



Università degli Studi di Pisa
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Oncologia

Tesi di Specializzazione

***Le neoplasie mucinose papillari intraduttali del pancreas:
fattori clinico-molecolari prognostici e
ruolo della chemioterapia adiuvante.***

Relatore:

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

Candidato:

Dott.ssa Sara Caponi

Anno Accademico 2010/2011

Indice

Lista delle tabelle	iii
Lista delle figure	iv
Riassunto	v
Capitolo 1. <i>Introduzione</i>	1
1.1. Trattamento del tumore del pancreas: stato dell'arte.....	1
1.1.1. Ruolo di un trattamento adiuvante nel tumore del pancreas.....	3
1.2. Fattori molecolari prognostici e predittivi nel tumore del pancreas.....	7
1.2.1. Fattori di crescita e loro recettori: <i>pathway</i> di EGFR.....	8
1.2.2. Oncogeni e geni oncosoppressori.....	9
1.2.3. Mediatori di angiogenesi: <i>pathway</i> di VEGFR.....	10
1.2.4. Regolatori di apoptosi: Bcl-2 e Bax.....	12
1.2.5. Matrice extracellulare and interazione tumore–stroma: le metalloproteinasi di matrice.....	13
1.2.6. I Micro-RNA.....	14
Capitolo 2. <i>Le Neoplasie Mucinoase Papillari Intraduttali Del Pancreas</i>	17
2.1. Le neoplasie mucinose papillari intraduttali del pancreas: definizione, descrizione e cenni di trattamento chirurgico.....	17
2.2. Outcome dei pazienti resecati per IPMN invasiva.....	20
2.3. Fattori prognostici nelle neoplasie mucinose papillari intraduttali invasive.....	21
2.4. Ruolo di un trattamento adiuvante nelle neoplasie mucinose papillari intraduttali invasive.....	23
Capitolo 3. <i>MicroRNA</i>	25
3.1. Micro RNA: definizione e caratterizzazione.....	25

3.2.	MicroRNA e tumore.....	26
3.3.	I miRNA come fattori prognostici e predittivi nel tumore del pancreas..	29
3.4.	Espressione di miRNA nelle IPMN invasive e correlazione con l’outcome clinico.....	33
Capitolo 4. <i>Le neoplasie mucinose papillari intraduttali del pancreas: fattori clinico-molecolari prognostici e ruolo della chemioterapia adiuvante</i>.....		35
4.1.	Razionale.....	35
4.2.	Materiali e metodi.....	38
4.2.1.	Selezione dei pazienti.....	38
4.2.2.	Campionamento tumorale, microdissezione laser (LMD) e estrazione dell’RNA.....	40
4.2.3.	Trascrizione inversa e analisi con RT-PCR quantitativa di miR-21, miR-155 e miR-101.....	42
4.2.4.	Analisi statistica.....	42
4.3.	Risultati.....	44
4.3.1.	Associazione tra i fattori clinico-patologici analizzati e la prognosi dei pazienti e ruolo della chemioterapia adiuvante (coorte 1)..	44
4.3.2.	Correlazione tra l’espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 e le caratteristiche cliniche e l’outcome dei pazienti (coorte 2).....	47
Capitolo 5. <i>Discussione e conclusioni</i>.....		63
5.1.	Discussione.....	63
5.2.	Conclusioni.....	67
Bibliografia.....		69

LISTA DELLE TABELLE

Tabella 4.1. Caratteristiche cliniche dei pazienti della coorte 1.....	53
Tabella 4.2. Caratteristiche dei pazienti della coorte 1 trattati e non trattati con terapia adiuvante.....	54
Tabella 4.3. Outcome dei pazienti della coorte 1 in relazione alle caratteristiche clinico-patologiche.....	55
Tabella 4.4. Fattori associati a DFS e OS all'analisi multivariata dei pazienti della coorte 1.....	56
Tabella 4.5. Caratteristiche dei pazienti della coorte 2.....	57
Tabella 4.6. Caratteristiche dei pazienti della coorte 2 affetti da IPMN invasiva.....	58
Tabella 4.7. Associazione dell'espressione di miR-21 con le covariate clinico patologiche nei pazienti della coorte 2.....	59
Tabella 4.8. Outcome dei pazienti della coorte 2 in rapporto all'espressione di miRNA.....	60
Tabella 4.9. Fattori associati a DFS e OS all'analisi multivariata dei pazienti della coorte 2.....	61
Tabella 4.10. Outcome dei pazienti della coorte 2 trattati e non trattati con terapia adiuvante in relazione all'espressione di miR-21.....	62

LISTA DELLE FIGURE

Figura 1. Esempio di estrazione di epitelio di IPMN pre-invasiva.....	41
Figura 2. Stime di Kaplan-Meier di DFS e OS in base al coinvolgimento linfonodale e al grading tumorale.....	45
Figura 3. Stime di Kaplan-Meier di DFS e OS nei pazienti N0 e N1 in base al trattamento adiuvante.....	46
Figura 4. Valori di espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 nella coorte 2 di pazienti.....	49
Figura 5. Curve di Kaplan-Meier di DFS e OS secondo l'espressione di miR-21.....	50

RIASSUNTO

Nonostante la recente definizione e la iniziale difficoltà di identificazione, le neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN) sono ormai riconosciute quali neoplasie cistiche pancreatiche relativamente comuni ma la cui gestione postoperatoria ottimale rappresenta ancora argomento dibattuto.

Abbiamo analizzato, in una casistica accuratamente selezionata di 64 pazienti affetti da IPMN invasiva, la correlazione con la prognosi dei vari fattori clinico-patologici ed il ruolo della terapia adiuvante. I nostri dati confermano che i pazienti con linfonodi negativi e le cui cellule tumorali sono bene o moderatamente differenziate presentano sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale significativamente migliori. I risultati del nostro studio supportano inoltre l'efficacia di una chemioterapia a base di gemcitabina nel setting adiuvante per i pazienti affetti da IPMN invasiva. Il ruolo prognostico del coinvolgimento linfonodale e dell'aver eseguito una terapia adiuvante è stato inoltre confermato all'analisi multivariata.

In assenza di dati di letteratura atti ad indagare il ruolo prognostico di eventuali marcatori biomolecolari in questo tipo di patologia, il nostro studio si è posto anche l'obiettivo di indagare l'espressione e il contributo prognostico di tre miRNA candidati (miR-21, miR-155 e miR-101) in pazienti resecati per IPMN invasiva di cui fosse disponibile ed adeguato il materiale istologico.

I miRNA sono stati infatti recentemente designati quali regolatori cardine dell'espressione genica, con la potenzialità di spiegare il divario che spesso esiste tra genotipo e fenotipo tumorale.

Nel nostro studio l'espressione miR-21 emerge come fattore costantemente e significativamente associato con la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale di questi pazienti, confermandosi come fattore prognostico indipendente all'analisi multivariata. Inoltre, abbiamo osservato iper-espressione di miR-21 e miR-155 e ipo-espressione di miR-101 nelle IPMN invasive rispetto alle IPMN non-invasive rispetto al tessuto pancreatico sano suggerendo che l'alterata espressione di questi miRNA sia correlata con la progressione dalle lesioni benigne alle IPMN invasive.

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1. Trattamento del tumore del pancreas: stato dell'arte

Il carcinoma pancreatico rappresenta la quarta causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali con oltre 250.000 nuovi casi e decessi all'anno nel mondo di cui 8.000 in Italia, dove causa più del 5% dei decessi tumore-correlati, con un'incidenza e una mortalità che permangono in aumento in entrambi i sessi (1-3). Negli Stati Uniti ha raggiunto il secondo posto per incidenza e mortalità tra le neoplasie gastroenteriche, dopo le neoplasie del colon retto (1). Il carcinoma del pancreas rappresenta una malattia altamente letale con una mortalità che approssima l'incidenza della patologia; la probabilità di sopravvivenza a 5 anni si attesta infatti intorno al 3-4% e mostra solo lievissimi miglioramenti negli ultimi decenni (4). Le cause di questa elevata letalità sono da ricercarsi in una malattia biologicamente molto aggressiva, nella diagnosi tardiva e nella resistenza ai trattamenti attualmente disponibili (5).

Al momento della diagnosi circa il 50% dei pazienti con carcinoma del pancreas presenta una malattia metastatica; le sedi più frequenti di diffusione della malattia sono il fegato e il peritoneo, seguiti da polmone e linfonodi extra-regionali. Per questi pazienti l'unica terapia capace di prolungare l'aspettativa di vita è un trattamento medico chemioterapico che attualmente permette di ottenere una sopravvivenza mediana prossima a 12 mesi (6).

Il 20-30% dei pazienti con carcinoma pancreatico presenta invece, alla diagnosi, una malattia localmente avanzata prevalentemente per infiltrazione extrapancreatica loco-

regionale con coinvolgimento dei tessuti retroperitoneali, dei vasi venosi e arteriosi della regione, delle stazioni linfonodali e degli organi vicini. La migliore terapia per questi pazienti è rappresentata da un approccio combinato che possa includere un trattamento chemioterapico seguito da chirurgia o chemio-radioterapia. Anche per questi pazienti la prognosi non è buona con una sopravvivenza mediana compresa tra 1 e 2 anni (6).

Solo nel restante 15-20% dei pazienti la malattia si manifesta, invece, come localizzata a livello del pancreas e suscettibile di resezione chirurgica; per questi pazienti la chirurgia resettiva rappresenta la migliore opzione di trattamento sebbene anche in caso di resezione radicale della neoplasia, vi sia un elevato rischio di recidiva che sia attestata intorno all'80%, con una sopravvivenza mediana dei pazienti resecati che si attesta intorno ai 2 anni e una percentuale di pazienti viva a 5 anni dall'intervento intorno al 20% (6,7). Al fine di migliorare l'outcome dei pazienti operati per tumore pancreatico e sulla base di alcuni trial clinici recentemente condotti, un trattamento chemioterapico eventualmente associato a radioterapia è solitamente proposto nel setting adiuvante.

La forma più comune di tumore pancreatico è l'adenocarcinoma duttale ma recentemente sono state identificate e definite più rare forme istologiche. Tra queste le neoplasie mucinose papillari intraduttali invasive (IPMN) presentano una incidenza in continuo aumento e sembrano avere un andamento clinico generalmente più indolente. L'iniziale difficoltà nella definizione e diagnosi di questi tipi istologici ha limitato la conduzione di studi *ad hoc* e pazienti affetti da IPMN invasiva sono stati probabilmente inclusi, in passato, negli studi clinici condotti in pazienti affetti da adenocarcinoma duttale.

Nei capitoli successivi saranno discussi i dati attualmente disponibili a supporto di un trattamento adiuvante nel tumore pancreatico e sarà rivisto il ruolo dei biomarcatori prognostici e predittivi che possano ad oggi essere di aiuto al clinico nel definire un algoritmo di trattamento personalizzato.

1.1.1. Ruolo di un trattamento adiuvante nel tumore del pancreas

L'elevato rischio di recidiva sia loco-regionale che con metastasi a distanza, dopo chirurgia resettiva anche radicale per adenocarcinoma pancreatico, ha portato a valutare, sia tramite l'analisi di casistiche retrospettive (8-11), che con studi clinici randomizzati (12-17), l'utilità dell'impiego di una chemioterapia sistemica e/o di una radioterapia loco-regionale postoperatoria a scopo adiuvante.

Il primo studio che ha dimostrato un possibile ruolo per un trattamento adiuvante è stato uno studio del *Gastrointestinal Tumor Study Group* (GITSG) pubblicato nel 1985 che ha arruolato, in circa 8 anni, poco più di 40 pazienti randomizzandoli a sola osservazione dopo la chirurgia o a ricevere chemio-radioterapia postoperatoria (40 Gy) concomitante a 5-fluorouracile somministrato in bolo alla dose di 500 mg/m² al giorno per i primi 3 giorni di ogni ciclo di radioterapia) seguita da 2 anni di mantenimento con chemioterapia esclusiva sempre con fluorouracile (500 mg/m² al giorno settimanalmente). Lo studio, sebbene non abbia completato l'arruolamento previsto, ha mostrato un incremento della sopravvivenza nei pazienti che ricevevano chemio-radioterapia adiuvante verso la sola osservazione (21 mesi di sopravvivenza mediana verso 10.9 mesi, con circa il 19% vs il 5% di pazienti vivi a 5 anni) (12). Dopo che lo studio è stato chiuso, ulteriori 32 pazienti sono stati candidati a ricevere il trattamento combinato e un successivo report ha confermato il beneficio in sopravvivenza ponendo le basi per gli studi futuri (18).

Riconoscendo alcuni dei limiti dello studio GITSG (il lungo tempo di accrual, il limitato numero di pazienti, l'uso del 5-fluorouracile in bolo), l'*European Organization for the Research and Treatment of Cancer* (EORTC) ha condotto negli anni '90 uno studio per verificarne i risultati. Oltre 200 pazienti con neoplasie periampollari sono stati randomizzati a ricevere chemio-radioterapia con 5-fluorouracile (alla dose di 25 mg/kg al

giorno in infusione continua; non era invece prevista una successiva chemioterapia di mantenimento) o sola osservazione dopo intervento chirurgico; 114 di questi pazienti avevano una adenocarcinoma della testa del pancreas (13). Anche se è stato evidenziato un trend verso un miglioramento nell'outcome nei pazienti che hanno ricevuto terapia adiuvante, la differenza non è risultata statisticamente significativa (con tasso di sopravvivenza a 2 anni del 34% vs 26% per il braccio sperimentale e per quello di controllo, rispettivamente, $p=0.099$). I risultati dello studio, sebbene inizialmente interpretati negativamente, ad una analisi statistica più attenta confermano il vantaggio in sopravvivenza dall'aver ricevuto il trattamento (19).

Sebbene negli stessi anni siano stati presentati altri piccoli studi randomizzati o serie retrospettive di confronto atti a valutare il ruolo di una chemioterapia esclusiva rispetto alla sola osservazione (20,21), il primo grande studio in questo ambito è stato presentato solo agli inizi degli anni 2000: lo studio è stato il risultato di uno sforzo internazionale europeo (*European Study Group for Pancreatic Cancer, ESPAC*) che ha consentito di arruolare quasi 300 pazienti randomizzati in 4 bracci di trattamento a ricevere sola osservazione, sola chemioterapia adiuvante con 5-fluorouracile (somministrato in bolo) per 6 mesi, sola chemio-radioterapia adiuvante o chemio-radioterapia adiuvante seguita da chemioterapia con 5-fluorouracile per 6 mesi (14,22). Lo studio ESPAC-1 ha confermato il ruolo della chemioterapia adiuvante nel prolungare la sopravvivenza di pazienti sottoposti a resezione chirurgica di tumori del pancreas mentre ha messo in dubbio il ruolo della radioterapia. La sopravvivenza mediana dei pazienti che hanno ricevuto radioterapia è stata infatti 15.9 mesi, rispetto ai 17.9 mesi dei pazienti che non la hanno ricevuta e la sopravvivenza mediana dei pazienti che hanno ricevuto chemioterapia è stata di 20.1 mesi, rispetto ai 15.5 mesi dei pazienti che non la hanno ricevuta; tale vantaggio si conferma anche con un 13% di sopravvivenza a 5 anni in più con la chemioterapia adiuvante (21% vs 8% con sola osservazione). Sebbene lo

studio ESPAC-1 sia stato molto criticato per alcuni problemi tecnici e metodologici, esso è stato il primo studio a sancire il ruolo della chemioterapia esclusiva come trattamento adiuvante dopo pancreasectomia per carcinoma del pancreas.

I risultati di questo studio sono stati poi rafforzati da una metanalisi della letteratura che, pur arruolando quasi 1000 pazienti, non ha mostrato nessuna differenza significativa nel rischio di morte tra i pazienti sottoposti a sola osservazione e i pazienti che hanno ricevuto chemioradioterapia (hazard ratio [HR] 1.09; $p=0.43$), mentre una significativa diminuzione del rischio di morte è stata osservata per i pazienti sottoposti a chemioterapia (HR 0.75; $p=0.001$) con una sopravvivenza mediana vicina ai 20 mesi e una sopravvivenza a 5 anni intorno al 20% per i pazienti trattati (23).

Questi risultati hanno portato molti oncologi a concludere che la chemioterapia adiuvante è efficace in pazienti con tumore del pancreas mentre l'utilità dell'aggiunta di trattamento radioterapico alla chemioterapia adiuvante rimane una questione controversa.

Un altro studio europeo, condotto dalla *German Charite' Onkologie* (CONKO-001), è stato disegnato allo scopo di confermare il ruolo della chemioterapia adiuvante in questi pazienti. Oltre 350 pazienti sono stati randomizzati a ricevere sola osservazione dopo la chirurgia o un trattamento chemioterapico con gemcitabina (alla dose di 1000 mg/m² ai giorni 1, 8 e 15 ogni 28 giorni). I risultati dello studio evidenziano un raddoppiamento nella sopravvivenza mediana libera da progressione con la chemioterapia (13.4 verso 6.9 mesi, $p<0.001$) e un prolungamento anche della sopravvivenza globale con un raddoppiamento della percentuale di pazienti vivi a 5 anni dall'intervento (sopravvivenza mediana 22.8 vs 20.2 mesi; pazienti vivi a 5 anni 22.5% vs 11.5%, $p=0.06$) (15).

A supporto dell'utilizzo della gemcitabina nel trattamento adiuvante nel tumore del pancreas e a sostegno delle conclusioni dei dati positivi dell'ESPAC e del CONKO-001, sono stati condotti altri 2 studi randomizzati che hanno confrontato una

chemioterapia adiuvante con gemcitabina verso 5-fluorouracile. Lo studio ESPAC-3 (16) prevedeva un confronto diretto tra i due agenti chemioterapici mentre nello studio RTOG-9704 (17) i pazienti erano randomizzati a ricevere uno dei due trattamenti chemioterapici prima e dopo un periodo di chemio-radioterapia con fluorouracile. I due studi, che hanno arruolato nel complesso oltre 1500 pazienti hanno evidenziato una uguale efficacia tra gemcitabina e 5-fluorouracile con un differente profilo di tossicità a vantaggio della gemcitabina per minori effetti tossici gastrointestinali. Non è stato invece possibile, nuovamente, trarre conclusioni riguardo all'utilità di un trattamento chemioradioterapico essendo questo non previsto nell'ESPAC 3 e incluso in entrambi i bracci di trattamento nell' RTOG-9704.

Lo standard di trattamento varia anche a seconda della sponda dell'Atlantico in cui ci si trova: l'approccio europeo, sottolineando i risultati degli studi EORTC e ESPAC-1, non comprende radioterapia riservandola a quei pazienti con resezione non radicale; nel Nord America l'approccio sottolinea invece l'elevato rischio di recidiva locale e il potenziale beneficio di un trattamento radiante.

Le linee guida NCCN offrono come condivisibili una varietà di approcci tra cui un trattamento chemioterapico sistemico esclusivo con farmaci quali la gemcitabina, il 5-fluorouracile, la capecitabina o un trattamento con gemcitabina seguito da un trattamento combinato chemio-radioterapico a base di 5-fluorouracile. L'arruolamento in un trial clinico è considerato comunque l'opzione preferibile (24).

1.2. Fattori molecolari prognostici e predittivi nel tumore del pancreas

A causa della singolare aggressività biologica, nonostante i molti sforzi, ancora oggi il trattamento medico del carcinoma pancreatico permette di ottenere risultati limitati, con una percentuale di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti resecati e sottoposti a chemioterapia adiuvante che si attesta intorno al 20% (14,15).

La sopravvivenza dopo resezione è in gran parte determinata da fattori anatomo-patologici connessi al tumore che ne riflettono l'aggressività: le dimensioni della neoplasia, il grado istologico di differenziazione, lo stato linfonodale e il coinvolgimento dei margini di resezione chirurgici sono tra i fattori prognostici più importanti e maggiormente validati (25).

Tuttavia, a parità di caratteristiche cliniche e patologiche, alcuni pazienti presentano malattia sensibilmente più indolente, a più lenta progressione o maggiormente responsiva ai trattamenti proposti. Una migliore comprensione del profilo molecolare della neoplasia potrebbe consentire una valutazione prognostica più accurata: la variabilità genetica individuale in geni chiave coinvolti nella genesi e proliferazione tumorale (presente come mutazioni somatiche o polimorfismi genici) oppure differenze nel pattern di espressione genica o epigenetica a livello tumorale potrebbero essere alla base delle osservate discrepanze prognostiche inter-individuali. Nella pianificazione dell'iter terapeutico, appare infatti importante cercare degli strumenti che possano guidare il clinico verso una migliore selezione dello specifico trattamento da proporre al singolo paziente e verso una migliore selezione dei pazienti cui proporre o meno un trattamento in modo da aumentare le probabilità di risposta al trattamento stesso, evitare terapie inutili a pazienti a miglior prognosi e candidare piuttosto pazienti a prognosi più infausta a trattamenti più aggressivi.

Le principali aree di interesse nello studio di fattori biomolecolari che possano rivestire un ruolo prognostico nel carcinoma pancreatico sono di seguito elencati.

1.2.1. Fattori di crescita e loro recettori: *pathway* di EGFR

Il recettore per il fattore di crescita endoteliale (EGFR o HER-1), codificato dal proto-oncogene *c-erbB1*, è un recettore tirosin-chinasico di membrana, membro della famiglia ErbB che include altri tre recettori (HER-2 o *c-erbB2*, HER-3 o *c-erbB3* e HER-4 o *c-ErbB4*). È costituito da tre regioni: un dominio extracellulare con i siti di attacco per i ligandi; un dominio transmembrana; una parte intracellulare con attività tirosin-chinasica, responsabile dell'attivazione di varie cascate di segnale. L'attivazione del recettore può avvenire con un meccanismo ligando-dipendente o indipendente. Molti ligandi possono attivare EGFR, come amfiregulina, epiregulina, EGF, TGF- α , betacellulina e HB-EGF. Indipendentemente dal meccanismo che la ha causata, l'attivazione di EGFR comporta trasmissione di un segnale intracellulare attraverso diverse vie: RAS-RAF-MAPK, PI3K/AKT, fosfolipasi C, SRC chinasi, STAT. Nel loro insieme queste cascate sono cruciali nel controllare la crescita cellulare, l'apoptosi, la proliferazione, la migrazione cellulare e l'angiogenesi: tutti meccanismi chiave nel conferire un fenotipo maligno alla cellula (26-28). EGFR è iperespresso in circa il 70% dei carcinomi del pancreas ma, mentre mutazioni nei geni implicati nella cascata del segnale di EGFR, in particolare di *K-ras*, sono estremamente frequenti e conferiscono una prognosi peggiore in pazienti con carcinoma del pancreas sia in stadio precoce che avanzato (29), il ruolo prognostico dell'espressione di EGFR è tuttora poco chiaro (30,31).

In considerazione della dimostrata efficacia di terapie anti-EGFR in associazione alla chemioterapia in pazienti con tumore del pancreas metastatico (32) maggiori informazioni sul ruolo prognostico di EGFR e su eventuali fattori predittivi per l'attività e l'efficacia di queste terapie sono fortemente attese per migliorare l'utilizzo di terapie costose che, usate senza selezionare i pazienti, non comportano importanti vantaggi. Infatti, in considerazione del limitato beneficio dimostrato, l'Agenzia Italiana per il Farmaco (AIFA) non ha riconosciuto la rimborsabilità per erlotinib nell'indicazione di trattamento nel carcinoma pancreatico suggerendo la ricerca di fattori bio-molecolari che permettano una selezione dei pazienti da trattare. Ad oggi, tuttavia, non sono stati identificati fattori rilevanti ed è stato escluso un possibile ruolo come fattori predittivi di risposta, delle mutazioni di *K-ras* e del numero di copie del gene *EGFR* in questa patologia (33).

1.2.2. Oncogeni e geni oncosoppressori

- *K-ras*

Come anticipato, mutazioni nei geni implicati nella cascata del segnale di EGFR, in particolare dell'oncogene *K-ras*, sono estremamente frequenti (34). La famiglia di oncogeni *ras* codificano per proteine con attività GTP-asi che agiscono come interruttori nella trasduzione del segnale. La presenza di mutazioni di *K-ras*, che riguardano più frequentemente il codone 12, conferiscono una prognosi peggiore in pazienti con carcinoma del pancreas, sia in stadio precoce che avanzato (29).

- p53

Il gene oncosoppressore *Tp53*, e la proteina p53 da esso codificata, rappresentano probabilmente i marcatori più estensivamente studiati quali fattori prognostici o predittivi in pazienti affetti da tumore del pancreas. La proteina p53 regola il ciclo cellulare nella fase di transizione G1/S e svolge un ruolo chiave nell'indurre la morte cellulare programmata in risposta a gravi danni al DNA cellulare. Nei vari studi emerge un notevole grado di eterogeneità riguardo alla associazione tra l'espressione di p53 e la sopravvivenza. In una recente metanalisi di 17 studi è emerso globalmente un trend verso una peggior prognosi nei pazienti che presentano iperpressione di p53 (30,35).

- p16

Il gene oncosoppressore *p16 (CDKN2A)* svolge un ruolo chiave nella carcinogenesi pancreatica (36). La proteina p16 svolge un ruolo di checkpoint del ciclo cellulare e, legandosi a chinasi ciclina-dipendenti, determina arresto del ciclo cellulare nella fase G1/S. La possibilità che la positività di p16 all'immunoistochimica rappresenti un fattore correlato a prognosi favorevole è pertanto coerente con la sua funzione di onco-soppressore. Tuttavia, il numero di studi condotti a tal proposito, in pazienti affetti da tumore del pancreas è limitato; l'utilizzo dell'espressione di p16 come marcatore prognostico nel tumore del pancreas deve dunque essere ancora validato (30,37).

1.2.3. Mediatori di angiogenesi: *pathway* di VEGFR

Anche il recettore per il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR) è un recettore di membrana. Il legame di VEGFR ad uno dei suoi quattro ligandi (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D), determina l'attivazione della sua attività tirosino-

chinasica con l'avvio di varie cascate di segnale. In particolare VEGF-A (solitamente chiamato semplicemente VEGF) media le proprietà pro-angiogeniche chiave del recettore stimolando la proliferazione e migrazione di cellule endoteliali e aumentando la permeabilità vascolare (38,39); VEGF-C e VEGF-D sarebbero invece implicati nel processo di linfangiogenesi (40), mentre la funzione di VEGF-B non è ancora completamente chiara (41). L'impatto critico dell'angiogenesi nella progressione di malattia nei tumori solidi è inizialmente emerso in dati preclinici (42) e confermato dai risultati di studi clinici che hanno dimostrato, negli ultimi anni, un effetto terapeutico di un trattamento anti-angiogenico in pazienti con tumore del colon-retto (43) e del polmone non a piccole cellule (44). Il ruolo della angiogenesi nella progressione di malattia in pazienti affetti da tumore del pancreas, tuttavia, è rimasto meno chiaro, così come la potenziale efficacia di un trattamento antiangiogenico in questi pazienti (45,46). I tumori pancreatici non sono tumori con una abbondante vascolarizzazione; sono piuttosto caratterizzati da una reazione densa stromale che è poi alla base dell'aggressività locale della neoplasia (47). Curiosamente, però, le neoplasie pancreatiche mostrano una forte iperespressione di molecole angiogeniche e, in un recente report, livelli circolanti di alcune citochine angiogeniche (VEGF, PDGF-AA, Ang-1 e EGF) correlano con la prognosi dei pazienti dopo resezione chirurgica di carcinoma pancreatico (48). Anche in una recente metanalisi l'iperespressione di VEGF all'immunoistochimica è emersa come marcatore maggiormente indicativo di prognosi sfavorevole in pazienti con tumore del pancreas resecato (30).

1.2.4. Regolatori di apoptosi: Bcl-2 e Bax

Con apoptosi si intende quel processo di morte cellulare programmata che agisce allo scopo di limitare la proliferazione cellulare nei tessuti normali. Ci sono molti percorsi apoptotici, ma il più studiato è quello della famiglia di geni *bcl-2*. Bcl-x appartiene alla famiglia di proteine Bcl-2 e altri membri sono Bcl-2, Bcl-w e Mcl-1. Bcl-x esiste sotto forma di due isoforme: Bcl-xL e Bcl-xS. Bcl-xL agisce come inibitore di apoptosi mentre Bcl-xS agisce come promotore. Proteine pro-apoptotiche, come Bax (*bcl-2-associated X protein*), dimerizzano con le proteine Bcl e il rapporto quantitativo tra le proteine Bcl e la proteina pro-apoptotica Bax determinerà la morte o la sopravvivenza della cellula (49).

L'apoptosi può determinare l'outcome del carcinoma pancreatico direttamente o influenzando la suscettibilità delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici. Quasi tutti gli agenti chemioterapici possono infatti avvalersi di meccanismi apoptotici endogeni per indurre la morte cellulare: l'espressione di questi geni potrebbe dunque correlare con la risposta ai farmaci. Ci sono dati clinici a sostegno di una correlazione positiva tra Bcl-2 e la sopravvivenza dopo resezione del cancro al pancreas (50), sebbene alcuni studi non abbiano registrato alcuna correlazione o una correlazione negativa (51,52). L'osservazione che l'espressione di Bcl-2, fattore anti-apoptotico, si traduce in una più lunga sopravvivenza è sorprendente e paradossale; potrà forse essere spiegato solo quando avremo ottenuto ulteriori informazioni sul ruolo degli altri membri della famiglia Bcl-2. Dati relativi all'espressione di Bax e la sua correlazione con la sopravvivenza sono invece ancora insufficienti per trarre conclusioni definitive (31).

1.2.5. Matrice extracellulare and interazione tumore–stroma: le metalloproteinasi di matrice

La prognosi del tumore pancreatico dipende sulle sue precoci capacità invasive locali e a distanza. L'invasione delle cellule tumorali nei tessuti circostanti si basa sulla perdita di adesione cellula-cellula, sull'invasione della membrana basale e sulla dissoluzione della matrice extracellulare. Queste condizioni sono frutto di una complessa interazione tra l'espressione e l'attività di alcuni enzimi, quali le metalloproteinasi di matrice (MMP), e l'integrità delle proteine costituenti la matrice extracellulare.

Le MMP sono una famiglia di enzimi proteolitici contenenti zinco che vanno a disgregare le proteine della matrice extracellulare. Uno dei primi passi dell'invasione delle cellule tumorali nei tessuti circostanti è il degrado della membrana basale. Questo è prevalentemente composto di collagene tipo IV, e i due tipi principali di collagenasi di tipo IV sono la MMP-2 (gelatinasi A) e la MMP-9 (gelatinasi B). Le MMP sono generalmente classificate secondo la loro specificità di substrato e quindi la MMP-2 e la MMP-9 sono note come gelatinasi, altri gruppi comprendono le collagenasi (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e le stromalisine (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-19). Le MMP-7 (anche nota come matrilisina), MMP-12 e MMP-18 sono invece non classificate. L'attività delle MMP è strettamente regolata da citochine, fattori di crescita e oncogeni. Nella maggior parte degli studi è stata osservata una correlazione tra l'aumentata espressione di MMP ed una minore sopravvivenza in pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico. In particolare il ruolo prognostico negativo di MMP-7 è piuttosto solido in letteratura mentre per le altre MMP i dati sono maggiormente contrastanti (31).

1.2.6. I Micro-RNA

Lo sviluppo dei microarrays ha aperto nuove possibilità di analisi, consentendo l'analisi simultanea di migliaia di geni e dei loro trascritti: l'analisi genomica del DNA tumorale dopo l'amplificazione tramite PCR, l'analisi dell'RNA messaggero (mRNA) dopo amplificazione tramite PCR inversa, l'analisi di microRNA (miRNA) non codificanti (53,54).

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificanti altamente conservate durante l'evoluzione e che sono recentemente emerse come classe di molecole regolatrici dell'espressione genica attraverso modulazione dell'attività post-trascrizionale del mRNA bersaglio reprimendone la traslazione o inducendone la degradazione (55). I miRNA interagiscono con multipli mRNA e sono quindi coinvolti nella regolazione di multipli *pathway* di segnale all'interno della cellula. Diversi studi hanno dimostrato che l'espressione dei miRNA è alterata in diverse neoplasie solide ed ematologiche potendone risultare aumentata o ridotta (56-58).

Il possibile ruolo dei miRNA nel controllo della proliferazione e differenziazione cellulare e dell'apoptosi, la presenza di molti geni codificanti per i miRNA a livello di siti di traslocazioni o delezioni del DNA tipiche in malattie tumorali e la diversa espressione di miRNA tra tessuto tumorale e tessuti sani, confermano che queste molecole possono funzionare come oncogeni o oncosoppressori (59-61). Inoltre, dati recenti suggeriscono che selezionati miRNA possono correlare con la prognosi di alcune neoplasie (62-64) e influenzare la risposta delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici (65-67). Gli studi di profili di espressione hanno identificato un grande numero di miRNA espressi in modo anomalo nei carcinomi del pancreas tra cui anche molti miRNA già descritti in altre neoplasie gastrointestinali (come miR-122, miR-155, miR-21, miR-221 and miR-222) (68-74).

Dall'analisi dei target di miR-21, miR-155 e miR-101 è evidente come queste 3 molecole appaiano da subito come interessanti nello studio del tumore del pancreas. Da studi preclinici su cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale emerge come miR-21 sia coinvolto nella proliferazione, invasione cellulare e chemioresistenza alla gemcitabina, attraverso la modulazione di alcuni target diretti e indiretti come la metalloproteinasi-2, la metalloproteinasi-9 (75,76), il *programmed cell death 4* (PDCD4), la tropomiosina 1 (TPM1) e il *phosphatase and tensin homolog* (PTEN); quest'ultimo inibisce la crescita cellulare agendo sul *pathway* PI3K/Akt/mTOR che è alterata in molte neoplasie pancreatiche. La riduzione dell'espressione di PTEN da parte di miR-21 può portare a un'augmentata attivazione di PI3K/Akt/mTOR che potrebbe risultare un interessante bersaglio molecolare in pazienti con tumori del pancreas e iperspressione di miR-21. MiR-155 è responsabile invece della inibizione della proteina tumorale 53-proteina nucleare indotta 1 che è un gene pro-apoptotico target di p53 stress-indotta (77). Mir-21, miR-155 e miR-101 sono inoltre coinvolti nella regolazione di *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), membro chiave della famiglia di geni del gruppo Polycomb (78), in grado di silenziare diversi geni oncosoppressori e di svolgere un ruolo di primo piano nello sviluppo del tumore e costituendo un fattore cruciale nello sviluppo di chemioresistenza cellulare alla gemcitabina (79).

Gli studi disponibili indicano come miR-21 sia tra i principali miRNA alterati nei tumori del pancreas e la sua espressione aumentata è stata correlata con una peggiore prognosi sia in carcinomi esocrini duttali che in tumori neuroendocrini.

Nei capitoli successivi saranno discussi i dati attualmente disponibili a supporto del ruolo dei miRNA nella genesi e proliferazione neoplastica nonché del loro ruolo quali fattori prognostici nelle neoplasie solide e nel tumore del pancreas in particolare. Il valore prognostico della maggior parte di questi marcatori tuttavia non è stato ancora stabilito

con certezza. Occorrono dunque studi con una numerosità campionaria maggiore e condotti prospetticamente al fine di delinearne più chiaramente il ruolo.

CAPITOLO 2. LE NEOPLASIE MUCINOSE PAPILLARI INTRADUTTALI DEL PANCREAS

2.1. Le neoplasie mucinose papillari intraduttali del pancreas: definizione, descrizione e cenni di trattamento chirurgico

L'evidenza clinica ha iniziato a mostrare che lo screening di parenti di primo grado di pazienti con familiarità importante per tumore pancreatico può identificare precursori non invasivi di questa patologia.

Le neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN) sono state descritte per la prima volta nel 1982 da Ohhashi e Takekoshi che riportano quattro casi di tumore pancreatico muco-secerneente caratterizzato da una triade endoscopica patognomica: rigonfiamento della papilla di Vater, dilatazione del dotto pancreatico e secrezione di mucina (80). Negli anni successivi, in mancanza di una precisa definizione e classificazione istologica, lesioni simili sono riportate in letteratura sotto diversi nomi: adenoma villosa, carcinoma papillare, neoplasia papillare, ectasia mucinosa duttale, e tumore pancreatico muco-secerneente.

Solo nel 1996, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha classificato le neoplasie cistiche pancreatiche muco-secerneenti in due categorie: tumori cistici mucinosi e tumori mucinosi papillari intraduttali (81), poi rinominati neoplasie mucinose cistiche (MCN) e neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN), nella classificazione rivista nel 2000 (82,83). Nella classificazione WHO le IPMN sono definite come lesioni

istologicamente caratterizzate da cellule epiteliali alte, colonnari, contenenti mucina, che delineano dotti dilatati, spesso formando strutture papillari; possono essere distinte dal MCN per l'assenza di stroma ovarico e per il diretto coinvolgimento del sistema duttale pancreatico (83-86)

La maggior parte delle IPMN si presentano come massa cistica unica del dotto pancreatico principale e/o dei dotti secondari localizzati nella testa pancreatica; un coinvolgimento diffuso o segmentale viene comunque spesso descritto. La malattia ha, infatti, una origine multicentrica. La quantità di produzione di mucina è molto variabile, così come il grado di dilatazione dei dotti.

L'incidenza di IPMN sembra essere aumentata esponenzialmente dalle prime relazioni; questo riflette certamente l'effetto combinato della disponibilità di nuove tecniche diagnostiche e dei progressi nel riconoscimento, definizione e classificazione della malattia. E' stato riportato, in recenti casistiche, che le IPMN rappresentano circa il 25% delle neoplasie pancreatiche reseccate nei centri di chirurgia pancreatica, e fino al 50% delle cisti pancreatiche incidentalmente diagnosticate (87,88).

Dalla definizione del grado di displasia epiteliale, le IPMN vengono classificate come benigne (se le cellule mostrano nessuna o lieve displasia), borderline (se con displasia moderata), maligne (con displasia grave). Le IPMN maligne possono a loro volta essere non invasive (in situ) o invasive (definite "carcinoma papillare-mucinoso intraduttale" o semplicemente "carcinoma papillare mucinoso" in quanto, di fatto, non è più soltanto intraduttale). La componente invasiva può anche assumere l'aspetto di un adenocarcinoma duttale tubulare o di un carcinoma mucinoso non-cistico e dunque anche tale diagnosi può essere utilizzata (83). Le conoscenze attuali suggeriscono come vi sia una progressione dalle lesioni benigne alle IPMN invasive (89,90) e come la prevalenza di carcinoma invasivo sia di circa il 35-50% nei pazienti con diagnosi di IPMN (91,92).

Gli studi di imaging possono quantificare il coinvolgimento del dotto pancreatico principale, dei rami laterali, o di entrambi da parte della neoplasia. Durante la stadiazione preoperatoria di malattia, la distinzione tra IPMN del dotto principale (Main Duct-IPMN [IPMN-M], IPMN dei dotti secondari (Branch Duct-IPMN [IPMN-BR]) e IPMN di tipo misto (Mixed Type-IPMN [IPMN-MT]) ha implicazioni prognostiche in quanto il coinvolgimento del dotto di Wirsung risulta associato a malattia più aggressiva. La prevalenza di neoplasia è infatti di circa il 25% (con incidenze in letteratura che vanno dal 6% al 46%) nelle IPMN-BR e del 70% (60-92%) nelle IPMN-M (93).

Sulla base di questi dati e considerati gli eccellenti tassi di sopravvivenza per i pazienti sottoposti a resezione di IPMN pre-invasiva (con sopravvivenze a 5 anni di circa il 77-100%) se confrontati con quelli dei pazienti sottoposti a resezione per IPMN invasiva (22-65%) (89,90,94-109): poiché non è sempre possibile distinguere con certezza le lesioni benigne da quelle maligne con gli strumenti di imaging preoperatorio, un approccio chirurgico è raccomandato per tutti i pazienti con diagnosi di IPMN-M e IPMN-MT. Per quanto riguarda le IPMN-BR, la resezione è da riservarsi a pazienti sintomatici (con pancreatite ricorrente, dolori addominali, steatorrea, perdita di peso o diabete), a lesioni di misura >20-30 mm o a lesioni associate a componente solida. Pazienti asintomatici, affetti da IPMN-BR che non abbiano queste caratteristiche iconografiche, raramente presentano aspetti di malignità all'esame istologico e possono esser candidati a regolare follow-up, riservando la possibilità di resezione chirurgica al manifestarsi di queste caratteristiche clinico-strumentali (93,110).

Per quanto riguarda le forme invasive, la resezione chirurgica radicale, laddove possibile, è ovviamente mandatoria.

2.2. Outcome dei pazienti resecati per IPMN invasiva

Anche se è ormai consolidato come vi sia una notevole differenza in sopravvivenza tra i pazienti sottoposti a resezione per IPMN pre-invasiva e invasiva, la storia naturale della IPMN invasiva dopo resezione radicale deve ancora essere definita con chiarezza. I tassi di sopravvivenza e di recidiva di malattia variano molto nelle diverse casistiche: i tassi di sopravvivenza a 5 anni riportati in letteratura vanno dal 22 al 65% (97-114) mentre la recidiva di malattia è osservata nel 26-65% dei pazienti e di solito si verifica entro 3 anni dall'intervento con metastasi a distanza (96,97,100-102,107,108,112). La ridotta numerosità delle casistiche delle singole istituzioni è probabilmente alla base di questa variabilità di risultati. Secondo questi dati, tuttavia, pazienti radicalmente operati per IPMN invasiva sembrano avere una prognosi migliore di quella dei pazienti sottoposti a resezione per adenocarcinoma duttale sporadico, il cui tasso di sopravvivenza a 5 anni è, in letteratura, circa il 10-25%.

Studi che confrontino direttamente l'outcome postoperatorio di pazienti affetti da IPMN invasiva e da adenocarcinoma pancreatico duttale sono stati finora condotti retrospettivamente e mostrano risultati contrastanti: la prognosi appare simile in alcune serie (94,99) mentre più indolente in altre (104,113-115). I dati di una recente analisi basata sul registro americano di sorveglianza, epidemiologia, e risultati finali (SEER database), valutando una lunga serie di 729 pazienti affetti da IPMN invasiva e 8082 pazienti da adenocarcinoma duttale sporadico sottoposti a resezione chirurgica, mostrano una sopravvivenza complessiva a 5 anni del 22% per le IPMN invasive e dell'11% per le neoplasie duttali ($p < 0,001$). La stratificazione dei pazienti per stato linfonodale non ha dimostrato alcuna differenza in sopravvivenza mediana tra pazienti con linfonodi positivi; la sopravvivenza mediana dei pazienti con IPMN invasiva e linfonodi negativi è risultata

invece significativamente migliore rispetto all'adenocarcinoma duttale con linfonodi negativi (34 versus 18 mesi; $P < 0.001$) (99).

Si potrebbe ipotizzare che il motivo per cui sembra emergere un vantaggio prognostico nelle IPMN invasive potrebbe riconducibile al fatto che la diagnosi e la terapia di queste forme si verificano in una fase precoce di malattia mentre la prognosi delle forme più avanzate di IPMN invasiva sia invece analoga a quella dell'adenocarcinoma duttale. In una recente analisi combinata delle casistiche dell'Indiana University e della Mayo Clinic, una migliore sopravvivenza generale dopo resezione chirurgica è stata osservata per le IPMN invasive rispetto agli adenocarcinomi duttali confrontando le due patologie stadio per stadio; tale differenza risultava però importante nei pazienti con linfonodi negativi, mentre minore in caso di coinvolgimento linfonodale di malattia (116).

Definire la storia naturale delle IPMN invasive dopo resezione chirurgica rimane una questione di primaria importanza per la gestione ottimale dei pazienti nel setting post-operatorio.

2.3. Fattori prognostici nelle neoplasie mucinose papillari intraduttali invasive

Negli ultimi anni, è stato riportato come vi siano alcuni fattori clinici e patologici associati con l'outcome dei pazienti affetti da IPMN invasiva che sono stati trattati chirurgicamente. Attualmente si possono distinguere due sottotipi istologici di IPMN invasiva: il carcinoma mucinoso papillare variante tubulare e il carcinoma mucinoso papillare variante colloidale. La variante tubulare appare simile all'esame istologico, all'adenocarcinoma duttale convenzionale del pancreas, con ghiandole tubulari prevalentemente associate a invasione desmoplastica in assenza di significativa mucina

stromale. D'altra parte il carcinoma colloidale presenta una componente invasiva composta per più dell'80% da ampie raccolte stromali di mucina extracellulare nell'ambito delle quali è possibile riconoscere sporadici elementi cellulari epiteliali neoplastici (117). La prognosi delle IPMN sembra essere fortemente correlata al sottotipo istologico del componente invasiva: il carcinoma colloidale, infatti, mostra tassi di sopravvivenza stimata a cinque anni del 57%-83%, globalmente migliori rispetto a quelli del carcinoma tubulare (24%-55%) (90,116-121).

In altre casistiche sono stati identificati ulteriori fattori prognostici patologici: le dimensioni del tumore (99,121-123), il coinvolgimento linfonodale (101,104,116,121), il grado tumorale (99), la percentuale della componente invasiva (124), la presenza di invasione vascolare (121) o perineurale (124). Tra i fattori clinici, nella casistica dello Sloan-Kettering Memorial Cancer Center (MSKCC), livelli sierici di bilirubina al di sopra range di normalità sono risultati significativamente associati a prognosi infausta. Tuttavia, l'analisi comprendeva sia IPMN invasive che non invasive (su un totale di 63 pazienti solo 30 presentavano IPMN con componente invasiva) e, inoltre, non è stato possibile eseguire l'analisi multivariata dei fattori prognostici a causa della piccola dimensione campionaria. L'iperbilirubinemia, essendo significativamente associata con la presenza di una componente invasiva, con carcinoma di tipo tubulare, con dimensioni maggiori della neoplasia, con la percentuale della componente invasiva e con il coinvolgimento dei linfonodi, non è probabilmente un fattore prognostico indipendente (121).

Non vi sono tuttavia ad oggi dati a disposizione riguardo all'eventuale ruolo prognostico di biomarcatori molecolari sierologici o istologici in questo tipo di neoplasia.

2.4. Ruolo di un trattamento adiuvante nelle neoplasie mucinose papillari intraduttali invasive

Il ruolo della terapia adiuvante nelle IPMN invasive rappresenta una criticità ulteriore ancora in fase di definizione. La recente analisi del database SEER mostra come una più alta percentuale di pazienti resecati per adenocarcinoma duttale del pancreas sporadico siano stati sottoposti a trattamento radioterapico adiuvante rispetto ai pazienti resecati per IPMN invasiva (42% vs 35%). Questo è probabilmente lo specchio del fatto che i medici percepiscono le IPMN invasive come patologie più indolenti rispetto alle neoplasie duttali pancreatiche. Inoltre, mentre un trattamento adiuvante ha dimostrato di migliorare la sopravvivenza nell'adenocarcinoma duttale, dati chiari di efficacia mancano per quanto riguarda il ruolo di terapie nel setting postoperatorio in pazienti affetti da questa patologia recentemente definita (99).

Il database SEER è stato inoltre esplorato retrospettivamente per verificare se la radioterapia adiuvante migliori l'outcome dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica per IPMN invasiva. Su un totale di 972 pazienti, nessuna differenza è però emersa in sopravvivenza tra i pazienti trattati con radioterapia adiuvante (32%) rispetto a quelli che non hanno ricevuto tale trattamento (68%). Ad una analisi per sottogruppi, la radioterapia adiuvante risulta però associata ad un aumento della sopravvivenza nei pazienti con tumore T3/T4 e coinvolgimento linfonodale (HR 0.73, P=0.014) (125).

Una ulteriore analisi, anch'essa retrospettiva, condotta in una serie combinata di 98 pazienti sottoposti a resezione per IPMN invasiva presso l'Indiana University e la Mayo Clinic non ha rilevato alcun beneficio in sopravvivenza dal trattamento adiuvante in pazienti con linfonodi positivi né in pazienti con linfonodi negativi. Tuttavia solo il 41,6% dei pazienti era stato trattato e di questi quasi tutti avevano ricevuto un trattamento combinato chemio-radioterapico a base di 5-fluorouracile o gemcitabina (81%, 30

pazienti); solo il 14% (7 pazienti) aveva ricevuto chemioterapia adiuvante esclusiva classica con Gemcitabina (122).

L'esperienza del Johns Hopkins Hospital ha invece suggerito un possibile effetto positivo sulla sopravvivenza di un trattamento chemio-radioterapico seguito da chemioterapia adiuvante. Sono stati analizzati retrospettivamente, i dati di 70 pazienti con diagnosi di IPMN invasiva: quaranta di questi sono stati trattati con radioterapia adiuvante concomitante a trattamento chemioterapico a base di 5-fluorouracile seguiti da chemioterapia con solo 5-fluorouracile. Pazienti con linfonodi positivi e margini positivi che hanno ricevuto tale trattamento adiuvante mostrano una sopravvivenza significativamente migliore rispetto a quelli sottoposti a osservazione. Inoltre, all'analisi multivariata, dopo correzione per alcuni bias di selezione (malattia linfonodale, stato dei margini, localizzazione del tumore, grado del tumore e tipo istologico), tale trattamento chemio-radioterapico adiuvante seguito da chemioterapia è stato associato ad un miglioramento della sopravvivenza globale (126).

Gli obiettivi di questo studio sono di identificare fattori clinici e patologici associati a prognosi dopo resezione di IPMN invasiva e di indagare il ruolo di un trattamento adiuvante per questi pazienti.

CAPITOLO 3. *MicroRNA*

3.1. **Micro RNA: definizione e caratterizzazione**

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificanti altamente conservate durante l'evoluzione e che sono recentemente emerse come classe di molecole regolatrici dell'espressione genica attraverso modulazione dell'attività post-trascrizionale del mRNA bersaglio reprimendone la traslazione o inducendone la degradazione (55). La maggior parte dei geni che codificano per i miRNA sono localizzati all'interno di introni di geni non codificanti o codificanti proteine e possono essere regolati trascrizionalmente attraverso i promotori stessi dei geni che li ospitano (127). Altri miRNA possono invece trovarsi all'interno di esoni oppure formare complessi assieme ad altri geni miRNA (128-129).

Il miRNA primario (pri-miRNA) è trascritto dalla RNA-polimerasi e viene poi scisso dalla Drosha-RNasi III endonucleasi nel miRNA precursore (pre-miRNA). Il Pre-miRNA è attivamente trasportato dal nucleo al citoplasma dalla Exportin-5 ed è qui ulteriormente scisso dal Dicer (o Ribonucleasi III) in miRNA maturi. Il miRNA maturo viene poi assemblato nel complesso di silenziamento RNA-indotto (RISC) e, insieme con le proteine associate al RISC, dirige questo complesso a regolare negativamente l'espressione genica legandosi al 3-UTR del mRNA bersaglio (55).

I miRNA dei vegetali e di alcuni animali formano coppie di basi perfette con i loro mRNA bersaglio determinandone la conseguente successiva degradazione. Tuttavia, la maggior parte dei miRNA umani si legano ai loro target 3-UTR con complementarità

imperfetta reprimendone quindi, più frequentemente, la traslazione (130). I miRNA interagiscono con multipli mRNA e sono quindi coinvolti nella regolazione di multipli *pathway* di segnale all'interno della cellula. I miRNA hanno dimostrato essere responsabili della regolazione di molti processi biologici quali la differenziazione, la proliferazione, l'apoptosi, la resistenza cellulare allo stress e il metabolismo dei lipidi (60,131-133). Sono inoltre coinvolti nella patogenesi di alcune malattie virus o immuno-correlate e di altre patologie (134,135). In particolare, il ruolo dei miRNA nel controllo della proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare, la presenza di molti geni per i miRNA a livello di siti di traslocazione o delezione del DNA tipiche di malattie tumorali e la loro espressione aberrante in molte neoplasie solide ed ematologiche rispetto ai tessuti sani (136,137) indica che queste molecole potrebbero agire come oncogeni o oncosoppressori (61,138).

Nei paragrafi successivi verranno esposti i recenti dati di letteratura a supporto del ruolo prognostico dell'ipo o iper-espressione di alcuni microRNA in molte neoplasie solide (62-64) e come questa possa inoltre influenzare la risposta delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico (66,67).

3.2. MicroRNA e tumore

L'associazione di miRNA e tumore è stata inizialmente descritta nella leucemia linfatica cronica (LLC). Delezioni nel cromosoma 13q14 sono le anomalie cromosomiche più frequentemente osservate nella LLC. Entrambi i miR-15a e miR-16-1 sono risultati essere collocati all'interno di una regione piccola del 13q14 e di esser spesso deleti e/o down-regolati in più della metà delle LLC (59). La posizione di circa il 50% dei geni miRNA umani in regioni fragili o associate a tumore (come ad esempio siti di delezione,

amplificazione e traslocazione) e il diverso pattern di espressione di miRNA tra tumori e tessuti normali, rafforza ulteriormente il legame tra miRNA e cancro (62,139). Diversi studi hanno dimostrato come l'espressione dei miRNA possa essere alterata in diversi tumori ematologici e solidi rispetto alle loro controparti normali (58,62), suggerendo che i microRNA possono contribuire all'oncogenesi attraverso la modulazione di processi cellulari strategici agendo come oncosoppressori o oncogeni (61,138).

E' stato dimostrato che i miRNA svolgono un ruolo nello sviluppo e nella progressione di vari tumori, tra cui quelli dell'endometrio, dell'ovaio, del fegato, del seno, del colon, dell'esofago, del polmone e del pancreas (57,71,140-146); in alcuni di questi tumori l'espressione istologica di alcuni miRNA può anche classificare i tumori in base alla loro origine e stato di differenziazione (58,62).

I microRNA nel sangue e nel siero potrebbero invece essere utilizzati come biomarcatori per la diagnosi di tumore (147,148). Altri dati suggeriscono l'uso dei miRNA a scopo stadiativo, dimostrando che un pattern di espressione di 217 miRNA può classificare i tumori scarsamente differenziati meglio del pattern di espressione di 16.000 mRNA (62).

Un unico miRNA può regolare più geni codificanti legati alla crescita tumorale ed è anche probabile che rifletta in modo più fedele la sensibilità/resistenza di una malattia a diversi trattamenti. Dal momento che la complementarità tra miRNA e mRNA target è imperfetta, ogni miRNA può regolare l'espressione di multipli mRNA, e quindi diversi *pathways* cellulari. Nella maggior parte degli studi, i miRNA hanno dimostrato di essere coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e dell'apoptosi avendo come target vari geni legati al cancro come Bcl-2, MYC, E2F1 e Ras (56,60,149). Essi possono però anche influenzare l'angiogenesi e alterare le interazioni tumore-ospite, con conseguente invasione locale e metastatizzazione (150,151). Alcune delle multiple possibilità di interazione miRNA-mRNA possono inoltre coinvolgere processi biologici fondamentali

per la risposta o la resistenza del tumore ai vari trattamenti chemioterapici. I microRNA possono giocare un ruolo importante attraverso *pathway* diversi, nella resistenza a vari farmaci in tumori diversi. Recenti evidenze indicano, ad esempio, che i microRNA possono influenzare la risposta delle cellule tumorali di carcinoma ovarico a vari trattamenti antitumorali come il cisplatino o farmaci diretti contro i microtubuli (paclitaxel, docetaxel e vincristina) (65, 152).

Tutte queste evidenze pongono l'accento sul ruolo fondamentale dei miRNA nel regolare meccanismi critici durante la genesi e la proliferazione di varie neoplasie e meccanismi di chemio-sensibilità/resistenza delle cellule tumorali e comprendere i meccanismi coinvolti nella resistenza di cellule tumorali diverse ai diversi farmaci è fondamentale per poter ottimizzare il trattamento oncologico. Pertanto, l'NCI-60, un pannello di 60 diverse linee cellulari tumorali umane, che è stato usato dal National Cancer Institute per testare più di 100.000 composti chimici per la sensibilità ai farmaci antitumorali, è stato esaminato per valutare l'espressione di mRNA e proteine, stati mutazionali, aberrazioni cromosomiche e numero di copie di DNA (153). Più recentemente, nel pannello di NCI-60, è stata analizzata anche l'espressione dei miRNA (137,154), mostrando una forte correlazione tra i pattern di espressione dei miRNA e i pattern di efficacia di composti antitumorali. In particolare, la variazione dei livelli cellulari di let-7i, miR-16 e miR-21 sembrano alterare l'efficacia di vari agenti antitumorali riducendola fino a 4 volte a seconda della classe del composto e del tipo di cancro (66).

L'osservazione che i miRNA possono avere effetti opposti verso lo stesso agente antitumorale in diversi tipi di tumore, e che possono alterare la potenza dei vari agenti antitumorali in modo diverso in una stessa linea cellulare, suggerisce che il rapporto tra funzione dei miRNA e resistenza ai farmaci è molto complesso. La funzione del microRNA in cellule tumorali diverse può essere influenzata dalla deregolamentazione

dell'espressione genica o da mutazioni/polimorfismi dei miRNA stessi (136,154-158). La deregolamentazione dell'espressione dei miRNA nelle cellule tumorali maligne, come già anticipato, è stata ampiamente osservata e può essere causata da tre diversi meccanismi: posizione dei miRNA in regioni genomiche cancro associate o in siti fragili, regolazione epigenetica di geni miRNA, e anomalie nei geni di elaborazione di miRNA e proteine (136). Questa deregolamentazione dei miRNA influenzerà l'espressione di multipli mRNA target, e quindi di numerose proteine, portando a variazioni nella chemiosensibilità delle cellule tumorali attraverso vari processi cellulari. La maggior parte dei miRNA ha dimostrato di alterare la risposta cellulare a vari agenti antitumorali attraverso la modulazione delle vie di sopravvivenza e/o risposta apoptotica (158). Inoltre, alcuni miRNA sono emersi come co-responsabili nella modulazione di alcuni target di farmaci antineoplastici e di vari sistemi di riparazione del DNA (67,156); altri risultano invece coinvolti nella regolazione del metabolismo dei chemioterapici stessi avendo come target proteine/enzimi atti a trasportare o metabolizzare il farmaco (159).

3.3. I miRNA come fattori prognostici e predittivi nel tumore del pancreas

L'espressione di alcuni miRNA come fattori predittivi di risposta-resistenza a vari farmaci è stata valutata in diversi tipi di tumori mostrando risultati controversi. Numerosi sforzi sono stati fatti in particolare per identificare miRNA che possano essere utilizzati per la diagnosi precoce e la previsione dell'outcome in pazienti affetti da tumore del pancreas. Diversi studi hanno riscontrato profili di espressione aberrante di miRNA in varie patologie pancreatiche, tra cui il cancro del pancreas, come recentemente recensito da Seux e colleghi (70); la definizione del potenziale prognostico di questi microRNA è tuttavia ancora in fase iniziale (160). In particolare, diversi studi di profili di espressione

hanno identificato un grande numero di miRNA espressi in modo aberrante nell'adenocarcinoma duttale del pancreas tra cui anche molti miRNA già descritti in altre neoplasie gastrointestinali (come miR-122, miR-155, miR-21, miR-221 e miR-222) (72,73). Questi risultati sono stati confermati da studi recenti che dimostrano come miR-21 sia il microRNA con maggiormente iperespresso nell'adenocarcinoma duttale (161).

Dall'analisi dei target di miR-21, miR-155 e miR-101 è evidente come queste 3 molecole appaiano da subito come interessanti nello studio del tumore del pancreas. Da studi preclinici su cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale emerge come miR-21 sia coinvolto nella proliferazione, invasione cellulare e chemioresistenza alla gemcitabina, attraverso la modulazione di alcuni target diretti e indiretti come la metalloproteinasi-2, la metalloproteinasi-9 (75,76), PDCD4, la tropomiosina 1 e PTEN; quest'ultimo inibisce la crescita cellulare agendo sul *pathway* PI3K/Akt/mTOR che è alterata in molte neoplasie pancreatiche. La riduzione dell'espressione di PTEN da parte di miR-21 può portare a un'aumentata attivazione di PI3K/Akt/mTOR che potrebbe risultare un interessante bersaglio molecolare in pazienti con tumori del pancreas e iperspressione di miR-21.

MiR-155 è responsabile invece della inibizione della proteina tumorale 53-proteina nucleare indotta 1 che è un gene pro-apoptotico target di p53 stress-indotta (77). Mir-21, miR-155 e miR-101 sono inoltre coinvolti nella regolazione di *EZH2*, membro chiave della famiglia di geni del gruppo Polycomb (78), in grado di silenziare diversi geni oncosoppressori e di svolgere un ruolo di primo piano nello sviluppo del tumore e costituendo un fattore cruciale nello sviluppo di chemioresistenza cellulare alla gemcitabina (79). Alti livelli di espressione di miR-21 sono stati infatti correlati con una peggiore prognosi sia in carcinomi esocrini duttali che in tumori neuroendocrini del pancreas (162,163).

Più recentemente, abbiamo dimostrato come miR-21 sia associato a miglior sopravvivenza in pazienti affetti da adenocarcinoma duttale metastatico e trattati con

gemcitabina. Abbiamo inoltre osservato una associazione significativa tra l'espressione di miR-21 e la sopravvivenza nei pazienti sottoposti a resezione radicale per adenocarcinoma duttale e trattati con gemcitabina nel setting adiuvante (75). Allo stesso modo, l'analisi per sottogruppi in una casistica di pazienti coreani operati per adenocarcinoma pancreatico duttale e trattati con terapia adiuvante ha mostrato che una ipo-espressione di miR-21 era associata ad un rischio di morte e di recidiva di malattia significativamente inferiore. In particolare, lo stato di espressione di miR-21, tra i 27 fattori biologici e i 9 fattori clinico-patologici in esame, è risultato rappresentare il biomarcatore singolo maggiormente predittivo di sopravvivenza in questi pazienti. Al contrario, con i limiti di una casistica relativamente limitata, nessuna associazione significativa è stata rilevata nel sottogruppo di pazienti operati ma non trattati con terapia adiuvante, suggerendo il ruolo specifico di miR-21 come predittivo di chemioresistenza (165).

Lo studio di Bloomston e coll. (71) ha individuato invece 6 ulteriori microRNA (miR-452, miR-105, miR-127, miR-518a-2, miR-187 e miR-30a-3p) la cui espressione sembrerebbe identificare i lungo sopravvissuti tra i pazienti con tumore del pancreas e linfonodi positivi, sebbene alcuni di questi miRNA non risultino tra maggiormente espressi nel tumore del pancreas. Un altro recente studio ha misurato i livelli di miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222 in tessuti di adenocarcinoma duttale microdissezionato (166). Questi microRNA sono stati scelti in quanto vi era già evidenza di una loro diversa espressione nei tumori del pancreas rispetto ai tessuti normali. In questa coorte di 56 adenocarcinomi duttali resecati, è stata osservata una correlazione significativa tra l'elevata espressione dei 4 microRNA candidati (miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222) e una minore sopravvivenza globale dei pazienti. Inoltre, i pazienti che presentavano elevati livelli di espressione di tutti e 4 questi microRNA contemporaneamente, possedevano un rischio di morte per tumore di 6.2 volte maggiore rispetto ai pazienti con

bassa espressione. Questo studio costituisce la prima evidenza della attività oncogenica di miR-155, miR-203, miR-210 e miR-222 nello sviluppo del tumore al pancreas (166). Infine, Wang e colleghi hanno analizzato l'espressione di quattro microRNA, miR-21, miR-210, miR-155 e miR-196a, nel plasma di 49 pazienti con carcinoma pancreatico e di 36 individui sani, individuando elevati livelli di miR-155 e miR196a come probabili indicatori di progressione precoce di malattia (167). Da segnalare che l'analisi dei livelli plasmatici di questo pannello di quattro miRNA aveva una sensibilità del 64% e una specificità del 89%. Questi risultati, nonostante la piccola dimensione del campione, nonostante l'estremizzazione dei criteri di inclusione della popolazione analizzata (costituita dunque, di fatto, da adenocarcinomi e controlli sani) e in assenza di dati sui trattamenti cui questa popolazione è stata sottoposta, dimostra comunque la possibilità di sviluppo del microRNA profiling plasmatico come test semplice, sensibile, specifico e con elevata potenzialità di applicazione clinica.

E' comunque evidente da questi studi che, come già avvenuto in precedenza per gli studi sulla espressione genica, i dati riguardanti la maggior parte dei miRNA emergenti non sono completamente sovrapponibili. Questi risultati potrebbero essere spiegati dall'utilizzo di diversi campioni (congelati vs inclusi in paraffina, micro-vs non-microdissezionati), dalle diverse metodologie applicate (PCR quantitativa vs altri *array* o vs sistemi di ibridazione in situ), dalla valutazione di diverse neoplasie e in diverso stadio di malattia, dalle differenze etniche delle popolazioni in studio, dalla ridotta numerosità dei campioni e dalla conseguente mancata possibilità di esecuzione di analisi multivariate . Queste molecole appaiono comunque indissolubilmente legate alla nascita e allo sviluppo del tumore del pancreas e di molte altre neoplasie umane. Ulteriori studi in popolazioni più ampie e omogenee, utilizzando metodologie convalidate, sono necessari per chiarire questi aspetti

Lo scopo finale sarà quello di possedere, in un futuro prossimo, profili di

espressione di miRNA specifici che possano facilitare la classificazione e la diagnosi differenziale dei vari tipi di neoplasie e che possano fornire informazioni relative alla resistenza delle neoplasie ai vari trattamenti. La valutazione dell'espressione dei miRNA al momento della diagnosi potrà guidare la decisione terapeutica del clinico verso trattamenti personalizzati. L'analisi della modulazione dell'espressione dei miRNA durante il trattamento potrebbe offrire inoltre uno strumento ulteriore per la diagnosi precoce di resistenza acquisita ai farmaci. Nel tumore del pancreas come in altri tipi di tumore, queste informazioni possono essere utilizzate per guidare gli oncologi verso una più razionale pianificazione dell'iter terapeutico dei diversi pazienti.

3.4. Espressione di miRNA nelle IPMN invasive e correlazione con l'outcome clinico

I pazienti affetti da IPMN invasiva sono di solito trattati con gli stessi regimi chemioterapici utilizzati per i carcinomi duttali del pancreas ma la notevole differenza tra i tassi di sopravvivenza nelle due patologie suggeriscono che, anche se molte delle anomalie genetiche descritte negli adenocarcinomi duttali convenzionali sono risultate comuni alle IPMN, ci possono essere alcune differenze nella biologia di queste due patologie (168). Elevati livelli di miR-21 erano già stati identificati nelle IPMN preinvasiva (169), così come nel liquido cistico di una limitata casistica di 3 IPMN invasive (170).

Anche l'espressione di miR-155 è risultata significativamente elevata in IPMN preinvasive rispetto a controlli non-neoplastici, e l'espressione di entrambi miR-21 e miR-155 è stata più frequentemente rilevata nelle IPMN con carcinoma in situ rispetto alle IPMN preinvasive (169).

Al contrario, un recente studio che ha confrontato i livelli di miR-101 in 5 IPMN preinvasive e 5 IPMN invasive, ha mostrato una significativa ipoespressione di miR-101 in queste ultime, suggerendo che la down-regulation di questo miRNA possa determinare una aumentata espressione del suo target EZH2 nella carcinogenesi delle IPMN (78).

Attualmente non sono disponibili dati riguardanti l'espressione dei vari miRNA (e in particolare di miR-21, miR-155 e miR-101) in coorti più ampie e omogenee di pazienti affetti da IPMN invasiva e non, né la loro correlazione con l'outcome clinico. Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare l'espressione di questi miRNA candidati in un ampio archivio di campioni tissutali pancreatici ben caratterizzati istologicamente, includendo tessuti duttali di pancreas sano, tessuti di IPMN preinvasiva e invasiva, e di correlare questi dati con l'outcome clinico.

**CAPITOLO 4. LE NEOPLASIE MUCINOSE PAPILLARI INTRADUTTALI DEL
PANCREAS: FATTORI CLINICO-MOLECOLARI PROGNOSTICI E RUOLO
DELLA CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE**

4.1. Razionale

Sebbene relativamente poco comune, il carcinoma pancreatico rappresenta la quarta causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali. L'elevata letalità è da attribuire ad una malattia biologicamente molto aggressiva, all'iniziale decorso asintomatico responsabile di una diagnosi tardiva e alla resistenza ai trattamenti attualmente disponibili (5). Anche nel caso di diagnosi precoce di malattia, con possibilità di resezione chirurgica, la sopravvivenza mediana dei pazienti resecati si attesta intorno ai 2 anni ed il rischio di recidiva postoperatoria è di circa l'80% (6,7). Vari trial clinici randomizzati hanno dimostrato come un trattamento chemioterapico adiuvante a base di gemcitabina o fluorouracile sia efficace nel migliorare la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale di questi pazienti (12-17). Il beneficio di questi trattamenti è tuttavia limitato e la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti resecati e sottoposti a chemioterapia adiuvante si attesta attorno al 20% (14,15). Dati i risultati limitati ad oggi ottenuti anche dal miglior trattamento medico nel carcinoma pancreatico, la selezione dei pazienti attraverso lo studio di fattori individuali o a livello tumorale che abbiano un ruolo prognostico e/o predittivo di possibile efficacia del trattamento appare un campo di notevole interesse.

La ricerca si sta recentemente interessando, a tal proposito, nel tumore del pancreas, all'analisi dell'espressione di alcuni microRNA (miRNA). I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificanti altamente conservate durante l'evoluzione e che sono recentemente emerse come classe di molecole regolatrici dell'espressione genica attraverso modulazione dell'attività post-trascrizionale del mRNA bersaglio reprimendone la traslazione o inducendone la degradazione (55). Gli studi di profili di espressione hanno identificato un grande numero di miRNA espressi in modo anomalo nei carcinomi del pancreas; in particolare dall'analisi dei target di miR-21, miR-155 e miR-101 è evidente come queste 3 molecole appaiano da subito come interessanti nello studio del tumore del pancreas. Da studi preclinici su cellule di adenocarcinoma duttale pancreatico emerge come miR-21 sia infatti coinvolto nella proliferazione, invasione cellulare e chemioresistenza alla gemcitabina, attraverso la modulazione di alcuni target diretti e indiretti, come PTEN, la metalloproteinasi-2, e la metalloproteinasi-9 (22,36). MiR-155 è responsabile invece della inibizione della proteina tumorale 53-proteina nucleare indotta 1 che è un gene pro-apoptotico target di p53 stress-indotta (37). Tutti e 3 i miRNA candidati sono inoltre coinvolti nella regolazione di *EZH2*, membro chiave della famiglia di geni del gruppo Polycomb (30), in grado di silenziare diversi geni oncosoppressori e di svolgere un ruolo di primo piano nello sviluppo del tumore e costituendo un fattore cruciale nello sviluppo di chemioresistenza cellulare alla gemcitabina (38).

Studi clinici hanno dimostrato come l'iperespressione di miR-21 sia predittiva di una minore sopravvivenza dei pazienti affetti da tumore neuroendocrino del pancreas e da adenocarcinoma pancreatico duttale sia dopo resezione radicale che in stadio di diffusione sistemica della malattia (75, 162,164,165). Andando a valutare poi miR-155, l'effetto prognostico negativo di una sua iperespressione è stato osservato in una coorte di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico duttale, in stadio localmente avanzato o

con residuo R2 di malattia dopo resezione (171). Per quanto riguarda miR-101 non vi sono ancora, invece, dati certi di una correlazione prognostica di una sua iperespressione e l'outcome di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas, ma l'espressione della suo target principale, EZH2, è stata associata a prognosi sfavorevole in questi pazienti (164).

La forma più comune di tumore pancreatico è l'adenocarcinoma duttale ma recentemente sono state identificate e definite più rare forme istologiche. Tra queste le neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN) invasive presentano una incidenza in continuo aumento e sembrano avere un andamento clinico generalmente più indolente ma che ancora deve essere definito in ampie casistiche. L'iniziale difficoltà nella definizione e diagnosi di questi tipi istologici ha limitato la conduzione di studi *ad hoc* e pazienti affetti da IPMN invasiva sono stati probabilmente inclusi, in passato, negli studi clinici condotti in pazienti affetti da adenocarcinoma duttale. Dunque, i pazienti affetti da IPMN invasiva sono di solito trattati con gli stessi regimi chemioterapici utilizzati per i carcinomi duttali del pancreas sia in fase adiuvante che nella malattia metastatica ma il ruolo di questi trattamenti nelle IPMN deve ancora essere validato. La notevole differenza tra i tassi di sopravvivenza nelle due patologie suggerisce inoltre che, anche se molte delle anomalie genetiche descritte nell'adenocarcinoma duttale convenzionale sono risultate comuni alle IPMN, ci possono essere alcune differenze nella biologia di queste due patologie (168).

Dati relativi all'analisi di fattori prognostici nelle IPMN invasive derivano da casistiche tuttavia limitate e esperienze relative alla valutazione dell'espressione dei miRNA nelle IPMN sono ancora preliminari. Elevati livelli di miR-21 erano già stati identificati nelle IPMN preinvasiva (164), così come nel liquido cistico di una limitata casistica di 3 IPMN invasive (170). Anche l'espressione di miR-155 è risultata significativamente elevata in IPMN preinvasive rispetto a controlli non-neoplastici, e

l'espressione di entrambi miR-21 e miR-155 è stata più frequentemente rilevata nelle IPMN con carcinoma in situ rispetto alle IPMN preinvasive (169). Al contrario, un recente studio che ha confrontato i livelli di miR-101 in 5 IPMN preinvasive e 5 IPMN invasive, ha mostrato una significativa ipoespressione di miR-101 in queste ultime, suggerendo che la down-regulation di questo miRNA possa determinare una aumentata espressione del suo target EZH2 nella carcinogenesi delle IPMN (78). Attualmente non sono disponibili dati riguardanti l'espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 in coorti più ampie e omogenee di pazienti affetti da IPMN invasiva e non, né la loro correlazione con l'outcome clinico.

Pertanto, lo scopo del presente studio è duplice, ovvero:

- identificare i fattori clinici e patologici associati a prognosi dopo resezione del IPMN invasiva ed indagare il ruolo di una terapia adiuvante a base di gemcitabina per questi pazienti;
- valutare l'espressione di tre miRNA candidati (miR-21, miR-155 e miR-101) in una ampio archivio di campioni tissutali pancreatici ben caratterizzati istologicamente, includendo tessuti duttali di pancreas sano, tessuti di IPMN preinvasiva e invasiva e correlare questi dati con l'outcome clinico.

4.2. Materiali e metodi

4.2.1. Selezione dei pazienti

- Coorte 1

Il registro elettronico dei pazienti sottoposti a resezione per tumore al pancreas presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana è stato esplorato retrospettivamente e

associato a dati clinici e patologici per identificare i pazienti sottoposti a resezione per IPMN invasiva negli ultimi 6 anni (dal 2005 al 2011). Abbiamo dunque rivisto i dati di pazienti sottoposti a resezione chirurgica radicale (duodenocefalopancreasectomia, pancreasectomia totale e pancreasectomia distale) per IPMN invasiva, in accordo con la stadiazione tumore-linfonodi-metastasi (TNM) secondo la VII edizione dell'*American Joint Committee on Cancer Staging System* per il cancro del pancreas. Abbiamo raccolto anche ulteriori dettagli anatomo-patologici riguardanti la localizzazione del tumore, il numero totale di linfonodi resecati e di linfonodi coinvolti, il grading del tumore, la presenza di invasione vascolare e perineurale, il coinvolgimento dei margini di resezione.

Abbiamo ristretto la nostra analisi a pazienti aventi una caratterizzazione patologica completa del tumore. Di questi abbiamo poi raccolto informazioni riguardanti le caratteristiche demografiche e cliniche: sesso, età, performance status, comorbidità, terapie adiuvanti e l'outcome clinico (ovvero la data di progressione della malattia e della morte, la sede di progressione, i trattamenti eventualmente successivamente intrapresi). Alla fine abbiamo incluso solo i pazienti di cui fossero disponibili i report clinici, dei quali avessimo accesso ad adeguati dati di follow-up e che avessero una accurata valutazione radiologica perioperatoria della malattia.

I pazienti con malattia metastatica, pazienti sottoposti a chemio o radioterapia neo-adiuvante o in assenza di una accurata stadiazione strumentale perioperatoria della malattia, sono stati esclusi dall'analisi. I pazienti selezionati sono risultati dunque 64 e stati tutti inclusi in una analisi retrospettiva per valutare l'associazione tra i fattori clinico-patologici analizzati e la prognosi dei pazienti dopo chirurgia radicale e per indagare su un possibile ruolo della chemioterapia adiuvante in questo tipo di patologia.

- Coorte 2

Alcuni (in totale 51) dei pazienti selezionati come sopra descritto, di cui fosse anche disponibile ed adeguato il materiale istologico e che avessero dato il consenso ad effettuare analisi biomolecolari sullo stesso, sono stati analizzati per valutare la correlazione tra l'espressione di alcuni miRNA (in particolare miR-21, miR-155 e miR-101) nella neoplasia e l'outcome clinico. E' stata inoltre selezionata una coorte di 11 pazienti affetti da IPMN pre-invasiva e di 5 pancreas resecati per trapianto in modo da poter valutare eventuali differenze nell'espressione di alcuni miRNA nei tre gruppi (IPMN invasiva, IPMN non invasiva e pancreas normale).

Per quanto riguarda l'analisi della correlazione tra l'espressione dei miRNA candidati e l'outcome clinico, al fine di aumentare la dimensione campionaria, grazie ad una collaborazione già esistente con l'HPB Surgical Unit dell'Hammersmith Hospital (London, UK), sono stati inclusi anche ulteriori 32 pazienti (26 radicalmente resecati per IPMN invasiva e 6 per IPMN pre-invasiva) provenienti da tale centro, di cui vi fosse ovviamente la disponibilità del materiale istologico, il consenso all'analisi e dati riguardanti la stadiazione TNM e l'outcome clinico.

4.2.2. Campionamento tumorale, microdissezione laser (LMD) e estrazione dell'RNA

L'RNA è stato isolato con successo dalle sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE) di 81 pazienti della coorte 2 (65 IPMN invasive e 16 IPMN pre-invasive) usando il kit di isolamento Total RecoverAll Nucleic Acid (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA), secondo le istruzioni del produttore. La resa di RNA e la

sua integrità è stata controllata a 260-280 nm con NanoDrop[®]-1000 Detector (NanoDrop-Technologies, Wilmington, USA).

I campioni FFPE sono stati esaminati per confermare la diagnosi e la presenza di cellule neoplastiche nel materiale analizzato. I campioni FFPE sono stati dunque tagliati in sezioni 10 µm, fissate in etanolo al 70%, colorati con ematossilina/eosina per l'esame istologico, e deidratati tramite sequenziale passaggio in etanolo al 70%, 96%, 100% e xilene. Una media di 5000 cellule neoplastiche sono state poi sezionate utilizzando il dispositivo Leica LMD6500 (Leica, Wetzlar, Germania). Grazie della nostra precedente esperienza con questo metodo, non c'è stata difficoltà nel selezionare e definire morfologicamente le aree contenenti cellule tumorali (173). La precisione del focus ristretto del fascio laser ha permesso di individuare le singole cellule neoplastiche con elevato grado di precisione (**Figura 1**). LMD è stato utilizzato anche per ottenere cellule epiteliali dei dotti pancreatici dai 5 tessuti sani, ottenuti dalla "Organ Donor-programma".

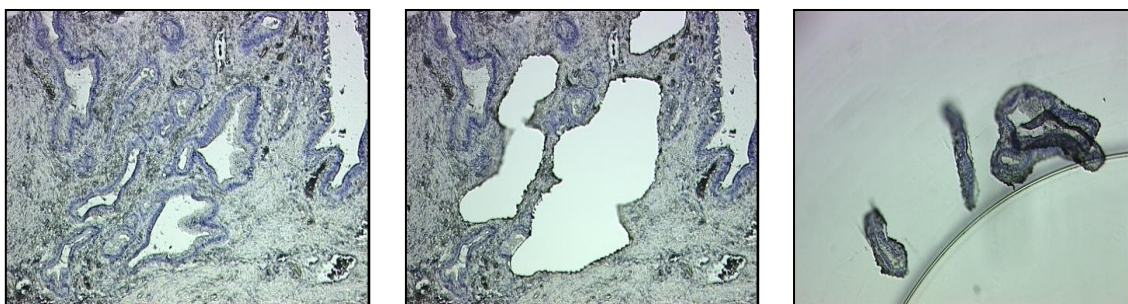


Figura 1. Esempio di estrazione di epitelio di IPMN pre-invasiva: prima (A), durante (B) e dopo (C) la microdissezione laser. Sezioni FPPE di 10 micron di spessore colorate con ematossilina e eosina.

4.2.3. Trascrizione inversa e analisi con RT-PCR quantitativa di miR-21, miR-155 e miR-101

L'RNA (10-100 ng) è stato inversamente trascritto e il cDNA risultante è stato amplificato utilizzando lo specifico TaqMan[®] microRNA-test (Applied Biosystems) per miR-21, miR-155, miR-101 e RNU6 (Assay-ID 000.397, 002.623, 002.253 e 001.093, rispettivamente). Le reazioni di PCR sono state eseguite con il sistema di rilevamento di sequenza 7500HT (Applied Biosystems), secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati amplificati in duplice copia per avere opportuni controlli. I dati di amplificazione sono stati normalizzati all'espressione di RNU6. La quantificazione dell'espressione relativa (riportata come unità arbitrarie [au]) è stata eseguita utilizzando il metodo Δ Ct. La PCR quantitativa dei dati ha mostrato un coefficiente di variabilità di Ct sempre inferiore al 2% dei valori medi.

4.2.4. Analisi statistica

E' stata effettuata una analisi retrospettiva sui 64 pazienti sottoposti a resezione per IPMN invasiva presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana selezionati per valutare l'associazione tra i fattori clinico-patologici analizzati e la prognosi dei pazienti dopo chirurgia radicale e per indagare su un possibile ruolo della chemioterapia adiuvante in questo tipo di patologia (**Coorte 1**).

Dati di 67 pazienti (51 resecati per IPMN invasiva, 11 per IPMN pre-invasiva e 5 per trapianto di pancreas) provenienti dall'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana e di 32 pazienti (26 resecati per IPMN invasiva, 6 per IPMN pre-invasiva) provenienti dall'HPB Surgical Unit dell'Hammersmith Hospital sono stati inoltre analizzati per

valutare la correlazione tra l'espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 e le caratteristiche cliniche e l'outcome dei pazienti (**Coorte 2**). In questi pazienti, il confronto tra le caratteristiche cliniche e i livelli di espressione miR-21, miR-155 e miR-101 è stato effettuato utilizzando il test χ^2 di Pearson e il Wilcoxon rank-sum test. Tutte le analisi dei campioni sono state fatte in cieco per quanto riguarda il corrispondente clinico. La correlazione tra l'espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 e l'outcome è stata valutata stratificando i pazienti rispetto al valore mediano di espressione degli stessi (alta *versus* bassa espressione).

La sopravvivenza globale (OS) è stata calcolata dalla data dell'intervento chirurgico alla data della morte, la sopravvivenza libera da malattia (DFS) è stata definita come il tempo dalla data dell'intervento chirurgico alla data della prima recidiva o di morte. L'analisi di sopravvivenza è stata eseguita utilizzando il metodo di Kaplan-Meier, e le differenze in sopravvivenza tra i gruppi sono state confrontate applicando il rango logaritmico per l'analisi univariata.

Per entrambe le coorti un'analisi multivariata, usando modelli di regressione di Cox, è stata effettuata includendo i fattori prognostici emersi all'analisi univariata, al fine di identificare i predittivi di DFS e OS.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software statistico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

4.3. Risultati

4.3.1. Associazione tra i fattori clinico-patologici analizzati e la prognosi dei pazienti e ruolo della chemioterapia adiuvante (coorte 1)

Tutti i sessantaquattro pazienti (27 maschi e 37 femmine) sottoposti a resezione per IPMN invasiva presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana sono stati effettivamente arruolati nell'analisi retrospettiva per la valutazione dell'associazione tra i fattori clinico-patologici analizzati e la prognosi dei pazienti dopo chirurgia radicale e per indagare su un possibile ruolo della chemioterapia adiuvante in questo tipo di patologia. Le caratteristiche patologiche del tumore e cliniche dei pazienti della coorte 1 sono riportate nella **Tabella 4.1**. L'età mediana dei pazienti al momento della resezione chirurgica era di 70 anni (range 37-87). La maggior parte dei pazienti (82,8%) hanno avuto un tumore primario estendentesi oltre il pancreas ma senza interessamento del tronco celiaco o dell'arteria mesenterica superiore (T3); metastasi nei linfonodi regionali (N1) sono stati individuate nel 62,5% dei pazienti. Solo tre pazienti presentavano coinvolgimento dei margini di resezione chirurgici. Dopo una revisione *ad hoc*, solo tre pazienti (4,7%) sono stati confermati avere come variante istologica un carcinoma colloidale. Trentatré pazienti (51,6%) hanno ricevuto terapia adiuvante: 23 hanno ricevuto chemioterapia adiuvante con gemcitabina da sola; 10 pazienti sono stati trattati anche con radioterapia adiuvante (vedi **Tabella 4.2** per i dettagli riguardanti le caratteristiche dei pazienti trattati e non trattati).

Al momento dell'analisi 35 pazienti (54,7%) sono progrediti e 26 (40,6%) sono deceduti. La **Tabella 4.3** riassume l'analisi univariata delle caratteristiche cliniche e tumorali e che influenzano la sopravvivenza. La DFS mediana è risultata di 17.0 mesi. La DFS mediana è risultata significativamente migliore nei pazienti con linfonodi negativi

(N0) rispetto ai pazienti con coinvolgimento linfonodale (32,7 [95% CI: 17,4-48,0] vs 14,6 mesi [95% CI: 9,1-20,1], $p < 0,01$) e per i pazienti le cui cellule tumorali erano bene o moderatamente differenziate rispetto ai tumori di grado 3 (18,4 [95% CI: 6,2-30,6] vs 7,6 mesi [95% CI: 4,3-10,9], $p = 0,001$). La OS mediana della popolazione in studio è risultata di 41,8 mesi. Migliore OS è stata osservata per i pazienti con linfonodi-negativi (57,4 [95% CI: 45,6] vs 25,3 mesi [95% CI: 13,2-37,5], $p = 0,03$), e per i tumori differenziati (44,8 [95% CI: 21,6-68,0] vs 9,7 mesi [95% CI: 2,7-17,3], $p = 0,02$) (**Figura 2**).

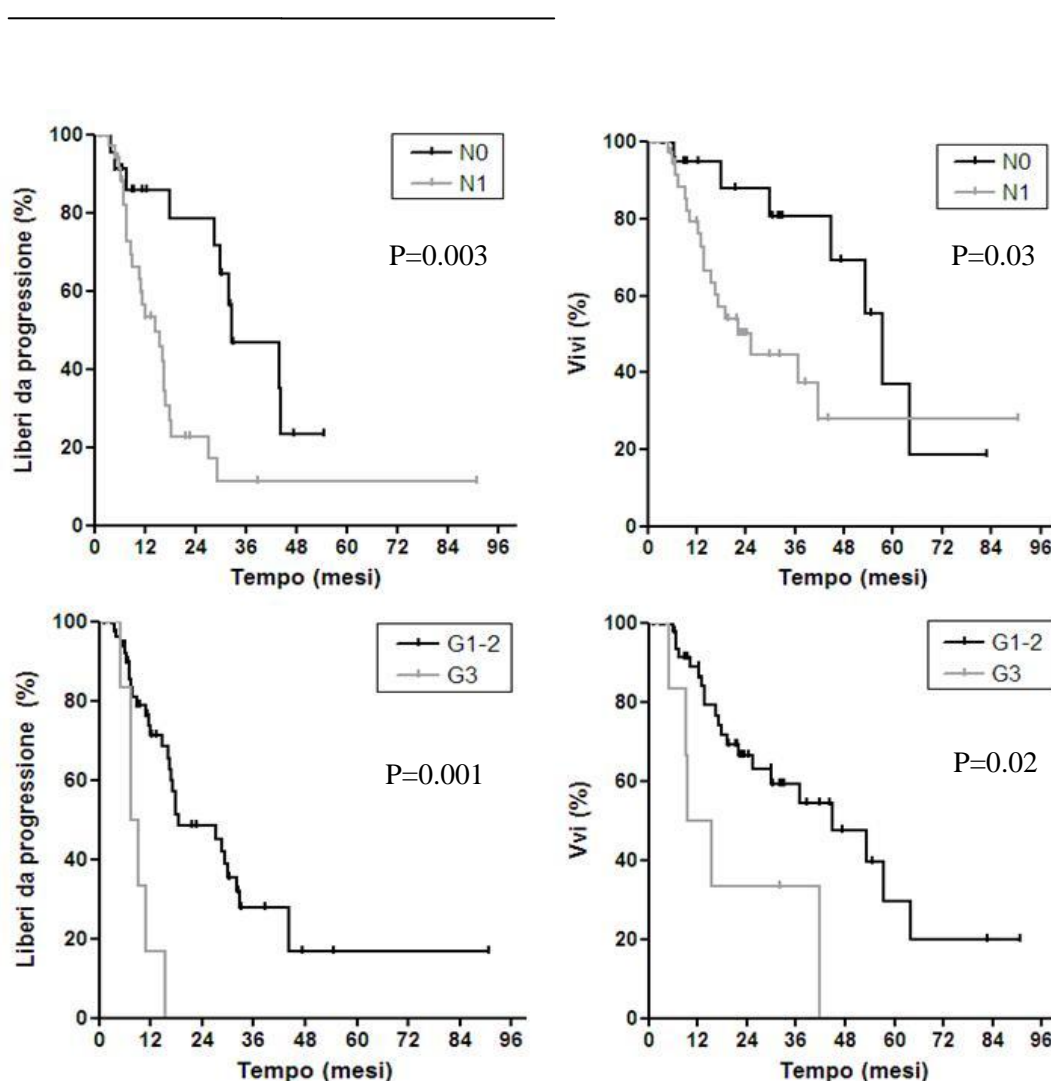


Figura 2. Stime di Kaplan-Meier di (A) DFS in base al coinvolgimento linfonodale, (B) OS in base al coinvolgimento linfonodale, (C) DFS secondo il grading tumorale, (D) OS secondo il grading tumorale.

Nella popolazione globale la prognosi di pazienti che hanno ricevuto un trattamento adiuvante non differiva significativamente da quella dei pazienti sottoposti a sola chirurgia, probabilmente a causa di bias di selezione dovuti alla natura retrospettiva dell'analisi, ma è stato osservato solo un trend verso una migliore DFS e OS. Tuttavia, analizzando separatamente i sottogruppi dei pazienti con linfonodi positivi e linfonodi negativi, in entrambi è emerso un notevole vantaggio in sopravvivenza libera da malattia dall'aver effettuato un trattamento adiuvante. E' emerso inoltre un vantaggio in sopravvivenza globale in entrambi i gruppi e questo vantaggio è risultato statisticamente significativo nei pazienti con coinvolgimento linfonodale (**Figura 3**).

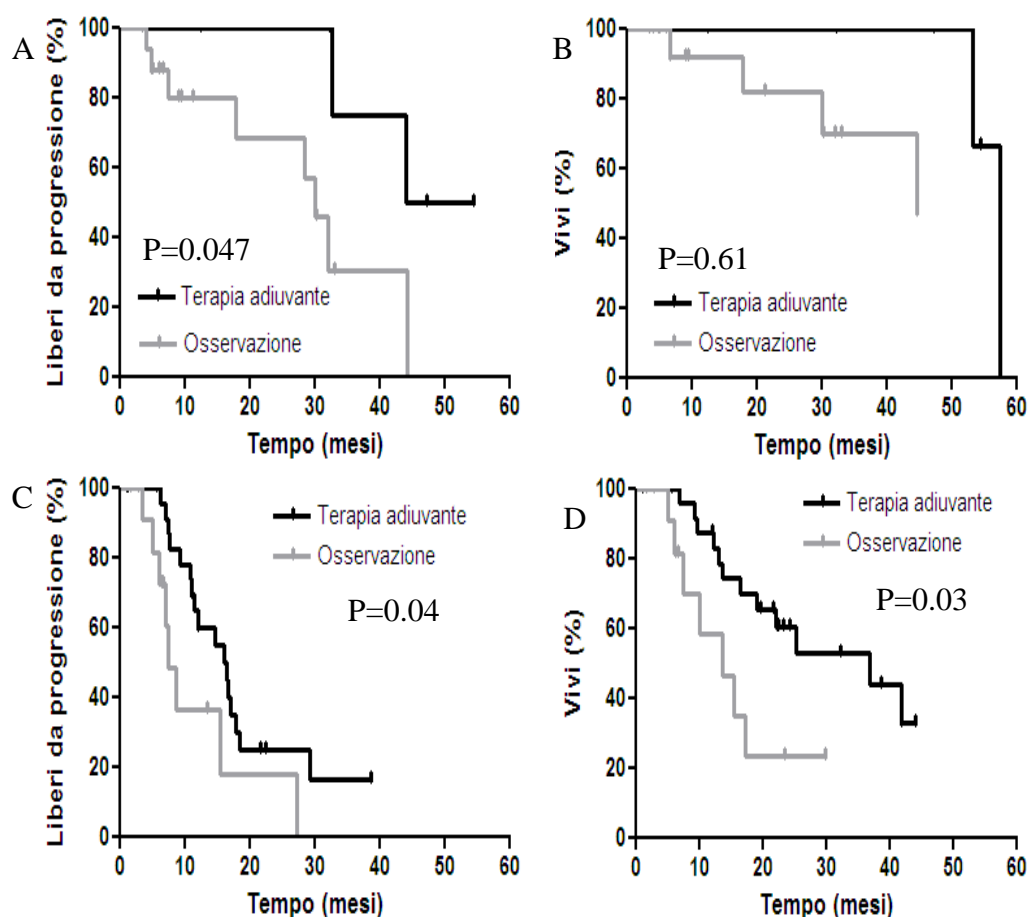


Figura 3. Stime di Kaplan-Meier di (A) DFS nei pazienti N0 in base al trattamento adiuvante, (B) OS in pazienti N0 in base al trattamento adiuvante, (C) DFS nei pazienti N1 in base al trattamento adiuvante (D) OS nei pazienti N1 in base al trattamento adiuvante.

L'analisi multivariata dell'intera coorte ha identificato come fattori prognostici positivi per DFS la negatività linfonodale, il basso grado tumorale e l'aver effettuato un trattamento adiuvante ($p=0,001$ [HR 0,23 95% CI: 0,10-0,56], $p=0,03$ [HR 0,34 95% CI: 0,13-0,92], e $p=0,02$ [HR 0,40 95% CI: 0,19-0,86], rispettivamente). La negatività linfonodale e l'aver effettuato un trattamento adiuvante sono risultati fattori prognostici positivi anche per OS dopo resezione chirurgica ($p<0,01$ [HR 0,22 95% CI: 0,08-0,64] e $p=0,03$ [HR 0,37 95% CI: 0,15-0,92], rispettivamente) (**Tabella 4.4**).

4.3.2. Correlazione tra l'espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 e le caratteristiche cliniche e l'outcome dei pazienti (coorte 2)

Un totale di 77 pazienti resecati per IPMN invasiva, e 17 per IPMN pre-invasiva sono stati arruolati (coorte 2); sono stati inoltre analizzati 5 tessuti di pancreas sano espianato per trapianto. Per le caratteristiche globali della popolazione in esame vedi **Tabella 4.5**. La maggior parte dei pazienti con IPMN invasiva ha avuto un tumore T3 (70,1%), N1 (53,2%), G2 (49,4%) e senza evidenza di coinvolgimento dei margini di resezione R0 (75,3%) (**Tabella 4.6**). Trentatré pazienti hanno ricevuto chemioterapia adiuvante con gemcitabina, fluorouracile o combinazioni di fluorouracile e derivati del platino, di cui nove in associazione a chemio-radioterapia; 34 pazienti non hanno invece ricevuto alcun trattamento adiuvante. Di 10 pazienti non erano disponibili informazioni riguardanti eventuali trattamenti ricevuti nel setting adiuvante. Il follow-up mediano è stato di 28,4 mesi (range, 6,4 a 117,3 mesi). La DFS mediana è risultata 16,5 mesi (95% CI, 11,1-21,9) mentre la sopravvivenza globale mediana è risultata 30,0 mesi (95% CI, 13,4-46,6).

- **Espressione di MiR-21, miR-155 e miR-101 nel materiale istologico.** MiR-21, miR-155 e miR-101 sono stati rilevati in 86 campioni e la **Figura 4** mostra la loro grande variabilità di espressione tra i diversi tessuti pancreatici. In particolare, i valori mediani di espressione di miR-21 (**Figura 4A**) sono risultati 0,06 au (Range 0,03-0,13) nelle cellule pancreatiche duttali normali, 3,15 au (Range 1,03-4,48) in cellule pancreatiche affette da IPMN pre-invasiva e 11,12 au (Range 3,97-20,39) in cellule pancreatiche affette da IPMN invasiva. Sorprendentemente, l'espressione miR-21 differiva significativamente tra tumori di grado 1/2 (N = 36) e tumori di grado 3 (N = 8) (p=0,01 nel Wilcoxon rank-sum test). Invece, nessuna differenza è stata rilevata nei livelli di espressione di miR-21 secondo gli altri parametri clinicopatologici (**Tabella 4.7**).

Differenze significative tra i livelli di espressione nelle IPMN invasive, pre-invasive e nelle cellule pancreatiche normali, sono state rilevate anche per miR-155 (**Figura 4B**).

Al contrario, i valori di espressione di miR-101 sono risultati simili nei tessuti pancreatici normali e nelle IPMN pre-invasive (con valori mediani di 8,6 e 9,8 au, rispettivamente), mentre valori significativamente più bassi (in media 2,71 au) sono stati osservati nelle IPMN invasive (**Figura 4C**).

Non è emersa inoltre alcuna associazione tra i livelli di espressione di miR-155 e miR-01 secondo i vari parametri clinico patologici analizzati (dati non mostrati).

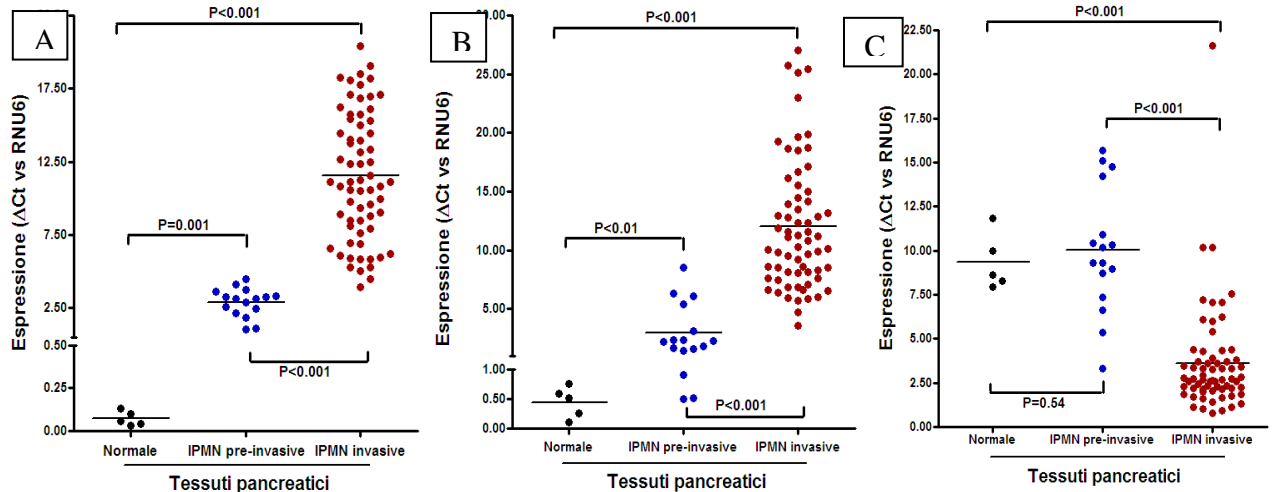


Figura 4. Valori di espressione di miR-21 (A), miR-155 (B) e miR-101 (C) nella coorte 2 di pazienti. I punti neri, blu e rossi rappresentano rispettivamente il tessuto duttale normale, le IPMN pre-invasive e le IPMN invasive. Le linee orizzontali nere indicano i valori di espressione mediani.

- **Correlazione tra i livelli di espressione di miR-21, miR-155 e miR-101 e l'outcome clinico.** Nessuno dei pazienti con IPMN pre-invasiva è deceduto a causa della malattia. Pertanto, i livelli di espressione di miR-21, miR-155, miR-101 sono stati valutati per la loro associazione con OS o DFS nella sola coorte di pazienti affetta da IPMN invasiva. Quattro di questi pazienti sono stati esclusi dalla valutazione relativa all'outcome clinico a causa di precoce decesso postoperatorio. Dunque, 61 dei 65 pazienti della coorte 2 sono stati valutati pre quanto riguarda l'outcome clinico. I pazienti

sono stati classificati in base ai valori medi di espressione di ognuno dei 3 miRNA candidati, come precedentemente descritto.

In particolare è emersa una forte interazione tra lo stato di espressione di miR-21 e l'outcome clinico. La prognosi del gruppo di pazienti che presentavano alti livelli di espressione di miR-21 è risultata peggiore rispetto a quella del gruppo di pazienti con bassi livelli di espressione. I pazienti con espressione di miR-21 sopra la media (high miR-21) avevano sopravvivenza globale mediana significativamente più breve (17,2 mesi, 95% CI, 12.5-21.8 mesi) rispetto ai pazienti con espressione di miR-21 inferiore a quella media (low miR-21: 53.3 mesi, 95% CI, 30.3-76.2 mesi; HR = 2.47, 95% CI, 1,37-5,65, $p=0,0047$). Risultati simili sono stati ottenuti per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia: la DFS mediana dei pazienti con high miR-21 è risultata 10,9 mesi rispetto ai 29,9 mesi nei pazienti con low miR-21 ($P = 0,01$). Le curve di Kaplan-Meier per OS e DFS sono mostrate nelle **Figura 5 A,B**.

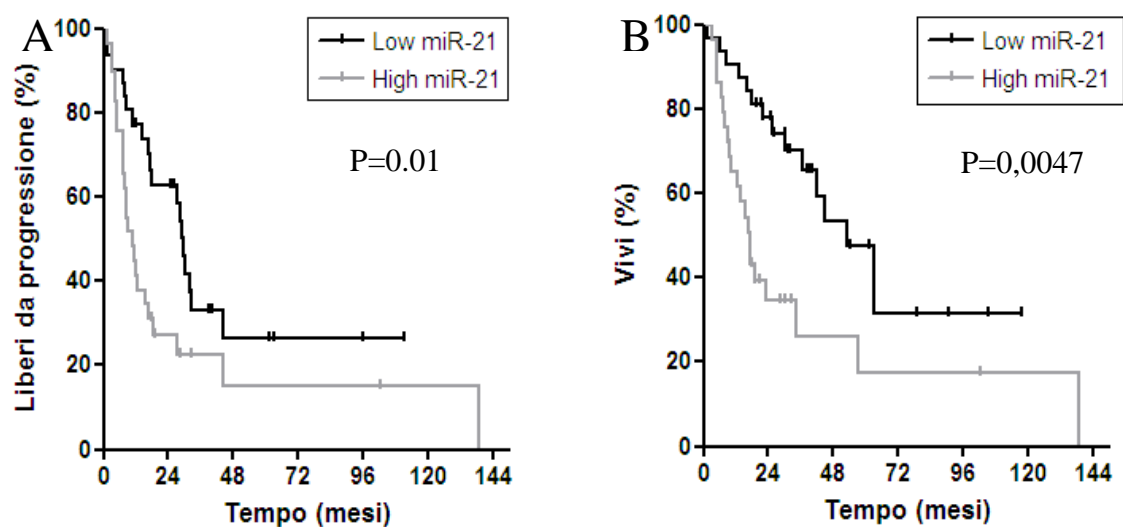


Figura 5. Curve di Kaplan-Meier di DFS (A) e OS (B) secondo l'espressione di miR-21.

Al contrario nessuna associazione significativa con l'outcome clinico è emersa sia per miR-155 che per miR-101 (**Tabella 4.8**)

Al fine di eseguire l'analisi multivariata, anche per i pazienti della coorte 2 sottoposti a resezione per IPMN invasiva è stata analizzata la correlazione tra le varie caratteristiche clinico-patologiche e l'outcome clinico. All'analisi univariata non è stata osservata nessuna associazione significativa tra le caratteristiche analizzate e l'OS o la DFS ad eccezione del coinvolgimento dei linfonodi e dei margini di resezione. La prognosi dei pazienti con coinvolgimento linfonodale era infatti significativamente peggiore rispetto a quella dei pazienti con linfonodi negativi ($p < 0.001$ sia per OS che per DFS). Allo stesso modo, pazienti con margini di resezione positivi hanno avuto OS e DFS mediana inferiori a quelle dei pazienti con margini di resezione negativi ($p = 0.03$ e $p = 0.002$ rispettivamente). Per valutare il rischio di progressione di malattia e di morte, sono state effettuate due analisi di regressione di Cox inserendo tutte le variabili significativamente associate alla DFS e all'OS all'analisi univariata. La modello di regressione di Cox utilizzato per l'analisi multivariata ha confermato il ruolo prognostico indipendente dell'espressione di miR-21 e del coinvolgimento linfonodale (**Tabella 4.9**). In particolare, ad l'alta espressione miR-21 è risultata significativamente associata ad un aumentato rischio di morte (HR 2.6, 95% CI, 1,1-6,3, $p = 0,03$), e ad un aumentato rischio di progressione (HR 3.3, 95 % CI, 1,5-7,1, $p = 0,02$).

Sebbene lo scopo di questa analisi fosse quello di valutare se l'espressione dei miRNA candidati fosse associata con l'outcome dei pazienti affetti da IPMN invasiva, abbiamo tuttavia valutato anche modelli di Cox distinti per i pazienti trattati con terapia adiuvante rispetto ai pazienti che non hanno eseguito terapia adiuvante. Il gruppo di pazienti sottoposti a trattamento adiuvante ha mostrato tassi significativamente più elevati di malattia localmente invasiva (T3-4) e di coinvolgimento linfonodale ($p = 0,008$ e $0,004$,

rispettivamente) rispetto ai pazienti non trattati. L'analisi univariata di questi gruppi ha mostrato che solo nel sottogruppo di pazienti trattati, l'alta espressione di miR-21 è stata associata ad un rischio di morte significativamente maggiore (**Tabella 4.10**).

Tabella 4.1. Caratteristiche cliniche dei pazienti della coorte 1

Caratteristiche	Pazienti N (%)
<i>No. Pazienti</i>	64
<i>Età mediana [range] anni</i>	70 [37-87]
<70	33 (51.6)
≥70	31 (48.4)
<i>Sesso</i>	
Maschile	27 (42.2)
Femminile	37 (57.8)
<i>Tumore primario</i>	
T1	4 (6.3)
T2	6 (9.4)
T3	53 (82.7)
T4	1 (1.6)
<i>Stato linfonodale</i>	
N0	24 (37.5)
N1	40 (62.5)
<i>N mediano di linfonodi resecati/[range]</i>	29 [7-97]
<i>N mediano di linfonodi positivi/[range]</i>	3.5 [1-14]
<i>Grading</i>	
G1-2	57 (89.0)
G3	7 (11.0)
<i>Sottotipo istologico</i>	
Carcinoma tubulare	61 (95.3%)
Carcinoma colloidale	3 (4.7%)
<i>Terapia adiuvante</i>	
Si	33 (51.6)
No	31 (48.4)
<i>Tipo di terapia adiuvante</i>	
Gemcitabina	23 (69.7)
Gemcitabina + radioterapia	10 (30.3)

Tabella 4.2. Caratteristiche dei pazienti della coorte 1 trattati e non trattati con terapia adiuvante

Caratteristiche	Pazienti trattati N (%)	Pazienti non trattati N (%)
<i>No. Pazienti</i>	33	31
<i>Età mediana [range]</i>	67 [37-80]	71 [50-87]
<70 anni	19 (57.6)	14 (45.2)
≥70 anni	14 (42.4)	17 (54.8)
<i>Sesso</i>		
Maschile	15 (45.5)	12 (38.7)
Femminile	18 (54.5)	19 (61.3)
<i>Tumore primario</i>		
T1-2	0 (0)	10 (32.3)
T3-4	33 (100)	21 (67.7)
<i>Stato linfonodale</i>		
N0	6 (18.2)	18 (58.1)
N1	27 (81.8)	13 (41.9)
<i>Grading</i>		
G1-2	29 (87.9)	28 (90.3)
G3	4 (12.1)	3 (9.7)

Tabella 4.3. Outcome dei pazienti della coorte 1 in relazione alle caratteristiche clinico-patologiche

Caratteristiche	Pazienti N (%)§	DFS mediana mesi (95% CI)	P*	OS mediana mesi (95% CI)	P*
<i>No. Pazienti</i>	64	17.0 (14.9-19.2)		41.8 (25.1-58.6)	
<i>Età</i>	70 [37-87]				
<70 anni	33 (51.6)	17.8 (15.8-19.9)	0.81	44.8 (22.0-67.6)	0.89
≥70 anni	31 (48.4)	16.7 (1.5-32.0)		37.0 (13.4-60.4)	
<i>Sesso</i>					
Maschile	27 (42.2)	16.5 (11.7-21.3)	0.71	25.3 (10.7-39.9)	0.21
Femminile	37 (57.8)	17.9 (15.6-20.2)		53.3 (33.0-73.5)	
<i>Tumore primario</i>					
T1-2	10 (15.6)	28.6 (22.1-34.2)	0.13	NR†	0.12
T3-4	54 (84.4)	16.5 (13.8-19.2)		36.9 (15.5-58.4)	
<i>Stato linfonodale</i>					
N0	24 (37.5)	32.7 (17.4-48.0)	0.003	57.4 (49.2-65.6)	0.03
N1	40 (62.5)	14.6 (9.1-20.1)		25.3 (13.1-37.5)	
<i>Grading</i>					
G1-2	57 (89.0)	18.4 (6.2-30.6)	0.001	44.8 (21.6-68.0)	0.02
G3	7 (11.0)	7.6 (4.3-10.9)		9.7 (2.1-17.2)	
<i>Terapia adiuvante</i>					
Si	33 (51.6)	17.0 (14.9-19.2)	0.27	41.8 (23.2-60.5)	0.38
No	31 (48.4)	17.9 (0.00-37.3)		30.0 (2.9-57.1)	

Abbreviazioni: DFS, Sopravvivenza libera da malattia; OS, Sopravvivenza globale.

* *log-rank* test.

† Non raggiunto [NR]

Tabella 4.4. Fattori associati a DFS e OS all'analisi multivariata dei pazienti della coorte 1

Covariate per DFS		Hazard (95%CI)	ratio	gl	P
<i>Stato linfonodale</i>	N1	1 (rif.)		1	0.001
	N0	0.23 (0.10-0.56)			
<i>Grading</i>	G3	1 (rif.)		1	0.03
	G1-2	0.34 (0.13-0.92)			
<i>Terapia adiuvante</i>	no	1 (rif.)		1	0.02
	si	0.40 (0.19-0.86)			

Covariate per OS		Hazard (95%CI)	ratio	gl	P
<i>Stato linfonodale</i>	N1	1 (rif.)		1	<0.01
	N0	0.22 (0.08-0.64)			
<i>Grading</i>	G3	1 (rif.)		1	0.07
	G1-2	0.39 (0.14-1.08)			
<i>Terapia adiuvante</i>	no	1 (rif.)		1	0.03
	si	0.37 (0.15-0.92)			

Tabella 4.5. Caratteristiche dei pazienti della coorte 2

Caratteristiche	Pazienti N (%)
<i>No. Pazienti</i>	94
<i>Tipo IPMN</i>	
Preinvasiva	17 (18.1)
Invasiva	77 (81.9)
<i>Età mediana [range] anni</i>	
≤68	38 (40.4)
>68	39 (41.5)
Non nota	17 (18.1)
<i>Sesso</i>	
Maschile	45 (47.9)
Femminile	49 (52.1)

Nota. Per l'analisi della diversa espressione dei miRNA candidati nei vari tessuti sono stati inoltre analizzati 5 tessuti pancreatici espuntati per trapianto

Tabella 4.6. Caratteristiche dei pazienti della coorte 2 affetti da IPMN invasiva

Caratteristiche	Pazienti N (%)
<i>No. Pazienti</i>	77
<i>Età mediana [range] anni</i>	69 [37-87]
≤68	34 (44.2)
>68	36 (46.7)
Non nota	7 (9.1)
<i>Sesso</i>	
Maschile	37 (48.1)
Femminile	40 (51.9)
<i>Tumore primario</i>	
T1	5 (6.5)
T2	9 (11.7)
T3	54 (70.1)
T4	2 (2.6)
Non noto	7 (9.1)
<i>Stato linfonodale</i>	
N0	29 (37.7)
N1	41 (53.2)
Non noto	7 (9.1)
<i>Grading</i>	
G1	4 (5.2)
G2	38 (49.3)
G3	8 (10.4)
Non noto	27 (35.1)
<i>Coinvolgimento dei margini chirurgici</i>	
R0	58 (75.3)
R1	8 (10.4)
Non noto	11 (14.3)
<i>Terapia adiuvante</i>	
Si	33 (42.9)
No	34 (44.2)
Non noto	10 (12.9)

Tabella 4.7. Associazione dell'espressione di miR-21 con le covariate clinico patologiche nei pazienti della coorte 2

Caratteristiche	Low miR-21 (%)	High miR-21 (%)	Espressione mediana di miR-21	P (Wilcoxon)
<i>Età</i>				
<69 anni	19 (57.6)	17 (53.1)	11.12	0.50
≥69 anni	14 (42.4)	15 (46.9)	11.16	
<i>Sesso</i>				
Maschile	14 (42.4)	17 (53.1)	12.38	0.18
Femminile	19 (57.6)	15 (46.9)	10.71	
<i>Tumore primario</i>				
T1-2	7 (21.9)	6 (18.8)	10.85	0.07
T3-4	25 (78.1)	26 (81.2)	11.16	
<i>Stato linfonodale</i>				
N0	16 (50.0)	11 (34.4)	9.78	0.72
N1	16 (50.0)	21 (65.6)	11.55	
<i>Grading</i>				
G1-2	20 (87.0)	16 (76.2)	10.84	0.01
G3	3 (13.0)	5 (23.8)	16.48	

NOTA: La valutazione di espressione dei microRNA è stata eseguita con successo sui campioni di 65 pazienti. I dati relativi all'età e al sesso sono disponibili da tutti questi pazienti, mentre un totale di 64, 64, e 44 dei 65 pazienti erano valutabili per le dimensioni del tumore, stato linfonodale e grading, rispettivamente.

Tabella 4.8. Outcome dei pazienti della coorte 2 in rapporto all'espressione di miRNA

Caratteristiche	Pazienti N	DFS mediana [mesi] (95% CI)	P*	OS mediana [mesi] (95% CI)	P*
<i>Tutti</i>	65 (61)	17.0 (3.7-30.3)		36.9 (16.9-57.0)	
<i>miR-21</i>					
Low miR-21	33 (32)	29.9 (27.6-32.1)	<i>0.01</i>	53.3 (30.3-76.2)	<i><0.01</i>
High miR-21	32 (29)	10.9 (6.1-15.7)		17.2 (12.5-21.8)	
<i>miR-155</i>					
Low miR-155	33 (29)	27.2 (12.3-42.2)	<i>0.69</i>	41.8 (23.9-59.8)	<i>0.96</i>
High miR-155	32 (32)	15.6 (8.2-22.9)		25.3 (4.7-45.9)	
<i>miR-101</i>					
Low miR-101	32 (31)	16.7 (9.9-23.5)	<i>0.73</i>	34.3 (20.5-48.2)	<i>0.87</i>
High miR-101	33 (30)	17.9 (1.12-34.7)		44.8 (0.0-92.7)	

* *log-rank* test.

Tabella 4.9. Fattori associati a DFS e OS all'analisi multivariata dei pazienti della coorte 2

Covariate per DFS		Hazard ratio (95%CI)	gl	P
<i>Stato linfonodale</i>	N0	1 (rif.)	1	0.03
	N1	2.62 (1.09-6.26)		
<i>Coinvolgimento dei margini</i>	R0	1 (rif.)	1	0.35
	R1	1.78 (0.53-6.02)		
<i>Espressione di miR-21</i>	low	1 (rif.)	1	0.02
	high	3.28 (1.52-7.05)		

Covariate per DFS		Hazard ratio (95%CI)	gl	P
<i>Stato linfonodale</i>	N0	1 (rif.)	1	0.04
	N1	2.23 (1.03-4.85)		
<i>Coinvolgimento dei margini</i>	R0	1 (rif.)	1	0.24
	R1	2.08 (0.61-7.04)		
<i>Espressione di miR-21</i>	low	1 (rif.)	1	0.02
	high	2.30 (1.16-4.56)		

Abbreviazioni: gl, gradi di libertà; DFS, Sopravvivenza libera da malattia; OS, Sopravvivenza globale

Tabella 4.10. Outcome dei pazienti della coorte 2 trattati e non trattati con terapia adiuvante in relazione all'espressione di miR-21

Caratteristiche	Pazienti N	OS mediana mesi (95% CI)	P*
<i>Trattati</i>	30	36.9 (16.8-57.0)	
Low miR-21		53.3 (33.4-73.2)	<i>0.01</i>
High miR-21		16.5 (10.0-23.0)	
<i>Non trattati</i>	27	30.0 (0.0-62.3)	
Low miR-21		62.9 (21.8-104.0)	<i>0.12</i>
High miR-21		15.6 (0.0-31.3)	

Abbreviazioni: DFS, Sopravvivenza libera da malattia; OS, Sopravvivenza globale

NOTA: La valutazione dell'espressione di miR-21 è stata eseguita con successo sui campioni di 57 pazienti di cui fosse noto lo status di trattamento.

* *log-rank* test.

CAPITOLO 5. *DISCUSSIONE E CONCLUSIONI*

5.1. *Discussione*

Nonostante la recente definizione e la iniziale difficoltà di identificazione, le IPMN sono ormai riconosciute quali neoplasie cistiche pancreatiche relativamente comuni (87,88) che possono presentarsi con una ampia gamma di caratteristiche cliniche e patologiche, dalla displasia mucinosa lieve, al carcinoma invasivo (175), ma la cui gestione postoperatoria ottimale rappresenta ancora argomento dibattuto. Definire la storia naturale delle IPMN invasive resecate è di fondamentale importanza per la gestione ottimale dei pazienti dopo l'intervento chirurgico; l'individuazione di fattori prognostici è infatti necessaria per identificare pazienti con malattia più aggressiva, che potrebbero beneficiare maggiormente di trattamenti adiuvanti.

Negli ultimi anni, è stato riportato che vi sono alcuni fattori clinici e patologici associati all'outcome dei pazienti resecati per IPMN invasiva: il tipo istologico del componente invasiva (90,116-121), le dimensioni del tumore (99,121-123), il coinvolgimento linfonodale (101,104,116,121), il grado tumorale (99), la percentuale della componente invasiva (124), la presenza di invasione vascolare (121) o perineurale (124). Le caratteristiche molecolari, ed il loro eventuale contributo prognostico, sono tuttavia ancora da indagare in questo tipo di neoplasie.

Altra questione ancora da definire è il ruolo della terapia adiuvante nelle IPMN invasive. I pazienti affetti da IPMN invasiva sono infatti solitamente trattati con gli stessi

regimi chemioterapici utilizzati per i carcinomi duttali ma l'andamento clinico è generalmente più indolente, suggerendo che anche se molte delle anomalie genetiche descritte nei carcinomi duttali convenzionali sono state osservate anche nelle IPMN, ci possono essere alcune differenze nella biologia delle due patologie (168).

Una esperienza, sebbene retrospettiva, del Johns Hopkins Hospital suggerisce un possibile effetto positivo sulla sopravvivenza di un trattamento chemio-radioterapico seguito da chemioterapia adiuvante in pazienti affetti da IPMN invasiva, soprattutto in evidenza di coinvolgimento linfonodale o dei margini di resezione chirurgici (126).

Anche se con i limiti di una casistica limitata e dei *bias* legati alla natura retrospettiva dell'analisi, i nostri dati confermano i principali fattori prognostici nei pazienti sottoposti a resezione per IPMN invasiva: l'analisi univariata rivela che i pazienti con linfonodi negativi e le cui cellule tumorali sono bene o moderatamente differenziate presentano sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale significativamente migliori. I risultati del nostro studio supportano inoltre l'efficacia di una chemioterapia a base di gemcitabina nel setting adiuvante per i pazienti affetti da IPMN invasiva: il trattamento adiuvante conferisce notevole beneficio in sopravvivenza libera da malattia sia in pazienti con linfonodi negativi che in pazienti con linfonodi positivi; emerge inoltre un significativo vantaggio in sopravvivenza globale nei pazienti con coinvolgimento linfonodale. Un *trend* verso una maggiore sopravvivenza generale si osserva anche in pazienti con linfonodi negativi anche se non è stata raggiunta la significatività statistica.

L'analisi multivariata conferma che l'aver linfonodi positivi e il non aver effettuato una terapia adiuvante costituiscono fattori prognostici negativi con impatto significativo sulla sopravvivenza libera da malattia e sulla sopravvivenza globale dopo la resezione chirurgica.

In assenza di dati di letteratura atti ad indagare il ruolo prognostico di eventuali marcatori biomolecolari nelle IPMN invasive, il nostro studio si è posto anche

l'ambizioso obiettivo di indagare la relazione di tre miRNA candidati e l'outcome clinico. A seguito della loro recente scoperta, i miRNA sono stati infatti designati quali regolatori cardine dell'espressione genica, con la potenzialità di spiegare il divario che spesso esiste tra genotipo e fenotipo tumorale.

Abbiamo dunque valutato l'impatto di miR-21, miR-155 e miR-101 sull'outcome dei pazienti affetti da IPMN invasiva dimostrando una associazione significativa tra l'espressione di miR-21 e la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale dei pazienti radicalmente operati. Inoltre, abbiamo osservato differenze significative tra i livelli di espressione di miR-21 e miR-155 nel tessuto pancreatico sano rispetto alle IPMN non-invasive e rispetto alle IPMN invasive, il che suggerisce che i valori crescenti di questi miRNA siano correlati con la progressione dalle lesioni benigne alle IPMN invasive. Diversamente, i livelli di espressione di miR-101 nei campioni di tessuto pancreatico sano sono risultati simili a quelli rilevati nelle IPMN non-invasive, ma significativamente maggiori rispetto alle IPMN invasive, in accordo con un recente studio condotto in pazienti asiatici su una casistica ben più limitata (5 IPMN non invasive e 5 invasive) (78). Sarebbe dunque la down-regulation di miR-101 e la conseguente aumentata espressione dei suoi target a contribuire al processo di carcinogenesi delle IPMN.

Un vantaggio dell'utilizzo dei miRNA come biomarcatori è che i progressi tecnologici hanno permesso di determinare in modo attendibile la loro espressione utilizzando tessuti d'archivio FFPE, rendendo l'analisi possibile anche quando vi siano piccole quantità di tessuto tumorale disponibile. I miRNA valutati nei nostri campioni pancreatici sono stati accuratamente selezionati in base ai precedenti dati di letteratura disponibili riguardo alle IPMN non-invasive e/o invasive (78,169,170).

Inoltre, dai preclinici relativi agli adenocarcinomi duttali hanno dimostrato che questi miRNA sono coinvolti nella 1) proliferazione, invasione e chemioresistenza a

gemcitabina, attraverso la modulazione di diversi target diretti e indiretti, come il *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), la metalloproteinasi-2 e la metalloproteinasi-9 (miR-21), (75,76); 2) repressione della proteina tumorale 53- proteina indotta nucleare 1, che è un gene proapoptotico stress-indotto, target di p53 (miR-155), (77) e 3) regolazione del membro chiave della famiglia del gruppo-Polycomb, EZH2 (78), che può inibire diversi geni oncosoppressori, svolgendo un ruolo di primo piano nello sviluppo del cancro, e che rappresenta un fattore importante nella chemioresistenza a gemcitabina (79).

Studi clinici hanno dimostrato che la iper-espressione miR-21 è predittiva di minore sopravvivenza nei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas sia in stadio adiuvante che in fase metastatica (75,162,164,165); allo stesso modo anche il ruolo prognostico negativo della iper-espressione di miR-155 è stato osservato in casistiche analoghe (169). Mancano ad oggi dati di correlazione tra espressione di miR-101 e la prognosi di pazienti con tumore pancreatico ma possono essere ipotizzati sulla base del ruolo prognostico negativo del suo target EZH2 in questa popolazione (164).

Nel nostro studio l'espressione miR-21 emerge come fattore costantemente e significativamente associato con la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale, confermandosi come fattore prognostico indipendente all'analisi multivariata. Questi risultati sono coerenti con una meta-analisi che dimostra come elevati livelli di espressione di miR-21 siano indicativi di minore sopravvivenza in pazienti affetti da tumori del tratto gastro-intestinale (174). Prendendo in considerazione i risultati di studi preclinici che dimostrano il significativo impatto dell'espressione di miR-21 sulla genesi e progressione neoplastica (176) nonché l'evidenza di una quasi costante iper-espressione di miR-21 nei tumori umani, miR-21 è stato denominato "oncomir" (cioè un miRNA con proprietà oncogeniche).

Un punto di forza di questo studio è che esso è che le analisi dei tre miRNA candidati sono state condotte su una serie omogenea e multicentrica di pazienti, i cui esemplari sono stati tutti accuratamente rivisti e laser-microdissezionati. Accurata è stata inoltre la selezione dei pazienti per l'analisi di fattori clinici e patologici, la loro correlazione con la prognosi e la valutazione del ruolo della chemioterapia adiuvante: abbiamo infatti ristretto la nostra analisi a pazienti aventi una caratterizzazione patologica completa, accurata valutazione radiologica perioperatoria della malattia, di cui fossero disponibili i report clinici e dei quali avessimo accesso ad adeguati dati di follow-up.

Al contrario, i limiti principali di questo studio risiedono nella relativamente modesta dimensione del campione e nel disegno retrospettivo; i nostri risultati devono dunque essere considerati come generatori di ipotesi in attesa di essere confermati prospettivamente in più ampie casistiche.

5.2. Conclusioni

I risultati del nostro studio suggeriscono che i pazienti sottoposti a resezione per IPMN associata a componente invasiva possono beneficiare di un trattamento chemioterapico adiuvante. Come farmaco abbiamo utilizzato la gemcitabina sulla base dei dati disponibili riguardo all'adenocarcinoma duttale in questo setting, ma studi clinici prospettici saranno necessari per ottimizzare l'approccio a questi pazienti, identificare quale trattamento può essere offerto e quali pazienti possono avere maggiori benefici dal trattamento.

Si riportano inoltre, per la prima volta, dati riguardo alla associazione tra l'espressione di miR-21e la sopravvivenza dei pazienti affetti da IPMN invasiva. L'evidenza di una espressione differenziale di questo miRNA, di miR-155 e miR-101 nei tessuti normali, nelle IPMN non invasive e in quelle invasive, rafforza ulteriormente l'influenza di questi

miRNA nello sviluppo di questa patologia, e suggerisce il loro possibile ruolo quali nuovi bersagli terapeutici. In ultima analisi, la validazione del ruolo di questi miRNA in studi prospettici multicentrici potrebbe offrire nuovi strumenti per l'ottimizzazione del trattamento in pazienti selezionati.

Bibliografia

1. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 134.
2. I tumori in Italia, Rapporto 2006: Tumore del pancreas. Tumori, Associazione Italiana Registri. 2006, E&P, Vol. Suppl. 2, p. 46-47.
3. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 2010; 21: 1323-1360.
4. Petrelli NJ, Winer EP, Brahmer J et al. *Clinical Cancer Advances 2009: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology.* *J Clin Oncol* 2009, Vol. 27, p. 6052-6069.
5. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*, 2004, Vol. 363, p. 1049-1052.
6. Vincent A, Herman J, Schulick R. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011, Vol. 378, p. 607-620.
7. Varadhachary GR, Tamm EP, Abbruzzese JL, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions, management, and role of preoperative therapy. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1035-46.
8. Corsini MM, Miller RC, Haddock MG, et al. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy for pancreatic carcinoma: the Mayo Clinic experience (1975-2005). *J Clin Oncol* 2008; 26: 3511-16.
9. Herman JM, Swartz MJ, Hsu CC, et al. Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3503-10.

10. Hsu CC, Herman JM, Corsini MM, et al. Adjuvant chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma: the Johns Hopkins Hospital-Mayo Clinic collaborative study. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 981–90.
11. Hattangadi JA, Hong TS, Yeap BY, Mamon HJ. Results and patterns of failure in patients treated with adjuvant combined chemoradiation therapy for resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2009; 115: 3640–50.
12. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer: adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985; 120: 899–903.
13. Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahmoud T, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 1999; 230:776–782; discussion 782–784.
14. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:1200–1210.
15. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2007; 297:267-277.
16. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, et al. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2010, 304:1073-1081.
17. Regine WF, Winter KA, Abrams RA et al. Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 1019–26.

18. Gastrointestinal Tumor Study Group. Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. *Cancer* 1987; 59:2006–2010.
19. Garofalo MC, Regine WF, Tan MT. On statistical reanalysis, the EORTC trial is a positive trial for adjuvant chemoradiation in pancreatic cancer. *Ann Surg* 2006; 244:332-333.
20. Bakkevold KE, Amesjo B, Dahl O et al. Adjuvant combination chemotherapy (AMF) following radical resection of carcinoma of the pancreas and papilla of vater—Results of a controlled, prospective, randomized multicenter study. *Eur J Cancer* 1993; 29:698-703.
21. Takada T, Amano H, Yasuda H, et al. A Phase III Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial in Patients with Resected Pancreaticobiliary Carcinoma. *Cancer* 2002;95:1685-1695.
22. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 358:1576–1585.
23. Stocken DD, Buchler MW, Dervenis C, et al. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2005; 92:1372–1381.
24. National Comprehensive Cancer Network. Pancreatic Adenocarcinoma V.2.2012. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.
25. C. Neuzillet, A. Sauvanet, P. Hammel. Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Visceral Surgery* 2011;148: e232 - e243.
26. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5268-5272.
27. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12:541-552.

28. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002; 94:1593-1611.
29. Kim ST, Lim do H, Jang KT, et al. Impact of KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Pancreatic Cancer Patients Treated with First-line Gemcitabine-Based Chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2001;10:1993-1999.
30. Smith RA, Tang J, Tudur-Smith C, Neoptolemos JP and P Ghaneh. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 2011;104:1440 – 1451
31. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005; 41(15):2213—36.
32. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-1966.
33. Da Cunha Santos G, Dhani N, Tu D, et al. Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3. *Cancer* 2010;116:5599-5607.
34. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, et al. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988;16:7773-7782.
35. Campani D, Boggi U, Cecchetti D, Esposito I, Ceccarelli F, D'Antonio L, De Negri F, Mosca F, Bevilacqua G, Fornaciari G. p53 overexpression in lymph node metastases predicts clinical outcome in ductal pancreatic cancer. *Pancreas* 1999;19: 26–32.
36. Schutte M, Hruban RH, Geradts J. Abrogation of the Rb/p16 tumor suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126–3130.

37. Chen J, Li D, Killary AM et al. Polymorphisms of p16, p27, p73, and MDM2 modulate response and survival of pancreatic cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Ann Surg Oncol* 2009;16, 431–439.
38. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* 2006;10: 515– 527.
39. Dallas NA, Fan F, Gray MJ, Van Buren II G, Lim SJ, Xia L, Ellis LM. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells. *Cancer Metastasis* 2007; Rev 26: 433–441.
40. Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131: 225–234.
41. Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther* 2006;19: 61–69.
42. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438(7070):932-936.
43. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350(23):2335-2342.
44. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for nonsmall-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 2006; 355(24):2542-2550.
45. Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2009; 6(7):412-422.
46. Korc M. Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2003; 2:8-8.

47. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007; 6(4):1186-1197.
48. Rahbari NN, Schmidt T, Falk CS, Hinz U, Herber M, Bork U, Büchler MW, Weitz J and Koch M. Expression and prognostic value of circulating angiogenic cytokines in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2011; 11:286.
49. Gross A, McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13,1899–1911.
50. Nio Y, Iguchi C, Yamasawa K et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2001; 22, 230–239.
51. Evans JD, Cornford PA, Dodson A, et al. Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology* 2001;1, 254–262.
52. Campani D, Esposito I, Boggi U, et al. Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. *J Pathol* 2001;194, 444–450.
53. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321(5897):1801-6.
54. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55(4): 623—31.
55. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell* 2004;116:281-297.
56. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269
57. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Molecular Cancer Research* 2003;1:882-891.

58. Volinia S, Calin GA, Liu C, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS* 2006;103:2257-2261.
59. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes mir-15 and mir-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524–9.
60. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(4):1290–7.
61. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressor and oncogenes. *Oncogene* 2006; 25(46):6188–96.
62. Lu J, Getz G, Miska EA et al. microRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
63. Jay C, Nemunaitis J, Chen P, et al. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol* 2007; 26:293-300.
64. Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 2011;30:59-67.
65. Blower PE, Chung J, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 7:1-9.
66. Passetti F, Ferreira CG, Costa FF. The impact of microRNAs and alternative splicing in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics J* 2009;9:1-13.
67. van Jaarsveld MT, Helleman J, Berns EM, Wiemer EA. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1282-1290.
68. Jin L, Hope KJ, Zhai Q et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 2006; 12:1167-1174.

69. Ali S, Ahmad A, Banerjee S et al. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer Res* 2010; 70:3606-3617.
70. Seux M, Iovanna J, Dagorn JC, Dusetti NJ. MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: new diagnostic and therapeutic clues. *Pancreatology* 2009; 9:66-72.
71. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007;297:1901-1908.
72. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1046-1054.
73. Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26:4442-4452.
74. Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 2009; 33:698-709.
75. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenci LA, Vasile E, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 2010; 70:4528-38.
76. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1067-74.
77. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16170-5.

78. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Tanaka H, et al. Carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Loss of MicroRNA-101 Promotes Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol* 2011 Sep 20. [Epub ahead of print]
79. Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res* 2008;14:6790-6.
80. Ohhashi KMY, Takekoshi T. Four cases of mucin producing cancer of the pancreas on specific findings of papilla of Vater. *Prog Diag Endosc* 1982; 20: 348-351.
81. Kloppel G, Solcia E, Longnecker DS et al. Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. In: World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors*, 2nd ed. Berlin: Springer 1996:15–21.
82. Zamboni G Longnecker DS et al. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. *World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon, France: IARC Press, 2000.
83. Longnecker DS, Adler G, Hruban RH et al. Intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. *World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon, France: IARC Press 2000:237–241.
84. Reddy RP, Smyrk TC, Zapiach M, Levy MJ, Pearson RK, Clain JE, Farnell MB, Sarr MG, Chari ST. Pancreatic mucinous cystic neoplasm defined by ovarian stroma: demographics, clinical features, and prevalence of cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1026–1031.
85. Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, Sessa F, Capella, C, Solcia E, Rickaert F, Mariuzzi GM, Kloppel G: Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 410–422.

86. Thompson LD, Becker RC, Przygodzki RM, Adair CF, Heffess CS: Mucinous cystic neoplasm (mucinous cystadenocarcinoma of lowgrade malignant potential) of the pancreas: a clinicopathologic study of 130 cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1–16.
87. Andrejevic-Blant S, Kosmahl M et al: Pancreatic intraductal papillary-mucinous neoplasms: a new and evolving entity. *Virchows Arch* 2007; 451: 863-863.
88. Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G. Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal. *Virchows Arch* 2004 Aug;445(2):168-78.
89. Salvia R, Fernandez-del Castillo C et al. Main duct intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long term survival following resection. *Ann Surg* 2004; 239: 678-685.
90. Sohn TA, Yeo CJ et al. Intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas: an update experience. *Ann Surg* 2004; 239: 788-797.
91. Kimura W, Makuuchi M et al. Characteristics and treatment of mucin-producing tumor of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2001-2008.
92. Yamao K, Ohashi K et al. The prognosis of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1129-1134.
93. Tanaka M, Chari S, Adsay V et al. International Consensus Guidelines for Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas. *Pancreatology* 2006; 6:17–32.
94. Rodriguez JR, Salvia R, Crippa S et al. Branch-duct intraductal papillary mucinous neoplasms: Observations in 145 patients who underwent resection. *Gastroenterology* 2007;133:72–79.
95. Jang JY, Kim SW, Lee SE et al. Treatment guidelines for branch duct type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: When can we operate or observe? *Ann Surg Oncol* 2008; 15:199 –205.

96. Partelli S, Fernandez-Del Castillo C, Bassi C et al. Invasive intraductal papillary mucinous carcinomas of the pancreas: predictors of survival and the role of lymph node ratio. *Ann Surg* 2010; 251:477–482.
97. Schnelldorfer T, Sarr MG et al. Experience with 208 resections for intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Arch Surg* 2008; 143: 639-646.
98. Nagai K, Doi R, Kida A et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinicopathologic characteristics and long-term follow-up after resection. *World J Surg* 2008; 32:271–278; discussion 279–280.
99. Wasif N, Bentrem DJ, Farrell JJ et al. Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Versus Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer* 2010; 116: 3369–77.
100. Niedergethmann M, Grützmann R, Hildenbrand R et al. Outcome of Invasive and Noninvasive Intraductal Papillary-Mucinous Neoplasms of the Pancreas (IPMN): A 10-year Experience. *World J Surg* 2008; 32:2253–2260.
101. Chari ST, Yadav D et al. Study of recurrence after surgical resection of intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123(5):1500-7.
102. Wada K, Kozaked RA et al. Outcomes following resection of invasive and noninvasive intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Am J Surg* 2005; 189: 632-637.
103. Kitagawa Y, Unger TA et al. Mucus is a predictor of better prognosis and survival in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Gastrointest Surg* 2003; 7:12-19.
104. Maire F, Hammel P et al. Prognosis of malignant intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas after surgical resection. Comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002; 51: 717-722.

105. Kim SC, Park KT, Lee YJ et al. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: clinical characteristics and treatment outcomes of 118 consecutive patients from a single center. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:183–188.
106. Doi R, Fujimoto K, Wada M et al. Surgical management of intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas. *Surgery* 2002;132:80–85.
107. Raut CP, Cleary KR, Staerkel GA et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: effect of invasion and pancreatic margin status on recurrence and survival. *Ann Surg Oncol* 2006;13:582–594.
108. Falconi M, Salvia R, Bassi C et al. Clinicopathological features and treatment of intraductal papillary mucinous tumour of the pancreas. *Br J Surg* 2001; 88:376–381.
109. Sugiyama M, Izumisato Y, Abe N et al. Predictive factors for malignancy in intraductal papillary-mucinous tumours of the pancreas. *Br J Surg* 2003;90:1244–1249.
110. Grützmann R, Niedergethmann M, Pilarsky C, Klöppel G, Saeger HD. Intraductal Papillary Mucinous Tumors of the Pancreas: Biology, Diagnosis, and Treatment. *Oncologist* 2010; 15:1294–1309.
111. Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, et al. Pattern of recurrence after resection for intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *World J Surg* 1998;22:874–878.
112. Terris B, Ponsot P, Paye F et al. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas confined to secondary ducts show less aggressive pathologic features as compared with those involving the main pancreatic duct. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:1372–1377.
113. Woo SM, Ryu JK et al. Survival and prognosis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2008; 36: 50-55

114. Shimada K, Sakamoto Y et al. Invasive carcinoma originating in an intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: a clinicopathologic comparison with a common type of invasive ductal carcinoma. *Pancreas* 2006; 32: 281-287
115. Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hayashidani Y, Hashimoto Y, Nakashima A, Sueda T. Invasive intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2009 Jul 1;100(1):13-8.
116. Waters JA, Schnelldorfer T, Aguilar-Saavedra JR, Chen J-H, T Yiannoutsos C, Lillemoe KD, Farnell MB, Sarr MG, Schmidt CM. Survival after Resection for Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm and for Pancreatic Adenocarcinoma: A Multi-Institutional Comparison According to American Joint Committee on Cancer Stage. *J Am Coll Surg* 2011Aug;231(2):275-83.
117. Adsay NV, Pierson C, Sarkar F, Abrams J, Weaver D, Conlon KC, Brennan MF, Klimstra DS Colloid (mucinous noncystic) carcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:26–42.
118. Conlon KC. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *J Clin Oncol* 2005 Jul 10;23(20):4518-23.
119. Sadakari Y, Ohuchida K, Nakata K, Ohtsuka T, Aishima S, Takahata S, Nakamura M, Mizumoto K, Tanaka M. Invasive carcinoma derived from the nonintestinal type intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas has a poorer prognosis than that derived from the intestinal type. *Surgery* 2010; 147: 812-817.
120. Yopp AC, Allen PJ. Prognosis of invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *World J Gastrointest Surg* 2010 Oct 27;2(10):359-62.
121. D'Angelica M, Brennan MF, Suriawinata AA, Klimstra D, Conlon KC. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an analysis of clinicopathologic features and outcome. *Ann Surg* 2004 Mar;239(3):400-8.

122. Turrini O, Waters JA, Schnelldorfer T, Lillemoe KD, Yiannoutsos CT, Farnell MB, Sarr MG, Schmidt CM. Invasive intraductal papillary mucinous neoplasm: predictors of survival and role of adjuvant therapy. *HPB (Oxford)* 2010 Sep;12(7):447-55.
123. Wilentz RE, Hruban RH. Pathology of cancer of the pancreas. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7:43-65.
124. Jang JY, Hwang DW, Kim MA, Kang MJ et al. Analysis of Prognostic Factors and a Proposed New Classification for Invasive Papillary Mucinous Neoplasms. *Ann Surg Oncol* 2011;18:644–650.
125. Worni M, Akushevich I, Gloor B, Scarborough J, Chino JP, Jacobs DO, Hahn SM, Clary BM, Pietrobon R, Shah A. Adjuvant Radiotherapy in the Treatment of Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: an Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry. *Ann Surg Oncol* 2011 Oct 15. [Epub ahead of print]
126. Swartz MJ, Hsu CC, Pawlik TM, et al. Adjuvant chemoradiotherapy after pancreatic resection for invasive carcinoma associated with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:839–44.
127. Baskerville S, Bartel D. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005;11(3):241–7
128. Bentwich I, Avniel A, Karov Y et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature* 2005;37(7):766–70.
129. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10(12):1957–66.
130. He L, Hannon GJ. microRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature* 2004; 5 (7): 522–31.
131. Ambros V. microRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress and timing. *Cell* 2003; 113(6):673–6.

132. Brennecke J, Hipfner AS, Russell RB, Cohen SM. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. *Cell* 2003;113(1):25–36.
133. Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP. microRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303(5654):83–6.
134. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005;4:269–76.
135. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005;435(7042):682–6.
136. Calin GA, Croce CM. microRNA signatures in human cancers. *Nature* 2006;6(11):857–66.
137. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007; 67(6):2456–68.
138. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5848–56.
139. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(9):2999–3004.
140. Boren T, Xiong Y, Hakam A et al. microRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2008;110(2):206–15.
141. Iorio MV, Ferracin M, Liu C, et al. microRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065–70.
142. Iorio MV, Visone R, Di Leva G et al. microRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67(18):8699–707.

143. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. microRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome. *JAMA* 2008;299(4):425–36.
144. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006;25(17):2537–45.
145. Nguyen GH, Schetter AJ, Chou DB et al. Inflammatory and microRNA gene expression as prognostic classifier of Barrett’s-associated esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(23):5824–34.
146. Dacic S, Kelly L, Shuai Y, Nikiforova MN. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* 2010;23(12):1577–82.
147. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513–8.
148. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011 Nov;80(2):193-208.
149. O’Donnell KA, Wentzel EA, Zellen KI et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435(7043):839–43.
150. Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2010; 126(6):1283–90.
151. Wang S, Olsun EN. Angiomirs: key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19(3):205–11.
152. Boren T, Xiong Y, Hakam A et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2009;113(2):249–55.

153. Boyd MR, Kenneth DP. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res* 2005;34(1):91–109.
154. Blower PE, Verducci JS, Lin S et al. microRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel. *Mol Cancer Ther* 2007;6(5):1483–591.
155. Zhang L, Huang J, Yang N et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(24):9136–41.
156. Mishra PJ, Bertino JR. microRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009;10(3):399–416.
157. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):389–402.
158. Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 2009;126(1):2–10.
159. Fojo T. Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or pro moter regions, epigenetic changes and microRNAs. *Drug Resist Updat* 2007;10(1–2):59–67.
160. Song B, Ju J. Impact of miRNAs in gastrointestinal cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e33.
161. Mardin WA, Mees ST. MicroRNAs: novel diagnostic and therapeutic tools for pancreatic ductal adenocarcinoma? *Ann Surg Oncol* 2009;16(11):3183–9.
162. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24(29):4677-84.

163. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24(29):4677–84.
164. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. MicroRNA- 21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(12):2171–6.
165. Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical out- come following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS ONE* 2010;5(5):e10630.
166. Greither T, Grochola LF, Udelnow A et al. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 2010;126(1):73–80.
167. Wang J, Chen J, Chang P et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2(9):807–13.
168. Fernández-del Castillo C, Adsay NV. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology* 2010;139:708-13.
169. Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2009;8:340-6.
170. Ryu JK, Matthaei H, Dal Molin M, Hong SM, Canto MI, Schulick RD et al. Elevated microRNA miR-21 levels in pancreatic cyst fluid are predictive of mucinous precursor lesions of ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2011;11:343-50.
171. Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter R et al. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathological criteria, and overall

survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(2):534-45.

172. Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, Yeo CJ, Kleer CG, Brody JR, et al. Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2010;41:1205-9.

173. Funel N, Giovannetti E, Pollina LE, del Chiaro M, Mosca F, Boggi U, et al. Critical role of laser microdissection for genetic, epigenetic and proteomic analyses in pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11:695-701.

174. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1245-53.

175. Shi C, Hruban RH. Intraductal papillary mucinous neoplasm. *Hum Pathol* 2012 Jan;43(1):1-16.

176. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010;467:86–90.