maschio	20 (48,8)
Femmina	21 (51,2)
CA19.9 U/ml (min-max)	101,5 (1-10761)
Stadio	
1A	1 (2,4)
2A	14 (34,1)
2B	26 (63,4)
T	
T1	1 (2,4)
T2	0 (0)
T3	41 (97,6)
N	
Negative	15 (36,6)
Positive	26 (63,4)
Grading	
G1	4 (9,8)
G2	22 (53,7)
G3	15 (36,6)
R	
R0	21 (51,2)
R1	20 (48,8)
Neoadiuvante	
Adiuvante	5 (12,2)
chemioterapia	36 (87,8)
radioterapia	23 (56,1)
Follow up (giorni)	
Mediana (min-max)	1033 (118-2479)

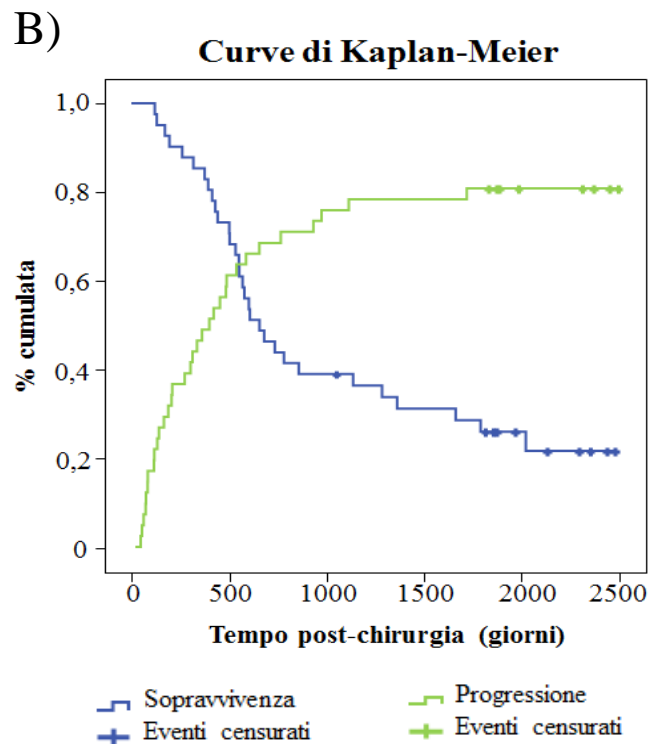


Figura 5.18. A) Caratteristiche cliniche-patologiche ed antropometriche dei 41 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico. B) Curve di Kaplan-Meier che rappresentano l'intervallo di tempo che intercorre tra l'intervento chirurgico di rimozione del tumore e la recidiva o la morte nei 41 pazienti affetti da PDAC.

Variabili	Sopravvivenza Globale (OS)			
	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
Età	0,103	1,032	0,994	1,072
Sesso (femmina)	0,057	2,021	0,98	4,17
CA19.9 pre intervento	0,485	1	1	1
Stadio	0,013	2,699	1,229	5,925 *
T	0,983	646,301	0	1,496E+266
N	0,014	2,78	1,227	6,297 *
G	0,02	2,073	1,122	3,829 *
R	0,311	1,448	0,708	2,965
Comparsa metastasi	0,004	3,698	1,505	9,082 **
Neoadiuvante	0,084	2,693	0,876	8,285
Chemioterapia adiuvante	0,081	3,014	0,871	10,428
Radioterapia adiuvante	0,097	0,54	0,261	1,117
Dimensioni	0,413	1,158	0,815	1,644

Variabili	Progressione			
	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
Età	0,106	1,028	0,994	1,064
Sesso (femmina)	0,063	1,951	0,964	3,95
CA19.9 pre intervento	0,154	1	1	1
Stadio	0,036	2,032	1,047	3,944 *
T	0,394	4,694	0,134	163,978
N	0,059	2,03	0,974	4,228
G	0,018	1,975	1,122	3,476 *
R	0,065	1,922	0,959	3,85
Comparsa metastasi	0,00015	5,543	2,28	13,474 ***
Neoadiuvante	0,563	1,364	0,477	3,901
Chemioterapia adiuvante	0,25	2,009	0,612	6,599
Radioterapia adiuvante	0,065	0,52	0,26	1,041
Dimensioni	0,883	1,024	0,746	1,407

Tabella 5.12. Analisi univariata mediante regressione di Cox dei fattori di rischio clinico-antropometrici per la sopravvivenza e la progressione nel gruppo di 41 pazienti con malattia non metastatica al momento dell'intervento. Per la OS i valori sono stati corretti per età e sesso. La correlazione con il T non è da considerare in quanto il 97,6% dei casi era un T3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,001$

In analisi univariata, corretta per età e per sesso, nel gruppo dei 41 pazienti, lo stadio, il coinvolgimento linfonodale, il grading tumorale e la comparsa di metastasi sono risultati fattori di rischio statisticamente significativi per la sopravvivenza globale. Risultano fattori di rischio per la progressione lo stadio, il grading e la comparsa di metastasi (Tabella 5.12).

Nel corso dello studio, fra i pazienti non metastatici, si è assistito all'insorgenza di una recidiva nell'76% dei casi. Il numero totale di pazienti che hanno avuto una ricaduta in sede pancreaticata è di $n=16$ e a distanza di $n=25$, in particolare: nel 19,35% dei pazienti la recidiva era locale, nel 48,39% si aveva recidiva a distanza (metastasi) e il 32,26% dei pazienti recidivava sia localmente che a distanza. Non si è osservata una correlazione statisticamente

significativa tra i diversi tipi di recidiva e l'esito clinico della patologia in termini di media di comparsa, espressa in giorni, dell'evento morte o ripresa di malattia (Figura 5.19).

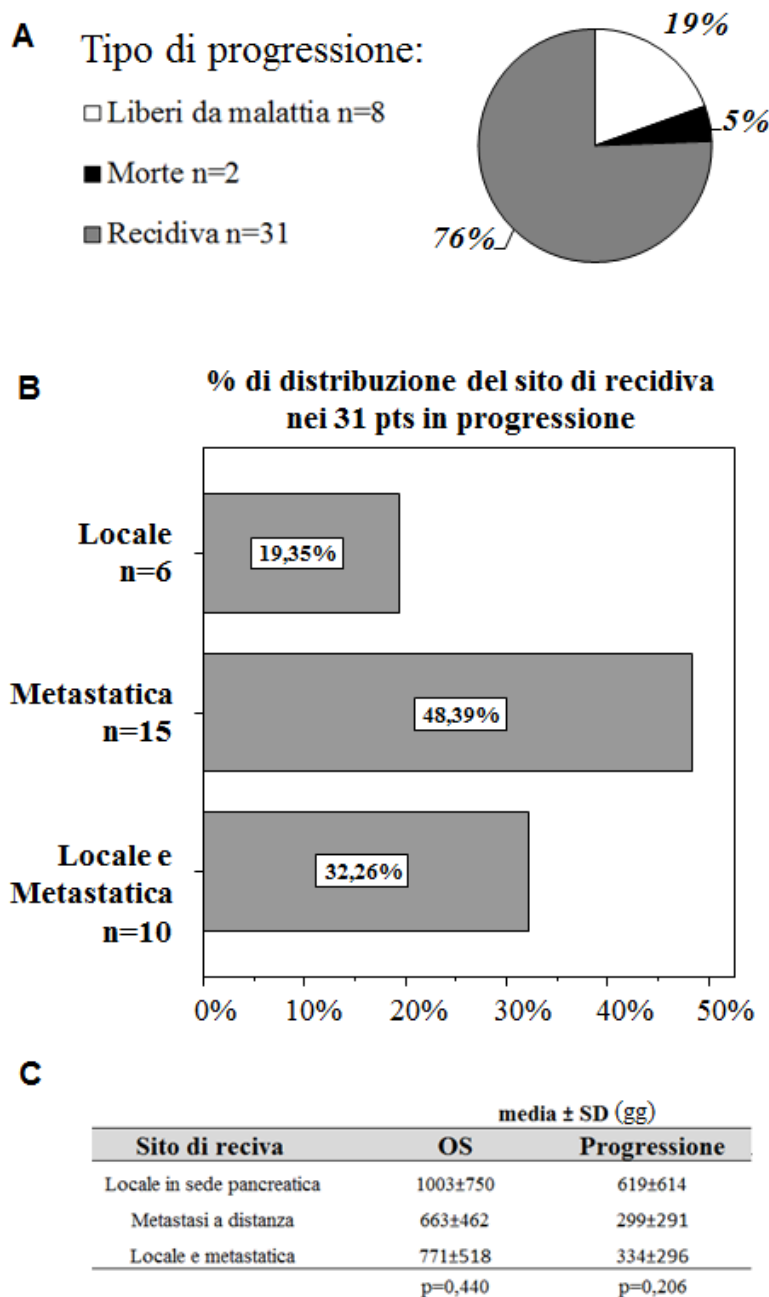


Figura 5.19. A) Grafico a torta che rappresenta che tipo di progressione hanno avuto i 41 pazienti analizzati. B) Distribuzione, espressa in percentuale, del sito di recidiva nei 31 pazienti che hanno progredito. C) Analisi univariata mediante test di Anova dell'impatto del sito di ricaduta tumorale sulla sopravvivenza globale (OS) e la progressione. I numeri sono espressi in giorni post chirurgia.

5.4.2 Analisi dell'espressione dei fattori molecolari di sviluppo pancreatico PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19 nella coorte dei 42 pazienti affetti da PDAC

Per ogni paziente è stato estratto l'mRNA da 10 sezioni criostatiche consecutive di 5 μ m ciascuna dopo valutazione da parte di un anatomopatologo dell'effettiva presenza di tumore mediante la colorazione in ematossilina-eosina di una sezione adiacente. L'mRNA estratto è stato quindi retrotrascritto ed analizzato in Real Time PCR per l'espressione di PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19. Nella figura 5.20 sono mostrati i livelli di espressione dell'mRNA di ciascun fattore molecolare: tali livelli sono espressi come unità arbitrarie (AU) riferite all'espressione del gene nel campione calibratore di riferimento. Il calibratore è costituito dalla media di n=4 preparazioni di isole pancreatiche purificate. Rispetto alle isole, il tumore esprime più alti livelli dell'mRNA della citocheratina 19 (CK19), mentre gli altri fattori molecolari sono meno espressi. Per quanto riguarda PTF1 α /p48 si noti che la sua espressione non è stata rilevata in 14 casi (33%), similmente a quanto era stato riscontrato sulle linee cellulari (solo n=7 linee lo esprimevano)

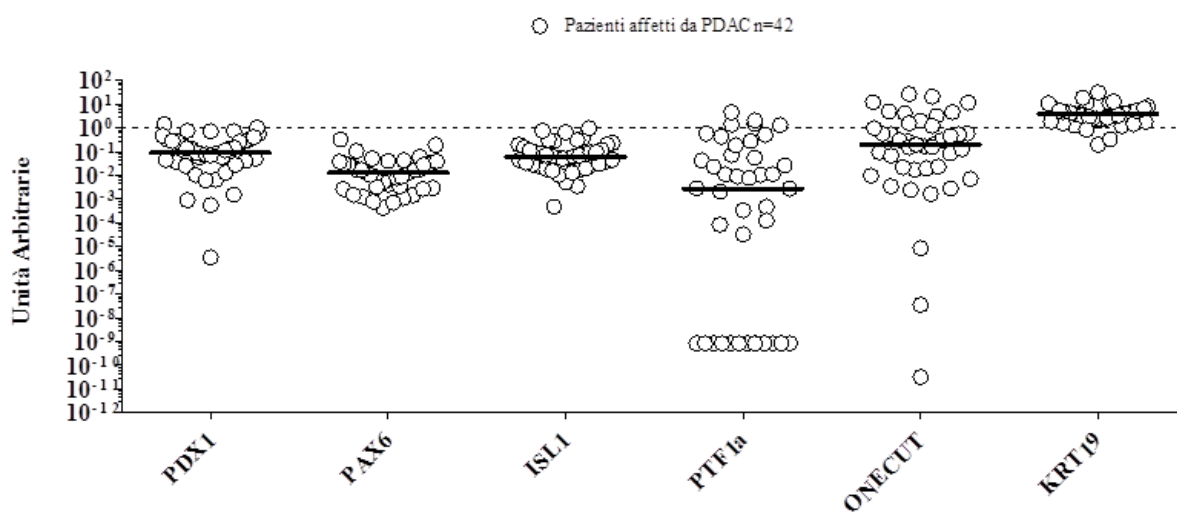


Figura 5.20. Espressione di fattori molecolari implicati nel differenziamento pancreatico in n=42 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico. La quantità di cDNA amplificato è stata normalizzata all'espressione del gene costitutivo GAPDH ($\Delta Ct_{\text{geneX}} = Ct_{\text{geneX}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) e di seguito riferita al calibratore che assume valore 1. L'espressione è riportata come Unità Arbitrarie (AU) riferite all'espressione del gene nel campione calibratore (isole di Langerhans), indicato con la linea tratteggiata, secondo la formula: $\text{Unità arbitrarie}_{(\text{linea Y})} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{geneX}} \text{ nella linea Y} - \Delta Ct_{\text{geneX}} \text{ nelle isole})}$. Le barre orizzontali nere sono le mediane di espressione.

5.4.3 Correlazione fra l'espressione dei fattori molecolari PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19 e l'esito clinico nei pazienti non metastatici alla resezione chirurgica.

L'espressione genica di PDX1, PAX6, ISL1, PTF1alpha, ONECUT e KRT19 è stata correlata con la sopravvivenza globale, il tempo di progressione e il sito di recidiva dei n=41 pazienti della coorte precedentemente descritta. Per ogni gene, per tutti i pazienti, il *Fold change* rispetto al GAPDH è stato trasformato con la funzione logaritmo per riportare la variabile ad una distribuzione normale. Statisticamente, è quindi il logaritmo in base 10 del *Fold change* (Log FC) di ogni fattore molecolare a venire correlato con l'esito clinico della patologia.

In analisi univariata (tabella 5.12), corretta per età e sesso, nessun fattore coinvolto nello sviluppo pancreatico è significativamente correlato con la sopravvivenza. Più alti livelli di mRNA della CK19 hanno tuttavia una tendenza statistica associata ad una minore sopravvivenza post-chirurgica (HR=2,99 p=0,057, analisi di regressione di cox). Inoltre solo una più alta espressione genica di KRT19 è risultata un fattore di rischio per la progressione tumorale (HR=4,45 p=0,01, analisi di regressione di cox). L'analisi multivariata, effettuata considerando le variabili clinico-antropometriche con p<0,05, non conferma che avere più elevati livelli di KRT19 mRNA costituisca un fattore di rischio indipendente né per la OS (p=0,945) né per la progressione (p=0,896).

Abbiamo approfondito lo studio di correlazione con la progressione, valutando se i fattori molecolari fossero correlati con una progressione precoce. Nessuna associazione è stata trovata tra i loro livelli di espressione genica e la progressione entro 1 anno o entro 2 anni dalla resezione chirurgica (tabella 5.13).

Analisi Univariata

Sopravvivenza Globale (OS)				
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
PDX1	0,998	1,001	0,65	1,541
PAX6	0,687	1,106	0,677	1,808
ISL1	0,481	0,785	0,399	1,542
PTF1 α	0,626	1,027	0,922	1,144
ONECUT	0,513	1,062	0,887	1,27
KRT19	0,057	2,99	0,966	9,256

Progressione				
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
PDX1	0,803	1,057	0,685	1,631
PAX6	0,436	1,205	0,754	1,926
ISL1	0,395	0,786	0,452	1,368
PTF1 α	0,816	1,011	0,922	1,109
ONECUT	0,695	0,968	0,823	1,139
KRT19	0,01	4,45	1,42	13,941 *

Tabella 5.12. Analisi univariata di regressione di cox dei fattori di rischio molecolari per la sopravvivenza e la progressione nel gruppo di 41 pazienti con malattia non metastatica al momento dell'intervento. Per la OS i valori sono stati corretti per età e sesso. * $p \leq 0,05$

Analisi Univariata- Regressione logistica binaria

Progressione a 1 anno				
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore
PDX1	0,659	0,874	0,48	1,591
PAX6	0,981	1,011	0,404	2,531
ISL1	0,259	0,554	0,199	1,545
PTF1 α	0,956	0,995	0,842	1,177
ONECUT	0,503	0,905	0,675	1,213
KRT19	0,236	2,649	0,529	13,276

Progressione a 2 anni				
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore
PDX1	0,717	1,121	0,606	2,073
PAX6	0,387	1,558	0,571	4,253
ISL1	0,676	0,799	0,278	2,296
PTF1 α	0,949	0,982	0,82	1,178
ONECUT	0,906	0,982	0,724	1,331
KRT19	0,132	3,754	0,671	21,022

Tabella 5.13. Analisi univariata di regressione logistica binaria dell'associazione fra i geni e la progressione precoce di 41 pazienti con malattia non metastatica al momento dell'intervento.

Risultati interessanti si sono ottenuti nella valutazione della correlazione tra l'espressione di specifici fattori molecolari di sviluppo pancreatico e il sito di recidiva. Si è detto

precedentemente (figura 5.19) che la recidiva si ha in 31 pazienti (76%) e fra questi 16 recidivano localmente. I livelli di mRNA sia di PAX6 che di PDX1 correlano in maniera statisticamente significativa con la comparsa di una recidiva in sede pancreatica (tabella 5.14). Inoltre questi due fattori trascrizionali hanno una correlazione lineare positiva fra loro: pazienti che hanno una più alta espressione di PAX6 hanno generalmente anche elevati livelli di PDX1 ($R=0,549$ $p=0,0002$ analisi di regressione lineare) (figura 5.21). Infatti PAX6 e PDX1 non risultano fattori prognostici indipendenti tra di loro per la progressione locale in analisi multivariata, ma lo sono se considerati singolarmente e correggendo per la radicalità dell'intervento, unica variabile clinico-antropometrica significativa per la ricaduta locale in analisi univariata (tabella 5.15).

Analisi Univariata- Regressione logistica binaria					
Recidiva locale					
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore	
PDX1	0,031	3,468	1,118	10,757	*
PAX6	0,037	3,322	1,074	10,277	*
ISL1	0,481	0,785	0,399	1,542	
PTF1 α	0,639	1,042	0,876	1,241	
ONECUT	0,297	1,221	0,839	1,776	
KRT19	0,399	1,997	0,4	9,957	

Tabella 5.14. Analisi univariata di regressione logistica binaria dell'associazione fra i fattori molecolari e la progressione in sede pancreatica. * $p \leq 0,05$

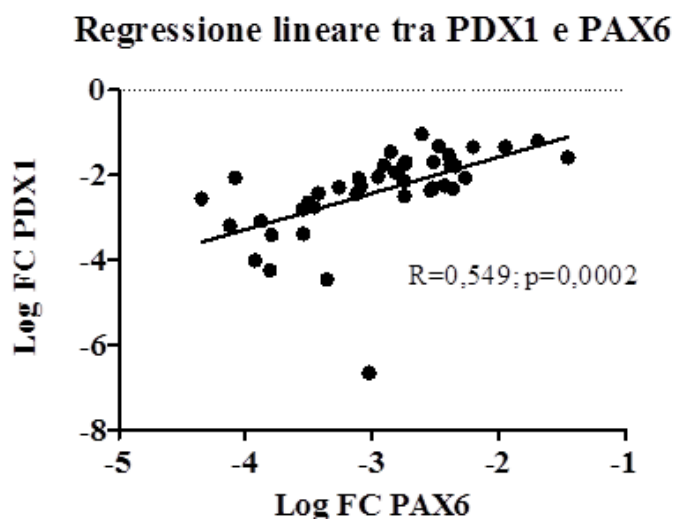


Figura 5.21. Regressione lineare tra il logaritmo del Fold Change (FC) dell'mRNA di PAX6 e di PDX1.

Analisi Multivariata- Regressione logistica binaria

Recidiva locale					
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore	
PDX1	0,207	2,524	0,600	10,624	
PAX6	0,538	1,591	0,362	6,983	
R	0,048	4,759	1,017	22,278	*
PDX1	0,018	4,604	1,301	16,296	*
R	0,172	2,624	0,657	10,471	
PAX6	0,039	3,442	1,064	11,134	*

Tabella 5.15. Analisi multivariate di regressione logistica binaria dell'associazione fra i fattori molecolari e la progressione in sede pancreatica. La radicalità all'intervento è l'unica variabile clinica risultata rilevante in analisi univariata (dato non mostrato). *p≤0,05

L'espressione genica di PDX1, PAX6, ISL1, PTF1 α , ONECUT e KRT19 è stata correlata anche con la progressione metastatica nei 25 pazienti su 41 che recidivano a distanza. Da questa analisi è emerso che avere più alti livelli di mRNA di CK19 risulta essere un fattore di rischio indipendente per la comparsa di metastasi a distanza (tabella 5.16): infatti presenza un Odds ratio maggiore di 1 e con p-Value<0,05 sia in analisi univariata che in analisi multivariata.

Analisi Univariata- Regressione logistica binaria

Recidiva a distanza					
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore	
PDX1	0,601	1,173	0,644	2,137	
PAX6	0,204	1,892	0,707	5,068	
ISL1	0,575	1,325	0,495	3,544	
PTF1 α	0,474	1,065	0,897	1,264	
ONECUT	0,861	0,974	0,729	1,303	
KRT19	0,028	10,525	1,289	85,939	*

Analisi Multivariata- Regressione logistica binaria

Recidiva a distanza					
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore	
Grading	0,019	6,150	1,348	28,065	*
R	0,026	8,680	1,299	58,015	*
KRT19	0,032	12,410	1,250	123,251	*

Tabella 5.16. Analisi univariata e multivariata mediante regressione logistica binaria dell'associazione fra i fattori molecolari e la progressione metastatica. Nell'analisi multivariata sono state considerate come covariate il grading e la radicalità all'intervento, le uniche variabili clinico-antropometriche risultate correlata alla comparsa di metastasi a distanza con p-Value < 0,05 (dato non mostrato). *p≤0,05

5.4.4 Correlazione fra PDX1, PAX6, KRT19 e le caratteristiche clinico-patologiche nei pazienti non metastatici alla resezione

L'espressione dei geni risultati correlati con la recidiva in un sito preferenziale è stata correlata con le caratteristiche clinico-patologiche della neoplasia primaria. Per ogni gene abbiamo suddiviso i pazienti in due gruppi sulla base della mediana di espressione del Log₁₀FC. Dalla tabella 5.17 si deduce che solo il gene KRT19 è associato all'invasione linfonodale (p=0,019) e di conseguenza ad uno stadio TNM più avanzato.

Variabili	PDX1			PAX6			KRT19		
	≤ mediana	> mediana	p-Value	≤ mediana	> mediana	p-Value	≤ mediana	> mediana	p-Value
Sesso									
maschio	10	10		12	9		10	11	
femmina	10	11	0,563	8	12	0,216	10	10	0,563
Età									
<65 anni	9	5		7	7		9	5	
≥65 anni	11	10	0,136	13	14	0,585	11	10	0,136
CA19.9									
<100 U/ml	9	9		8	10		11	7	
≥100 U/ml	9	10	0,567	10	9	0,433	7	12	0,126
N									
N0	9	6		7	8		11	4	
N1	11	13	0,222	13	13	0,547	9	17	0,019
R									
R0	8	13		10	11		10	11	
R1	12	8	0,138	10	10	0,563	10	10	0,563
G									
G1/G2	12	14		11	15		14	12	
G3	8	7	0,453	9	6	0,222	6	9	0,299
Stadio									
1A-1B	9	6		7	8		11	4	
2B	11	15	0,222	13	13	0,547	9	17	0,019

Tabella 5.17. Correlazione fra l'espressione dei fattori PDX1, PAX6 e KRT19 e le caratteristiche clinico-patologiche della neoplasia nella coorte dei 41 pazienti non metastatici alla resezione. I numeri riportati indicano il numero di pazienti appartenenti ad un gruppo di categorizzazione. I p-Value sono stati calcolati mediante il test esatto di Fisher. Mediane mRNA Log₁₀FC PDX1=-2,253; PAX6=-2,879; KRT19=-0,014. Per CA19.9 si avevano a disposizione i valori per 37 pazienti. Tra le caratteristiche clinico-patologiche non è stato considerato il T perché tutti i pazienti, tranne uno, sono T3.

5.4.5 Combinazione dei marcatori molecolari PDX1, PAX6, KRT19 e correlazione con la sopravvivenza nei pazienti non metastatici alla resezione

Dato che sia elevati livelli dell'mRNA di PDX1 o PAX6 che di KRT19 correlano comunque con una progressione che sia essa in sede locale o metastatica, abbiamo ipotizzato che i pazienti che avevano una minore espressione di questi geni a livello di mRNA potessero avere una miglior prognosi.

Abbiamo quindi suddiviso i pazienti in 3 gruppi sulla base della mediana di espressione molecolare di PAX6 e KRT19:

- 1° gruppo (n=12): Pazienti che hanno livelli di espressione di PAX6 e KRT19 al di sotto delle mediane (le mediane del Log_{10}FC sono state calcolate nella coorte dei 41 pazienti non metastatici alla resezione, $\text{PAX6}=-2,879$; $\text{KRT19}=-0,014$); sono classificati come $\text{PAX6-}/\text{KRT19-}$.
- 2° gruppo (n=17): Pazienti che hanno uno dei due livelli di espressione di PAX6 e KRT19 al di sopra delle mediane; sono classificati come $\text{PAX6+}/\text{KRT19+}$.
- 3° gruppo (n=12): Pazienti che hanno livelli di espressione di PAX6 e KRT19 al di sopra delle mediane; sono classificati come $\text{PAX6+}/\text{KRT19+}$.

La stessa suddivisione è stata fatta per PDX1 e KRT19:

- 1° gruppo (n=12): Pazienti che hanno livelli di espressione di PDX1 e KRT19 al di sotto delle mediane (mediane mRNA Log_{10}FC $\text{PDX1}=-2,253$; $\text{KRT19}=-0,014$); sono classificati come $\text{PDX1-}/\text{KRT19-}$.
- 2° gruppo (n=17): Pazienti che hanno uno dei due livelli di espressione di PDX1 e KRT19 al di sopra delle mediane; sono classificati come $\text{PDX1+}/\text{KRT19+}$.
- 3° gruppo (n=12): Pazienti che hanno livelli di espressione di PDX1 e KRT19 al di sopra delle mediane; sono classificati come $\text{PDX1+}/\text{KRT19+}$.

I pazienti che esprimono a più bassi livelli PDX1 e KRT19 ($\text{PDX1-}/\text{KRT19-}$) sono effettivamente quelli con una migliore prognosi in termini di sopravvivenza globale (mediana di 1788 giorni), mentre i pazienti alto esprimenti sopravvivono di meno (mediana di 579 giorni) ($p=0,048$ analisi di Log Rank) (figura 5.22). Per la combinazione di PAX6 e KRT19 il dato statistico indica solamente una tendenza e non una chiara significatività.

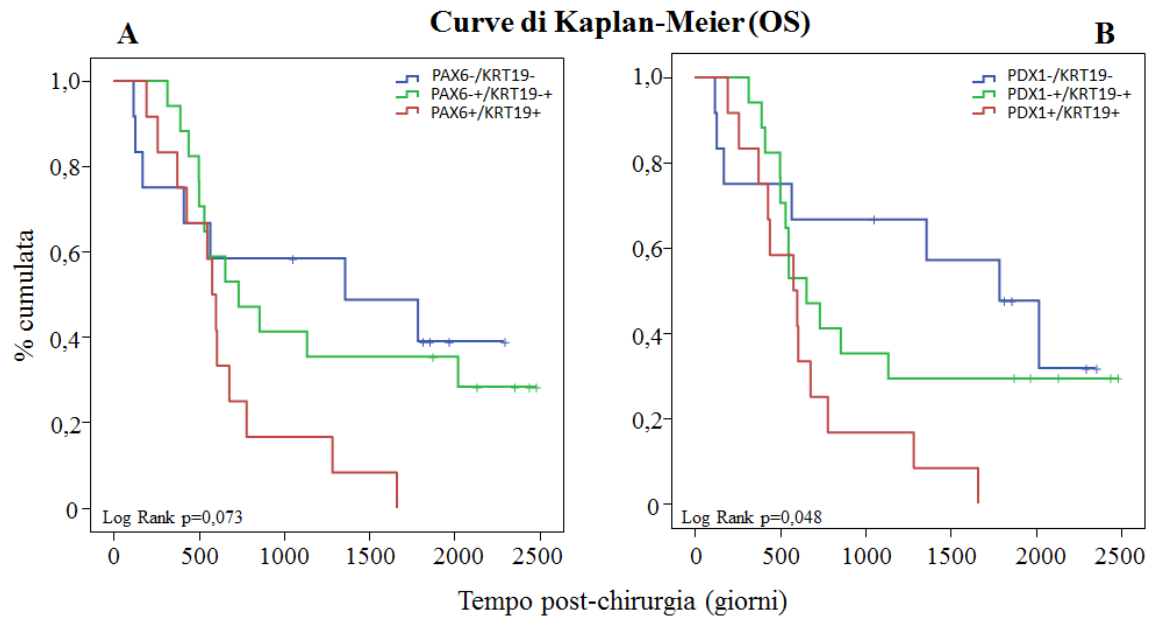


Figura 5.22. Sopravvivenza globale stimata dalla curve di Kaplan-Meier. I pazienti (n=41) sono stati suddivisi in 3 gruppi in base all'espressione genica di PAX6 e KRT19 (pannello A) o di PDX1 e KRT19 (pannello B). L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test di Log-Rank.

5.5 Fase di validazione: marcatori di staminalità

5.5.1 *Studio prospettico: descrizione della coorte di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas*

Dai risultati ottenuti mediante la regressione di cox (paragrafo 5.3) si deduce che avere più cellule positive per i marcatori staminali di superficie descritti in letteratura (ESA+/CD24+CD44+, CD133+, CD133+/CXCR4+) non è rilevante per la tumorigenicità di linee immortalizzate nel topo (tabella 5.11 e figura 5.16). Il modello statistico ha individuato però nell'espressione di CXCR4 un aumentato rischio di crescita tumorale con un HR di 1,658 ($p=0.042$) (tabella 5.11). Anche il fenotipo ESA+/CD24-/CD44+ sembra influenzare la tumorigenesi: la sua espressione è associata ad un maggiore rischio di sviluppare il tumore nel modello murino ($p=0.038$; HR 1.011) (tabella 5.11). Allo scopo di validare se queste putative sub-popolazioni cellulari identificassero realmente la componente più aggressiva del tumore e di correlare la loro espressione con gli aspetti clinici, si è valutata quantitativamente l'espressione di questi marcatori staminali in resezioni tumorali di pazienti.

Abbiamo arruolato 55 pazienti che in seguito a riscontro di neoformazione pancreatica, sono stati sottoposti a chirurgia resettiva presso l'Ospedale San Raffaele, tra gennaio 2008 e marzo 2010. Da otto resezioni non abbiamo ottenuto, in seguito alla digestione enzimatica, un numero di cellule sufficienti per procedere con la fenotipizzazione al FACS. Nello studio prospettico è stata quindi analizzata una coorte di 47 soggetti per l'espressione dei fenotipi staminali. Di questi tuttavia $n=8$ pazienti sono stati esclusi nell'analisi di correlazione con l'esito clinico della patologia: $n=3$ poiché per complicanze chirurgiche dirette sono deceduti entro 30 giorni dall'intervento; $n=4$ perché già metastatici al momento dell'intervento e $n=1$ perché il soggetto è stato perso durante il follow up (figura 5.23). Nella figura 5.24 (pannello A) sono riportate le caratteristiche cliniche-patologiche e antropometriche dei 39 pazienti analizzati per l'esito clinico della patologia. Nel corso del follow up (mediana di 780 giorni, minimo 100 e massimo 2479 giorni) 30 pazienti sono deceduti e 32 hanno avuto una progressione. Le curve di Kaplan-Meier (figura 5.24 pannello B) evidenziano le curve di progressione e la sopravvivenza della malattia.

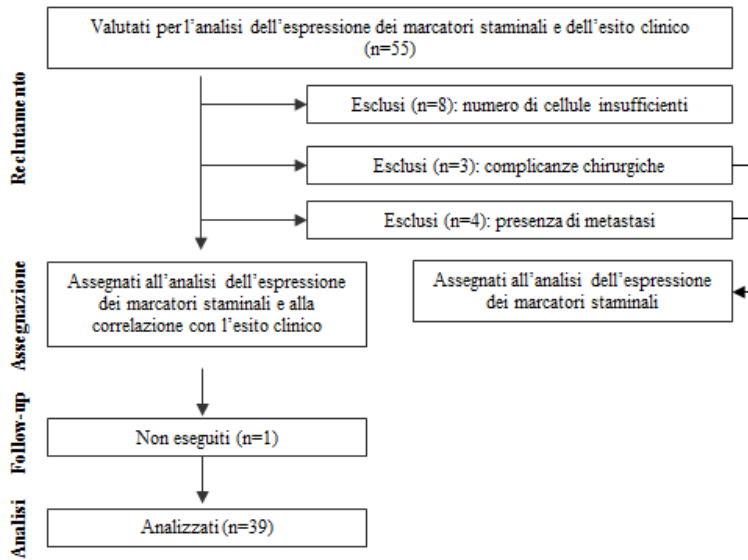


Figura 5.23. Organizzazione dello studio e distribuzione del campione nei diversi gruppi di analisi.

A)

	Totale n= 39 (%)
Età (anni)	
Media ± s.d.	68 ± 9,7
Sesso	
Maschio	21 (44,3)
Femmina	18(55,7)
CA19.9 U/ml	
Mediana (min-max)	74 (1-1801)
Stadio	
1A	1 (2,1)
2A	9 (26,3)
2B	29 (71,6)
T	
T1	1 (2,1)
T2	0 (0)
T3	38 (97,9)
N	
Negativo	10 (28,4)
Positivo	29 (71,6)
Grading	
G1	0 (0)
G2	22 (54,9)
G3	17 (45,1)
R	
R0	18 (38,1)
R1	21 (61,9)
Neoadiuvante	
	2 (5,9)
Adiuvante	
chemioterapia	31 (83,6)
radioterapia	16 (44)
Follow up (giorni)	
Mediana (min-max)	780 (100-2479)

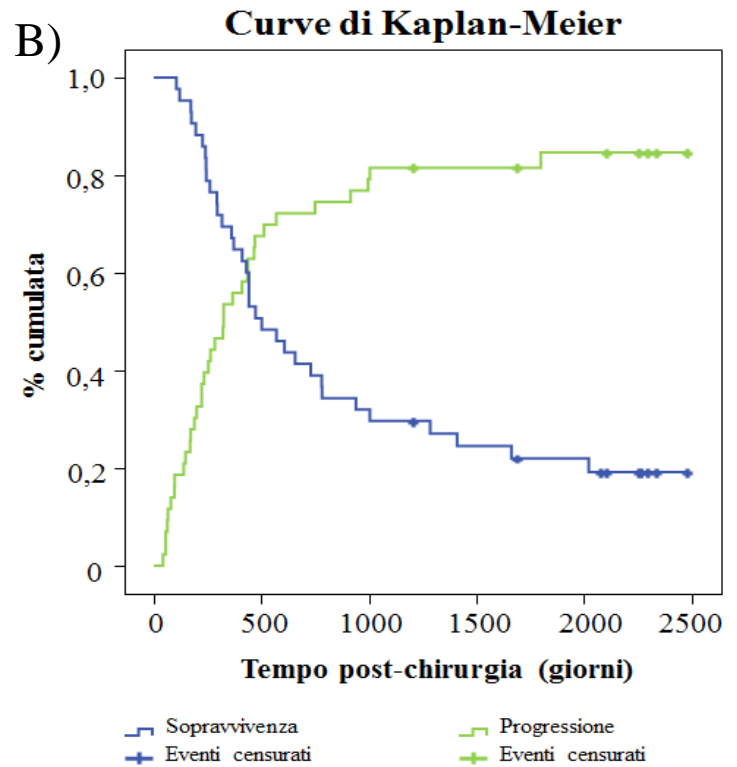


Figura 5.24. A) Caratteristiche cliniche-patologiche ed antropometriche dei 39 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico. **B)** Curve di Kaplan-Meier che rappresentano l'intervallo di tempo che intercorre tra l'intervento chirurgico di rimozione del tumore e la progressione nei 39 pazienti affetti da PDAC.

Per la coorte di 39 pazienti analizzati le variabili clinico ed antropometriche sono state correlate con la sopravvivenza globale e la progressione, intesa come ripresa di malattia o decesso, mediante regressione di cox (tabella 5.18).

Variabili	Sopravvivenza Globale (OS)			
	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
Età	0,382	1,017	0,979	1,058
Sesso (femmina)	0,739	1,129	0,551	2,314
CA19.9 pre intervento	0,073	1,001	1	1,002
Stadio	0,153	1,788	0,805	3,972
T	0,473	0,685	0,244	1,923
N	0,039	2,667	1,051	6,763 *
G	0,002	4,37	1,691	11,294 **
R	0,417	1,372	0,639	2,943
Comparsa metastasi	0,009	3,186	1,336	7,598 **
Neoadiuvante	0,475	1,715	0,39	7,534
Chemioterapia adiuvante	0,443	1,473	0,547	3,964
Radioterapia adiuvante	0,051	0,443	0,196	1,002
Dimensioni	0,26	1,176	0,887	1,561

Variabili	Progressione			
	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore
Età	0,871	1,003	0,968	1,039
Sesso (femmina)	0,824	1,082	0,54	2,17
CA19.9 pre intervento	0,272	1	1	1,001
Stadio	0,27	1,477	0,739	2,953
T	0,773	0,863	0,316	2,357
N	0,113	1,974	0,851	4,583
G	0,08	1,884	0,926	3,832
R	0,399	1,353	0,67	2,731
Comparsa metastasi	0,001	4,212	1,816	9,769 **
Neoadiuvante	0,273	2,288	0,521	10,041
Chemioterapia adiuvante	0,799	1,122	0,461	2,732
Radioterapia adiuvante	0,039	0,466	0,226	0,962 *
Dimensioni	0,597	1,074	0,823	1,402

Tabella 5.18. Analisi univariata di regressione di Cox dei fattori di rischio clinico-antropometrici per la sopravvivenza e la progressione nella coorte di 39 pazienti. Per la OS i valori sono stati corretti per età e sesso. La correlazione con il T non è da considerare in quanto il 97,9% dei casi era un T3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$

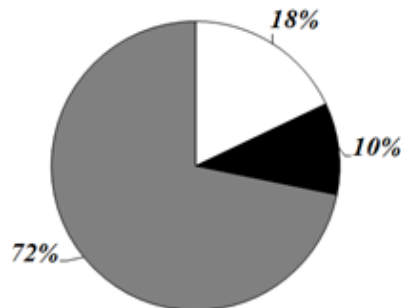
Come nella precedente casistica, utilizzata per la validazione dei fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico, l'interessamento tumorale dei linfonodi, il grading e la comparsa di metastasi sono fattori predittivi di una minore sopravvivenza in analisi univariata corretta per età e sesso. La comparsa di metastasi e il grading tumorale sono anche fattori predittivi di una progressione più precoce.

La recidiva è insorta nel 72% dei pazienti (n=28); nel 14,29% si è trattata di una recidiva locale, nel 64,29% di una recidiva a distanza (metastasi) e nel 21,48% dei casi sono state

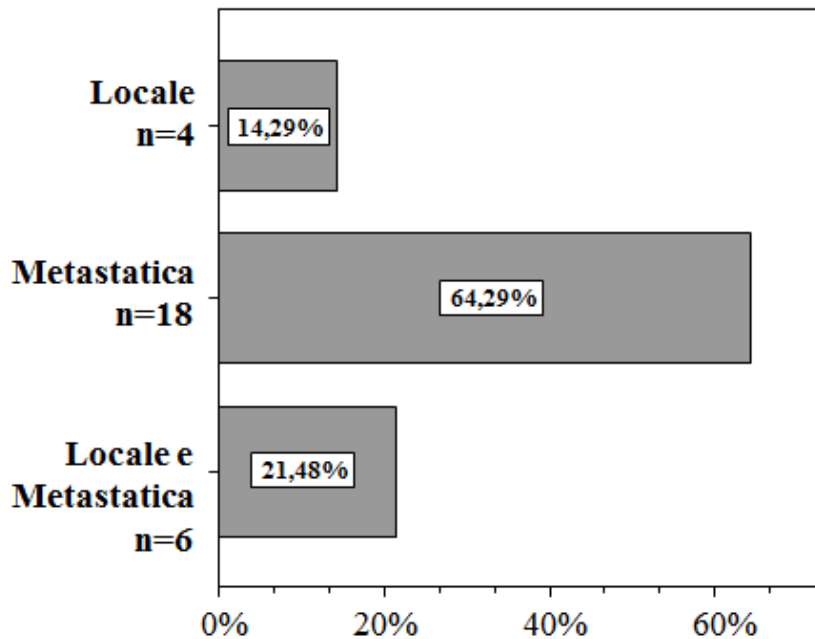
diagnosticate entrambe (figura 5.25, pannello A e B). Come per i marcatori molecolari dello sviluppo pancreatico, indipendentemente da dove il tumore recidiva i tempi di sopravvivenza e di progressione tumorale rimangono pressoché invariati (figura 5.25, pannello C).

A Tipo di progressione:

- Liberi da malattia n=7
- Morte n=4
- Recidiva n=28



B % di distribuzione del sito di recidiva nei 28 pazienti in progressione



C

Sito di reciva	media ± SD (gg)	
	OS	Progressione
Locale in sede pancreatica	622±222	352±309
Metastasi a distanza	717±709	365±420
Locale e metastatica	794±626	335±329
	p=0,918	p=0,987

Figura 5.25. A) Grafico a torta che rappresenta che tipo di progressione hanno avuto o meno i 39 pazienti analizzati. B) Distribuzione, espressa in percentuale, del sito di recidiva nei 28 pazienti che hanno progredito. C) Analisi univariata mediante test di Anova dell’impatto del sito di ricaduta tumorale sulla sopravvivenza globale e la progressione (esprese in giorni post chirurgia).

5.5.2 Valutazione dell'espressione dei marcatori staminali nella coorte dei 46 pazienti affetti da PDAC

Il tessuto tumorale, prelevato dal pezzo operatorio ottenuto dalla resezione chirurgica, è stato processato enzimaticamente e meccanicamente al fine di ottenere cellule singole provenienti da popolazioni eterogenee componenti il tumore. Analogamente a quanto è stato precedentemente descritto per le linee cellulari, queste popolazioni sono state analizzate al citofluorimetro per l'espressione dei marcatori di superficie ESA, CD24, CD44, CD133, CXCR4. Nelle figure 5.26 e 5.27 sono riportati alcuni dot plot rappresentativi dell'immunoreattività, rilevata al citofluorimetro, degli anticorpi anti-ESA, anti-CD24, anti-CD44, anti-CXCR4 e anti-CD133, sulle cellule tumorali di un paziente affetto da adenocarcinoma duttale del pancreas.

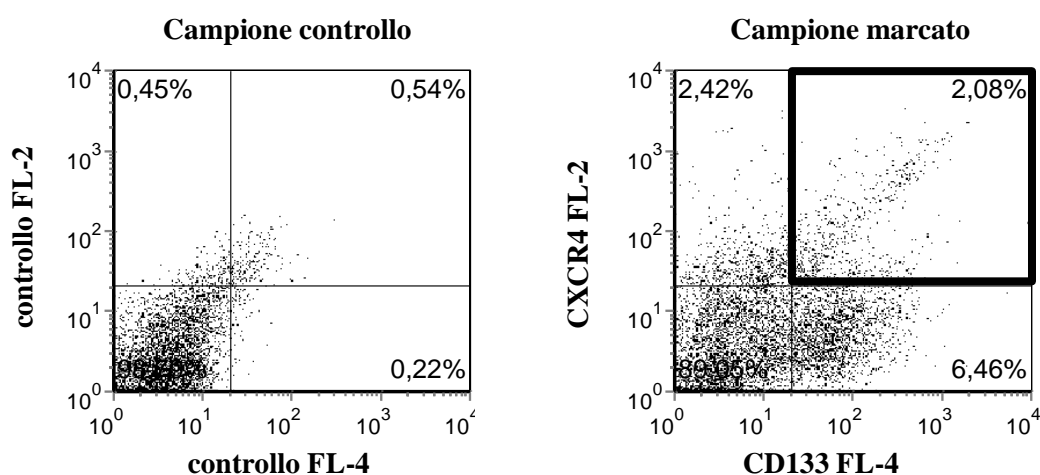


Figura 5.26. Dot plot rappresentativo dell'immunoreattività degli anticorpi anti-CXCR4 e anti-CD133 sulle cellule tumorali di un paziente; il campione di controllo rappresenta la fluorescenza endogena di tali cellule. Il quadrante evidenziato dal contorno nero più spesso mostra la popolazione con fenotipo CXCR4+/CD133+ e la sua percentuale di espressione rispetto alla popolazione cellulare totale.

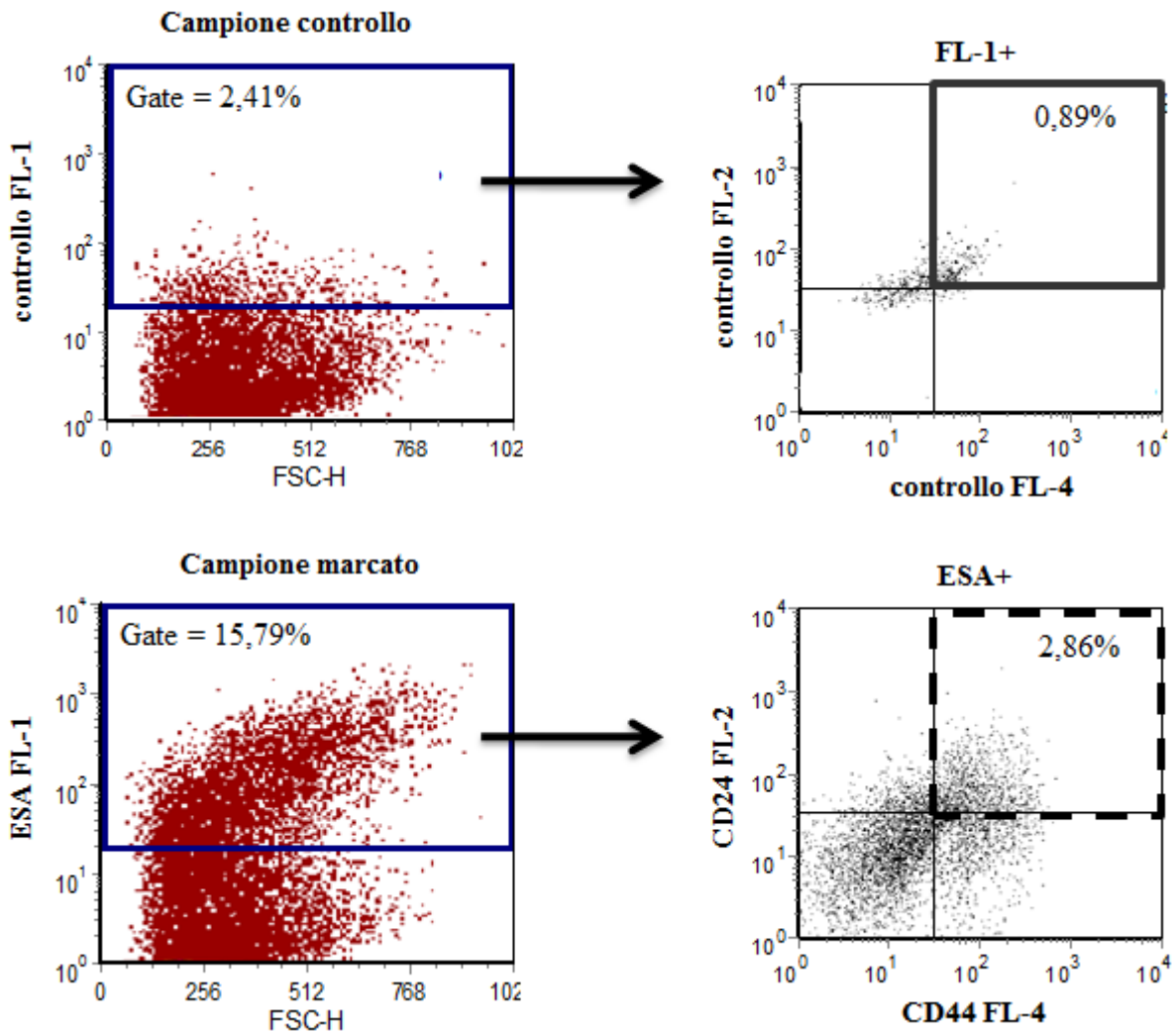


Figura 5.27. Dot plot rappresentativo dell'immunoreattività degli anticorpi anti-ESA, anti-CD24 e anti-CD44 sulle cellule tumorali di un paziente; il campione di controllo rappresenta la fluorescenza endogena di tali cellule. Il contorno blu spesso dei dot plots a sinistra evidenzia le cellule FL-1+ o ESA+ e la loro percentuale rispetto alla popolazione totale. Nel dot plot in basso a destra la popolazione ESA+ è stata analizzata per l'espressione di CD24 e CD44: il contorno tratteggiato mostra la popolazione con fenotipo ESA+/CD24+/CD44+.

I fenotipi staminali, descritti in letteratura, hanno un'espressione eterogenea anche fra i tumori umani (figura 5.28); è stato possibile valutare il fenotipo triplo positivo (ESA+/CD24+/CD44+) in 41 pazienti ed esso presenta una percentuale di espressione che varia dallo 0 al 9.05% con una mediana di 1,87%. Su 46 pazienti è stata valutata l'espressione di CD133 e CXCR4. Si è osservata una distribuzione eterogenea per il fenotipo esprimente il CD133 che va dallo 0,06% al 37,76% (mediana di 3%); la popolazione descritta come metastatica (CD133+/CXCR4+) ha una mediana di espressione dello 0,77%. Inoltre l'uso di marcatura doppie e triple ha permesso di quantificare l'espressione in percentuale di tutte le

possibili combinazioni dei marcatori utilizzati, riassunta nella tabella 5.19. La combinazione dei marcatori che risultava un fattore di rischio per lo sviluppo tumorale nel topo, ESA+/CD24-/CD44+, ha una mediana di espressione di 1,29% con un massimo di 10,26% ed è quindi molto meno rappresentata rispetto alle linee tumorali immortalizzate (mediana di 42,67%, paragrafo 5.2.3); le cellule CXCR4+ sono medianamente il 3,125% di tutte le cellule (nelle linee rappresentavano lo 0,85%).

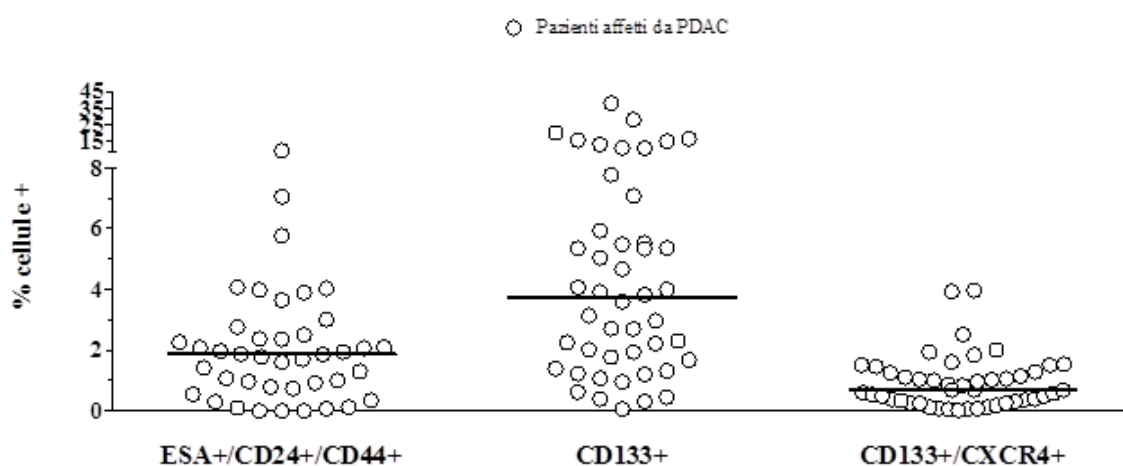


Figura 5.28. Espressione di fenotipi staminali descritti in letteratura in pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico.

Fenotipo	Mediana	Minimo	Massimo
ESA+/CD24+/CD44-	2,35	0	37,99
ESA+/CD24+/CD44+	1,87	0	9,81
ESA+/CD24-/CD44-	10,19	0,87	54,19
ESA+/CD24-/CD44+	1,29	0	10,26
ESA-/CD24+/CD44-	1,26	0	61,12
ESA-/CD24+/CD44+	0,45	0	9,18
ESA-/CD24-/CD44-	52,29	16,77	91,76
ESA-/CD24-/CD44+	13	0,79	66,18
ESA+	18,28	2,17	70,33
CD24+	7,55	0	70,29
CD44+	19,87	1,58	75,7
CXCR4+/CD133-	2,03	0	24,35
CXCR4+/CD133+	0,77	0,02	3,97
CXCR4-/CD133-	93,475	62,24	99,65
CXCR4-/CD133+	2,27	0	35,81
CXCR4+	3,125	0,02	26,2
CD133+	3,055	0,06	37,76

Tabella 5.19. Espressione dei putativi marcatori staminali ESA, CD24, CD44, CD133 e CXCR4 e delle loro combinazioni in pazienti affetti da PDAC. I numeri sono espressi in percentuale (%) di cellule positive sul totale delle cellule analizzate al citofluorimetro.

5.5.3 Correlazione fra l'espressione dei putativi marcatori staminali e l'esito clinico nella coorte dei 39 pazienti affetti da PDAC.

La percentuale di espressione in membrana dei marcatori staminali è stata correlata con la sopravvivenza globale, il tempo di progressione e il sito di recidiva. Come per i fattori molecolari di sviluppo pancreatico, ogni variabile, se non distribuita normalmente, è stata trasformata con la funzione logaritmo.

Nessuna correlazione è stata osservata tra i fenotipi staminali precedentemente descritti, e nemmeno tra i fenotipi ESA+/CD24-/CD44+ e CXCR4+, e la sopravvivenza o la progressione in analisi univariata (tabella 5.20). Interessante è risultato il fenotipo ESA+/CD24+/CD44- come fattore di rischio sia per una minor sopravvivenza che per la progressione tumorale. Sembra inoltre che sia l'espressione del CD24 a guidare il comportamento più aggressivo del tumore dato che anche i fenotipi esprimenti solo CD24 (ESA-/CD24+/CD44- e CD24+ da solo) sono correlati con una minor sopravvivenza. Esiste infatti anche una correlazione lineare positiva tra l'espressione dei fenotipi ESA+/CD24+/CD44- e ESA-/CD24+/CD44- ($R=0,500$, $p=0,006$, analisi di regressione lineare) ed ESA+/CD24+/CD44- e CD24+ ($R=0,680$, $p<0,0001$, analisi di regressione lineare). L'analisi multivariata, effettuata considerando le variabili clinico-antropometriche con $p<0,05$ (tabella 5.18), conferma questi fenotipi come fattori di rischio indipendenti sia per la sopravvivenza (covariate: età, sesso, grading e comparsa di metastasi) che per la progressione (covariate: comparsa di metastasi e radioterapia adiuvante) (Tabella 5.21). I fenotipi ESA+/CD24+/CD44-, ESA-/CD24+/CD44- e CD24+ da solo non correlano con nessuna delle caratteristiche clinico-patologiche della neoplasia primaria (dato non mostrato). Nessuna correlazione è emersa tra i livelli di espressione dei putativi fenotipi staminali, né delle altre possibili combinazioni, e il sito di recidiva (tabelle 5.22) che sia esso in sede pancreatica (n=10 pazienti) o a distanza (n=24 pazienti).

Analisi Univariata

Sopravvivenza Globale (OS)					
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
ESA+/CD24+/CD44-	0,009	2,901	1,309	6,431	**
ESA+/CD24+/CD44+	0,22	1,755	0,714	4,313	
ESA+/CD24-/CD44-	0,418	1,328	0,668	2,639	
ESA+/CD24-/CD44+	0,188	1,57	0,802	3,075	
ESA-/CD24+/CD44-	0,006	2,695	1,326	5,477	**
ESA-/CD24+/CD44+	0,653	1,158	0,611	2,197	
ESA-/CD24-/CD44-	0,966	1,044	0,142	7,662	
ESA-/CD24-/CD44+	0,221	0,605	0,271	1,352	
ESA+	0,27	1,609	0,691	3,749	
CD24+	0,012	3,025	1,282	7,137	*
CD44+	0,611	1,226	0,559	2,692	
CXCR4+/CD133-	0,12	1,58	0,888	2,813	
CXCR4+/CD133+	0,382	1,44	0,636	3,261	
CXCR4-/CD133-	0,287	0,023	0	23,73	
CXCR4-/CD133+	0,25	1,425	0,78	2,606	
CXCR4+	0,192	1,526	0,808	2,879	
CD133+	0,098	1,824	0,895	3,717	
Progressione					
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
ESA+/CD24+/CD44-	0,041	1,94	1,028	3,658	*
ESA+/CD24+/CD44+	0,198	1,787	0,738	4,325	
ESA+/CD24-/CD44-	0,454	1,29	0,662	2,513	
ESA+/CD24-/CD44+	0,287	1,384	0,761	2,516	
ESA-/CD24+/CD44-	0,053	1,565	0,994	2,462	
ESA-/CD24+/CD44+	0,572	1,168	0,682	2,001	
ESA-/CD24-/CD44-	0,993	1,008	0,166	6,114	
ESA-/CD24-/CD44+	0,394	0,725	0,345	1,52	
ESA+	0,334	1,498	0,66	3,404	
CD24+	0,059	1,954	0,975	3,914	
CD44+	0,38	1,374	0,676	2,792	
CXCR4+/CD133-	0,234	1,378	0,813	2,338	
CXCR4+/CD133+	0,767	1,122	0,523	2,405	
CXCR4-/CD133-	0,503	0,116	0	62,933	
CXCR4-/CD133+	0,238	1,398	0,801	2,439	
CXCR4+	0,619	1,173	0,626	2,199	
CD133+	0,21	1,472	0,804	2,695	

Tabella 5.20. Analisi univariata di regressione di Cox dei marcatori staminali per la sopravvivenza e la progressione nel gruppo di 39 pazienti eleggibili per lo studio di follow up. Per la OS i valori sono stati corretti per età e sesso. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Analisi Multivariata

OS					
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
Età	0,882	1,004	0,956	1,054	
Sesso(femmina)	0,119	2,560	0,786	8,333	
G	0,001	10,739	2,540	45,406	***
Comparsa metastasi	0,747	1,192	0,410	3,467	
ESA+/CD24+/CD44-	0,001	4,166	1,750	9,919	***
<hr/>					
Età	0,700	0,989	0,936	1,045	
Sesso(femmina)	0,035	4,181	1,108	15,777	*
G	0,028	4,510	1,176	17,291	
Comparsa metastasi	0,069	2,469	0,931	6,551	
ESA-/CD24+/CD44-	0,007	2,700	1,307	5,577	**
<hr/>					
Età	0,421	1,019	0,973	1,068	
Sesso(femmina)	0,085	2,382	0,886	6,404	
G	0,005	4,258	1,556	11,650	**
Comparsa metastasi	0,015	3,309	1,265	8,655	*
CD24+	0,004	4,113	1,557	10,869	**
<hr/>					
Progressione					
Variabili	p-Value	HR	Limite inferiore	limite superiore	
Comparsa metastasi	0,008	3,633	1,406	9,390	*
Radioterapia adiuvante	0,031	0,406	0,179	0,920	*
ESA+/CD24+/CD44-	0,019	2,208	1,136	4,289	*

Tabella 5.21. Analisi multivariate di regressione di cox nel gruppo di 39 pazienti eleggibili per lo studio di follow up. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; p*** $\leq 0,001$

Analisi Univariata- Regressione logistica binaria

Recidiva locale				
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore
ESA+/CD24+/CD44-	0,459	1,669	0,43	6,47
ESA+/CD24+/CD44+	0,246	3,763	0,401	35,338
ESA+/CD24-/CD44-	0,06	6,323	0,927	43,118
ESA+/CD24-/CD44+	0,089	5,634	0,77	41,236
ESA-/CD24+/CD44-	0,614	0,76	0,262	2,205
ESA-/CD24+/CD44+	0,721	0,787	0,212	2,921
ESA-/CD24-/CD44-	0,117	0,035	0,001	2,315
ESA-/CD24-/CD44+	0,614	1,513	0,302	7,57
ESA+	0,082	7,361	0,776	69,842
CD24+	0,955	0,959	0,226	4,068
CD44+	0,305	2,615	0,416	16,426
CXCR4+/CD133-	0,935	1,049	0,331	3,328
CXCR4+/CD133+	0,516	1,656	0,361	7,592
CXCR4-/CD133-	0,876	0,321	0	495910,287
CXCR4-/CD133+	0,204	2,416	0,619	9,428
CXCR4+	0,458	0,657	0,216	1,993
CD133+	0,224	2,506	0,57	11,013

Analisi Univariata- Regressione logistica binaria

Recidiva a distanza				
Variabili	p-Value	Odds ratio	Limite inferiore	limite superiore
ESA+/CD24+/CD44-	0,754	1,186	0,407	3,457
ESA+/CD24+/CD44+	0,751	1,301	0,256	6,604
ESA+/CD24-/CD44-	0,054	0,201	0,039	1,031
ESA+/CD24-/CD44+	0,116	0,295	0,065	1,35
ESA-/CD24+/CD44-	0,72	0,845	0,336	2,123
ESA-/CD24+/CD44+	0,255	2,025	0,601	6,828
ESA-/CD24-/CD44-	0,202	12,263	0,26	578,886
ESA-/CD24-/CD44+	0,183	2,756	0,62	12,255
ESA+	0,155	0,272	0,045	1,64
CD24+	0,628	1,367	0,386	4,839
CD44+	0,11	3,635	0,747	17,693
CXCR4+/CD133-	0,367	1,613	0,571	4,559
CXCR4+/CD133+	0,909	1,077	0,303	3,831
CXCR4-/CD133-	0,223	4506,201	0,006	3,33548E+11
CXCR4-/CD133+	0,675	0,795	0,272	2,321
CXCR4+	0,269	1,814	0,631	5,216
CD133+	0,228	0,454	0,125	1,641

Tabella 5.22. Analisi univariata di regressione logistica binaria dell'associazione fra i marcatori molecolari e la progressione in sede pancreatica o a distanza.

5.6 Fase di validazione preliminare: recettori delle chemochine

5.6.1 Espressione di CCR5 e CXCR3 su tessuti processati a fresco di resezioni tumorali pancreatiche e pancreas sano di donatori

I risultati presentati in questa parte sono dati in fase preliminare.

Tra i recettori delle chemochine, risultati fattori di rischio, abbiamo selezionato CCR5 e CXCR3 come i due recettori più promettenti da validare. Per confermare la validità della nostra analisi abbiamo controllato la loro espressione su tessuti freschi, ricavati da tumori primari PDAC resecati (n=6). Il tessuto tumorale in seguito a digestione enzimatica e meccanica è stato ridotto ad una sospensione di cellule singole, che sono state marcate e successivamente analizzate in citometria a flusso. La percentuale mediana di espressione sul totale delle cellule CA19.9+ (marcatore che identifica le cellule duttali) è risultata essere di 11.9 % per CCR5 e 17.6% per CXCR3.

Questo dato è risultato interessante anche a fronte di una negatività del tessuto sano. Infatti abbiamo potuto analizzare in citometria a flusso n=10 preparazioni di pancreas sano da donatore a cuore battente e le mediane di espressione sono state 0.4% per CCR5 e 0.34% per CXCR3 sul totale delle cellule CA19.9+.

La differenza di espressione di entrambi i recettori tra tessuto tumorale e tessuto sano è risultata statisticamente significativa: CCR5 $p=0,002$; CXCR3 $p=0,001$ (test di Mann-Whitney) (figura 5.29).

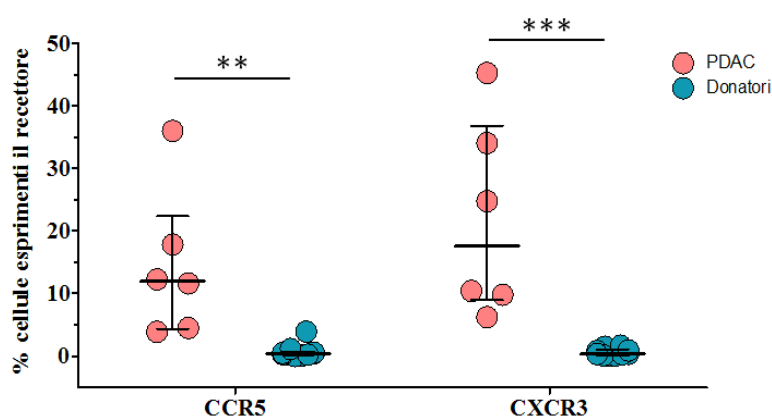


Figura 5.29. Scatter dot rappresentativo della % di cellule positive per CCR5 e CXCR3 sul totale delle cellule duttali (CA19.9+). Sono rappresentati la mediana e i percentili (25°-75°). ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

6. Discussione

Il lavoro presentato in questa tesi ha descritto una strategia di analisi per l'identificazione di nuovi possibili marcatori molecolari validabili in clinica per l'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC).

Ad oggi c'è una effettiva necessità sia di migliorare la diagnosi che di individuare fenotipi tumorali con un esito clinico più o meno favorevole, in modo da impostare il processo decisionale riguardante le opzioni di trattamento terapeutico.

L'adenocarcinoma duttale, che rappresenta l'85% delle neoplasie pancreatiche, è noto per avere una precoce ed aggressiva invasione locale che, associata ad una ritardata presentazione clinica e all'alto potenziale metastatico, ne fanno una neoplasia a prognosi generalmente infausta. Il tumore pancreatico sembra avere tratto ben poco beneficio dai progressi effettuati in campo oncologico: ha una mortalità paragonabile alla sua incidenza e che è rimasta essenzialmente costante negli ultimi 10 anni^{12,13}. I marcatori molecolari potrebbero mettere in evidenza i pazienti a rischio prima che si manifesti la neoplasia o mostrare la presenza di un processo neoplastico nelle prime fasi del suo sviluppo. Inoltre i fattori molecolari che mostrano un significato prognostico hanno la possibilità di diventare bersagli per un intervento terapeutico alternativo. In aggiunta questi indicatori potrebbero risultare utili per stratificare i pazienti sulla base della differente progressione (malattia metastatica o ripresa locale) e quindi della diversa aggressività biologica della neoplasia, così da poter impostare una terapia mirata.

Pertanto lo scopo di questo progetto è stato quello di identificare nuovi determinanti molecolari che indichino comportamenti differenziali dell'adenocarcinoma duttale pancreatico.

La nostra strategia può essere suddivisa in tre distinte fasi: la prima si basa sulla caratterizzazione funzionale, fenotipica e molecolare di linee cellulari immortalizzate; segue una fase di analisi statistica inter-linea per individuare quali dei fattori molecolari analizzati siano indicatori di rischio o fattori protettivi correlati con uno o più parametri di aggressività cellulare; in ultimo si è proceduto alla loro validazione su casistiche di pazienti affetti da PDAC.

L'utilizzo delle linee cellulari rimane un conveniente punto di partenza per gli studi di *discovery* e *proof-of-concept*: sono uno strumento utile ed efficiente per scoprire e studiare i

meccanismi molecolari di iniziazione, sviluppo e progressione di un tumore. Inoltre queste linee ricapitolano gli eventi genomici più comuni che si verificano nei PDAC, come l'attivazione di Kras e l'inattivazione di p16, p53 e Smad4^{114,115}. Questa somiglianza con i tumori nell'uomo facilita le indagini meccanicistiche. Tuttavia le linee cellulari non devono essere considerate come una popolazione omogenea: hanno origini tissutali differenti (derivano da tumore primario o metastatico), diverso grado di differenziazione e le diverse mutazioni possono presentarsi contemporaneamente o meno. Limitarsi all'uso di poche linee potrebbe condurre ad una selezione di una popolazione cellulare che non rispecchia il fenotipo eterogeneo del tumore⁹ e quindi contribuire ad un errore nell'interpretazione dei risultati. Per questo motivo abbiamo analizzato diciassette linee cellulari immortalizzate di cui sette avevano derivazione metastatica (metastasi epatica, linfonodale o ascite di PDAC).

Abbiamo analizzato sistematicamente alcuni comportamenti funzionali delle linee associati alla malignità di un tumore, in particolare la capacità clonogenica e la chemioresistenza *in vitro* e la tumorigenicità *in vivo*.

Il potenziale metastatico è fra le caratteristiche di aggressività più importanti di un tumore e può essere anche definito come l'abilità di una singola cellula o di un piccolo numero di cellule di migrare dal sito primario e generare un tumore secondario in una sede diversa. Abbiamo misurato questo potenziale nelle linee tumorali con il saggio di clonogenicità *in vitro*. I risultati ottenuti suggeriscono che questa abilità non segrega con il tipo di origine della linea tumorale.

È interessante notare che tutte le linee, tranne la Panc-1 e la CFPAC-1, si sono rivelate essere resistenti all'azione chemioterapica della gemcitabina (il *gold standard* utilizzato nella chemioterapia del tumore pancreatico) fino alla dose testata di 1000 μ M. Considerando il dato di farmacocinetica della gemcitabina nell'uomo che attribuisce alla C_{max} un valore di 61 μ M¹¹⁶, tutte le IC50 misurate sono risultate abbondantemente sopra questo valore confermando che l'adenocarcinoma pancreatico è un tumore generalmente chemioresistente.

La tumorigenicità descrive l'abilità o la propensione di una linea cellulare a produrre un tumore *in vivo* e quindi è indice della sua aggressività in un contesto più simile al processo multifasico dello sviluppo della neoplasia nell'uomo. Tutte le linee di PDAC sono state in grado di generare un tumore sottocutaneo in topi immunocompromessi CD1-Nude alla dose di 1×10^6 di cellule e solo una linea derivata da metastasi (AsPc-1) ha mantenuto questa abilità alla dose di 1×10^2 cellule.

Caratterizzate le linee per le proprietà biologiche riconosciute essere indice di malignità cellulare, le abbiamo quindi fenotipizzate per l'espressione di classi di marcatori molecolari.

Molti aspetti della biologia dei tumori, tra cui la diffusione delle cellule tumorali, l'infiltrazione leucocitaria e infiammatoria e l'angiogenesi sono guidati da meccanismi di migrazione cellulare, dipendenti in gran parte dalle chemochine¹¹⁷. Nel tumore pancreatico è stata descritta la rilevanza di alcuni recettori chemochinici, tra i quali per esempio CX3CR1, CXCR4 e CCR7. Il recettore CX3CR1, espresso dalle cellule di adenocarcinoma duttale, è coinvolto nei meccanismi di neurotropismo, una delle maggiori cause di recidiva locale¹⁰⁶. L'asse CXCR4/CXCL12 sostiene la proliferazione cellulare e la sopravvivenza *in vitro*¹¹⁸ e inoltre il recettore CXCR4 è stato identificato su una putativa popolazione di cellule tumorali staminali pancreatiche CD133+ come responsabile del fenotipo metastatico¹⁰³. CCR7 è stato trovato espresso nel 32,6% di casi di PDAC resecati e la sua espressione correla con la diffusione linfonodale e una più breve sopravvivenza¹⁰⁷. Date queste evidenze la prima classe di marcatori molecolari analizzata è stata quella dei recettori delle chemochine. CCR5, CXCR10 e CXCR3 sono risultati quelli maggiormente espressi su linee derivanti da metastasi.

Abbiamo poi valutato la secrezione di alcune chemochine, citochine e fattori di crescita al fine di caratterizzare un profilo PDAC-specifico. L'insensibilità a fattori inibitori della crescita così come ai segnali apoptotici e il rilascio di fattori promotori della proliferazione, immunomodulatori e pro-angiogenici sono elementi caratteristici dei tumori. È interessante notare che i fattori solubili maggiormente secreti (PDGF-BB, VEGF, IL8, Gro α , MIF) sono fattori pro-angiogenici e che non vi sono differenze in termini quantitativi di secrezione fra linee derivate da tumori primari e linee derivate da metastasi. Il PDGF-BB (fattore di crescita derivato dalle piastrine isoforma BB) promuove la crescita di nuovi vasi così come il VEGF, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare. Gro α e IL-8 appartengono alla famiglia delle chemochine che possiedono il motivo ELR+ (gli aminoacidi Glu-Leu-Arg) e che legandosi al recettore CXCR2 sull'endotelio promuovono l'angiogenesi¹¹⁹. MIF (fattore di inibizione della migrazione) è un potente chemoattrattore delle cellule endoteliali¹²⁰.

Un'ipotesi interessante è che l'aggressività tumorale sia dovuta a una piccola subpopolazione di cellule all'interno del tumore stesso, le cellule staminali tumorali pancreatiche (CSC) che condividono le stesse proprietà funzionali delle cellule staminali normali (auto-rinnovamento e capacità differenziative). Le radio e chemioterapie convenzionali, che portano alla riduzione della massa tumorale, hanno scarsa efficacia nel colpire tali cellule che, possedendo meccanismi di *escape* (come alti livelli di espressione di geni anti-apoptotici,

pompe di estrusione di farmaci), potrebbero essere alla base della recidiva^{108,109}. Per identificare e isolare le CSC pancreatiche sono state utilizzate differenti strategie tra cui l'analisi di espressione di marcatori di superficie (la più diffusa), l'esclusione del colorante Hoechst 33342 (*side population, SP*) e l'abilità di espandersi in sfere in sospensione¹⁰⁸. I marcatori di superficie che sono stati utilizzati per identificare le CSC pancreatiche includono CD133¹⁰³ e la tripla combinazione ESA+/CD24+/CD44+¹⁰²: nonostante queste popolazioni descritte siano relativamente rare e non completamente sovrapponibili, mostrano una tumorigenicità simile dato che riescono a generare tumori in topi immunocompromessi fino alla dose di qualche centinaia di cellule iniettate. La coespressione dei marcatori CD133 e CXCR4 sarebbe inoltre in grado di discriminare il fenotipo metastatico delle CSC all'interno della massa tumorale¹⁰³. Un altro studio ha identificato le CSC come SP/CD44-/CD24-/ESA+, analizzando cinque linee di PDAC e la loro capacità di dare origine a tumore in topi nudi atimici¹²¹. Appare dunque evidente che la popolazione di cellule staminali non sembra essere una popolazione omogenea e con effettivi marcatori universalmente riconosciuti. Abbiamo deciso di analizzare questi fenotipi staminali descritti (ESA/CD24/CD44 e CD133/CXCR4) in modo da verificare nel nostro modello di analisi se queste popolazioni fossero realmente associate a caratteristiche di malignità tumorale: l'utilizzo di anticorpi di superficie in citometria a flusso ci ha permesso anche di valutare tutte le possibili combinazioni di questi marcatori. L'espressione individuale, così come le combinazioni, dei putativi marcatori di staminalità risulta eterogenea fra le diciassette linee di PDAC e non dipendente dal loro tipo di derivazione tissutale.

L'ultima classe di marcatori biologici analizzati è quella dei geni coinvolti nello sviluppo pancreatico. La ri-espressione di molecole normalmente presenti nei progenitori pancreatici potrebbe essere indice di una de-differenziazione o di un'origine staminale del tumore. Non abbiamo osservato differenze fra l'espressione genica in linee derivate da tumori primari rispetto a linee derivate da metastasi. A parte il gene KRT19, che è un marcatore di differenziamento del dotto normale, tutti gli altri fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico sono risultati meno espressi rispetto alla componente endocrina pancreatico. Questo risultato è in linea con quanto ci si aspettava, dato che sono tutti geni che intervengono nella genesi pancreatico e che poi rimangono per lo più espressi dall'endocrino.

Il passo successivo è stato quello di correlare i parametri di aggressività cellulare sia *in vitro* che *in vivo* con l'espressione delle classi di marcatori biologici analizzati nelle diciassette linee cellulari tumorali pancreatiche. Dato l'elevato numero di biomarcatori candidati emersi (n=35) abbiamo dovuto definire una scala di priorità e quindi abbiamo

considerato rilevanti e da validare quei marcatori risultati fattori predittivi per lo sviluppo tumorale nel topo. Abbiamo scelto di concentrarci sulla tumorigenicità *in vivo* perché meglio di esperimenti *in vitro* può ricapitolare le condizioni e le interazioni complesse ed eterogenee che avvengono nel contesto del microambiente neoplastico, dall'insorgenza fino alla sua diffusione. Avendo 20 potenziali fattori di rischio abbiamo proceduto con la validazione di alcuni di essi direttamente in ambito clinico.

Tutti i fattori molecolari coinvolti nello sviluppo pancreatico e risultati fattori di rischio o protettivi sono stati analizzati in una casistica di 42 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico reclutati tra gennaio 2008 e novembre 2009. In particolare abbiamo valutato l'espressione genica di PDX1 (HR=1,455 in regressione di cox, analisi statistica inter-linea), KRT19 (HR=2,687), ISL1 (HR=1,309), PAX6 (HR=1,182), PTF1 α (HR=0,75) e ONECUT (HR=0,805) su resezioni pancreatiche della neoplasia primaria. Con una mediana di follow-up di 1030 giorni, nessun singolo fattore è risultato correlato con la sopravvivenza globale. In analisi univariata solo elevati livelli dell'mRNA di citocheratina 19 (CK19 codificata da KRT19) correlano in maniera statisticamente significativa con la progressione tumorale, intesa come recidiva o decesso (HR=4,45 p=0,01). Tuttavia la maggior espressione di KRT19 non costituisce un fattore prognostico indipendente per la progressione (analisi multivariata). Risultati interessanti si sono ottenuti analizzando il sito di recidiva. Una più elevata espressione dell'mRNA di PDX1 o di PAX6 è associata all'evento di ricaduta locale in sede pancreatica: entrambi sono fattori di rischio prognostici indipendenti. Inoltre generalmente pazienti che hanno più alti livelli di PDX1 hanno anche elevati livelli di PAX6. È stato precedentemente dimostrato che Pax6 regola positivamente la trascrizione di PDX1¹²². KRT19 è invece un fattore prognostico indipendente nel predire una recidiva in sede metastatica. Abbiamo infine individuato anche un fenotipo che identifica una sottopopolazione di pazienti a peggior prognosi in termini di sopravvivenza. Combinando l'espressione genica di PDX1 e KRT19, i pazienti (n=12) con i più alti livelli di mRNA di entrambi i fattori molecolari hanno una sopravvivenza minore: 6 su questi 12 pazienti presentano infatti una recidiva sia locale che metastatica.

La citocheratina 19 appartiene alla famiglia delle proteine dei filamenti intermedi che hanno un ruolo critico per l'organizzazione del citoscheletro, per la comunicazione intracellulare, per la differenziazione cellulare e nei processi di migrazione. Nel pancreas la sua espressione è ristretta alle cellule duttali ed è assente nel comparto acinare ed endocrino¹²³. L'espressione di citocheratina 19 è stata descritta essere un marcatore di

prognosi infausta nei tumori pancreatici neuroendocrini e correla con la metastatizzazione linfonodale ed epatica e con l'invasione perineurale^{124,125}. Nella nostra casistica elevati livelli di mRNA di KRT19 sono correlati con un coinvolgimento linfonodale ed un più elevato TNM. L'espressione di CK19 è stata osservata in differenti altri tipi tumorali tra cui carcinomi squamosi del distretto testa-collo e gastrici¹²⁵. Pazienti con carcinoma epatocellulare CK19+ presentano una recidiva post-operatoria più precoce con maggiore frequenza di metastasi intra- ed extra-epatiche¹²⁶. Uno studio del 1998 sul carcinoma della cervice uterina ha evidenziato che l'espressione di CK19 potrebbe essere associata ad una resistenza all'apoptosi indotta dalla chemioterapia su linee immortalizzate¹²⁷. In generale tuttavia non è stato spiegato il meccanismo biologico per cui un aumento dell'espressione di citocheratina 19 sia associato ad una prognosi più infausta.

Il *Pancreas duodenal homeobox-1* (Pdx1), conosciuto anche come *insulin promoter factor-1* è un fattore trascrizionale chiave per lo sviluppo del pancreas embrionale. Nel topo, PDX1 è trascritto a partire da E8.5 nelle cellule epiteliali sia dell'abbozzo dorsale che ventrale, e la sua delezione embrionale porta all'agenesi pancreatica¹¹³. Benché tutte le strutture pancreatiche derivano da precursori Pdx1+, nel corso della organogenesi pancreatica l'espressione di PDX1 è notevolmente ridotta nelle cellule acinari e duttali, mentre viene mantenuta ad elevati livelli nelle cellule endocrine. In particolare, nel pancreas adulto, è prevalentemente espresso nelle cellule β dove regola l'espressione di svariati geni tra i quali quelli dell'insulina, di Glut2 (*glucose transporter 2*) e della glucochinasi. A livello proteico l'espressione di questo fattore trascrizionale è stata osservata nel 40-43% dei PDAC ed è correlata ad un comportamento più maligno (elevati TNM, *grading* e invasione linfonodale) ed una prognosi peggiore in termini di sopravvivenza^{128,129}. A livello di mRNA noi non abbiamo osservato una correlazione tra PDX1 e le caratteristiche clinico patologiche della neoplasia primaria. È stato ipotizzato che l'espressione di PDX1 possa rappresentare un ritorno ad uno stato più indifferenziato delle cellule tumorali. Inoltre forzando *in vitro*, con l'uso di vettori adenovirali, l'espressione di PDX1 in una linea cellulare di PDAC che a livello proteico non esprimeva il fattore trascrizionale, si è osservato un aumento della migrazione cellulare¹²⁹; mentre in una linea di carcinoma gastrico l'aumento di espressione ne diminuisce le capacità migratorie¹³⁰. Tuttavia nessun lavoro presente in letteratura ha analizzato specificatamente la relazione tra PDX1 e il sito di recidiva direttamente nei pazienti.

Il *Paired box gene 6* (Pax6) è espresso precocemente nel corso della formazione del pancreas (E9) e nell'adulto è presente nelle cellule endocrine terminalmente differenziate ma

non nel pancreas esocrino¹¹³. Pax6 interviene nella regolazione dei promotori dei geni di insulina, glucagone, somatostatina e glut2. La ri-espressione della proteina Pax6 è stata osservata nel 70% dei PDAC nell'uomo (in IHC) e nel 90% delle linee immortalizzate (*western blot*) suggerendo che il tumore pancreatico possa derivare da mutazioni aberranti di cellule staminali multipotenti¹³¹. L'espressione di Pax6 è stata osservata anche nel glioblastoma multiforme ed è associata ad una minore invasività del tumore dovuta alla repressione del gene target MMP2 (*matrix metalloproteinase-2*)¹³². Questo meccanismo potrebbe spiegare perché nella nostra casistica tumori che esprimono più alti livelli di PAX6 recidivano localmente. Inoltre i nostri risultati sono la prima evidenza che una più alta espressione di PAX6 a livello di mRNA descrive un comportamento biologico differente nei pazienti affetti da PDAC.

È stata dimostrato che Pdx1 agisce come repressore trascrizionale di CK19 secondo due differenti meccanismi non ridondanti: attraverso la porzione ammino-terminale si lega al DNA e funziona da repressore (non è chiaro se direttamente o indirettamente attraverso l'interazione con altre proteine, dato che non sembra che il promotore di KRT19 abbia un sito classico di legame per Pdx1) ed inoltre è in grado di promuovere la degradazione proteasoma-dipendente di MEIS1, un trans-attivatore della trascrizione di KRT19¹²³. Nonostante questa evidenza non abbiamo osservato una correlazione lineare negativa tra l'espressione dei livelli di mRNA di PDX1 e KRT19, né nelle linee né nel tumore nell'uomo (dato non mostrato), che avrebbe potuto sostenere un eventuale differente biologia fra tumori recidivanti in sede pancreatica rispetto ai tumori che recidivano a distanza.

La nostra analisi mostra tuttavia alcuni punti deboli. Il limite principale è dato dal fatto di essere basato sulla misurazione dei livelli di mRNA senza la valutazione della controparte proteica: infatti meccanismi post-traslazionali potrebbero portare ad una degradazione dei fattori trascrizionali descritti. Per esempio per PDX1, nelle cellule β pancreatiche, è stata dimostrata la degradazione proteasoma-dipendente in seguito a stress ossidativo¹³³: ciò potrebbe spiegare l'assenza di una mancanza di correlazione inversa tra PDX1 e KRT19 nella nostra casistica. Un altro punto debole è l'assenza di un campione di soggetti sani con cui fare confronti diretti in termini di espressione genica dei fattori molecolari. Inoltre l'mRNA è stato estratto da campioni tumorali eterogenei per composizione (cellule mesenchimali, cellule neoplastiche duttali, cellule del sistema immunitario, componente endocrina pancreatica) e pertanto l'analisi dell'espressione dei fattori molecolari potrà essere, in futuro, valutata più dettagliatamente su sottotipi cellulari purificati (es: *laser capture*).

Nonostante con le attuali conoscenze non siamo in grado di spiegare perché a differenti livelli di espressione genica di KRT19, PDX1 e PAX6 corrispondano diversi comportamenti biologici, i dati presentati offrono comunque una possibilità di stratificazione dei pazienti per la prognosi post-operatoria ed eventuale terapia (mirata locale o sistemica) che merita in futuro un approfondimento anche meccanicistico.

Proseguendo nella fase di validazione, tra i marcatori risultati fattori di rischio nell'analisi di regressione di cox, abbiamo deciso di concentrarci sulle combinazioni dei putativi marcatori staminali anche se è ancora dibattuto se le CSC abbiano un effettivo ruolo prognostico nella patologia clinica. Infatti nonostante alcune cellule tumorali, che esprimono combinazioni specifiche di marcatori staminali, posseggano caratteristiche di staminalità *in vitro* o in modelli preclinici, la questione irrisolta è se siano davvero in grado di sviluppare un tumore primario o una lesione neoplastica secondaria nell'uomo.

La nostra strategia di screening ha mostrato essere fattori di rischio per lo sviluppo tumorale nel topo, non i classici fenotipi staminali descritti in letteratura^{102,103} (ESA+/CD24+/CD44+, CD133+, CD133+/CXCR4+) ma la combinazione ESA+/CD24-/CD44+ e la sola espressione di CXCR4 ed ESA. Tuttavia la validazione clinica, condotta su una coorte di 39 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale, non ha confermato che queste combinazioni di marcatori, né i classici già descritti, correlino in maniera statisticamente significativa con la sopravvivenza o con la progressione nel tempo e nemmeno con il sito di recidiva.

L'assenza di una correlazione tra la presenza delle *bona fide* CSC e un ruolo prognostico trova riscontro anche in letteratura in studi che hanno una durata di follow up simile alla nostra. Studi di sopravvivenza hanno mostrato l'assenza di un legame tra l'espressione proteica contemporanea di ESA/CD24/CD44 e l'esito clinico in 65 pazienti affetti da PDAC che presentavano un fenotipo triplo positivo nel 27,7% dei casi¹³⁴. CD133, valutato in IHC in 51 PDAC, è risultato espresso nell'80% dei casi e nessuna correlazione è stata trovata con la sopravvivenza, la stadiazione TNM e il grado di differenziazione¹³⁵. Percentuali di espressione così elevate non sono molto coerenti con l'idea che le CSC siano una popolazione rara di cellule in tumori solidi, anche se, ad oggi, è sconosciuta la proporzione di CSC aventi la capacità di formare una nuova neoplasia¹³⁶.

La mancanza di una conferma nell'uomo dei fenotipi risultati significativi nelle linee in fase di analisi suggerisce invece che l'utilizzo di linee immortalizzate può portare ad artefatti a causa degli eventi di de-differenziazione, mutazioni e sub-clonaggi che avvengono quando le cellule sono stabilizzate e mantenute in coltura. Il microambiente locale può indurre

differenti *pattern* di espressione dei marcatori staminali¹³⁷. Inoltre sia *in vitro* che *in vivo* nel topo viene a mancare la nicchia staminale umana, quel microambiente fisiologico costituito da cellule di supporto e matrice che per le CSC è essenziale per la sopravvivenza. Gli xenotrapianti infine potrebbero selezionare un sottotipo cellulare che ha una migliore capacità di sopravvivere e generare tumore nel modello murino, una realtà tuttavia differente dalla crescita tumorale nell'uomo¹³⁸. Per questa ragione abbiamo proceduto alla validazione di ogni fattore direttamente in ambito clinico.

Nella nostra coorte di PDAC il fenotipo ESA+/CD24+/CD44- è risultato un fattore di rischio prognostico indipendente sia per la sopravvivenza (HR=4,166 p=0,001) che per la progressione (HR=2,208 p=0,019). Inoltre anche la sola espressione di CD24 risulta un predittore indipendente di una più breve sopravvivenza, dando a questa molecola ulteriore rilevanza prognostica. CD24 è una piccola proteina di superficie ancorata al glicosilfosfatidilinositolo; si presenta altamente glicosilata e ha funzione di molecola di adesione cellula-cellula e cellula-matrice. È stata identificata come un ligando alternativo della P-selectina, un recettore di adesione espresso a livello endoteliale, attraverso la cui interazione facilita il passaggio delle cellule tumorali in circolo durante i processi di extravasazione e metastatizzazione¹³⁹. Esistono alcuni lavori a conferma dei nostri risultati sulla rilevanza del CD24. In un recente studio volto ad esplorare il valore prognostico di alcuni marcatori di transizione epitelio-mesenchima, 67 resezioni chirurgiche di PDAC sono state valutate in immunohistochimica anche per l'espressione sia di CD24 che di CD44 concludendo che CD24 ma non CD44 sia un predittore indipendente di cattiva prognosi in termini di tempo di progressione e di peggiore sopravvivenza globale¹⁴⁰. In questa casistica il 27% delle sezioni era positivo per il CD24. Nello studio di Ikenaga et al¹⁴¹, si è osservato che la percentuale di tessuto patologico positivo per CD24 aumenta passando da lesioni neoplastiche benigne a lesioni neoplastiche *borderline* (neoplasie mucinose papillari intraduttali e carcinomi mucinosi papillari intraduttali) suggerendo un suo ruolo nella progressione tumorale; l'epitelio normale del dotto pancreatico non ha mostrato reattività per CD24 a fronte di una positività del 62% dei PDAC. La sua espressione è stata associata ai PDAC che hanno elevato stadio (T3,T4) e coinvolgimento linfonodale (N1); in analisi univariata, nella coorte di 83 pazienti resecati, CD24 è stato associato ad una minore sopravvivenza anche se non costituisce un fattore prognostico indipendente¹⁴¹. CD24, di per sé, è risultato abbondantemente espresso nei tessuti tumorali pancreatici (dal 27% al 72%)¹⁴⁰⁻¹⁴², e date le considerazioni fatte fino ad ora, potrebbe essere un *target* terapeutico promettente. Nella nostra coorte invece il fenotipo ESA+/CD24+/CD44- ha una mediana di espressione di 2,35%

e quindi più vicina al concetto condiviso di comparto staminale. Fine di questa ricerca non è l'individuazione di una popolazione di cellule staminali tumorali ma l'identificazione o la conferma di potenziali biomarcatori; tuttavia le cellule con fenotipo ESA+/CD24+/CD44- sembrerebbero condividere entrambi questi aspetti e per questo motivo potrebbero essere un buon predittore di aggressività tumorale. Infatti anche nel lavoro di Li et al¹⁰², il primo che ha identificato le CSC pancreatiche come CD44+/CD24+/ESA+, la popolazione ESA+/CD24+ manteneva comunque ottime capacità tumorigeniche (abilità delle staminali) riuscendo a generare un tumore nel topo fino alla dose trapiantata di 500 cellule.

In futuro potremmo meglio caratterizzare questa popolazione non tanto nelle linee cellulari immortalizzate ma direttamente nell'uomo; dopo separazione mediante *cell sorting* sarà interessante determinare, per esempio, il profilo trascrittomico di queste cellule per verificare l'arricchimento di vie di segnalazione per il mantenimento della pluripotenza e del *self-renewal*.

In ultimo e solo in fase preliminare abbiamo validato nei tessuti tumorali CCR5 e CXCR3, due fra i recettori delle chemochine risultati rilevanti in fase di analisi sulle linee. Abbiamo iniziato la validazione con questi due recettori perché sono maggiormente espressi in linee derivanti da metastasi e in analisi di regressione di cox presentano un p-Value<0,01. CCR5 e CXCR3 sono espressi sulla componente duttale (CA19.9+) di tessuti freschi di resezioni chirurgiche di adenocarcinomi pancreatici a fronte di una quasi totale negatività del tessuto sano. Abbiamo ipotizzato che l'aumento dell'espressione dei due recettori sia una caratteristica specifica del tumore. Dato il numero esiguo di casi analizzati non è stato ancora possibile osservare correlazioni tra i livelli di espressione e le caratteristiche cliniche dei pazienti. In futuro prevediamo un ampliamento della casistica. Nelle linee immortalizzate non è stata riscontrata una correlazione lineare tra l'espressione dei due recettori e la secrezione dei loro ligandi. Infatti per CXCR3 non abbiamo osservato una significativa associazione tra l'espressione del recettore e la secrezione del suo ligando principale IP-10 (R=0,142 p=0,587, analisi di regressione lineare) e nemmeno di MIG (R=0,035 p=0,895). Anche CCR5 e i suoi ligandi RANTES, EOTAXIN, MIP-1 α e MIP-1 β non correlano (rispettivamente R=0,399 p=0,113; R=0,208 p=0,424; R=0,095 p=0,718; R=0,117 p=0,654). La presenza di un sistema di segnalazione autocrina non è tuttavia da escludere dato che comunque IP-10 e RANTES, i due ligandi principali, sono tra i fattori solubili mediamente secreti dalle linee cellulari analizzate (rispettivamente 619,69 e 325,95 pg/ml/10⁶/24h).

CXCR3 è implicato nei processi di crescita tumorale, migrazione e invasione in vari tipi di tumore. Per esempio, in un modello murino, l'inibizione di CXCR3 attraverso silenziamento genico provoca una diminuzione nel numero di metastasi polmonari originate da cellule di carcinoma della mammella¹⁴³. Utilizzando linee cellulari è stato dimostrato che la sua attivazione promuove la crescita tumorale nel glioma e aumenta le capacità di invasione di melanomi e carcinomi del colon-retto¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Recentemente due lavori sono stati pubblicati su CXCR3 e tumore pancreatico. Lo studio del 2012 del gruppo di Kim è stato il primo che ha valutato in immunohistochimica l'espressione di CXCR3 su 88 tessuti di PDAC resecabili investigando il suo ruolo prognostico per la sopravvivenza e la comparsa di metastasi: l'86% dei tumori esprime CXCR3 e questa espressione è risultata correlata solo con la sopravvivenza al limite della significatività ($p=0,08$)¹⁴⁷. Anche in uno studio più recente l'88% dei PDAC valutati (33 resezioni) è risultato positivo in IHC per CXCR3 con percentuali differenti di cellule positive nell'area tumorale: tuttavia solo il 55% dei casi lo esprimeva su cellule tumorali CK8+ mentre il restante 33% sullo stroma¹⁴⁸. Inoltre l'aumento dell'espressione di CXCR3 è stato associato ad una maggiore quantità di stroma tumorale¹⁴⁸. In questo ultimo lavoro non è stata valutata alcuna correlazione con l'esito clinico della neoplasia. La nostra strategia è stata dunque in grado di individuare un fattore la cui espressione risulta elevata negli adenocarcinomi pancreatici nell'uomo e che, data la povertà di dati in letteratura, necessita di una maggiore indagine sul ruolo prognostico.

Per quanto riguarda CCR5, ciò che è stato descritto per il tumore pancreatico è il ruolo dell'asse CCL5/CCR5 nell'interazione con il sistema immunitario: RANTES è secreto da parte delle cellule tumorali ed è in grado di reclutare le CD4+CD25+Foxp3+ cellule T regolatorie (Tregs) che esprimono CCR5; la presenza delle Tregs nei tumori pancreatici è dimostrata e supporta la progressione tumorale sopprimendo la risposta immunitaria contro il tumore stesso. Nel medesimo studio non è stata rilevata l'espressione in immunofluorescenza di CCR5 in PDAC ma il limite di questo studio sta nel fatto che sono stati analizzati solo 6 pazienti e l'unica immagine, presentata nell'articolo, mostra una positività per CCR5 anche su altri tipi cellulari, differenti dalle Tregs, e non identificati¹⁴⁹. I nostri dati, anche nel nostro caso da soli 6 pazienti, sono stati ottenuti con una metodica differente e molto sensibile (citometria a flusso) e sono la prima evidenza di questa possibile espressione, che non appare diffusa ma ristretta ad una piccola popolazione dei dotti trasformati (mediana attorno al 12%).

Pertanto nessun lavoro ben documentato è stato ancora pubblicato sull'espressione di CCR5 nei tumori pancreatici. L'espressione di CCR5 è stata già descritta in altre neoplasie come il carcinoma della mammella sottotipo basale e HER2-positivo¹⁵⁰ e il carcinoma

prostatico¹⁵¹ ed è associata ad una maggiore capacità di metastatizzazione delle linee cellulari: solo per il carcinoma prostatico è stata documentata la presenza di una segnalazione autocrina CCL5/CCR5 che sostiene la proliferazione tumorale. I pazienti con carcinomi gastrici che esprimono CCR5 hanno una minore sopravvivenza¹⁵².

Se l'espressione di CCR5 e CXCR3 fosse confermata su larga scala e fosse correlata ad una prognosi peggiore, i due recettori potrebbero diventare i bersagli molecolari di una terapia farmacologica adiuvante sperimentale per i PDAC esprimenti CCR5 e CXCR3. Il Maraviroc, prodotto dalla Pzifer's e approvato da FDA, è un antagonista del CCR5 in grado di bloccare la via di segnalazione dell'asse ligando/recettore ed è stato studiato per la terapia anti HIV poiché è in grado di impedire l'entrata nelle cellule T CD4 al virus dell'HIV-1 CCR5-tropico. Nei tumori gastrici il trattamento con Maraviroc inibisce la proliferazione e la mobilità di linee immortalizzate *in vitro*, riduce la massa tumorale e attenua la disseminazione sistemica peritoneale e aumenta la sopravvivenza nel modello murino di xenotrapianto¹⁵³. Per CXCR3 non esistono attualmente farmaci approvati ma solo in fase sperimentale¹⁵⁴.

Abbiamo quindi dimostrato che sia i recettori CCR5 e CXCR3 che i loro ligandi sono espressi da linee cellulari di PDAC. Entrambi i recettori sono presenti sul tessuto tumorale e non sui dotti pancreatici sani: per il CCR5 si tratta della prima evidenza descritta. Da indagare sarà la rilevanza di questa espressione sulla prognosi post-operatoria. L'esistenza di un *loop* autocrino di sostenimento della progressione tumorale mediato dall'asse chemochina/recettore dovrà essere esplorata nelle linee cellulari prima e nell'uomo poi.

Al fine di supportare tutti i risultati di espressione qui discussi e di confermare il loro legame con i risultati clinici stiamo ora realizzando un tissue microarray di resezioni chirurgiche di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale. Il TMA sarà costituito sia da sezioni di tessuti neoplastici che della controparte sana. Si tratta di un s-TMA, ovvero un tissue microarray "di sopravvivenza"¹⁵⁵, composto da due gruppi dicotomici di soggetti che differiscono appunto per il tempo di sopravvivenza: ad un primo gruppo (n=50) appartengono quei pazienti che hanno avuto una sopravvivenza inferiore ad un anno dalla chirurgia; al secondo sottogruppo (n=50) appartengono i pazienti che sono sopravvissuti per un tempo maggiore di 2 anni. I due sottogruppi sono confrontabili in termini di età, sesso, stadiazione TNM e grading. Lo scopo di avere un s-TMA è quello di potenziare al massimo l'analisi nell'identificare marcatori prognostici associati alla biologia del tumore piuttosto che al trattamento curativo ricevuto. Questo s-TMA verrà utilizzato per la valutazione dell'espressione proteica di PDX1, PAX6, KRT19, CCR5 e CXCR3.

7. Conclusioni

La strategia di screening descritta in questa tesi si è dimostrata in grado di identificare potenziali marcatori prognostici per l'adenocarcinoma duttale pancreatico. Non è stato possibile validare tutti i fattori di rischio e protettivi emersi dall'analisi statistica inter-linea ma ci proponiamo di fare questo in futuro.

Il limite principale dello studio è l'assenza di una validazione meccanicistica, che motivi il valore predittivo di un determinato marcatore, validazione che, data la molteplicità dei dati analizzati, non è stato ancora possibile eseguire.

Il nostro studio è nato come uno studio di tipo esplorativo allo scopo di fornire un numero cospicuo di putativi biomarcatori validabili direttamente in ambito clinico: abbiamo raggiunto questo obiettivo e alcuni di essi si sono rivelati in grado di individuare sottogruppi di pazienti ad alto rischio di progressione già al momento della resezione chirurgica.

Punto di forza da sottolineare è la possibilità di applicare il modello statistico utilizzato e rivelatosi appropriato a qualunque altro nuovo marcatore biologico che si voglia testare. Infatti, caratterizzata la sua espressione sulle diciassette linee cellulari si procederà con l'analisi inter-linea per verificare se la sua espressione correli con almeno una delle caratteristiche di aggressività tumorale analizzate *in vitro* o *in vivo*; quindi si potrà confermare il suo reale ruolo diagnostico, prognostico o predittivo in una casistica prospettica o retrospettiva di pazienti affetti da PDAC utilizzando di volta in volta la più opportuna tecnica di indagine.

8. Bibliografia

- 1 Silbernagl, S. Fisiologia. Casa Editrice Ambrosiana. (2002).
- 2 Longnecker, D. The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base. (2014).
- 3 Molinaro, M., Rizzoli, C., Siracusa, G. & Stefanini, M. Istologia di V.Monesi. Casa Editrice Piccin. (1998).
- 4 Castano, P., Donato, R. Anatomia dell'uomo. Casa editrice Edi-Ermes (2004).
- 5 Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897-909 (2002).
- 6 Hidalgo, M. Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **362**, 1605-1617 (2010).
- 7 Associazione Italiana di Oncologica medica. I numeri del cancro in Italia. Intermedia Editore. (2013).
- 8 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **61**, 69-90 (2011).
- 9 Ryan, D. P. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **371**, 1039-1049 (2014).
- 10 Feig, C. *et al.* The Pancreas Cancer Microenvironment. *Clinical Cancer Research* **18**, 4266-4276 (2012).
- 11 Berrino, F. *et al.* Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EURO CARE-4 study. *The Lancet Oncology* **8**, 773-783 (2007).
- 12 Malvezzi, M. *et al.* European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology* **25**, 1650-1656, (2014).
- 13 Associazione Italiana di Oncologica medica. I numeri del cancro in Italia. Intermedia Editore (2014).
- 14 Hamilton Stanley R. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC, Lyon (2000).
- 15 Associazione Italiana Oncologia Medica. Linee guida. Carcinoma del pancreas esocrino (2013).
- 16 Solcia E, Kloppel G. Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the pancreas. (1997).
- 17 Kloppel, G. Clinical pathology of exocrine tumors 467-479. Williams & Wilkins. (1998).
- 18 Kloppel, G. *et al.* Ductal Adenocarcinoma of the Head of the Pancreas: Incidence of Tumor Involvement Beyond the Whipple Resection Line. Histological and Immunocytochemical Analysis of 37 Total Pancreatectomy Specimens. *Pancreas* **2**, 170-175 (1987).
- 19 Pliam, MB. *et al.* Further evaluation of total pancreatectomy. *Arch Surg* **110**, 506-512 (1975).
- 20 VanHeerden, J. Pancreatic resection for the carcinoma of the pancreas: Whipple versus total pancreatectomy- an institutional prospective. *World J Surg* **8**, 880-888 (1984).
- 21 Kayahara, M. *et al.* Lymphatic flow in carcinoma of the head of the pancreas. *Cancer* **70**, 2061-2066 (1992).
- 22 Kloppel, G. *et al.* Histological typing of tumors of the exocrine pancreas 2nd Edition, Springer (1996).
- 23 Edge, B. AJCC Cancer Staging Handbook. Springer (2010).

- 24 Sobin, L.H., Gospodarowicz M. K., Wittekind, C. TNM Classification of Malignant Tumours
7th Edition. Wiley-Blackwell (2009).
- 25 Li, D. *et al.* Pancreatic cancer. *The Lancet* **363**, 1049-1057 (2004).
- 26 Landi, S. Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review
of the literature. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **681**, 299-307 (2009).
- 27 Jacobs, E. J. *et al.* Family history of cancer and risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis
from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *International journal of cancer*.
Journal international du cancer **127**, 1421-1428 (2010).
- 28 Becker, A. E. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection.
World J Gastroenterol **20**, 11182-11198 (2014).
- 29 Goldstein, A. *et al.* Prospective risk of cancer in CDKN2A germline mutation carriers.
Journal of Medical Genetics **41**, 421-424 (2004).
- 30 Lim, W. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers.
Gastroenterology **126**, 1788-1794 (2004).
- 31 LaRusch, J. & Whitcomb, D. C. Genetics of pancreatitis. *Current Opinion in*
Gastroenterology **27**, 467-474 (2011).
- 32 Finch, MD. *et al.* Hereditary pancreatitis and familial pancreatic cancer. **58**, 564-569 (1997).
- 33 Weiss, F. U. Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis. *Frontiers in Physiology* **5**
(2014).
- 34 Maisonneuve, P., Marshall, B. C. & Lowenfels, A. B. Risk of pancreatic cancer in patients
with cystic fibrosis. *Gut* **56**, 1327-1328 (2007).
- 35 Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of
meta-analytical studies. *International Journal of Epidemiology* (2014).
- 36 Wolpin, B. M. *et al.* ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. *Journal of the*
National Cancer Institute **101**, 424-431 (2009).
- 37 Bansal, P. & Sonnenberg, A. Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer.
Gastroenterology **109**, 247-251 (1995).
- 38 Raimondi, S. *et al.* Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early
detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **24**, 349-358 (2010).
- 39 Li, D. *et al.* Body Mass Index and Risk, Age of Onset, and Survival in Patients With
Pancreatic Cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **301**, 2553-2562
(2009).
- 40 Luo, J. *et al.* Obesity and risk of pancreatic cancer among postmenopausal women: the
Women's Health Initiative (United States). *Br J Cancer* **99**, 527-531 (2008).
- 41 Stolzenberg-Solomon, R. Z. *et al.* Adiposity, Physical Activity, and Pancreatic Cancer in the
National Institutes of Health–AARP Diet and Health Cohort. *American Journal of*
Epidemiology **167**, 586-597 (2008).
- 42 Larsson, S. C. *et al.* Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of
prospective studies. *International Journal of Cancer* **120**, 1993-1998 (2007).
- 43 Cui, Y. & Andersen, D. K. Diabetes and pancreatic cancer. *Endocrine-Related Cancer* **19**, F9-
F26 (2012).
- 44 Michaud, D. S. *et al.* Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer.
JAMA **286**, 921-929 (2001).
- 45 Sah, R. P. *et al.* New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes. *Nat Rev*
Gastroenterol Hepatol **10**, 423-433 (2013).
- 46 Everhart, J. & Wright, D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: A meta-
analysis. *JAMA* **273**, 1605-1609 (1995).

- 47 Inoue, M. *et al.* Diabetes mellitus and the risk of cancer: Results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Archives of Internal Medicine* **166**, 1871-1877 (2006).
- 48 Huxley, R. *et al.* Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* **92**, 2076-2083 (2005).
- 49 Ben, Q. *et al.* Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer* **47**, 1928-1937 (2011).
- 50 Li, D. *et al.* Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis of three large case-control studies. *Cancer Causes Control* **22**, 189-197 (2011).
- 51 Fokas, E. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1855**, 61-82 (2015).
- 52 Giovinazzo, F. *et al.* Clinical implications of biological markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgical Oncology* **21**, e171-e182 (2012).
- 53 Hruban, R. H. *et al.* Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **6**, 2969-2972 (2000).
- 54 Schutte, M. *et al.* Abrogation of the Rb/p16 Tumor-suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas. *Cancer Research* **57**, 3126-3130 (1997).
- 55 Redston, M. S. *et al.* p53 Mutations in Pancreatic Carcinoma and Evidence of Common Involvement of Homocopolymer Tracts in DNA Microdeletions. *Cancer Research* **54**, 3025-3033 (1994).
- 56 Xia, X. *et al.* SMAD4 and its role in pancreatic cancer. *Tumor Biol.*, 1-9 (2014).
- 57 Van Heek, N. T. *et al.* Telomere Shortening Is Nearly Universal in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *The American Journal of Pathology* **161**, 1541-1547, (2002).
- 58 Hruban, R. H. *et al.* An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology* **28**, 977-987 (2004).
- 59 Brat, D. J. *et al.* Progression of Pancreatic Intraductal Neoplasias to Infiltrating Adenocarcinoma of the Pancreas. *The American Journal of Surgical Pathology* **22**, 163-169 (1998).
- 60 Maitra, A. *et al.* Precursors to Invasive Pancreatic Cancer. *Advances in Anatomic Pathology* **12**, 81-91 (2005).
- 61 Kelsen, D. P. *et al.* Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. *Surgery* **122**, 53-59 (1997).
- 62 Pelaez-Luna, M. *et al.* Resectability of Presymptomatic Pancreatic Cancer and Its Relationship to Onset of Diabetes: A Retrospective Review of CT Scans and Fasting Glucose Values Prior to Diagnosis. *Am J Gastroenterol* **102**, 2157-2163 (2007).
- 63 Holly, E. A. *et al.* Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2**, 510-517 (2004).
- 64 Chow, W.H. *et al.* Risk of Pancreatic Cancer Following Diabetes Mellitus: a Nationwide Cohort Study in Sweden. *Journal of the National Cancer Institute* **87**, 930-931 (1995).
- 65 Chari, S. T. *et al.* Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study. *Gastroenterology* **129**, 504-511 (2005).
- 66 Chari, S. T. *et al.* Pancreatic Cancer-Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology* **134**, 95-101 (2008).
- 67 Balzano, G. *et al.* Clinical signature and pathogenetic factors of diabetes associated with pancreas disease (T3cDM): a prospective observational study in surgical patients. *Acta Diabetol* **51**, 801-811 (2014).

- 68 Glanemann, M. *et al.* Surgical strategies for treatment of malignant pancreatic tumors: extended, standard or local surgery? *World Journal of Surgical Oncology* **6**, 123 (2008).
- 69 Oettle, H. *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: A randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 267-277 (2007).
- 70 Neoptolemos, J. P. *et al.* A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **350**, 1200-1210 (2004).
- 71 Meta-analysis Group In Cancer, *et al.* Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* **16**, 301-308 (1998).
- 72 Burris, H. A. *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* **15**, 2403-2413 (1997).
- 73 Maringhini, A. *et al.* Clinical Presentation and Ultrasonography in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Pancreas* **8**, 146-150 (1993).
- 74 Coley, SC. *et al.* Spiral CT and the pre-operative assessment of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Radiol.* **52**, 24-30 (1997).
- 75 Horton, K. Multidetector CT and three-dimensional imaging of the pancreas: state of the art. *J Gastrointest Surg.* **6**, 126-128 (2002).
- 76 Ishiguchi, T. *et al.* CT and MR imaging of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* **48**, 923-927 (2001).
- 77 Adamek, H. E. *et al.* Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *The Lancet* **356**, 190-193 (2000).
- 78 Sandler, A. *et al.* Preoperative evaluation of pancreatic masses with positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose: diagnostic limitations. *World J Surg* **24**, 1121-1129 (2000).
- 79 Mertz, H. R., *et al.* EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointestinal Endoscopy* **52**, 367-371 (2000).
- 80 Magnani, J. L. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **426**, 122-131, (2004).
- 81 Magnani, J. L. *et al.* Identification of the Gastrointestinal and Pancreatic Cancer-associated Antigen Detected by Monoclonal Antibody 19-9 in the Sera of Patients as a Mucin. *Cancer Research* **43**, 5489-5492 (1983).
- 82 Liang, J. J. *et al.* Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **2**, 1-10 (2009).
- 83 Ferrone, C. R. *et al.* Perioperative CA19-9 Levels Can Predict Stage and Survival in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 2897-2902 (2006).
- 84 Kiliç, M. *et al.* Value of preoperative serum CA 19-9 levels in predicting resectability for pancreatic cancer. *Canadian Journal of Surgery* **49**, 241-244 (2006).
- 85 Berger, A. C. *et al.* Postresection CA 19-9 Predicts Overall Survival in Patients With Pancreatic Cancer Treated With Adjuvant Chemoradiation: A Prospective Validation by RTOG 9704. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 5918-5922 (2008).
- 86 Goonetilleke, K. S. & Siriwardena, A. K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **33**, 266-270 (2007).
- 87 Vincent, A. *et al.* Pancreatic cancer. *The Lancet* **378**, 607-620 (2011).

- 88 Bradley, E. L. I. Long-Term Survival After Pancreatoduodenectomy for Ductal Adenocarcinoma: The Emperor Has No Clothes? *Pancreas* **37**, 349-351 (2008).
- 89 Raut, C. P. *et al.* Impact of Resection Status on Pattern of Failure and Survival After Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of Surgery* **246**, 52-60 (2007).
- 90 Sohn, T. *et al.* Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg.* **4**, 567-579 (2000).
- 91 Conlon, K. C., Klimstra, D. S. & Brennan, M. F. Long-Term Survival After Curative Resection for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Clinicopathologic Analysis of 5-Year Survivors. *Annals of Surgery* **223**, 273-279 (1996).
- 92 Ishikawa, O. *et al.* Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter--collective review of Japanese case reports. *Hepatogastroenterology* **46**, 8-15 (1999).
- 93 Shimizu, Y. *et al.* Small carcinoma of the pancreas is curable: New computed tomography finding, pathological study and postoperative results from a single institute. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **20**, 1591-1594 (2005).
- 94 Furukawa, H. *et al.* Clinicopathologic features of small pancreatic adenocarcinoma. A collective study. *Cancer* **78**, 986-990 (1996).
- 95 Tsuchiya, R. *et al.* Collective review of small carcinomas of the pancreas. *Ann Surg.* **203**, 77-81 (1986).
- 96 Balzano, G. *et al.* Effect of hospital volume on outcome of pancreaticoduodenectomy in Italy. *British Journal of Surgery* **95**, 357-362 (2008).
- 97 Crane, C. H. *et al.* Phase II Trial of Cetuximab, Gemcitabine, and Oxaliplatin Followed by Chemoradiation With Cetuximab for Locally Advanced (T4) Pancreatic Adenocarcinoma: Correlation of Smad4(Dpc4) Immunostaining With Pattern of Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 3037-3043 (2011).
- 98 Iacobuzio-Donahue, C. A. *et al.* DPC4 Gene Status of the Primary Carcinoma Correlates With Patterns of Failure in Patients With Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 1806-1813 (2009).
- 99 Marengo, E. & Robotti, E. Biomarkers for pancreatic cancer: Recent achievements in proteomics and genomics through classical and multivariate statistical methods. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **20**, 13325-13342 (2014).
- 100 Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500-503 (2011).
- 101 Harsha, H. C. *et al.* A Compendium of Potential Biomarkers of Pancreatic Cancer. *PLoS Med* **6**, e1000046 (2009).
- 102 Li, C. *et al.* Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research* **67**, 1030-1037 (2007).
- 103 Hermann, P. C. *et al.* Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* **1**, 313-323 (2007).
- 104 Ouyang, H. *et al.* Immortal Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Lines with Near Normal Genotype and Phenotype. *The American Journal of Pathology* **157**, 1623-1631 (2000).
- 105 Sallusto, F. *et al.* Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European Journal of Immunology* **29**, 1617-1625 (1999).
- 106 Marchesi, F. *et al.* The Chemokine Receptor CX3CR1 Is Involved in the Neural Tropism and Malignant Behavior of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research* **68**, 9060-9069 (2008).
- 107 Nakata, B. *et al.* Chemokine Receptor CCR7 Expression Correlates with Lymph Node Metastasis in Pancreatic Cancer. *Oncology* **74**, 69-75 (2008).

- 108 Sergeant, G. *et al.* Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 580-586 (2009).
- 109 Kumar, R., Dholakia, A. & Rasheed, Z. Stem cell-directed therapies in pancreatic cancer. *Current Problems in Cancer* **37**, 280-286 (2013).
- 110 Rasheed, Z. A. *et al.* Prognostic Significance of Tumorigenic Cells With Mesenchymal Features in Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **102**, 340-351 (2010).
- 111 Habener, J. F., Kemp, D. M. & Thomas, M. K. Minireview: Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. *Endocrinology* **146**, 1025-1034 (2005).
- 112 Sordi, V. & Piemonti, L. Le cellule staminali nella terapia del diabete. *G It Diabetol Metab* **28**, 71-89 (2008).
- 113 Edlund, H. Pancreatic organogenesis [mdash] developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* **3**, 524-532 (2002).
- 114 Deer, E. L. *et al.* Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **39**, 425-435 (2010).
- 115 Monti, P. *et al.* A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile. *Virchows Arch* **445**, 236-247 (2004).
- 116 Mercalli, A. *et al.* A preclinical evaluation of pemetrexed and irinotecan combination as second-line chemotherapy in pancreatic cancer. *Br J Cancer* **96**, 1358-1367 (2007).
- 117 Marchesi, F. *et al.* Molecular Mechanisms of Pancreatic Cancer Dissemination: The Role of the Chemokine System. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 2432-2438 (2012).
- 118 Marchesi, F. *et al.* Increased Survival, Proliferation, and Migration in Metastatic Human Pancreatic Tumor Cells Expressing Functional CXCR4. *Cancer Research* **64**, 8420-8427 (2004).
- 119 Addison, C. L. *et al.* The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR+ CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity. *The Journal of Immunology* **165**, 5269-5277 (2000).
- 120 Amin, M. A. *et al.* Migration Inhibitory Factor Mediates Angiogenesis via Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol Kinase. *Circulation Research* **93**, 321-329 (2003).
- 121 Jaiswal, K. R. *et al.* Comparative testing of various pancreatic cancer stem cells results in a novel class of pancreatic-cancer-initiating cells. *Stem Cell Research* **9**, 249-260 (2012).
- 122 Samaras, S. E. *et al.* Conserved Sequences in a Tissue-Specific Regulatory Region of the pdx-1 Gene Mediate Transcription in Pancreatic β Cells: Role for Hepatocyte Nuclear Factor 3β and Pax6. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4702-4713 (2002).
- 123 Von Burstin, J. *et al.* The Pancreatic and Duodenal Homeobox Protein PDX-1 Regulates the Ductal Specific Keratin 19 through the Degradation of MEIS1 and DNA Binding. *PLoS ONE* **5**, e12311 (2010).
- 124 La Rosa, S. *et al.* Prognostic and biological significance of cytokeratin 19 in pancreatic endocrine tumours. *Histopathology* **50**, 597-606 (2007).
- 125 Jain, R. *et al.* The Use of Cytokeratin 19 (CK19) Immunohistochemistry in Lesions of the Pancreas, Gastrointestinal Tract, and Liver. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **18**, 9-15 (2010).
- 126 Uenishi, T. *et al.* Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Science* **94**, 851-857 (2003).
- 127 Yuan, C. C. *et al.* Elevated cytokeratin-19 expression associated with apoptotic resistance and malignant progression of human cervical carcinoma. *Apoptosis* **3**, 161-169, (1998).

- 128 Liu, T. *et al.* Pancreas duodenal homeobox-1 expression and significance in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **13**, 2615-2618 (2007).
- 129 Koizumi, M. *et al.* Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery* **134**, 260-266 (2003).
- 130 Ma, J. *et al.* Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX1) functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Carcinogenesis* **29**, 1327-1333 (2008).
- 131 Lang, D. *et al.* PAX6 is expressed in pancreatic adenocarcinoma and is downregulated during induction of terminal differentiation. *Molecular Carcinogenesis* **47**, 148-156 (2008).
- 132 Mayes, D. A. *et al.* PAX6 Suppresses the Invasiveness of Glioblastoma Cells and the Expression of the Matrix Metalloproteinase-2 Gene. *Cancer Research* **66**, 9809-9817 (2006).
- 133 Boucher, M.-J. *et al.* Phosphorylation Marks IPF1/PDX1 Protein for Degradation by Glycogen Synthase Kinase 3-dependent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 6395-6403 (2006).
- 134 Ohara, Y. *et al.* Histological and prognostic importance of CD44+/CD24+/EpCAM+ expression in clinical pancreatic cancer. *Cancer Science* **104**, 1127-1134 (2013).
- 135 Immervoll, H. *et al.* Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* **8**, 48 (2008).
- 136 Jaggupilli, A. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**, 11 (2012).
- 137 Wei, HJ. *et al.* Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **10**, 428-434 (2011).
- 138 Hill, R. P. Identifying Cancer Stem Cells in Solid Tumors: Case Not Proven. *Cancer Research* **66**, 1891-1896 (2006).
- 139 Aigner, S. *et al.* CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *The FASEB Journal* **12**, 1241-1251 (1998).
- 140 Lee, S. H. *et al.* CD24 and S100A4 Expression in Resectable Pancreatic Cancers With Earlier Disease Recurrence and Poor Survival. *Pancreas* **43**, 380-388 (2014).
- 141 Ikenaga, N. *et al.* Characterization of CD24 expression in intraductal papillary mucinous neoplasms and ductal carcinoma of the pancreas. *Human Pathology* **41**, 1466-1474 (2010).
- 142 Jacob, J. *et al.* Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology* **4**, 454-460 (2004).
- 143 Ma, X. *et al.* CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Molecular Cancer Therapeutics* **8**, 490-498 (2009).
- 144 Liu, C. *et al.* Chemokine receptor CXCR3 promotes growth of glioma. *Carcinogenesis* **32**, 129-137 (2011).
- 145 Zipin-Roitman, A. *et al.* CXCL10 Promotes Invasion-Related Properties in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Cancer Research* **67**, 3396-3405 (2007).
- 146 Kawada, K. *et al.* Pivotal Role of CXCR3 in Melanoma Cell Metastasis to Lymph Nodes. *Cancer Research* **64**, 4010-4017 (2004).
- 147 Park, J. *et al.* Postoperative Prognostic Predictors of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Clinical Analysis and Immunoprofile on Tissue Microarrays. *Annals of Surgical Oncology* **19**, 2664-2672 (2012).
- 148 Lunardi, S. *et al.* IP-10/CXCL10 induction in human pancreatic cancer stroma influences lymphocytes recruitment and correlates with poor survival. *Oncotarget* **5**, 11064-11080(2014).
- 149 Tan, M. C. B. *et al.* Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *The Journal of Immunology* **182**, 1746-1755 (2009).

- 150 Velasco-Velázquez, M. *et al.* CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research* **72**, 3839-3850 (2012).
- 151 Vaday, G. G. *et al.* Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *The Prostate* **66**, 124-134 (2006).
- 152 Sugasawa, H. *et al.* Prognostic significance of expression of CCL5/RANTES receptors in patients with gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* **97**, 445-450 (2008).
- 153 Mencarelli, A. *et al.* CCR5 Antagonism by Maraviroc Reduces the Potential for Gastric Cancer Cell Dissemination. *Translational Oncology* **6**, 784-793 (2013).
- 154 Mackay, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* **9**, 988-998 (2008).
- 155 Winter, J. M. *et al.* A Novel Survival-Based Tissue Microarray of Pancreatic Cancer Validates MUC1 and Mesothelin as Biomarkers. *PLoS ONE* **7**, e40157 (2012).



Un pensiero speciale è sicuramente rivolto a miei bimbi (a te Ricky che sei il mio coccolino e a Leo che ti stiamo aspettando) e a Matteo che più di ogni altro mi hanno supportato e sopportato. Questo lavoro è davvero faticoso, avete rinunciato molte volte a me e spesso mi mancano le energie per stare con voi, ma vi amo tantissimo e spero di riuscire a trovare sempre più tempo di qualità da trascorrere insieme. È una promessa per voi e per me e per la nostra famiglia.

Un grazie speciale è per i miei genitori che mi hanno sostenuto moralmente e fisicamente permettendomi di "fare tardi" molte volte sapendo che a casa Ricky era coccolato... e lo stesso pensiero è per Carla ed Elio

Un grazie speciale a tutto il laboratorio; siamo in tanti e negli anni siamo aumentati sempre di più... ma c'è una cosa speciale che spero rimanga per sempre... la voglia di andare oltre al semplice lavoro e di condividere anche ogni emozione e parte del nostro tempo di vita reale, a volte anche con un semplice racconto.

Un pensiero è rivolto anche agli amici di sempre che credono in me e nelle mie potenzialità. Ridere, divertirsi, sfogarsi, condividere, raccontare, vivere.

Grazie a Lorenzo che mi ha sempre spronato a fare di più scoprendo che non c'è limite alle possibilità quando ti spinge la curiosità o un imminente ostacolo.

Grazie alla Pro.ssa Bianchi che mi ha dato la possibilità di intraprendere questo percorso formativo.