

Università degli Studi di Urbino “Carlo Bo”



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

Dipartimento di Scienze Biomolecolari

---

Dottorato di Ricerca in

*Metodologie Biochimiche e Farmacologiche*

Ciclo XXVIII

SSD BIO/11

**Differente sopravvivenza tra maschi e femmine  
associata a polimorfismi e miRNA  
correlati ai *clock-genes* in pazienti con  
cancro metastatico del colon-retto**

**Relatore**

Chiar.mo Prof.  
Mauro Magnani

**Dottoranda**

Dott.ssa  
Teresa Ricciardi

**Co-relatrice**

Dott.ssa  
Annamaria Ruzzo

---

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>1.1 IL RITMO CIRCADIANO</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1</b> Il sistema circadiano nei Mammiferi: basi cellulari	8
<b>1.1.2</b> Il pathway molecolare dei <i>clock-genes</i> nei Mammiferi	11
<b>1.1.3</b> Le disfunzioni del ritmo circadiano: dal jet-lag al cancro	15
<b>1.1.4</b> La regolazione del ritmo circadiano: ruolo dei microRNA e dei polimorfismi genetici	18
<b>1.2 IL TUMORE AL COLON-RETTO</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1</b> I processi di patogenesi	22
<b>1.2.2</b> La prognosi e le terapie	27
<b>1.2.3</b> Il cancro al colo-retto e il ritmo circadiano	30
<b>1.3 IL FATTORE GENDER</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1</b> Il fattore gender nel cancro al colon-retto	32
<b>1.4 L'OBIETTIVO DELLA RICERCA</b>	<b>33</b>

---

<b>2. MATERIALI E METODI</b>	35
<b>2.1</b> Arruolamento dei pazienti e raccolta campioni	36
<b>2.2</b> Analisi dei microRNA: estrazione, retro trascrizione e quantificazione	37
<b>2.3</b> Analisi dei polimorfismi genetici: estrazione gDNA, amplificazione e genotipizzazione	45
<b>2.4</b> Analisi di immunoistochimica	48
<b>2.5</b> Analisi statistica	50
<b>3. RISULTATI</b>	52
<b>3.1</b> Analisi delle caratteristiche clinico-patologiche	53
<b>3.2</b> Overall Survival (OS) e Progression Free Survival (PFS) gender-related	54
<b>3.3</b> Associazione gender-related di microRNA e OS/PFS	54
<i>miR-206</i>	56
<i>miR-219</i>	57
<i>miR-132</i>	59
<i>miR-192</i>	60
<i>miR-194</i>	60
<b>3.4</b> Box-plot miRNA	61

	Indice
<b>3.5</b> Associazione gender-related di SNP e OS/PFS	67
<i>rs11133373</i>	69
<i>rs1801260</i>	70
<i>rs11133391</i>	70
<b>3.6</b> Box-plot SNP	73
<b>3.7</b> Sottogruppo di donne con prognosi migliore	77
<b>3.8</b> Associazione fra caratteristiche clinico-patologiche e microRNA	78
<b>3.9</b> Associazione fra caratteristiche clinico-patologiche e SNP	80
<b>4. DISCUSSIONE</b>	81
<b>5. CONCLUSIONE</b>	88
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	89

## **1. INTRODUZIONE**

*“...mentre il sole tramonta e gli animali diurni dormono, i roditori escono dalle loro tane per andare alla ricerca di cibo e i rapaci notturni si alzano in volo per cominciare la loro caccia; intanto i funghi filamentosi producono spore e i cianobatteri, terminata la fotosintesi diurna, iniziano la fissazione dell'azoto. Il mattino seguente, al sorgere del sole, le piante hanno già posizionato le loro foglie per catturare i primi raggi di luce, mentre molti esseri umani sono in auto, bloccati nel traffico di un'autostrada poco distante...”*

*(Buhr ED & Takahashi JS, 2013)*

## **1.1 IL RITMO CIRCADIANO**

Gli organismi di tutti i phyla presentano un ritmo biologico governato da un “orologio molecolare endogeno” e caratterizzato da un periodo di 24 ore, sincronizzato con il ciclo naturale del giorno e della notte: è il ritmo circadiano (Buhr ED & Takahashi JS, 2013).

Il termine “circadiano”, coniato da Franz Halberg, deriva dal latino “circa diem” che vuol dire “intorno al giorno”. La rotazione della Terra intorno al proprio asse, infatti, genera dei cambiamenti giornalieri delle condizioni ambientali, come le variazioni di luce e temperatura, le quali mettono alla prova la sopravvivenza di tutte le forme di vita. Come risultato, i differenti organismi hanno sviluppato dei meccanismi intrinseci di “*timekeeping*” che, sincronizzandosi con la rotazione terrestre, vanno a coordinare processi biochimici, fisiologici e comportamentali che consentono loro di anticipare e “prepararsi per” i cambiamenti ambientali, migliorando così il loro adattamento: si può facilmente dedurre come un apparato fotosintetico riesca a catturare maggiore energia se al filtrare dei primi raggi di sole sia già pronto e ben orientato (Merrow M *et al*, 2005).

Una proprietà fondamentale dell’ “orologio circadiano” consiste nel manifestarsi sia in presenza di stimoli temporali esterni, come la luce e la temperatura, espletando così la capacità di sincronizzarsi (Moore RY & Card JP, 1985), sia in assenza di

questi segnali: il comportamento ritmico persiste ugualmente in condizioni stabili (Merrow M *et al*, 2005).

Il metabolismo, il ciclo cellulare, l'apoptosi, la sintesi e la riparazione del DNA sono tutti esempi di attività regolate dal sistema circadiano (Karantanos *et al*, 2014).

Parametri che oscillano secondo un periodo circadiano si possono misurare in tutti gli organismi: negli animali molteplici parametri seguono andamenti ciclici, dall'espressione genica al comportamento; nelle piante si notano diversi fenomeni ritmici circadiani, come il movimento delle foglie, il tasso di crescita, l'apertura degli stomi, nonché l'espressione di gran parte dei geni che prendono parte al processo fotosintetico; il fungo *Neurospora crassa* produce spore asessuali ogni 22 ore in condizioni di buio costante; mentre il cianobatterio *Synechococcus* esegue i processi di fotosintesi e fissazione dell'azoto in momenti opposti del giorno, risolvendo così il problema dell'incompatibilità dei processi separandoli nel tempo piuttosto che nello spazio, come fanno altri cianobatteri (Merrow M *et al*, 2005).

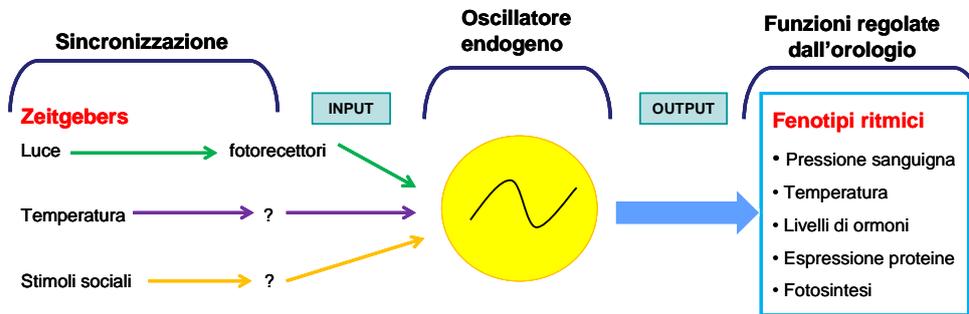
L'origine genetica dei ritmi circadiani è stata dimostrata per la prima volta nel 1935 su foglie di due diversi ceppi della pianta di fagiolo, le quali compivano movimenti con periodicità diversa nei due ceppi, ed esperimenti di ibridazione tra i due ceppi producevano foglie con movimenti regolati da una periodicità intermedia. Circa 40 anni dopo, l'identificazione del gene *per* nella *Drosophila melanogaster* costituì il primo passo fondamentale verso la conoscenza delle basi genetiche dei ritmi circadiani (Vella L, 2000).

Il ritmo circadiano si basa, sia dal punto di vista concettuale che strutturale, su tre componenti fondamentali:

- 1) *pacemaker*: un meccanismo intrinseco che genera l'oscillazione con un periodo intorno alle 24 ore;
- 2) *input*: una via di ingresso degli stimoli esterni necessari per la sincronizzazione dell'oscillazione intrinseca a tali informazioni (*entrainment*);
- 3) *output*: una via di uscita attraverso cui quest'oscillazione raggiunge gli organi periferici e innesca il ritmo biologico in tutto l'organismo.

Si tratta quindi di un'organizzazione gerarchica: un pacemaker centrale, sincronizzandosi con gli stimoli esterni, genera a livello cellulare delle oscillazioni molecolari, che si traducono in segnali endocrini e nervosi; questi ultimi, agendo in

concerto con il pacemaker, dettano il ritmo all'organismo, coordinando organi e tessuti periferici (Mohawk JA *et al*, 2012; Guilding C *et al*, 2007; Meroow M *et al*, 2005) (fig.1).

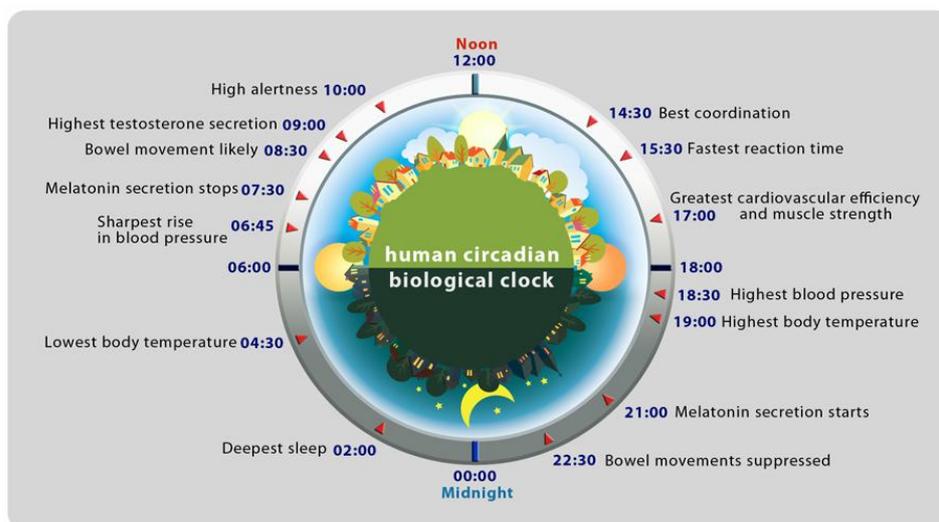


**Figura 1:** i tre componenti fondamentali del sistema circadiano: gli stimoli esterni che fanno da sincronizzatori (input), il pacemaker centrale che genera l'oscillazione, i fenotipi ritmici che vengono generati dai segnali oscillatori (output) del pacemaker.

Sebbene l'orologio biologico circadiano propriamente detto è conservato nella maggior parte degli organismi viventi, come è stato descritto, le componenti che costituiscono i segnali di *input* e *output* possono essere diverse e specie-specifiche (Gaudi S *et al*, 2000).

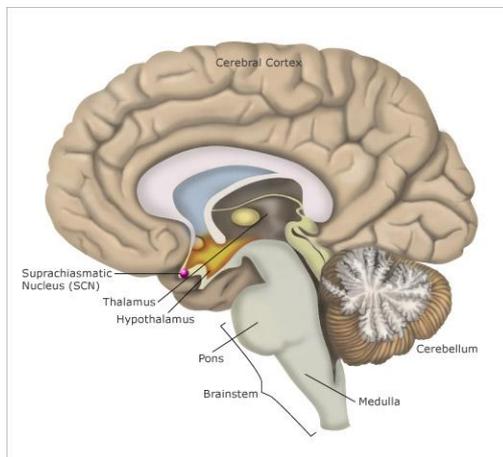
### 1.1.1 Il sistema circadiano nei Mammiferi: basi cellulari

Nei Mammiferi il sistema circadiano coordina, nel corso delle 24 ore, processi come il ciclo sonno-veglia, l'alternanza attività-riposo, l'angiogenesi, il ritmo di secrezione del cortisolo e di altri ormoni, le variazioni della temperatura corporea, dell'appetito e di alcuni parametri legati al sistema circolatorio (Lévi *et al*, 2010; Innominato *et al*, 2010) (fig.2).



**Figura 2:** manifestazione di alcuni fenotipi ritmici nei Mammiferi nel corso delle 24 ore.

Il pacemaker nei Mammiferi è rappresentato dal nucleo soprachiasmatico (SCN: *Supra Chiasmatic Nucleus*), una struttura composta da due agglomerati neuronali situati alla base dell'ipotalamo (Savvidis C *et al*, 2012; Vella L, 2000) (fig.3).



**Figura 3:** localizzazione del nucleo soprachiasmatico (SCN) alla base dell'ipotalamo.

La funzione del SCN come orologio biologico è ampiamente documentata in letteratura; è noto, infatti, come la sua distruzione abolisca i ritmi circadiani, rendendo aritmici i soggetti; mentre, al contrario, il trapianto di cellule nervose prelevate dal SCN di animali di controllo ripristina il regolare ritmo sonno-veglia (Boer GJ *et al*, 1998; Vella L, 2000). Molteplici studi sperimentali indicano oscillazioni ritmiche circadiane nel SCN sia per quanto riguarda l'espressione di molte molecole, quali neuropeptidi e recettori (Boer GJ *et al*, 1998; Vella L, 2000), sia per quanto riguarda la frequenza di scarica dei neuroni del SCN (Morrow M *et al*, 2005).

Negli ultimi trent'anni significativi progressi sono stati raggiunti sulla conoscenza della generazione del ritmo circadiano: sembra che i singoli neuroni del SCN, mediante un meccanismo molecolare di trascrizione-traduzione a feedback (TTFL: transcription-translation molecular feedback loop), guidino dei cambiamenti nell'eccitabilità della loro membrana, generando segnali elettrici secondo ritmi quotidiani che raggiungono i tessuti periferici (Belle MDC, 2015; Colwell CS, 2011; Brown TM *et al*, 2007).

Si ritiene che queste variazioni giorno-notte dello stato elettrico sincronizzino l'attività dei neuroni nel pacemaker e comunichino informazioni circadiane al cervello e al corpo (Colwell CS, 2011).

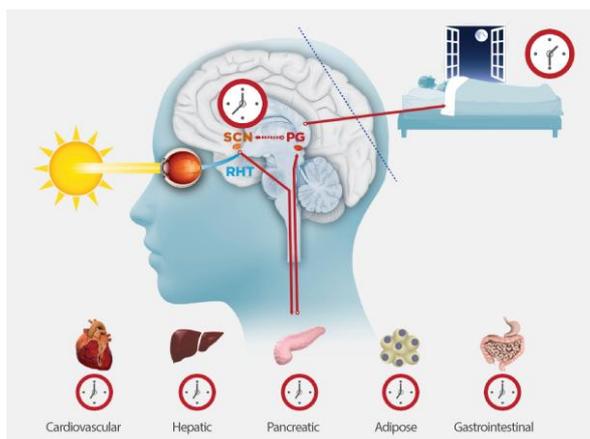
Il principale, anche se non l'unico, agente deputato alla sincronizzazione dei ritmi endogeni con l'ambiente esterno è la luce. Il SCN riceve informazioni sull'illuminazione attraverso gli occhi. La retina degli occhi è composta anche

da cellule gangliari retinali fotosensibili, contenenti un pigmento chiaro chiamato melanopsina. Queste cellule si eccitano con la luce e danno origine al tratto retino-ipotalamico (RTH), che comunica direttamente i livelli di luce dell'ambiente al SCN, mediante la sua attività glutammatergica (Lucas RJ *et al*, 2014; Meroz M *et al*, 2005). Il glutammato è un neurotrasmettitore e causa nelle cellule del SCN l'attivazione della trascrizione del gene *PER* (Lowery PL *et al*, 2000). Nell'ipotalamo sono stati descritti tutte le principali classi di recettori glutammatergici. Questo permette ai segnali di luce provenienti dall'ambiente esterno di resettare i neuroni del SCN e coordinare la loro attività per generare una fedele rappresentazione interna delle ore di luce (Lucas RJ *et al*, 2014).

Diversi stimoli fisiologici interni, che emergono principalmente dai sistemi omeostatici del corpo, fungono da segnali feedback e hanno come obiettivo quello di sopprimere principalmente l'espressione di *PER* e l'attività elettrica (Hughes AT *et al*, 2012). Questi segnali di retroazione vengono comunicati al SCN tramite una varietà di neuropeptidi, tra cui il GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico), la cui sintesi va incontro a oscillazioni circadiane (Belle MDC, 2015). Questo neurotrasmettitore potrebbe svolgere un ruolo critico nell'oscillazione della frequenza dei potenziali d'azione nei neuroni del SCN. Oltre al glutammato e al GABA, che sono sicuramente i neurotrasmettitori più utilizzati per questo tipo di comunicazione, mostrano espressione e fluttuazioni circadiane nel SCN anche la serotonina, che ha effetti generalmente inibitori; l'acetilcolina e peptidi come vasopressina (AVP) e somatostatina (Belle MDC, 2015).

L'impulso di tipo elettrico, generato dal TTFI e dall'apertura di diversi canali ionici nella membrana dei neuroni del SCN, diventa poi di tipo endocrino, quando raggiunge alcune ghiandole, come la ghiandola pineale (Andrade-Silva J *et al*, 2014), i neuroni ipotalamici secernenti GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Gillespie JM *et al*, 2003; Choe HK *et al*, 2013) ed anche alcuni tessuti endocrini periferici, come surrene, testicolo e ovaio (Bittman EL *et al*, 2003); ciò serve per divulgare in tutte le parti del corpo le informazioni generate dal SCN, in modo da sincronizzare tutte le funzioni dell'organismo.

Il SCN, infatti, non è essenziale per le oscillazioni nei tessuti periferici, in quanto vi sono altri sistemi di oscillazione autonomi, detti "*clocks*", dislocati nel nostro organismo che generano ritmi biologici; il ruolo del SCN diventa indispensabile per la sincronizzazione di tutti i *clocks* periferici (fig.4), incluso quello del tratto gastro-intestinale (Nishide SY *et al*, 2006).

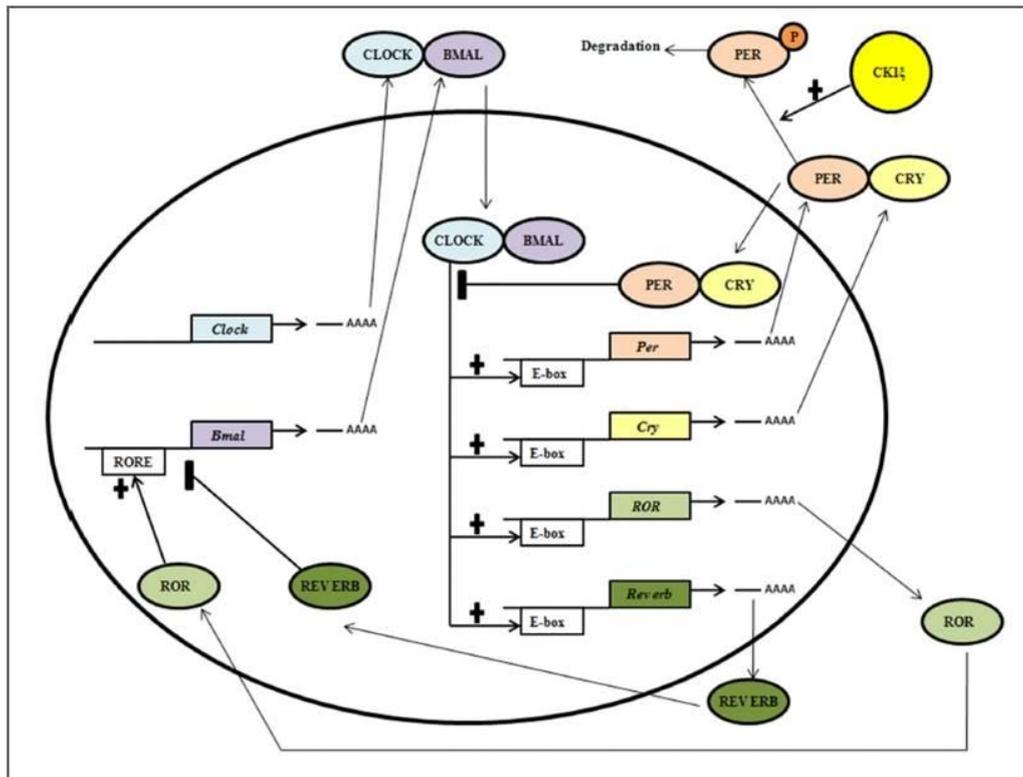


**Figura 4:** Una rappresentazione schematica del SCN che, sincronizzandosi con i segnali dell'ambiente esterno, va a coordinare altri *clocks* dislocati in tessuti e organi periferici.

Infine, nei Mammiferi è degna di nota la funzione della ghiandola pineale o epifisi, una piccola struttura situata nella parete posteriore del terzo ventricolo; essa è responsabile della sintesi e della secrezione dell'ormone melatonina in risposta ai segnali provenienti dal SCN (Foulkes NS *et al*, 2000; Mellow M *et al*, 2005). La secrezione di melatonina è governata da un ritmo circadiano che inibisce la sintesi di melatonina durante le ore diurne; in particolare i livelli di melatonina sono bassi durante il giorno e aumentano rapidamente poco dopo la comparsa dell'oscurità, fino a raggiungere il picco di concentrazione ematica tra le 2:00 e le 4:00 di notte, per poi ridursi gradualmente fino a raggiungere i livelli diurni subito prima dell'alba (Vella L, 2000).

### 1.1.2 Il pathway molecolare dei *clock-genes* nei Mammiferi

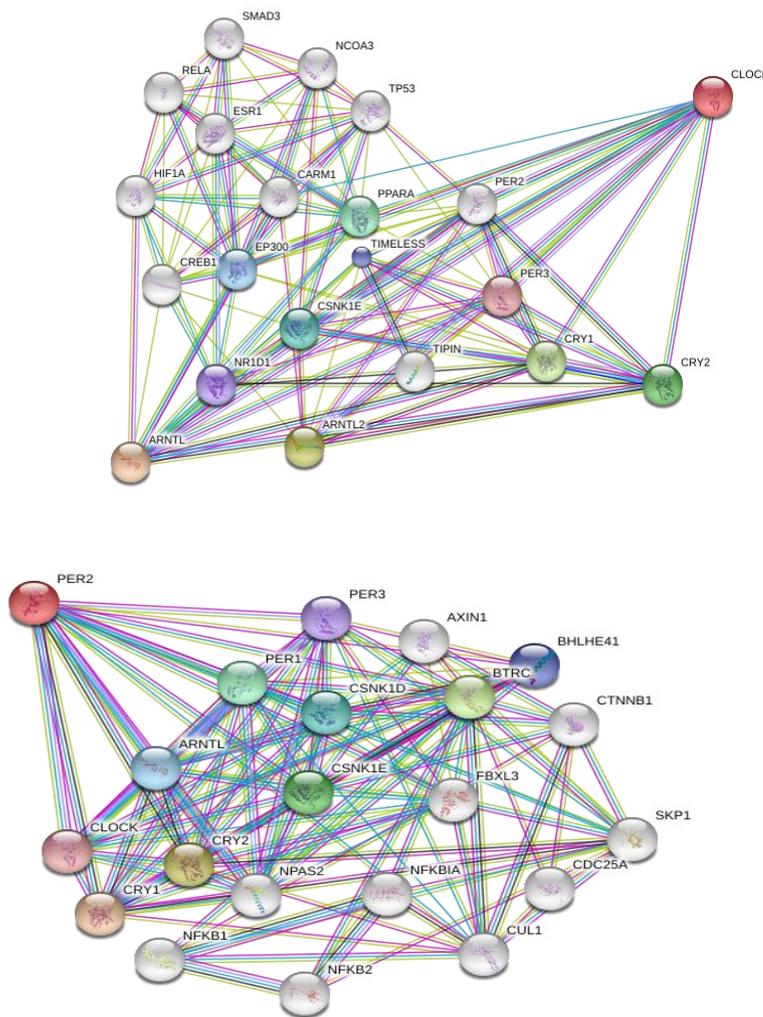
Il pathway molecolare che ha luogo nel SCN consiste in un circuito autoregolatorio di trascrizione-traduzione a feedback (TTFL) che coinvolge i geni *CLOCK*, *BMAL1* (*ARNTL*), *PERIOD* (*PER 1*, *2* e *3*) e *CRYPTHOCROME* (*CRY 1* e *2*) che nell'insieme costituiscono i *clock-genes* (i "geni clock"). I fattori di trascrizione *CLOCK* e *BMAL1* eterodimerizzano e up-regolano l'espressione dei geni *PER* e *CRY* legandosi agli elementi E-box presenti nella regione a monte di essi. Le proteine *PER* e *CRY* sono anch'esse dei fattori di trascrizione e, formando dei complessi eterotipici, reprimono l'attività trascrizionale del complesso *CLOCK/BMAL1* mediante un sistema a feedback negativo (Dibner C *et al*, 2010). L'eterodimero *CLOCK/BMAL1* attiva anche l'espressione di altri due fattori di trascrizione: *ROR* e *REV-ERB*, i quali si alternano, rispettivamente, nell'up-regolare e down-regolare l'espressione del gene *BMAL1*, legandosi agli elementi *RORE* a monte del gene (Borg *et al*, 2009; Dibner C *et al*, 2010). Nella figura 5 è descritto il pathway molecolare nei dettagli.



**Figura 5:** rappresentazione schematica del pathway molecolare dei *clock-genes* nei Mammiferi. Il meccanismo centrale che regola l'orologio molecolare consiste di un ramo a feedback autoregolatorio che oscilla con una periodicità di circa 24 ore. I fattori di trascrizione CLOCK e BMAL1 eterodimerizzano per formare il braccio positivo del ramo e up-regolano l'espressione dei fattori di trascrizione PER e CRY legandosi agli elementi E-box presenti nella regione a monte di questi geni. I fattori di trascrizione PER e CRY formano il braccio negativo del ramo regolatorio. Dopo aver raggiunto una concentrazione critica, PER e CRY formano dei complessi eterotipici e reprimono l'attività trascrizionale del complesso CLOCK/BMAL1. La trascrizione dei fattori di trascrizione ROR e REV-ERB, che fanno parte del pathway molecolare dei *clock-genes*, è regolata dal complesso CLOCK/BMAL1 che si lega agli elementi E-box di questi geni. A turno ROR e REV-ERB si alternano nell'up-regolare e down-regolare l'espressione del gene *Bmal1* legandosi agli elementi RORE a monte del gene. In più, la Caseina Chinasi 1ε (CK1ε) fosforila ed etichetta la proteina PER, destinandola così alla degradazione via proteasoma e di conseguenza ne regola la stabilità.

In figura il segno + rappresenta l'up-regolazione del gene e il segno | rappresenta la down-regolazione.

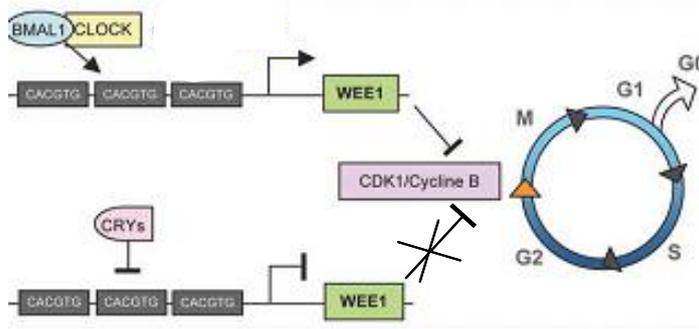
Oltre al coinvolgimento in questo circuito di TTFL, i *clock-genes* interagiscono con molte altre vie di segnalazione per regolare e sincronizzare tutte le funzioni del nostro organismo; la figura 6 riporta come esempio alcune interazioni stabilite da due componenti del TTFL.



**Figura 6:** due esempi delle principali interazioni proteina-proteina stabilite da CLOCK e PER2. E' possibile notare che oltre all'interazione con gli altri componenti del TTFL, CLOCK e PER2 influenzano l'attività di molte altre proteine e di conseguenza regolano molteplici processi fisiologici. Per esempio, CLOCK interagendo con HIF1 $\alpha$  (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) può regolare il processo di angiogenesi, interagendo con TP53, che è un oncosoppressore, può avere un ruolo nello sviluppo dei tumori. Fra le tante interazioni che stabilisce PER2 sono da sottolineare quelle con NF $\kappa$ B1 e 2, che sono dei regolatori dell'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria (<http://string-db.org>).

CLOCK, può attivare l'espressione di altri geni coinvolti, per esempio, nella regolazione dell'angiogenesi, nella riparazione del DNA (Karantanos T *et al*, 2014). Studi condotti sul fegato di topi, ad esempio, evidenziano come il dimero CLOCK/BMAL1 e le proteine CRYs agiscano sulla progressione del ciclo cellulare al livello della **transizione G<sub>2</sub>/M**, regolando l'espressione di *Wee1* (Matsuo *et al*, 2003; van der Horst GT *et al*, 1999).

*Wee1* è una tirosin-chinasi che, fosforilando a sua volta la *CDK1* (chinasi ciclina-dipendente 1), inattiva il complesso *CDK1/Ciclina B* che rappresenta un regolatore chiave della transizione G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare (Matsuo T *et al*, 2003). Il promotore di *Wee1* contiene tre E-box che sono attivati dall'eterodimero CLOCK/BMAL1 e repressi da CRY 1 e 2 (Borgs L *et al*, 2009) (fig.7).

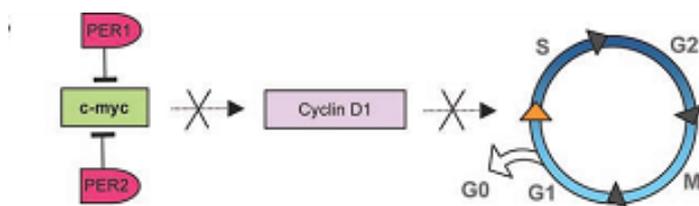


Borgs L *et al*, 2009

**Figura 7:** immagine schematica del meccanismo mediante il quale i *clock-genes* regolano la progressione del ciclo cellulare. L'eterodimero BMAL1/CLOCK e le proteine CRYs riconoscono le sequenze E-box presenti nel promotore di *WEE1*, si legano e rispettivamente attivano o reprimono la trascrizione di *Wee1*, portando all'inibizione o repressione del ciclo cellulare.

Inoltre, BMAL1 svolge anche un ruolo critico nella regolazione dell'espressione di p53, il gene oncosoppressore per eccellenza (Mullenders J *et al*, 2009; Grechez-Cassiau *et al*, 2008).

Le proteine PER sembrano essere coinvolte principalmente nella regolazione della risposta immunitaria (Liu J *et al*, 2006; Sukumaran S *et al*, 2010) e del ciclo cellulare a livello della **transizione G<sub>1</sub>/S**, reprimendo indirettamente l'espressione della Ciclina D1, tramite l'inibizione della trascrizione dell'oncogene *c-myc* che normalmente ne attiva l'espressione (Borgs L *et al*, 2009; Perez-Roger I *et al*, 1999) (fig.8).



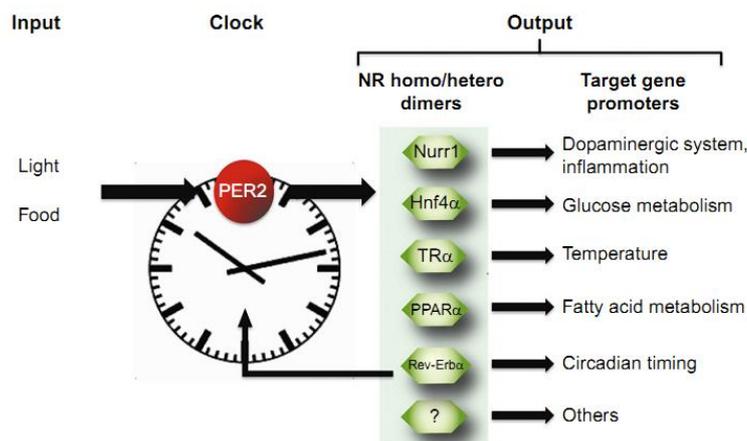
Borgs L *et al*, 2009

**Figura 8:** immagine schematica del meccanismo mediante il quale i *clock-genes* regolano la progressione del ciclo cellulare. Le proteine della famiglia PER possono inibire la trascrizione di *c-myc* e, di conseguenza, l'attivazione della ciclina D1. Le proteine PER reprimono, quindi, indirettamente la progressione G<sub>1</sub>/S.

PER1 e PER2, legandosi alle sequenze E-box contenute nel promotore di *c-myc* ne permettono un'espressione ritmica: di conseguenza, in presenza di PER1 o PER2 *c-myc* non viene espresso, la Ciclina D1 non viene trascritta e il ciclo cellulare si arresta (Pelengaris S *et al*, 2003; Fu L *et al*, 2002).

Inoltre, PER2 soprattutto nel fegato e in specifiche aree del cervello, media interazioni con diversi recettori nucleari, fungendo da co-attivatore o co-repressore e regolando finemente la loro attività adattandola al ritmo circadiano, e

influenzando diversi processi metabolici e fisiologici (Ripperger JA *et al*, 2012) (fig.9). E' stato dimostrato, infatti, che PER2 subisce modifiche post-trascrizionali di fosforilazione, che riflettono direttamente il ritmo circadiano, e ogni sito di fosforilazione può rappresentare un sito docking per specifiche proteine (Ripperger JA *et al*, 2012).



**Figura 9:** Trasmissione delle informazioni circadiane ai recettori nucleari target di PER2. Mediante interazioni dirette con i recettori nucleari (NR) omo- o eterodimerici, PER2 influenza i promotori dei geni target corrispondenti e diversi processi metabolici e fisiologici. L'attività di PER2 può essere modulata mediante segnali di input (come luce o cibo, etc) che arrivano all'oscillatore molecolare.

Ripperger JA *et al*, 2012

Infine, il sistema circadiano esercita un controllo anche sull'apoptosi, confermato dall'espressione ritmica e ben controllata di *BCL-2* e *BAX*, due proteine coinvolte nel processo di morte cellulare programmata (Granda TG *et al*, 2005).

Dal momento che i *clock-genes* interagiscono con molte altre vie di segnalazione, si può facilmente immaginare come una disfunzione del ritmo circadiano porti a numerose patologie nell'organismo.

### 1.1.3 Le disfunzioni del ritmo circadiano: dal jet-lag al cancro

La distruzione del ritmo circadiano è causa di una grande varietà di disordini, da quelli minori e facilmente reversibili, come il famoso *jet-lag*, a danni severi che comprendono disordini metabolici, malattie infiammatorie e persino il cancro (Sukumaran S *et al*, 2010).

Molti geni coinvolti nella regolazione della glicolisi, biosintesi, metabolismo lipidico, fosforilazione ossidativa sono direttamente e indirettamente sotto il controllo dei *clock-genes*, e infatti sono collegate alla disfunzione del ritmo circadiano la **sindrome metabolica**, l'**obesità** e il **diabete**. Per esempio, CLOCK, legandosi agli elementi E-box del gene codificante il recettore nucleare PPARα (o RORα), coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico, ne regola l'espressione (Sukumaran S *et*

*al*, 2010; Oishi K *et al*, 2005); REV-ERB sembra essere coinvolto nella regolazione della gluconeogenesi epatica (Sukumaran S *et al*, 2010; Yin L *et al*, 2007); mentre una delezione specifica del gene *BMAL1* nel fegato di ratto ha portato a ipoglicemia (Lamia *et al*, 2008). Infine è stato dimostrato che *PER2* è espresso in regioni del mesencefalo deputate alla regolazione dell'assorbimento di cibo (Ripperger JA *et al*, 2012).

Altri componenti del ritmo circadiano, invece, regolano negativamente l'espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria e nell'infiammazione, coinvolgendo i *clock-genes* nelle **malattie infiammatorie e disordini autoimmuni** (Cutolo M *et al*, 2008). Per esempio *PER2* è un importante regolatore della produzione di INF $\gamma$  (interferone  $\gamma$ ) e della funzionalità delle cellule Natural Killer (NK) (Liu J *et al*, 2006). REV-ERB, invece, regola l'espressione dei geni IL-6 e COX-2 (ciclossigenasi-2) nelle cellule muscolari lisce vascolari (Migita H *et al*, 2004) e aumenta la transattivazione del fattore nucleare NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), importante regolatore dell'espressione di diversi geni della risposta immunitaria (Sukumaran S *et al*, 2010; Wang J *et al*, 2006). Inoltre, anche l'espressione plasmatica delle citochine IL-6, IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , GM-CSF sembra avere ritmicità circadiana (Sukumaran S *et al*, 2010; Wang J *et al*, 2006); infatti le concentrazioni plasmatiche di IL-6 e TNF $\alpha$ , importanti citochine pro-infiammatorie, mostrano un picco all'inizio della parte attiva della giornata (durante le prime ore della mattina nell'uomo e durante le prime ore di buio nei roditori) (Cutolo M *et al*, 2008).

Inoltre, variazioni anomale dei livelli di *PER2* sono state associate sia con **depressione** e vulnerabilità psicologica (Lavebratt C *et al*, 2010; Partonen T *et al*, 2007), sia con **insonnia** e disturbi del sonno (Franken P *et al*, 2007; Kopp C *et al*, 2002).

Infine, è stato dimostrato il collegamento fra alterazione del ritmo circadiano e sviluppo e progressione del **cancro** (Zhu Y *et al*, 2006). Molteplici evidenze in letteratura hanno stabilito uno stretto legame non solo tra la disfunzione dell'orologio biologico e lo sviluppo e la progressione del cancro (Karantanos T *et al*, 2014; Lévi F *et al*, 2010; Kloog I *et al*, 2009; Viswanathan AN *et al*, 2009; Fu L and Lee CC, 2003; Filipski E *et al*, 2002), ma anche una correlazione con lo stadio del tumore, con la prognosi nell'uomo (Hsu CM *et al*, 2012) e con la velocità di crescita del tumore in modelli animali (Anderson LE *et al*, 2000).

Studi epidemiologici condotti su lavoratori che effettuavano turni di notte hanno rilevato che la rottura del ritmo circadiano rappresentava un fattore critico per la

tumorigenesi del cancro al seno (Stevens RG, 2005), alla pelle (Schernhammer ES *et al*, 2011), al colon-retto (Schernhammer ES *et al*, 2003), alla prostata (Zhu Y *et al*, 2006) e all'endometrio (Viswanathan AN *et al*, 2007); inoltre, è stata ritrovata un'espressione alterata dei *clock-genes* nel carcinoma epatocellulare (HCC) (Lin YM *et al*, 2008), nella leucemia mieloide cronica (CML) (Yang MY *et al*, 2011) e nel carcinoma a cellule squamose di testa e collo (HNSCC) (Hsu CM *et al*, 2012).

In diversi studi clinici, le disfunzioni del ritmo circadiano, oltre che con un più alto tasso di incidenza tumorale, sono state associate anche con una minore sopravvivenza e una peggiore qualità della vita dei pazienti (Lévi F *et al*, 2007).

Un altro collegamento fra instabilità circadiana e cancro riguarda la velocità di crescita delle cellule tumorali nell'uomo: la periodicità circadiana dell'attività metabolica o della proliferazione cellulare tende ad essere persa nei tumori in stadio avanzato e in quelli a crescita rapida e ad essere rimpiazzata con una periodicità di poche ore; mentre è solitamente conservata in tumori ben differenziati e a crescita lenta (Filipski E *et al*, 2005; Granda TG & Lévi F, 2002).

Tutti questi dati indicano senza dubbio che l'instabilità del ritmo circadiano gioca un ruolo molto importante nello sviluppo dei tumori; infatti fra i target regolati dal pathway dei *clock-genes* vi sono molecole coinvolte nella divisione cellulare (Lin F *et al*, 2013; Zeng ZL *et al*, 2010; Gréchez-Cassiau *et al*, 2008), nell'apoptosi e nella riparazione del DNA (Gery S *et al*, 2006; Lévi F *et al*, 2007), tutti meccanismi alla base del processo di tumorigenesi e che mostrano, in ogni caso, una regolazione circadiana (Fu L & Lee CC, 2003).

Un'alterazione del ritmo circadiano nelle cellule tumorali nell'uomo è supportata da una diminuita espressione dei geni PER1, PER2, PER3 rispetto al tessuto sano di riferimento; in particolare la deregolazione dei geni PER1 e PER2 è stata riscontrata in diversi tumori, tra cui glioma, cancro al seno, alla prostata, al colon-retto, all'endometrio e al pancreas (Xia HC *et al*, 2010; Kuo SJ *et al*, 2009; Chen ST *et al*, 2005; Cao Q *et al*, 2009; Iacobelli S *et al*, 2008; Wang Y *et al*, 2011; Krugluger W *et al*, 2007; Mostafaie N *et al*, 2009; Yeh KT *et al*, 2005; Pogue-Geile KL *et al*, 2006). Una metilazione inappropriata è stata osservata nelle isole CpG del gene *PER3* in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC) (Yang MY *et al*, 2006).

Inoltre, altri studi condotti su modelli murini, hanno confermato che topi con una deficienza di *Per2* risultavano essere più suscettibili a tumori indotti da radiazioni, che la down-regolazione di *Per* promuoveva la crescita tumorale (Fu L *et al*, 2002;

Lee S *et al*, 2010) e che l'overespressione di *Per1* o *Per2* riduceva la crescita del tumore *in vivo* e ne promuoveva l'apoptosi *in vitro* (Hua H *et al*, 2006; Miyazaki K *et al*, 2010; Fu L *et al*, 2002; Yang X *et al*, *Chronobiol Int* 2009; Yang X *et al*, *Cancer Res Treat* 2009; Yang X *et al*, *Integr Cancer Ther* 2009).

Tutti questi dati permettono di descrivere i geni della famiglia *PER* come geni oncosoppressori (Sukumaran S *et al*, 2010; Lee CC, 2006; Fu L and Lee CC, 2003).

Oltre che nello sviluppo e nella progressione del cancro, il ritmo circadiano è implicato anche nei meccanismi di risposta e di resistenza ai chemioterapici perché controlla i principali pathway responsabili della bioattivazione e del metabolismo cellulare dei farmaci antitumorali, caratterizza i meccanismi di trasporto e i processi di detossificazione, regolando la trascrizione di enzimi e proteine non solo nel fegato, che è il principale organo deputato all'eliminazione dei farmaci e dei loro metaboliti, ma anche nell'intestino, nei reni, nei polmoni (Lévi F *et al*, 2007; Innominato PF *et al*, 2010).

#### **1.1.4 La regolazione del ritmo circadiano: ruolo dei microRNA e dei polimorfismi genetici**

La regolazione del ritmo circadiano, non avviene semplicemente tramite meccanismi a feedback nei processi di trascrizione e traduzione; ci sono sempre maggiori evidenze di regolazioni a livello dei meccanismi post-trascrizionali, traduzionali e post-traduzionali (Cheng HY *et al*, 2007; Kojima S *et al*, 2011).

Per esempio è stato visto come nell'attivazione del pathway TTFL sia essenziale il ruolo delle modifiche epigenetiche, come acetilazione, deacetilazione e metilazione degli istoni nei promotori dei *clock-genes*: l'eterodimero BMAL1/CLOCK promuove l'espressione dei suoi target a valle tramite l'acetilazione dei loro istoni, mentre l'eterodimero PER/CRY, inducendo la deacetilazione e la metilazione degli istoni, down-regola l'espressione dei *clock-genes* (Karantanos T *et al*, 2014).

Inoltre, è più chiaro il ruolo dei microRNA (miRNA) nel regolare l'espressione di alcuni *clock-genes* (Mehta N *et al*, 2012; Cheng HY, 2007; Kojima S *et al*, 2011; Chu C *et al*, 2013). I microRNA sono piccole molecole di RNA non codificante che regolano l'espressione genica legandosi in siti del 3'-UTR di messaggeri (mRNA) target. Essi attuano il silenziamento genico o tramite un blocco della traduzione, quando il legame del miRNA con il 3'-UTR dell'mRNA è parzialmente complementare, oppure tramite la degradazione del messaggero target, quando il

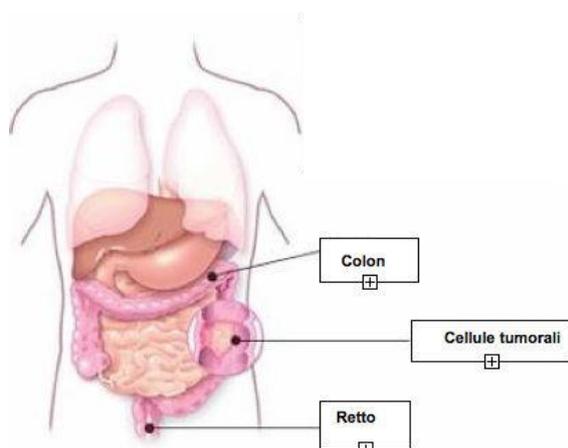
miRNA si lega in maniera perfettamente complementare con il sito al 3'-UTR del messaggero (Lim C et al, 2013). I miRNA agiscono, dunque, come potenti inibitori della traduzione di proteine; per questo motivo, un'alterata espressione dei miRNA che agiscono sui messaggeri dei *clock-genes* risulterebbe in una disfunzione del ritmo circadiano (Li A et al, 2013; Tan et al, 2012; Lee KH et al, 2013). Infatti, è stato dimostrato che in molti tumori la disfunzione del ritmo circadiano veniva causata proprio da un'aberrante espressione dei microRNA che avevano come target determinati *clock-genes* (Li A et al, 2013; Shende VR et al, 2013).

Ulteriori studi suggeriscono anche un potenziale ramo a feedback negativo che include miRNA e *clock-genes*; infatti, ci sono evidenze che i prodotti proteici dei *clock-genes*, legandosi al promotore dei geni, possono regolare l'espressione degli stessi microRNA di cui sono target (Tan X et al, 2012).

Come i miRNA, anche i polimorfismi dei *clock-genes* umani sono capaci di influenzare il fenotipo, e sono stati studiati soprattutto per la loro associazione con la prognosi e con la risposta alla terapia nei tumori (Ciarleglio CM et al, 2008). In recenti studi caso-controllo, i polimorfismi presenti su alcuni *clock-genes* sono stati associati al rischio di sviluppare Linfoma non-Hodgkin (LnH), cancro al seno e alla prostata (Hoffman AE et al, 2009; Chen K et al, 2009; Zhu Y et al, 2009). E' interessante sottolineare che per un dato *clock-gene* vi sono diversi SNP, ognuno dei quali potrebbe essere associato con rischio più alto o più basso di sviluppare uno o più tipi di cancro (Innominato PF et al, 2010).

## 1.2 IL TUMORE AL COLON-RETTO

Il cancro al colon-retto (CRC) è una neoplasia dell'intestino avente sede tra l'inizio del cieco e il retto (fig.10). E' uno dei più comuni tipi di cancro nelle società occidentali e rappresenta la principale causa di morte per cancro in tutto il mondo (Siegel R et al, 2013).



**Figura 10:** il tumore del colon-retto inizia come un piccolo agglomerato di cellule anomale che cresce sulle pareti intestinali. Quando il cancro cresce, le cellule possono diffondersi in altre parti del corpo (metastasi).

In Italia il carcinoma del colon-retto è in assoluto il tumore a maggiore insorgenza nella popolazione; con un'incidenza in Italia di circa 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti, colpisce circa 40.000 donne e 70.000 uomini ogni anno, con picco di incidenza tra i 50 e i 70 anni, in entrambi i sessi. Il CRC rappresenta il secondo tumore maligno per incidenza nella donna, dopo quello della mammella, e il terzo nell'uomo, dopo quello del polmone e della prostata (I numeri del cancro, 2014) (tab.1).

	♂	♀	
Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Prostata (20%)	Mammella (29%)	Colon-retto (14%)
2°	Polmone (15%)	Colon-retto (13%)	Mammella (13%)
3°	Colon-retto (14%)	Polmone (6%)	Prostata (11%)
4°	Vescica* (10%)	Tiroide (5%)	Polmone (11%)
5°	Stomaco (5%)	Utero corpo (5%)	Vescica (7%)

**Tabella 1:** primi cinque tumori più frequentemente diagnosticati e proporzione sul totale dei tumori (esclusi i carcinomi della cute) per sesso. Pool Airtum 2007-2010. \*comprende sia i tumori infiltranti che non infiltranti.

Nel 2011 in Italia sono stati registrati 19.077 decessi per carcinoma del colon-retto (ISTAT 2011), questo dato fa sì che questa neoplasia si classifichi al secondo posto per mortalità a causa di tumore, sia nella popolazione generale, sia nei maschi sia nelle femmine (I numeri del cancro, 2014) (tab.2).

	♂	♀	
Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Polmone (27%)	Mammella (17%)	Polmone (20%)
2°	Colon-retto (10%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (11%)
3°	Prostata (8%)	Polmone (11%)	Mammella (7%)
4°	Fegato (7%)	Pancreas (7%)	Stomaco (6%)
5°	Stomaco (7%)	Stomaco (6%)	Pancreas (6%)

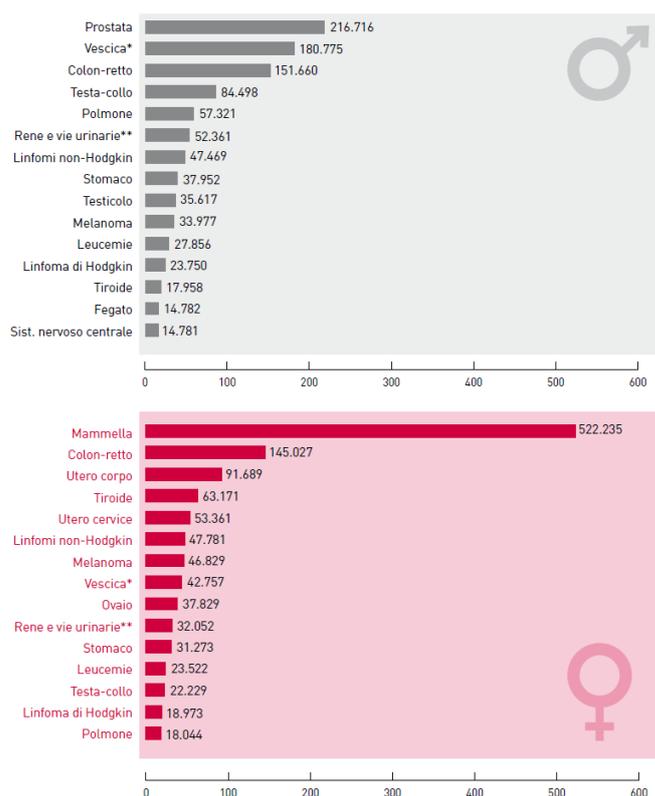
**Tabella 2:** prime cinque cause di morte tumorali più frequenti e proporzione sul totale dei decessi oncologici per sesso. Pool Airtum.

La tabella 3 mostra che 10.248 decessi sui 19.077 totali (circa il 54%) sono stati registrati nella popolazione maschile, indicando una maggiore mortalità per questa patologia nei maschi rispetto alle donne (ISTAT 2011) (tab.3).

	♂	♀	
Cause di morte	Uomini	Donne	Totale
Tumore	98.700	76.663	175.363
Tumori maligni	94.367	72.936	167.303
Tumori delle labbra, cavità orale e faringe	1.955	884	2.839
Tumori dell'esofago	1.362	439	1.801
Tumori dello stomaco	5.753	4.204	9.957
Tumori del colon-retto e dell'ano	10.248	8.829	19.077
Tumori del fegato e dei dotti biliari intraepatici	6.500	3.516	10.016
Tumori del pancreas	5.254	5.534	10.788
Tumori della laringe	1.437	183	1.620
Tumori della trachea/bronchi/polm.	25.153	8.553	33.706
Melanomi della cute	1.054	753	1.807
Tumori del seno	117	11.959	12.076
Tumori dell'utero		30.300	2.904
Tumori dell'ovaio		2.904	3.209
Tumori della prostata	7.520	3.209	7.520
Tumori del rene	2.090		3.261
Tumori della vescica	6.093	1.171	8.927
Tumori dell'encefalo e altro SNC	2.044	2.834	3.725
Tumori della tiroide	218	326	544
Linfomi	2.618	2.366	4.984
Leucemie	3.254	2.691	5.945

**Tabella 3:** numero di decessi per causa e per sesso osservati in Italia durante l'anno 2011. ISTAT 2011.

Nelle ultime due decadi, però, si è assistito ad un progressivo aumento dell'insorgenza di CRC nella popolazione femminile per via delle abitudini di vita sempre più uniformi tra i due sessi. Tuttavia, grazie alla diagnosi precoce e all'evoluzione delle terapie, la prognosi è sostanzialmente favorevole e la sopravvivenza a 5 anni è notevolmente aumentata ([www.airc.it/cancro/tumori/tumore-colon-retto](http://www.airc.it/cancro/tumori/tumore-colon-retto)). L'aumento dell'incidenza e il miglioramento della prognosi, però, aumentano la prevalenza di questa neoplasia sia fra i maschi che fra le femmine (I numeri del cancro, 2014) (fig.11).



**Figura 11:** numero stimato di casi prevalenti in Italia per sesso. Prime 15 sedi per frequenza.

\*comprende sia tumori infiltranti che non infiltranti.

\*\*comprende rene, pelvi e uretere.

### 1.2.1 I processi di patogenesi

I tumori invasivi (adenocarcinomi) del colon-retto sono dovuti alla crescita anomala delle cellule della mucosa del colon, cioè del rivestimento interno dell'organo.

La componente genetica è una tra le cause di questo tumore; solitamente infatti le cellule tumorali del colon-retto possiedono mutazioni, ereditate o acquisite, a carico di geni coinvolti nella via di trasduzione del segnale Wnt e/o nella replicazione o riparazione del DNA (Ionov Y *et al*, 1993; Markowitz SD *et al*, 2009). Oltre alle mutazioni genetiche, risulta comunque chiara la presenza di altri fattori che influenzano il rischio di contrarre questa malattia, tra i quali:

- fattori individuali non modificabili: sesso, età >50 anni (Haggar FA and Boushey RP, 2009);
- fattori ambientali: esposizione ad inquinanti ambientali (Haggar FA and Boushey RP, 2009; Czene K *et al*, 2002);
- fattori comportamentali: dieta ricca di grassi e proteine, povera di fibre e micronutrienti, alcool, fumo, sedentarietà, obesità (Chan AT *et al*, 2010; Marshall JR, 2008);
- patologie pregresse come il diabete o le malattie infiammatorie intestinali croniche, come il Morbo di Crohn e la Colite Ulcerosa (Freeman HJ, 2008; von Roon AC *et al*, 2007; Eaden JA *et al*, 2001; Mellekjær L *et al*, 1995);

- presenza di sindromi ereditarie, sia caratterizzate dall'insorgenza di polipi, come la Poliposi Adenomatosa Familiare (PAF) e la Sindrome di Gardner, sia non poliposiche, come l'HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), conosciuta anche come la Sindrome di Lynch (Ponz De Leon M et al, 2006; Jasperson KW et al, 2010).

Il cancro coloretale può presentarsi sotto tre forme principali: sporadico, familiare o ereditario.

La forma sporadica: gli individui affetti mancano di una storia familiare di cancro (National Cancer Institute, 2002). Risulta essere la più comune (Cunningham D et al, 2010).

La predisposizione familiare: responsabile approssimativamente di un quarto delle neoplasie coloretali. Gli individui appartenenti a gruppi familiari con predisposizione hanno un rischio di ammalarsi di CRC doppio rispetto a quello della popolazione generale nel caso in cui sia presente un consanguineo di primo grado, e più che triplo qualora quest'ultimo abbia contratto il tumore prima dei 50 anni di età (Jasperson KW et al, 2010; Castells A et al, 2009; Butterworth AS et al, 2006).

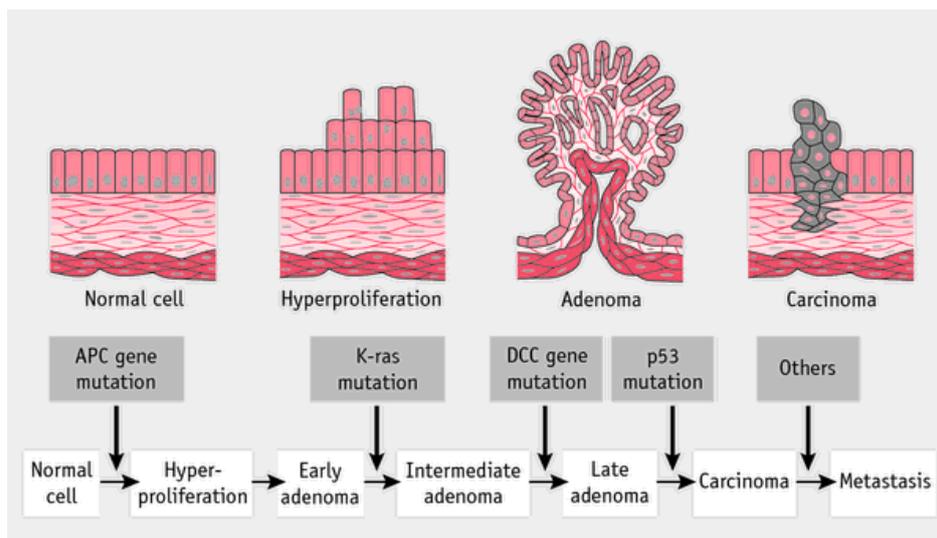
Le sindromi ereditarie: hanno un difetto genetico noto e sono responsabili solo del 2-5% dei casi. Le sindromi ereditarie più note sono la FAP e l'HNPCC (Markey K et al, 2002; Rosty C et al, 2011). La PAF è una patologia autosomica dominante, caratterizzata dalla delezione di un allele del gene Adenomatous Polyposis Coli (APC). Tutti i soggetti affetti da questa patologia sono destinati a sviluppare nell'arco della loro vita un carcinoma del colon-retto (Harrison 2006). La sindrome HNPCC, conosciuta anche come la Sindrome di Lynch, è anch'essa una malattia autosomica dominante che si sviluppa a causa di una mutazione in eterozigosi in uno dei geni coinvolti nel meccanismo del mismatch repair, soprattutto *MSH2* (*MutS Homolog 2*) (60% dei casi) e *MLH1* (*MutL Homolog 1*) (30% dei casi). A seguito di un'ulteriore mutazione dell'allele sano, gli individui perdono la capacità di riparare il DNA e conseguentemente aumenta la probabilità di acquisire ulteriori mutazioni a carico di geni oncosoppressori e proto-oncogeni (Harrison 2006).

Per la genesi del carcinoma invasivo, che sia sporadico o familiare, è necessario un processo patogenetico definito "*multistep*" che prevede l'accumulo nel tempo di danni genetici multipli, intesi come acquisizione di funzione di un proto-oncogene o perdita di funzione di un gene oncosoppressore (Harrison, 2006). In particolare a livello genetico molecolare esistono due principali modelli di sviluppo del carcinoma

colorettale: la via dell'instabilità cromosomica, detta anche sequenza adenoma-carcinoma, e la via dell'instabilità dei microsattelliti (Pontieri GM *et al*, 2005).

L'85% di CRC sporadico è caratterizzato da **instabilità cromosomica** e progredisce secondo la sequenza adenoma-carcinoma (Robbins e Cotran, 2008). Il CRC si sviluppa attraverso un passaggio tra diversi stadi che vanno da lesioni alle cripte coloniche all'adenoma ed infine progrediscono verso il carcinoma. Questa sequenza adenoma-carcinoma è caratterizzata dall'accumulo di mutazioni multiple, tra cui alterazioni del cariotipo, delezioni alleliche, attivazione di oncogeni e inattivazione di importanti geni oncosoppressori quali *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *APC* (*Adenomatosis polyposis coli*), *p53* che fanno venire meno l'equilibrio tra proliferazione cellulare ed apoptosi (Cruz-Bustillo C, 2004; Fearon ER, 2011).

Il paradigma di questo modello è rappresentato dalla sindrome genetica Poliposi Adenomatosa Familiare, che rappresenta una particolare malattia nella quale il soggetto eredita una copia già mutata del gene *APC*; tale condizione configura uno stato di rischio molto elevato per la genesi di cancro al colon-retto nei soggetti giovani. In figura 12 è riassunta la correlazione anatomo-molecolare nella patogenesi del cancro al colon-retto attraverso la via della sequenza adenoma-carcinoma.



**Figura 12:** via della sequenza adenoma carcinoma per il CRC. La perdita dell'oncosoppressore APC, dovuta alla delezione del braccio lungo del cromosoma 5, provoca un'iperproliferazione che si trasforma in adenoma al sopraggiungere della mutazione attivante l'oncogene KRAS. Giunti a questo stadio solitamente si assiste alla delezione del braccio lungo del cromosoma 18, con conseguente perdita del gene DCC, e del braccio corto del cromosoma 17, che inattiva l'oncosoppressore p53, trasformando l'adenoma in carcinoma. A questo punto altre mutazioni possono aggiungersi alle precedenti, come la perdita di SMAD4 e l'attivazione delle telomerasi, portando alla formazione di metastasi.

Le principali mutazioni genetiche della via della sequenza adenoma-carcinoma sono:

- Perdita di parte del cromosoma 5q, con conseguente perdita del gene *APC*. La perdita del gene oncosoppressore *APC* è ritenuta il primo evento nella formazione degli adenomi in quanto gioca un ruolo importante nel pathway di segnalazione Wnt (Hadjihannas MV et al, 2006). Solitamente, *APC* forma un complesso con l'axina e la GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3-beta), che sequestra la  $\beta$ -catenina, fosforilandola e marcandola per la degradazione. Quando il complesso non si forma, per inattivazione di *APC*, la  $\beta$ -catenina non viene né fosforilata né degradata; accumulandosi nella cellula (Cruz-Bustillo C, 2004; Polakis P, 1999; Kobayashi M et al, 2000) promuove l'attività di c-myc (He TC et al, 1998; Cruz-Bustillo C, 2004), portando ad una deficitaria adesione cellulare e ad un'eccessiva attività proliferativa. C-myc, infatti, attiva direttamente la Ciclina D1, coinvolta nella transizione G1-S del ciclo cellulare. La mutazione di *APC* è responsabile del 90% dei casi di tumore sporadico al colon (Najdi R et al, 2011) ed inoltre è il gene responsabile della FAP (Van Cutsem E et al, 2013).
- Mutazione del gene *KRAS*, il quale risulta mutato nel 40-50% nei carcinomi coloretali (Kanthan R et al, 2012). La proteina *KRAS* è responsabile della trasduzione del segnale all'interno della cellula e fa parte del pathway dell'EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico); in caso di mutazione la sua attività GTP-asica è costitutivamente attiva (Wicki A et al, 2010). EGFR è un recettore tirosin chinasi che legando EGF (epidermal growth factor) attiva diversi pathway a valle risultanti in un aumento della crescita e della proliferazione cellulare.
- Perdita del braccio lungo del cromosoma 18, risultante nella delezione del gene *DCC* (deleted in colon cancer), un gene che codifica per il recettore della netrina-1, una molecola implicata nella guida dell'assone (Mehlen P et al, 1998); questo gene agisce come oncosoppressore del tumore e induce apoptosi nelle cellule dove il suo ligando, la netrina-1, non è disponibile, per esempio nelle cellule tumorali (Bredesen DE et al, 2005).
- Delezione del braccio corto del cromosoma 17, evento che comporta la perdita del gene oncosoppressore *p53*; questa delezione è rara negli adenomi ma presente nel 70-80% dei casi di CRC. Questo gene codifica per un fattore di trascrizione che, in caso di danneggiamento del DNA, induce l'arresto del ciclo cellulare e manda le cellule in apoptosi. Nel momento in cui, a causa di una mutazione, *p53* viene perso per delezione, questo processo non può più avvenire,

favorendo la proliferazione di cellule mutate. La sua inattivazione spesso coincide con il passaggio da adenoma a carcinoma invasivo (Baker SJ, 1990).

- Mutazioni nel gene oncosoppressore *SMAD4*. Questo gene è coinvolto nel pathway di segnalazione del TGF $\beta$  (transforming growth factor-beta) ed è responsabile della soppressione della crescita delle cellule epiteliali. Nel cancro pancreatico e coloretale, l'inattivazione del gene *SMAD4* è associata frequentemente con un aumento dei livelli di  $\beta$ -catenina nella cellula e con una progressione del tumore (Freeman TJ et al, 2012; Miyaki M et al, 2003).
- Attivazione della telomerasi: è un evento tardivo nella sequenza adenoma-carcinoma, presente nei carcinomi ma non negli adenomi. L'attivazione delle telomerasi impedisce l'accorciamento dei telomeri e porta la cellula all'immortalità, caratteristica distintiva di ogni cellula tumorale (Chen R et al, 2015; Engelhardt M et al, 1997).

La via dell'**instabilità dei microsatelliti**, invece, è un modello caratterizzato da instabilità nei microsatelliti e comprende i casi di carcinoma ereditario e circa il 15% dei carcinomi sporadici, anche se rimane una caratteristica distintiva del cancro ereditario non poliposico (HNPCC) (Cruz-Bustillo C, 2004; Boland CR et al, 2010).

In questi tumori, definiti MSI-H (*microsatellite instability high*), la caratteristica genetica distintiva è l'accumulo di mutazioni nei microsatelliti che sono localizzati in regioni codificanti di geni come *TGF $\beta$ RII* (*transforming growth factor  $\beta$  type II receptor*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*) e *IGFR II* (*insulin growth factor type II receptor*) che regolano la proliferazione cellulare (Yashiro M et al, 2010; Shin KH et al, 2000). Tali alterazioni al livello dei microsatelliti sono il risultato di un malfunzionamento del sistema di riparazione del DNA "mismatch repair" (MMR) (Boland CR et al, 2010) dovuto, nella maggioranza dei casi, ad un'inattivazione dei geni *MLH1* o *MSH2* o *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) (Gryfe R et al, 1997; Cunningham D, 2010). Quando questi geni non funzionano perfettamente non riparano più le mutazioni che incorrono nelle sequenze ripetute del genoma, che spesso slittano durante il processo di replicazione del DNA (Cunningham D et al, 2010; Peltomaki P, 2003; Ionov Y et al, 1993).

A differenza della sequenza adenoma-carcinoma, per questo modello di patogenesi non esistono stadi morfologici chiaramente identificabili nelle varie tappe di evoluzione del tumore.

### 1.2.2 La prognosi e le terapie

La strategia terapeutica viene definita in funzione delle condizioni generali del paziente, che rappresentano un fattore prognostico rilevante al pari di altre caratteristiche quali età, sede della malattia e stadio della malattia (Linee guida AIOM, 2014).

Il sistema TNM (Tumor Nodes Metastasis), che rappresenta la classificazione più comunemente utilizzata, assegna un numero per indicare la gravità di ciascun aspetto preso in considerazione:

T – identifica il grado di invasione della parete intestinale da parte del tumore primitivo:

- T0 – nessuna evidenza di tumore
- Tis – il cancro in situ (il tumore è presente ma non c'è invasione)
- T1 – invasione attraverso la sottomucosa nella lamina propria (la membrana basale invasa)
- T2 – invasione nella muscularis propria
- T3 – invasione attraverso la subsierosa
- T4 – invasione di strutture attorno

N – identifica il grado di coinvolgimento dei linfonodi regionali da parte di metastasi:

- N0 – non c'è coinvolgimento dei linfonodi
- N1 – da uno a tre linfonodi coinvolti
- N2 – quattro o più linfonodi coinvolti

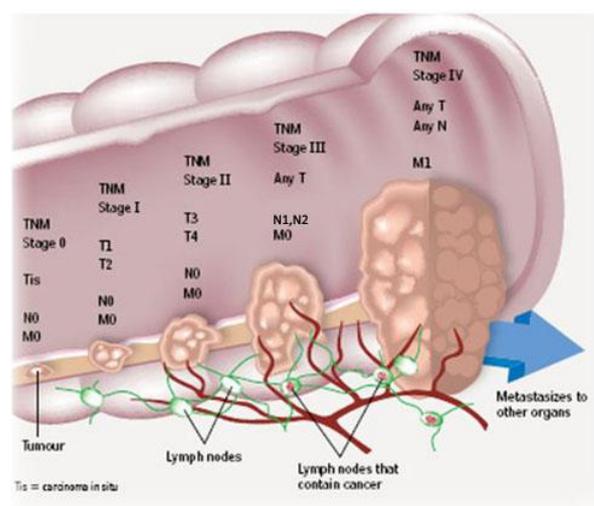
M – identifica la presenza di metastasi a distanza:

- M0 – assenza di metastasi
- M1 – metastasi presenti

I valori di TNM sono stati raggruppati per prognosi dalla AJCC (American Joint Committee on Cancer) per classificare i tumori in quattro stadi (I, II, III, IV): un numero più alto è indice di cancro più avanzato (Linee guida AIOM, 2014) (tab.4 e fig.13).

STADIO	DESCRIZIONE
Stadio 0	Tis, N0, M0
Stadio II	T1, N0, M0 T2, N0, M0
Stadio IIa	T3, N0, M0
Stadio IIb	T4a, N0, M0
Stadio IIc	T4b, N0, M0
Stadio IIIa	T1-2, N1a-c, M0 T1, N2a, M0
Stadio IIIb	T3, T4a, N1a-c, M0 T2-3, N2a, M0 T1-2, N2b, M0
Stadio IIIc	T4a, N2a-b, M0, T3, N2b, M0 T4b, N1-2, M0
Stadio IVa	Ogni T, ogni N, M1a
Stadio IVb	Ogni T, ogni N, M1b

**Tabella 4:** classificazione usata dalla AJCC per la stadiazione del CRC: a ogni valore TNM assegnato al CRC corrisponde uno specifico stadio del tumore.



**Figura 13:** rappresentazione schematica della correlazione fra lo stadio AJCC, il sistema TNM e l'anatomia dell'intestino.

Ad oggi, la principale opzione terapeutica per il CRC è la chirurgia, che prevede l'asportazione parziale o totale del tratto interessato di colon o di retto (Linee guida AIOM, 2014; Cunningham D *et al.*, 2010).

Molto impiegati sono la radio- e la chemio-terapia. La radioterapia, sia pre- che post- operatoria, a seconda delle indicazioni, è in grado di diminuire le ricadute locali e di allungare la sopravvivenza (Linee guida AIOM, 2014).

La chemioterapia è efficace e mostra benefici sia come trattamento adiuvante (cioè effettuato dopo l'intervento chirurgico per diminuire il rischio di ricaduta), sia come terapia neoadiuvante (cioè effettuata prima dell'intervento per ridurre la dimensione del tumore da asportare), sia come terapia di induzione o di conversione (che converte alla chirurgia i tumori metastatici, permettendo di realizzare un intervento di resezione completa delle metastasi epatiche, che altrimenti sarebbe impossibile da effettuare) (Young A & Rea D, 2000; Kopetz S *et al.*, 2009).

Le prime esperienze di impiego di farmaci chemioterapici con questa indicazione risalgono ormai a circa 15 anni fa, all'infusione di 5-fluorouracile (5-FU), acido folico e oxaliplatino da parte del team dell'ospedale "Paul Brousse" a Villejuif in Francia. Nel corso degli anni sono state sperimentate nuove combinazioni di chemioterapici in grado di dimostrare un tasso di conversione dei tumori metastatici alla chirurgia variabile dal 15 al 30% (Masi G *et al.*, 2011).

Oggi la chemioterapia di induzione si basa sulla somministrazione di doppiette o triplete di chemioterapici, accompagnate o meno da un farmaco a bersaglio

molecolare, a seconda dello stato della malattia (metastatico o non metastatico) e dello stato mutazionale di *KRAS* e *BRAF* del paziente. La proteina BRAF è coinvolta, come KRAS, nella trasmissione dei segnali per la crescita cellulare e il gene risulta mutato in diversi tumori umani, tra cui anche nel 5% di CRC da instabilità cromosomica e nel 35% di CRC da instabilità dei microsatelliti (Lenos K *et al*, 2015). Sono state identificate più di 30 mutazioni del gene *BRAF* associate a tumori umani, ma nel 90% dei casi una valina (V) viene sostituita con glutammato (E) in corrispondenza del codone 600 (V600E) nel segmento di attivazione della proteina (Gear H *et al*, 2004).

Per quanto riguarda la chemioterapia esistono due tipi di doppiette. Entrambe sono basate sulla combinazione di acido folico e fluoropirimidine (5-FU) che, inibendo l'enzima  *timidilato sintasi*, provoca citotossicità per deplezione di dTTP e inclusione di uracili nel DNA; le due doppiette prevedono l'aggiunta o di oxaliplatino, che è un agente alchilante che si lega alle basi azotate, forma legami crociati con il DNA e innesca l'apoptosi, o di irinotecano, che è un inibitore delle topoisomerasi, che causa aberrazioni genomiche, problemi nel superavvolgimento del DNA, innescando l'apoptosi. La tripletta è formata invece da 5-FU e acido folico in presenza sia di oxaliplatino che di irinotecano. Quando sono presenti metastasi, sia in prima linea, sia in linee successive (quando la malattia metastatizza successivamente alla rimozione del tumore primitivo), la chemioterapia può prevedere l'aggiunta di farmaci a bersaglio molecolare, come il cetuximab (Erbix®) o il bevacizumab (Avastin®) (Masi G *et al*, 2011).

Il cetuximab è un anticorpo monoclonale IgG diretto contro il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) ed è efficace solo nei casi in cui *KRAS* non è mutato (Ciardiello F e Tortora G, 2008): studi randomizzati di fase II e III hanno dimostrato che il cetuximab aumenta maggiormente il tasso di resezioni epatiche quando aggiunto alle doppiette, rispetto alla sola chemioterapia (studio Crystal, Van Cutsem E *et al*, 2011; studio OPUS, Bokemeyer C *et al*, 2008).

Nei pazienti che presentano *KRAS* mutato e *BRAF wild type*, il cetuximab viene sostituito dal bevacizumab (Yokota T, 2012; Dempke WC *et al*, 2010; Köhne CH e Lenz HJ, 2009; Cervantes A *et al*, 2008; Bokemeyer C *et al*, 2008; Lièvre A *et al*, 2006;), un anticorpo monoclonale diretto contro VEGF e in grado di bloccare l'angiogenesi (Los M *et al*, 2007).

### 1.2.3 Il cancro al colon-retto e il ritmo circadiano

Quando si parla di ritmo circadiano e colon bisogna sottolineare, innanzitutto, che nelle cellule dell'intestino il ritmo circadiano è regolato da un *clock* periferico e non direttamente dal SCN. Come è stato già detto, anche se vi è un pacemaker centrale, sono stati comunque ritrovati *clocks* molecolari dislocati in molti organi, incluso il tratto gastro-intestinale. In particolare, nelle cellule della mucosa orale e del colon le oscillazioni circadiane di PER1 e PER2 sono regolate da un *clock* periferico detto feeding-entrained oscillator (FEO) che sembra essere indipendente dal SCN (Pardini L et al, 2005) e che controlla, ad esempio, tutte quelle attività food-anticipatory, come l'aumento di temperatura corporea e di locomozione dell'intestino, che precedono un pasto giornaliero (Damiola F et al, 2000).

Numerosi studi epidemiologici, molecolari e genetici evidenziano il coinvolgimento dei *clock-genes*, non solo nello sviluppo e nella progressione del cancro al colon-retto (CRC), ma anche nei processi di resistenza agli agenti chemioterapici (Karantanos T et al, 2014).

L'espressione di PER2 risulta diminuita nei tessuti tumorali del colon ed è stata associata con il grado istologico e lo stadio del tumore. Questi risultati suggeriscono che PER2 è importante per la normale funzionalità delle cellule colon-rettali, e una sua deregolazione provoca sviluppo, invasione e metastasi del cancro al colon-retto (Wang Y et al, 2011). Inoltre, proprio su pazienti affetti da cancro al colon-retto metastatico è stato effettuato per la prima volta nel 2008 da Iacobelli e collaboratori uno studio clinico di associazione fra l'espressione di un *clock-gene* e l'outcome dei pazienti. Lo studio riguardava l'analisi dell'espressione di PER2 nel tumore primario e nella mucosa normale. Dallo studio è emerso che la down-regulation di PER2 è statisticamente associata a una minore sopravvivenza in pazienti chemo-naive. Quello che si osservava nello studio era che l'espressione di PER1, PER2 e PER3 risultava diminuita nelle cellule tumorali rispetto alle sane nel 21% dei pazienti; PER2 risultava completamente assente nel 26% delle cellule tumorali verso il 17% delle cellule sane; e infine, il 19% dei pazienti con un'espressione costitutiva di PER2 nella mucosa normale non mostrava, invece, alcuna espressione di PER2 nelle cellule tumorali (Iacobelli S et al, 2008). L'espressione di PER2 nel tumore primario diventa così un fattore prognostico indipendente di sopravvivenza, insieme al performance status e al numero di metastasi (Iacobelli S et al, 2008).

Karantanos e collaboratori affermano anche che BMAL1 attiva la proliferazione cellulare, il pathway della  $\beta$ -catenina ed è fortemente associato con l'inizio del CRC e con un outcome negativo (Karantanos T et al, 2014).

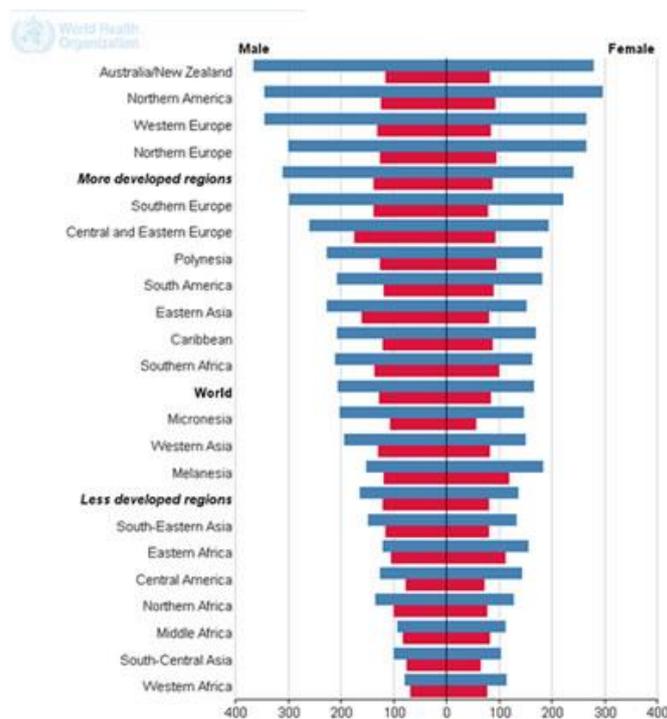
I dati molecolari suggeriscono che CLOCK inibisce la progressione del ciclo cellulare e promuove la riparazione di danni al DNA ma le correlazioni cliniche mostrano che CLOCK è maggiormente espresso nel tessuto tumorale del colon; inoltre diversi polimorfismi nel gene *CLOCK* provocano un aumento del rischio per CRC e sono stati associati con una prognosi infausta e una minore sopravvivenza (Karantanos T *et al*, 2014).

Determinare come i vari *clock-genes* siano implicati nella patogenesi del CRC e scoprire le correlazioni con la prognosi e l'outcome diventa importante per l'identificazione di nuovi agenti terapeutici per questo tipo di cancro.

E' stato già riscontrato che gli interventi atti a normalizzare i ritmi biologici e a contrastare la disfunzione del sistema circadiano migliorano la qualità della vita e la sopravvivenza dei pazienti affetti da questa patologia (Innominato PF *et al*, 2009).

### **1.3 IL FATTORE GENDER**

Le donne vivono più a lungo dei maschi in quasi tutti i Paesi (Beltrán-Sánchez H *et al*, 2015; Barford A *et al*, 2006). Il fattore gender è un aspetto da valutare quando si parla di incidenza, progressione e mortalità di molte patologie, incluso il cancro. Si stima che delle 366.000 nuove diagnosi di tumore all'anno in Italia il 54% sia negli uomini e il 46% nelle donne; in breve, nel corso della vita circa un uomo su 2 e una donna su 3 hanno la probabilità di ammalarsi di tumore. Non solo l'incidenza ma anche la mortalità è diversa negli uomini e nelle donne: in media, un uomo su 3 e una donna su 6 muoiono a causa di un tumore nel corso della loro vita (dati ISTAT). La sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi di un tumore maligno risulta del 55% fra gli uomini e del 63% fra le donne (i numeri del cancro, 2014). Questi dati vengono confermati in tutti i Paesi: le donne registrano sempre una minore incidenza e mortalità per cancro rispetto ai maschi (fig.14).



**Figura 14:** incidenza (barre blu) e mortalità (barre rosse) per cancro stratificate in base al genere registrate nel 2012 in tutto il mondo. Il 57% (8 milioni) delle diagnosi, il 65% (5.3 milioni) dei decessi per cancro e il 48% (15.6 milioni) di tumori diagnosticati entro 5 anni sono stati registrati nelle regioni sottosviluppate.

Il tasso di incidenza di tumore standardizzato per età è almeno il 25% più alto negli uomini rispetto alle donne.

Il tasso di incidenza dei maschi varia almeno di 5 volte fra i diversi Paesi del mondo, con un tasso che va da 79 maschi affetti su 100.000 dell'Africa Occidentale, fino a 365 su 100.000 dell'Australia/Nuova Zelanda. Meno variabile (3 volte) è il tasso di incidenza nelle donne, che va da 103 su 100.000 dell'Asia Centro-Meridionale fino a 295 su 100.000 del Nord America.

Diversamente dai tassi di incidenza, in termini di mortalità si registra una minore variabilità fra le diverse regioni. Fra i maschi la mortalità è il 15% più alta nei Paesi sviluppati rispetto alle regioni meno sviluppate; e fra le donne è solo l'8% più alta. Negli uomini il tasso più alto si registra in Europa Centro-Orientale (173 su 100.000) e il più basso in Africa Occidentale (69). Al contrario, il tasso di mortalità più alto per le donne si registra in Malesia (119), mentre il più basso in Asia Centro-Meridionale (65).

### 1.3.1 Il fattore gender nel cancro al colon-retto

Vi è una crescente evidenza che lo sviluppo e la progressione del cancro al colon-retto siano influenzate dal sesso; in particolar modo le donne hanno una minore incidenza di CRC e anche una migliore prognosi rispetto agli uomini. Vi sono diverse ipotesi che spiegano questa differenza fra maschi e femmine: siccome fra le cause di CRC vi sono anche fattori comportamentali (Chan AT *et al*, 2010; Marshall JR, 2008), si pensa che le donne siano più protette perché conducono uno stile di vita più sano rispetto agli uomini (meno alcool, meno fumo, più attenzione all'alimentazione); ma anche gli ormoni sessuali e i loro recettori sembrano poter influenzare lo sviluppo del CRC in maniera differente nei maschi e nelle donne.

Hendifar e collaboratori hanno analizzato oltre 50.000 pazienti affetti da cancro al colon retto metastatico (mCRC) dal 1988-2004 e hanno valutato diversi parametri, come l'età della diagnosi, il sesso, l'etnicità, l'overall survival (OS), la sopravvivenza cancro-specifica (CSS) etc. Dalle analisi è emerso che per ogni fascia di età, le donne avevano sempre una minore probabilità di sviluppare un tumore al colon-retto: il rischio delle donne era comparabile a quello di uomini più giovani di circa 4-8 anni. Questi risultati erano consistenti e uguali per tutte le etnicità,

indipendentemente dal trattamento, dal sito della patologia, dalle radioterapia e/o chirurgia (Hendifar A *et al*, 2009).

Oltre a una più bassa incidenza, le donne mostravano anche migliore OS e CSS: le femmine giovani (<45 anni di età) avevano una migliore OS (20% in più) rispetto ai maschi giovani. Questo vantaggio non veniva confermato per le donne con più di 45 anni, la cui prognosi diventava simile a quella degli uomini della stessa età, evidenziando che le donne non in menopausa rispondono meglio alle terapie e hanno una migliore prognosi; al contrario, l'entrata in menopausa sembrerebbe azzerare questo vantaggio, portando il rischio di incidenza e di prognosi infausta delle donne uguale a quello dei maschi. Un'ipotesi che spiegherebbe questi risultati potrebbe essere che gli estrogeni svolgano un ruolo protettivo, ostacolando lo sviluppo e la progressione del CRC. E' stato dimostrato, infatti, che gli estrogeni migliorano considerevolmente l'outcome clinico nelle donne che assumono contraccettivi orali o che seguono terapie ormonali sostitutive (Hendifar A *et al*, 2009).

#### **1.4 L'OBIETTIVO DELLA RICERCA**

Il cancro al colon-retto è uno dei tumori più diffusi nella popolazione italiana; ma nonostante i progressi nello sviluppo di nuovi farmaci, necessitano ulteriori studi per aumentare i tassi di sopravvivenza e risposte (Gordon MA *et al*, 2011). Un'opportunità è data dalla ricerca dei biomarcatori individuali, i quali, caratterizzando ciascun paziente in base al profilo molecolare, permetterebbero al clinico di conoscere in anticipo la prognosi dei pazienti o la predittività di una terapia, e quindi di indirizzare il paziente verso una cura personalizzata.

Lo scopo di questa tesi è di cercare nuovi potenziali biomarcatori molecolari individuali di sopravvivenza per i pazienti affetti da CRC, partendo dall'osservazione che il ritmo circadiano gioca un ruolo importante nel processo di tumorigenesi e nell'outcome clinico di questi pazienti.

Lo studio si propone di analizzare, in una coorte di pazienti affetti da cancro al colon-retto metastatico (mCRC), 5 microRNA e 3 varianti genetiche, che in precedenti studi sono risultati coinvolti nella regolazione dei geni del ritmo circadiano, con lo scopo di valutare se questi possano eventualmente influenzare la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti. Il primo endpoint dello studio è

rappresentato dall'Overall Survival (OS), seguito dalla Progression Free Survival (PFS).

I 5 microRNA individuati come potenziali biomarcatori sono miR-206, miR-219, miR-132, miR-192 e miR-194; mentre i 3 polimorfismi sono rs11133373 C>G, rs1801260 T>C e rs11133391 T>C, tutti situati sul gene *CLOCK*, il principale regolatore del pathway circadiano.

Evidenze emergenti indicano un ruolo importante dei microRNA nella regolazione del ritmo circadiano a livello post-trascrizionale, dallo splicing alla poliadenilazione, alla stabilità dell'mRNA, etc (Zhou W *et al*, 2011; Lim C & Allada R, 2013). In letteratura è riportato che i **miR-206, -219 e -132** sono coinvolti nel sistema di regolazione dei ritmi biologici, perché possono influenzare la frequenza delle oscillazioni, la lunghezza del periodo circadiano e il resetting di *CLOCK* indotto dalla luce (Zhou W *et al*, 2011; Liu K *et al*, 2012; Pegoraro M *et al*, 2008). I **miRNA-192 e -194**, invece, sono dei potenti inibitori della famiglia dei geni *PER* e possono alterare il ritmo circadiano al livello post-trascrizionale (Nagel R *et al*, 2009); inoltre, è stato dimostrato che i miR-192 e -194 sono frequentemente down-regolati nel CRC (Chiang Y *et al*, 2012).

I polimorfismi presi in considerazione sono localizzati in regioni regolatorie e non codificanti del gene *CLOCK*, e in letteratura sono stati già associati con alcuni disordini. In particolare, gli SNP **rs11133373 C>G** e **rs1801260 T>C** sono situati nella regione 3'-UTR del gene *CLOCK*, e sono stati associati, il primo, con la suscettibilità del cancro alla prostata e al seno (Zhu Y *et al*, 2009; Zienolddiny S *et al*, 2013), mentre il secondo sembrerebbe avere un ruolo come potenziale marker dell'outcome clinico dei pazienti con CRC (Zhou F *et al*, 2012; Hoffman AE *et al*, 2010). Il terzo SNP, **rs11133391 T>C**, è localizzato in una regione intronica del gene *CLOCK*, ed è stato correlato con il rischio di sviluppare cancro al seno e glioma (Madden MH *et al*, 2014; Hoffman AE *et al*, 2010).

## **2. MATERIALI E METODI**

## 2.1 Arruolamento dei pazienti e raccolta dei campioni

Lo studio è stato condotto in collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" di Roma, dove sono stati arruolati retrospettivamente 83 pazienti (pz) con una diagnosi di cancro al colon-retto metastatico confermata istologicamente (mCRC). Tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato per il trattamento dei dati e per la raccolta del materiale biologico e delle informazioni clinico-patologiche nell'ambito del progetto AIRC 11770, approvato dal Comitato Etico locale dell'Istituto "Regina Elena" di Roma.

Le caratteristiche clinico-patologiche al baseline e l'outcome dei pazienti sono riassunti nella tabella 5.

	Pz	(%)
<b>Pazienti</b>	83	100
<b>Età mediana</b>	59 (30-85)	-
<b>Sesso: M/F</b>	50/33	60/40
<b>Performance Status</b>		
0	65	78
1	16	19
2	2	3
<b>KRAS: wt/mutato</b>	68/15	82/18
<b>BRAF: wt/mutato/nv</b>	63/2/18	76/2/22
<b>Sede metastasi</b>		
solo fegato	48	58
fegato + altre sedi	35	42
<b>Resezione metastasi epatiche</b>	36	43
<b>Resezione tum primario: si/no</b>	76/7	92/8
<b>Numero linee di tp</b>		
1	19	23
2	26	31
3	22	27
4	7	8
5	5	6
6	3	4
7	1	1
<b>Mediana num linee di tp</b>	4 (1-7)	-
<b>Cetuximab tot pz trattati</b>	63	76
in I linea	40	48
dalla II linea	23	28
<b>Trattamento I linea *</b>		
Tripletta ± cetuximab	64	77
Doppietta + cetuximab	12	15
Doppietta ± bevacizumab	6	7
Altro	1	1
<b>Risposta I linea di trattamento</b>		
Risposta completa	2	2
Risposta parziale	55	66
Malattia stabile	16	19
Progressione di malattia	8	10
Non valutabile	2	2
<b>Follow-up mediano (mesi)</b>	25 (1-132)	-
<b>PFS (mesi)</b>	14	CI 95% (10-19)
<b>OS (mesi)</b>	35	CI 95% (22-47)

**Tabella 5:** caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti arruolati nello studio.

\* Trattamenti:  
Tripletta: 5-FU, acido folico, oxaliplatino, irinotecan (FOLFOXIRI)  
Doppietta: 5-FU, acido folico + oxaliplatino (FOLFOX) oppure  
5-FU, acido folico + irinotecan (FOLFIRI).

Gli 83 pazienti arruolati, 50 maschi e 33 donne, sono tutti al IV stadio metastatico, hanno un'età mediana di 59 anni e un Performance Status che non supera il punteggio di 2. La rimozione del tumore primario è stata effettuata nel 92% dei casi; le metastasi epatiche, che sono presenti in tutti i pz, sono state rimosse chirurgicamente nel 43% dei casi. Tutti i pazienti sono stati trattati in prima linea

con chemioterapici a base di 5-FU (doppiette o triplete), con l'aggiunta di farmaci a bersaglio molecolare (cetuximab o bevacizumab), a seconda dello stato della malattia e dello stato mutazionale dei geni *KRAS* o *BRAF*.

L'Unità di Anatomia Patologica dell'Istituto "Regina Elena" di Roma ha fornito per ogni paziente da 3 a 5 sezioni istologiche di 10  $\mu\text{m}$  di spessore, fissate con formalina e incluse in paraffina (FFPE), sia di tessuto tumorale che sano, ricavate dalle biopsie effettuate al tempo della diagnosi. Il tessuto tumorale è stato utilizzato per la valutazione dei livelli dei microRNA; mentre dal corrispondente tessuto sano è stato estratto il DNA genomico per la genotipizzazione dei polimorfismi. Tutte le analisi eseguite sono state effettuate in cieco rispetto ai dati demografici e clinici dei rispettivi pazienti.

## **2.2 Analisi dei microRNA: estrazione, retrotrascrizione e quantificazione**

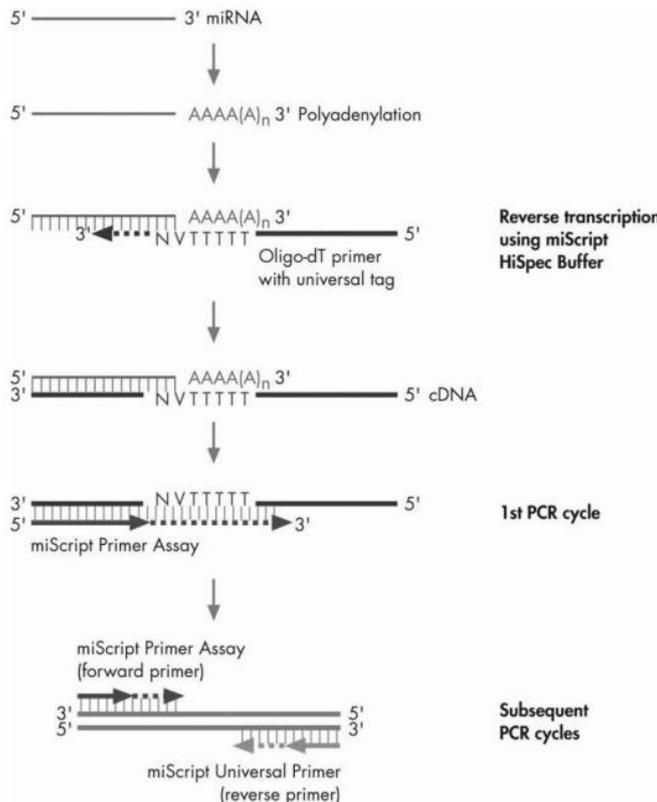
La valutazione quantitativa dei microRNA è stata effettuata su 81 pazienti arruolati; 2 campioni sono risultati non valutabili perché l'RNA estratto era degradato o scarso.

L'estrazione dei microRNA a partire da tessuto tumorale in FFPE ha richiesto una prima fase di deparaffinizzazione eseguita mediante l'utilizzo dello xilene, successivamente eliminato con lavaggi in etanolo.

I microRNA sono stati estratti mediante l'utilizzo del kit commerciale miRNeasy® FFPE (QIAGEN - Hilden, Germania), seguendo le istruzioni riportate sul manuale. La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto è stata valutata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 system (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), misurando la densità ottica del campione alla lunghezza d'onda di 260 nm per la concentrazione, 280 e 230 nm per valutare la purezza.

L'RNA estratto da ciascun campione è stato sottoposto a reazione di retrotrascrizione utilizzando il kit miScript® II RT (QIAGEN - Hilden, Germania). Questo kit permette di effettuare la reazione di trascrizione inversa utilizzando il Buffer miScript HiSpec che assicura una conversione selettiva in cDNA esclusivamente dei miRNA maturi, sopprimendo la conversione di lunghi RNA, come i messaggeri (mRNA). Diversamente dagli mRNA, i miRNA non vengono poliadenilati in natura e per questo motivo il kit permette di aggiungere una coda di poli-A ai miRNA tramite l'azione di una poli(A)polimerasi. L'aggiunta della coda di poli(A) permette così l'utilizzo degli oligo-dT come primer nella reazione di retrotrascrizione.

Gli oligo-dT hanno, inoltre, un'ancora degenerata all'estremità 3' e una sequenza di riconoscimento universale (tag) alla loro estremità 5'. Questo tag permette l'amplificazione dei miRNA tramite l'aggiunta di un primer universale nella mix di amplificazione utilizzata successivamente nella Real-Time PCR (fig.15). L'uso combinato della poliadenilazione e del tag rende ancora più specifica l'amplificazione dei soli microRNA.



**Figura 15:** Schema della conversione dei miRNA maturi in cDNA e successiva rilevazione. In una reazione di retrotrascrizione, in cui viene usato il Buffer miScript HiSpec, i miRNA maturi vengono poliadenilati mediante l'attività della *poli(A)polimerasi* e successivamente convertiti in cDNA dall'enzima *trascrittasi inversa*, utilizzando degli oligo-dT come primer. Il DNA copia viene usato come template nell'analisi di espressione dei miRNA maturi in real-time PCR.

Per ottenere un cDNA concentrato 12.5 ng/μL le reazioni di retrotrascrizione sono state allestite in un volume finale di 20 μL come riportato in tabella 6:

Componenti	Volume/reazione
5x miScript HiSpec Buffer	4 μL
10X miScript Nucleics Mix	2 μL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μL
Template RNA	Variabile (250 ng)
H <sub>2</sub> O RNase-free	Variabile
<b>Volume finale</b>	<b>20 μL</b>

**Tabella 6:** componenti e volumi per singolo campione.

La 10X miScript Nucleics Mix contiene al suo interno i deossiribonucleotidi (dNTP), gli oligo-dT primers ed un RNA sintetico esogeno (miRNA Reverse Transcription Control [miRTC]) utilizzato come controllo interno della reazione di cDNA; mentre la miScript Reverse Transcriptase Mix contiene gli enzimi *trascrittasi inversa* e *poly(A)polimerasi*.

La reazione è stata incubata per 1 ora a 37°C e successivamente a 95°C per 5 minuti.

Il cDNA ottenuto [12.5 ng/μL] è stato diluito ad una concentrazione finale di 1 ng/μL in H<sub>2</sub>O RNase-free e utilizzato come template nella fase successiva di analisi quantitativa in Real-Time PCR.

L'analisi del profilo di espressione dei miRNA maturi è stata effettuata utilizzando il kit miScript® miRNA PCR Array (QIAGEN - Hilden, Germania), il quale oltre ai reagenti classici per la reazione di Real-Time PCR, contiene piastre Custom miScript miRNA PCR Arrays (QIAGEN) da 96 pozzetti "ready-to-use" con i primer specifici per i miRNA da analizzare (miR-206, -132, -192, -194, -219) già spottati all'interno di ogni pozzetto secondo un layout stabilito al momento dell'ordine (fig.16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-miR-206											
B	hsa-miR-132-5p											
C	hsa-miR-192-3p											
D	hsa-miR-194-5p											
E	hsa-miR-219-5p											
F	RNU6-2											
G	miRTC											
H	PPC											

**Figura 16:** Layout della piastra "ready-to-use".

Nelle righe A, B, C, D, E vengono amplificati i miRNA da analizzare; nelle righe F, G, H vengono amplificati il reference RNU6-2 e i controlli miRTC e PPC.

- RNU6-2: è uno snRNA (small nuclear RNA) con livelli di espressione pressoché stabili tra i vari tessuti e tipi cellulari e per questo motivo è stato scelto come reference endogeno per normalizzare la quantità dei miRNA target ed ottenere risultati accurati e riproducibili nella quantificazione dei miRNA tramite Real-Time PCR.

- miRTC (miRNA Reverse Transcription Control): è un miRNA esogeno presente nella miscela di cDNA che permette di stimare l'efficienza del processo di retrotrascrizione, effettuato con il kit miScript® II RT QIAGEN, e di valutare la presenza di eventuali inibitori interni alla miscela di reazione.

- PPC (Positive PCR Control): rappresenta un controllo della reazione di PCR; all'interno di questi pozzetti, infatti, sono spottati una sequenza pre-dispensata di DNA artificiale e il suo saggio per la rilevazione, in modo tale da monitorare diverse variabili che possono inibire la reazione di PCR.

La miscela di reazione è stata assemblata in accordo a quanto riportato dal protocollo del kit miScript® miRNA PCR Array (QIAGEN - Hilden, Germania) (tab.7):

<b>Componenti</b>	<b>Volume/reazione</b>
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µL
10X mi Script Universal Primer	2.5 µL
Template cDNA	1 µL (~1 ng)
H <sub>2</sub> O RNase-free	9 L
<b>Volume finale</b>	<b>25 µL</b>

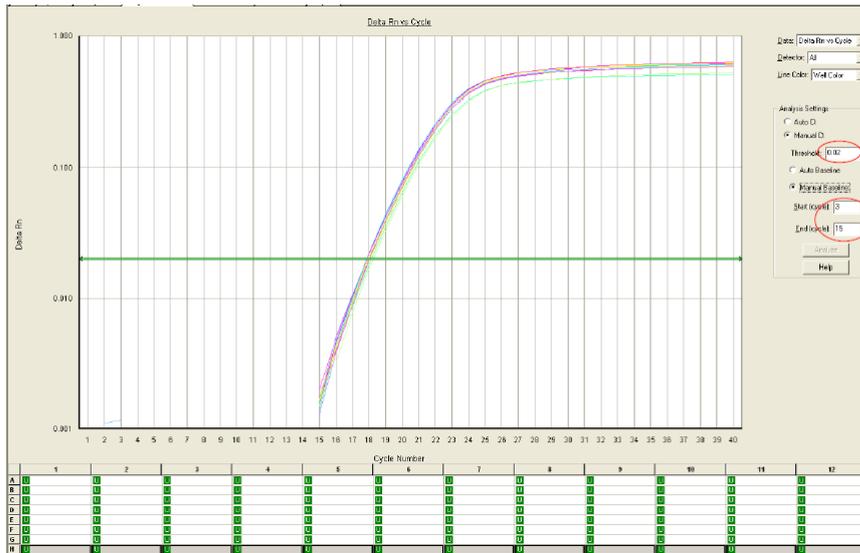
**Tabella 7:** componenti e volumi per singolo campione

Le reazioni sono state incubate a 95°C per 15 minuti per l'attivazione iniziale dell'enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, e successivamente sono seguiti 40 cicli formati da tre step: denaturazione dello stampo a 94°C per 15 secondi, annealing con i primers a 55°C per 30 secondi e una fase di estensione a 70°C per 30 secondi, durante la quale sono stati raccolti i dati relativi all'aumento di fluorescenza, dovuto alla presenza della molecola di SYBR Green contenuta nella Master Mix utilizzata.

Per le reazioni di Real-Time PCR è stato utilizzato il termociclatore Applied Biosystem 7500 Real Time PCR System ed il software 7500 system SDS v1.4.0 (Life Technologies Inc. Burlington, ON. Canada).

Per analizzare le amplificazioni sono state impostate la *baseline* dal terzo al quindicesimo ciclo e la *threshold* a 0.02, come suggerito dal protocollo (miScript® miRNA PCR Array, QIAGEN - Hilden, Germania).

La figure 17 e 18 mostrano le curve di amplificazione dei controlli PPC e miRTC.



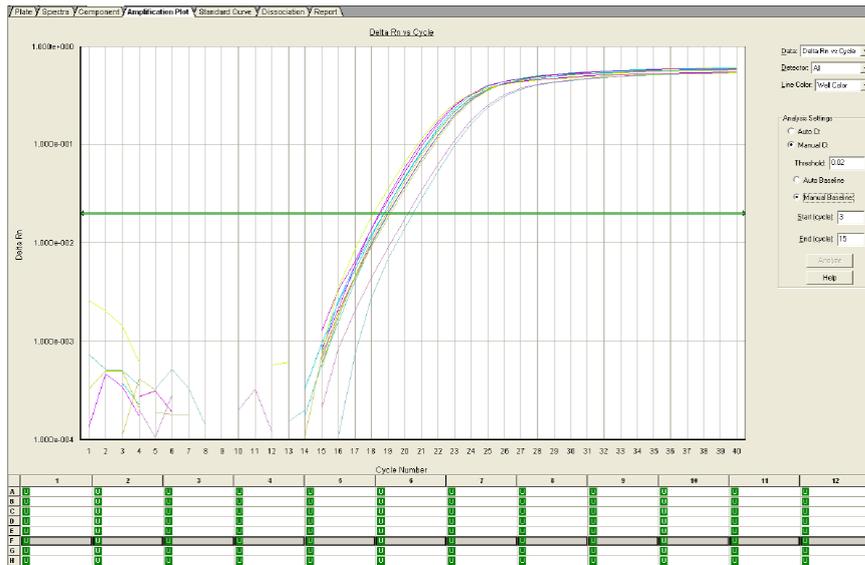
**Figura 17:** Curve di amplificazione dei PPC.

I valori dei Ct (*threshold cycle*) risultanti dall'amplificazione di PPC rientrano perfettamente nel range descritto dal protocollo in tutti i pozzetti e in tutte le piastre (fig.17); quindi si può confermare che la reazione di Real Time PCR è avvenuta correttamente e con la stessa cinetica in tutti i campioni e si può escludere la presenza di sostanze inibitrici capaci di interferire con le reazioni di amplificazione.



**Figura 18:** Curve di amplificazione dei miRTC.

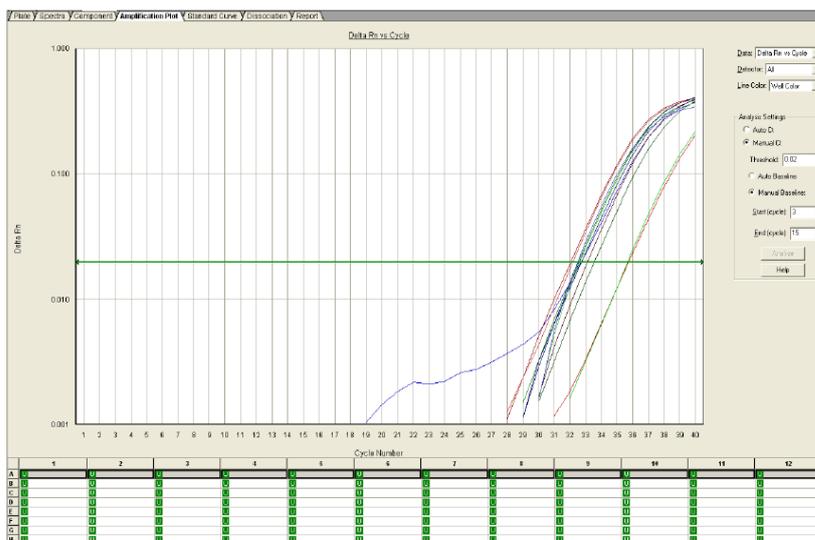
I Ct risultanti dall'amplificazione dei miRTC si sono rivelati inferiori al valore soglia imposto dal protocollo del kit, per cui si può dire che non si è verificata alcun tipo di inibizione e che la reazione è stata eseguita correttamente (fig.18).



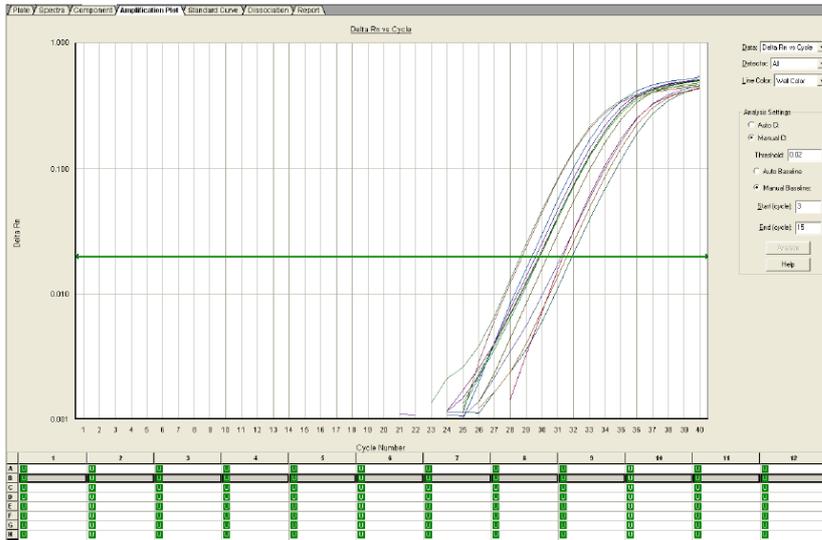
**Figura 19:** Curve di amplificazione di RNU6-2.

Nella fig.19 sono riportate le curve di amplificazione del reference RNU6-2, utilizzato per normalizzare la quantità dei miRNA *target*.

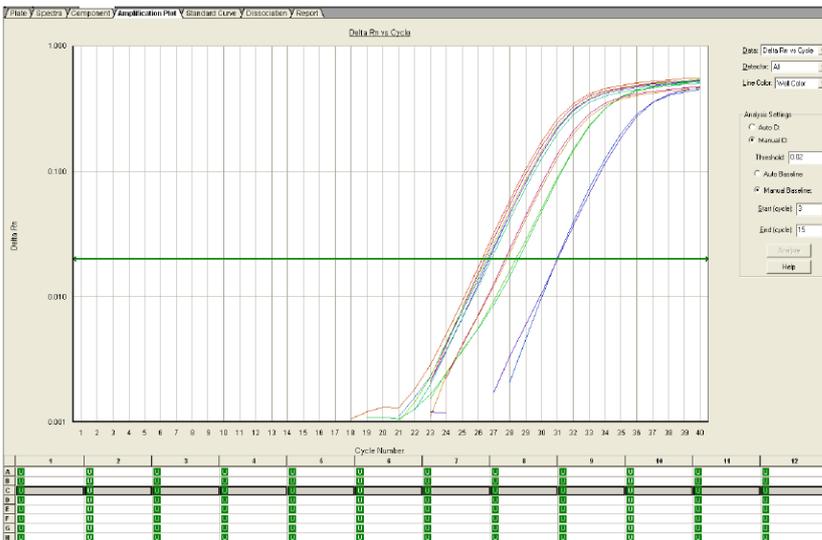
Verificata la performance delle reazioni di retrotrascrizione e di PCR, sono stati analizzati i *target* miR-206, miR-132, miR-192, miR-194 e miR-219 (fig.20-24) come da layout della piastra, mostrata in fig.16. La qualità delle corse e la specificità di amplificazione sono state verificate tramite le curva di dissociazione per ogni pozzetto, oltre che dalla constatazione di curve pulite e repliche simili tra loro. Ogni campione è stato analizzato in doppio.



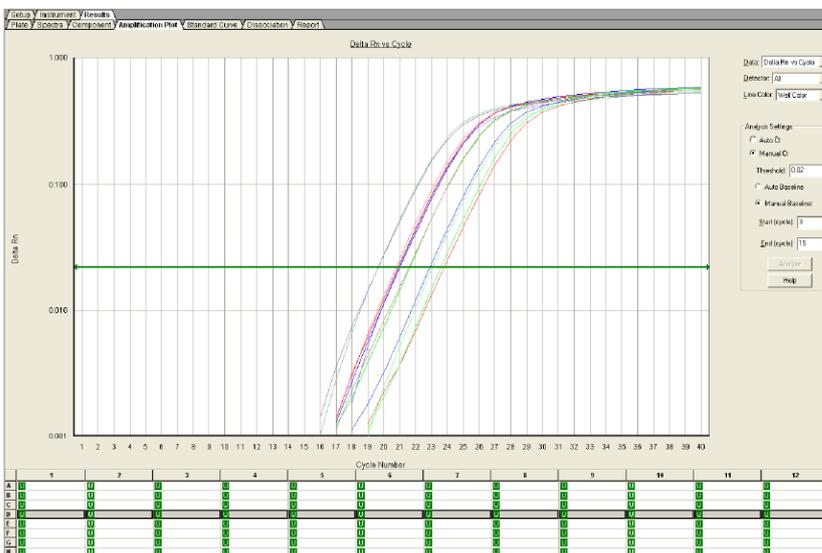
**Figura 20:** Curve di amplificazione di miR-206.



**Figura 21:** Curve di amplificazione di miR-132-5p.



**Figura 22:** Curve di amplificazione di miR-192-3p.



**Figura 23:** Curve di amplificazione di miR-194-5p.



miRNA	hsa-miR-206	hsa-miR-132-5p	hsa-miR-192-3p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-219-5p
sample	2 <sup>-ΔCt0</sup>				
1	1,10	2,06	25,15	3128,99	5,57
2	2,21	2,21	17,00	3275,96	2,21
3	0,32	0,32	12,77	5734,55	1,48
4	1,08	0,30	10,99	1721,00	1,89
6	2,03	1,83	33,59	5530,57	5,86
7	2,32	0,54	23,18	4129,39	2,82
8	1,40	7,39	16,41	2759,07	5,08
9	0,70	0,94	12,32	2387,34	2,40
10	0,22	1,15	29,66	3252,09	6,16
11	0,50	4,02	12,93	1590,78	4,36
12	0,42	2,35	41,43	4758,42	7,86
13	0,45	1,37	64,60	7090,05	8,71
14	0,39	1,64	47,82	7559,84	6,26
15	0,76	1,08	51,08	6572,79	7,63
16	0,52	1,70	68,46	7067,22	14,78
17	0,54	1,56	67,11	7285,07	6,57
18	0,43	0,53	51,19	7321,02	8,19
19	1,64	1,79	31,90	4425,39	7,18
20	0,79	1,05	49,72	4492,34	7,37
21	0,82	3,00	2,75	8,72	1,64
22	1,21	1,11	27,01	8774,35	3,33
23	0,70	1,51	39,42	5813,61	7,12
25	1,84	3,59	37,93	3223,89	6,21
26	0,81	0,69	30,03	4317,55	7,81
27	2,40	4,59	16,90	2455,26	4,61
28	2,13	2,03	20,58	4842,92	2,64
29	0,58	1,10	14,16	5875,96	1,93
30	0,80	0,94	10,02	2574,07	1,25
31	0,49	1,05	9,17	1232,03	1,65
32	3,10	3,01	12,20	2869,34	2,40
33	0,79	1,18	17,50	2115,55	2,27
34	0,26	0,08	0,59	128,84	0,07
35	0,95	1,59	25,49	8568,66	5,57
36	0,48	1,79	24,34	3750,89	8,42
37	28,89	1,04	66,42	14819,11	2,39
38	2,00	2,07	11,68	2589,36	1,76
39	1,32	1,40	9,76	4704,77	1,38
40	0,53	1,70	19,39	3751,88	1,91
42	0,61	0,68	18,72	4385,90	2,05
43	1,49	1,71	21,29	7667,83	4,27
44	0,52	0,79	19,16	4741,44	2,63
45	1,53	1,53	7,94	2762,88	1,42
46	1,63	1,61	6,90	1842,28	1,50
47	0,32	0,73	7,84	1486,96	0,99
48	0,84	0,88	16,22	4257,04	2,06
49	0,05	0,09	4,05	944,20	0,23
52	0,43	0,43	2,17	425,41	0,43
53	0,96	2,82	9,53	2194,75	3,00
54	0,38	1,03	20,32	3370,97	2,17
55	0,43	2,73	13,66	3113,76	4,15
59	0,84	1,96	21,20	4293,36	3,12
62	0,58	2,25	19,65	3704,52	3,25
63	0,52	2,39	60,63	6278,25	7,02
64	0,45	1,65	32,96	7936,72	3,77
65	0,76	2,56	8,97	4578,70	1,78
67	0,66	1,50	14,36	7523,70	3,75
68	0,16	2,51	14,50	2236,60	4,07
69	0,31	3,29	9,56	1379,48	1,13
70	2,69	2,50	14,20	2691,75	2,46
71	0,29	1,56	45,07	8933,94	6,73
72	0,83	38,32	18,64	4379,75	102,12
73	0,62	0,33	20,03	3686,00	2,58
76	0,92	0,69	26,35	7922,11	6,95
77	1,24	1,33	19,65	3397,45	2,04
78	0,88	0,44	9,70	2524,92	1,77
79	0,50	0,96	24,82	5571,95	3,20
80	0,39	0,94	9,48	3034,09	2,68
81	0,99	1,35	33,02	6894,15	3,21
82	0,73	0,73	23,93	4521,77	4,08
84	0,40	0,72	14,32	2924,57	3,67
85	1,03	0,91	13,23	2532,64	2,64
86	0,53	0,63	6,43	1695,97	1,39
87	0,58	2,07	13,60	3622,30	5,16
88	0,13	0,98	42,50	11079,66	3,40
89	1,28	1,86	46,25	5868,38	3,39
90	0,77	2,25	0,73	126,26	1,02
91	0,68	2,81	38,17	5911,44	3,04
93	1,29	2,25	1,50	348,01	0,51
94	0,24	2,69	62,64	10230,03	4,09
95	1,10	1,87	16,67	3867,52	2,13
96	0,25	2,21	4,99	888,70	3,24
mediana	0,73	1,56	18,72	3751,88	3,12

**Tabella 8:** valori di  $2^{-(\Delta Ct_0)}$  riportati per ogni campione e per ogni miRNA analizzato.

### 2.3 Analisi dei polimorfismi genetici: estrazione gDNA, amplificazione e genotipizzazione

Sono stati analizzati i polimorfismi genetici di 77 pazienti su 83 arruolati perché il DNA genomico di 6 pazienti è risultato degradato o scarso, quindi non valutabile per la genotipizzazione e le analisi statistiche.

Dopo il procedimento di deparaffinizzazione con xilene, il DNA genomico è stato estratto dai tessuti sani in FFPE mediante l'impiego del kit commerciale QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN - Hilden, Germania) e seguendo le istruzioni riportate sul protocollo. La purezza e la concentrazione del DNA per ogni campione è stata valutata mediante lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 system (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Successivamente si è proceduto all'amplificazione delle regioni contenenti gli SNP, che sono stati successivamente genotipizzati con la tecnica del Pyrosequencing, un metodo altamente efficace ed affidabile. Per l'amplificazione dei frammenti di DNA contenenti gli SNP sono state allestite reazioni di PCR secondo la tabella 9:

<b>Componenti</b>	<b>Volume/reazione</b>
2X PCR Master MIX® (Diateva - Fano, Italia)	12.5 µL
Primers mix (forward + reverse) 10 µM	1 µL (400 nM)
Polimerasi HotStarTaq® (Diateva, Fano, Italy)	0.125 µL (0.625 U)
DNA genomico	Variabile (~20-30 ng)
H <sub>2</sub> O	Variabile
<b>Volume finale</b>	<b>25 µL</b>

**Tabella 9:** componenti e volumi per singolo campione.

In particolare, le regioni contenenti gli SNP rs11133373 e rs1801260 sono state amplificate mediante PCR classica, mentre per la genotipizzazione dello SNP rs11133391 è stata eseguita una nested-PCR utilizzando due coppie di primers (tab.10). I primers sono stati disegnati usando il software PSQ Assay Design (Biotage, Uppsala - Sweden).

Gli amplificati sono stati verificati e controllati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%, prima di eseguire il pyrosequenziamento.

SNP	Condizioni di PCR		Primers	Lunghezza amplicone	Genotipizzazione
<i>CLOCK</i> rs11133373	Denat. iniziale: 95°C x 15' Denat: 95°C x 10" Annealing: 59°C x 20" Estensione: 72°C x 30" Est. finale: 72°C x 3'	40 cicli	Fw- [Biot]GTTGTAAATCCCATTCTGCAAATA Rev-CCAAGAACCAATTCAGGTTTTACT Seq-TTACTCTTGCCTCCGT	170 bp	Pyrosequencing
<i>CLOCK</i> rs1801260	Denat. iniziale: 95°C x 15' Denat: 95°C x 10" Annealing: 59°C x 20" Estensione: 72°C x 30" Est. finale: 72°C x 3'	40 cicli	Fw-CCAGCAGGAGGTGATCATAGG Rev-[Biot]CAGGCACCTAAAACACTGTCAG Seq- GGTGATCATAGGGGCA	56 bp	Pyrosequencing
<i>CLOCK</i> rs11133391	<b>NESTED PCR</b> <b>I PCR</b> Denat. iniziale: 95°C x 15' Denat: 95°C x 10" Ann/Est: 59°C x 40" Est. finale: 59°C x 60'	<b>II PCR</b> Denat. iniziale: 95°C x 15' Denat: 95°C x 10" Annealing: 59°C x 20" Estensione: 72°C x 30" Est. finale: 72°C x 3'	<b>I PCR</b> Fw-ACTGTGAACAATCAAATGAAATAACCC Rev-AACAGATGAAACAAGATTGA <b>II PCR</b> Fw- [Biot]CAAATGAAATAACCCATTACCTTTAGA Rev- AAGATTGATTAGCCATGAGTTGATAATT Seq-TGGAACCTGGTGAAG	<b>I PCR:</b> 190 bp <b>II PCR:</b> 163 bp	Pyrosequencing

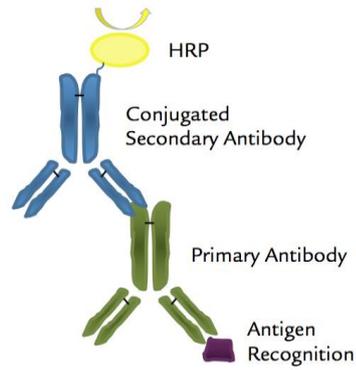
**Tabella 10:** condizioni di PCR e coppie di primer utilizzate per l'amplificazione di ciascun polimorfismo.

La tecnica di **Pyrosequencing** (PSQ 96MAR, Biotage AB – Uppsala, Svezia) consiste in un mini-sequenziamento del tratto di DNA in cui è localizzato il polimorfismo del singolo nucleotide. Viene preferita al sequenziamento classico perché i tempi di analisi e il costo risultano ridotti. Questo metodo si basa sul dosaggio del pirofosfato (PPi) liberato in seguito all'attacco del dNTP complementare al filamento polimerizzato. Il PPi, infatti, viene trasformato in ATP ad opera dell'enzima solforilasi, che usa l'ASP (adenosinolfosfato) come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina in ossiluciferina ad opera della luciferasi, con produzione di un segnale luminoso, il quale viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD) e trasformato in un pirogramma dal quale si risale alla sequenza completa del filamento neosintetizzato (Ronaghi M, 2001). I prodotti biotinilati ottenuti dalla PCR preparativa sono stati dunque preparati per il mini-sequenziamento nel seguente modo: innanzitutto sono stati processati mediante PSQ 96 Sample Preparation Kit (Biotage), immobilizzati su Streptavidin-coated Sepharose™ High Performance beads (Amersham Biosciences, Piscataway - NJ) e, infine, tramite l'utilizzo di una pompa a vuoto PSQ Vacuum Prep Tool (Biotage) i prodotti di PCR sono stati immersi in soluzioni denaturanti per ottenere DNA a singolo filamento, utilizzato come stampo nell'analisi successiva di pyrosequencing. I singoli filamenti di DNA sono stati incubati con il primer di sequenza 0.4 μM finale a 80°C per 2 minuti in una PSQ96 plate. Il sequenziamento mediante reazione di sintesi del filamento complementare è stato automaticamente eseguito dallo strumento PSQ 96MA (Biotage) con l'utilizzo dei reagenti del kit PyroMark Gold Q96 Reagents (QIAGEN) e seguendo le istruzioni del manuale.

## 2.4 Analisi di immunoistochimica

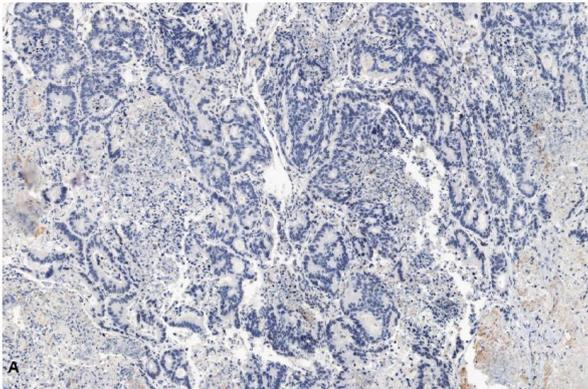
Le analisi immunoistochimiche (IHC), condotte presso la sezione di Anatomia patologica dell'Istituto Regina Elena di Roma, sono state eseguite sulle sezioni di tessuto tumorale coloretale dei pazienti arruolati per verificare la presenza e valutare l'espressione delle seguenti proteine coinvolte nella proliferazione cellulare: PER2, EGFR,  $\beta$ -catenina, Ciclina D1, ER $\beta$ 1 (recettore per gli estrogeni  $\beta$  – sottotipo 1), ER $\beta$ 2 (recettore per gli estrogeni  $\beta$  – sottotipo 2) e Ki-67 (indice proliferativo). Le sezioni in paraffina sono state prima riscaldate a 70°C per 20 minuti e successivamente sottoposte a una serie di lavaggi in toluene, in alcool a gradazione decrescente (99%, 96%, 70%) e per ultimo in acqua corrente, al fine di eliminare la paraffina e reidrattare il tessuto. Un pre-trattamento, in cui i vetrini sono stati immersi in una soluzione tampone a pH 8 ed incubati in forno a bagnomaria a 96°C per 40 minuti, è servito per sottoporre i tessuti allo smascheramento antigenico. L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante incubazione con perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% in metanolo per 10 minuti. Quindi, le sezioni sono state incubate per 30 minuti in una soluzione composta dal 2% di siero normale, 0.3% di TritonX100 e 1% di BSA ed infine è stato aggiunto l'Ab primario purificato da IgG di capra (N-19, Santa Cruz Biotechnology inc., USA) diluito 1:100, che ha reagito per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver effettuato dei lavaggi con PBS, i vetrini sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con un Ab secondario anti-goat, a cui è legata una coda dove si trova altamente ripetuto l'enzima HRP (Horseradish Peroxidase) (fig.25); ciò permette di amplificare il segnale che si ottiene quando viene aggiunto il DAB (3,3-diaminobenzidina), il substrato cromogeno dell'enzima HRP. L'ossidazione del DAB provoca la polimerizzazione e la ciclizzazione del DAB in una molecola più complessa che precipita nel sito di reazione come pigmento di colore bruno e, in questo modo, rende visibile il legame degli anticorpi al tessuto (fig.25).

Le sezioni sono state contrastate con ematossilina che, tramite un processo di ossidazione, si trasforma in emateina che esercita attività tintoriale: trattandosi di un colorante basico, l'emateina va a legarsi perlopiù a sostanze acide come i nuclei, conferendo una colorazione blu-violacea.

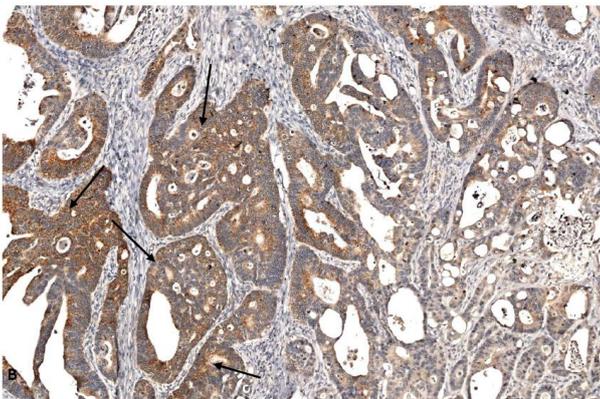


**Figura 25:** schema della reazione immunocitochimica. L'Ab primario (IgG di capra) si lega all'antigene presente nel tessuto; l'Ab secondario anti-goat, che ha una coda con l'enzima HRP altamente ripetuto, riconosce e si lega all'Ab primario. HRP reagisce con il DAB e provoca la formazione di un pigmento bruno che precipita nel sito di reazione, rendendo visibile il legame dell'anticorpo con il tessuto, e quindi indicando la presenza dell'antigene.

Nelle immagini A e B della figura 26 di seguito riportata è chiara la distinzione tra un tessuto positivo all'IHC, distinto da una colorazione bruna, ed un tessuto con IHC negativa, su cui domina invece la colorazione blu dei nuclei, dovuta alla trasformazione in emateina dell'ematosilina con cui è stata contrastata la sezione. Tutte le immagini sono state valutate tramite software Image-Pro Plus del microscopio Olympus BX60 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA).



**Figura 26:** immunocitochimica di un tessuto PER2 negativo (A) e di un tessuto PER2 positivo (B).



## 2.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita dal Dipartimento di Scienze Statistiche dell'Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" di Roma. Le variabili continue sono state sintetizzate attraverso le mediane e il range; le variabili categoriche, come il sesso (M vs F), il Performance Status score (0 vs 1 e 2), KRAS (*wt* vs *mut*), BRAF (*wt* vs *mut*), PER2 (pos vs neg), EGFR (pos vs neg),  $\beta$ -catenina (pos vs neg), Ciclina D1 (pos vs neg), ER $\beta$ 1 (pos vs neg), ER $\beta$ 2 (pos vs neg) e Ki-67 (pos vs neg), sono state riportate come frequenze.

Tutte le associazioni tra le diverse variabili categoriche sono state valutate mediante il test del Chi quadro o il test esatto di Fisher.

Per ciascun microRNA, i livelli di espressione nei vari campioni, espressi come  $2^{-\Delta C_T}$ , sono stati divisi in due gruppi: alto livello di espressione (H) e basso livello di espressione (L) del miRNA, prendendo in considerazione come cut-off il valore mediano dell'espressione di ciascun miRNA.

Per quanto riguarda le frequenze genotipiche dei polimorfismi, è stata valutata la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg; inoltre le frequenze genotipiche del campione sono state anche confrontate con quelle della popolazione italiana (TSI) (<http://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html>) mediante il test del  $\chi^2$  con un grado di libertà e settando la significatività statistica a p-value  $\leq 0.05$ . Successivamente, in accordo con la bassa frequenza degli allele minori dei tre polimorfismi (q), è stato deciso di collassare gli omozigoti per l'allele minore (qq) con gli eterozigoti (pq), applicando il modello statistico dominante (genotipo *pp* vs *pq+qq*) in tutte le analisi statistiche eseguite. In questo modo è stato possibile considerare i polimorfismi come variabili dicotomiche.

La sopravvivenza globale (OS), endpoint primario dello studio, è stata calcolata come il periodo di tempo che va dalla data di inizio della terapia di prima linea fino alla morte dell'individuo, sopraggiunta per qualsiasi causa, o fino alla data dell'ultimo follow-up. In oncologia umana si parla spesso anche di sopravvivenza mediana, definita come il tempo in cui è sopravvissuto il 50% dei pazienti (e quindi in cui è deceduto il 50% del campione totale).

La sopravvivenza libera da progressione (PFS), endpoint secondario dello studio, è stata calcolata come il periodo di tempo che intercorre dalla data di inizio della terapia di prima linea alla data di progressione. Per i pazienti che non hanno

registrato alcuna progressione di malattia o che sono risultati vivi al momento della raccolta dei dati clinici, la PFS o l'OS nell'analisi statistica sono state censurate al giorno dell'ultimo follow-up.

Le curve di OS e PFS sono state stimate mediante il metodo di Kaplan-Meier e i confronti tra i diversi sottogruppi considerati sono stati valutati con il log-rank test; sono stati considerati significativi tutti i risultati statistici con un p-value  $\leq 0.05$ . Tutte le analisi sono state eseguite nell'intero campione e anche nei maschi e nelle femmine separatamente.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte mediante il software statistico SPSS (versione 21.0).

### **3. RISULTATI**

### 3.1 Analisi delle caratteristiche clinico-patologiche

Nella tabella 11 sono riportate le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti e la distribuzione dell'espressione dei microRNA (H vs L) e dei polimorfismi sia nel campione totale, sia nel gruppo dei maschi e delle femmine. I pazienti analizzati sono 83, di cui 50 maschi e 33 femmine. L'età mediana è di 59 anni per l'intero campione, di 60 anni per la coorte maschile e di 56 anni per quella femminile.

	Variabile	Valori	Campione totale		Associazioni per gender				p-value (test esatto di Fisher)	TOT pz
			N pz	% pz	N maschi	N femmine	% maschi	% femmine		
Caratteristiche clinico-patologiche	Sesso	M/F	50/33	60/40						83
	Performance status	0/1 e 2	65/18	78/22	38/12	27/6	76/24	82/18	0,53	83
	Sede Metastasi	solo fegato/ fegato+altre sedi	48/35	58/42	30/20	18/15	60/40	55/45	0,62	83
	Resez tum primario	si/no	76/7	92/8	44/6	32/1	88/12	97/3	0,24	83
	Resez met epatiche	si/no	36/47	43/57	18/32	18/15	36/64	55/45	0,10	83
	Cetuximab	si/no	63/20	76/24	39/11	24/9	78/22	73/27	0,58	83
	Linea Cetuximab	I linea/dalla II linea	40/23	63/37	23/16	17/7	59/41	71/29	0,66	63
	Risposta alle tp	si/no	56/25	69/31	32/17	24/8	65/35	75/25	0,36	81
	KRAS	wt/mut	68/15	82/18	42/8	26/7	84/16	79/21	0,55	83
	BRAF	wt/mut	63/2	97/3	36/1	27/1	97/3	96/4	0,99	65
	PER2	pos (2+/3+) vs neg(0/1+)	48/35	58/42	31/19	17/16	62/38	52/48	0,34	83
	EGFR	pos/neg	44/39	53/47	27/23	17/16	54/46	52/48	0,82	83
	Ciclina D1	≤20 / >20	38/45	46/54	23/27	15/18	46/54	45/55	0,96	83
	β- catenina	≤20 / >20	25/58	30/70	10/40	15/18	20/80	45/55	0,01 *	83
	Ki-67	<15 / ≥15	32/51	39/61	19/31	13/20	38/62	39/61	0,90	83
	ERβ1	pos/neg	54/29	65/35	31/19	23/10	62/38	70/30	0,47	83
ERβ2	pos/neg	50/33	60/40	34/16	16/17	68/32	49/51	0,08	83	
microRNA	miR-206	Low/High	41/40	51/49	26/22	15/18	54/46	45/55	0,44	81
	miR-219	Low/High	41/40	51/49	23/25	18/15	48/52	55/45	0,56	81
	miR-132	Low/High	41/40	51/49	23/25	18/15	48/52	55/45	0,56	81
	miR-192	Low/High	41/40	51/49	24/24	17/16	50/50	52/48	0,89	81
	miR-194	Low/High	41/40	51/49	25/23	16/17	52/48	49/51	0,75	81
Polimorfismi	SNP rs11133373	CC vs GG+CG	35/42	46/54	19/27	16/15	41/59	52/48	0,37	77
	SNP rs1801260	TT vs CC+CT	36/41	47/53	23/23	13/18	50/50	42/58	0,49	77
	SNP rs11133391	TT vs CC+CT	30/47	38/62	15/31	15/16	33/67	48/52	0,16	77

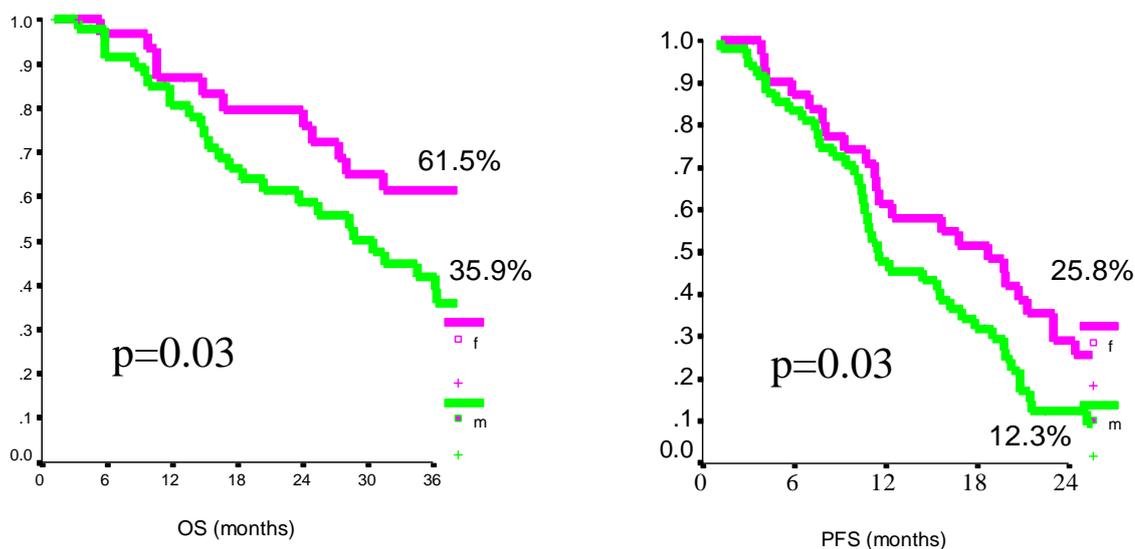
**Tabella 11:** caratteristiche clinico-patologiche, livelli di microRNA e genotipi degli SNP distribuiti nel campione totale e nel campione stratificato per sesso. Associazione fra i diversi caratteri e il gender calcolata mediante Fisher's exact test.

\*p-value≤0.05.

Nella tabella 11 si può notare che la distribuzione delle caratteristiche clinico-patologiche nei due sessi non si scosta da quella del campione totale, ad eccezione dell'espressione di β-catenina, che risulta più frequentemente elevata nei maschi (80%) rispetto alle femmine (55%) in modo statisticamente significativo (p=0.01). E' degna di nota, anche se non vi è significatività statistica, la diversa distribuzione fra maschi e femmine delle frequenza delle resezioni epatiche, più frequenti nelle donne (55%) rispetto agli uomini (36%) (p=0.10) e dell'espressione di ERβ2, più frequentemente elevata nei maschi (68%) rispetto alle femmine (49%) (p=0.08). La distribuzione dell'espressione dei miRNA e dei polimorfismi è paragonabile nei due sessi, come confermato dai valori di p-value >0.05.

### 3.2 Overall Survival (OS) e Progression Free Survival (PFS) gender-related

La mediana di OS dell'intera popolazione è di 35 mesi (Ci95% 22-47) e la mediana della PFS è di 14 mesi (Ci95% 10-19). Stratificando la popolazione in base al sesso si evidenzia, come mostrano le curve Kaplan-Meier, che esiste un vantaggio significativo per le donne rispetto agli uomini di 19 mesi per l'OS mediana ( $p=0.03$ ) e di 7 mesi per la PFS ( $p=0.03$ ) (fig.27).



Variabile	Sesso	OS a 3 anni	Mediana	CI95%	p-value
OS campione		46,7	35	22-47	
OS per sesso	M	35,9	31	22-39	0,03
	F	61,5	50	35-64	

Variabile	Sesso	PFS a 2 anni	Mediana	CI95%	p-value
PFS campione		17,7	14	10-19	
PFS per sesso	M	12,3	12	8-16	0,03
	F	25,8	19	11-27	

**Figura 27:** Curve Kaplan-Meier per l'OS e la PFS del campione stratificato per gender. Il confronto fra le curve è stato effettuato mediante il log-rank test. Le tabelle riportano la sopravvivenza a tre anni dall'inizio della terapia di I linea e la PFS a due anni dall'inizio della terapia di I linea, la mediana di sopravvivenza e di PFS e l'intervallo di confidenza al 95%, sia per la totalità del campione sia per maschi (M) che per femmine (F).

### 3.3 Associazione gender-related di microRNA e OS/PFS

Le analisi di espressione dei livelli di microRNA sono state condotte su 81 campioni (49 maschi e 32 femmine) perché 2 campioni, con RNA scarso e degradato, sono risultati non valutabili. I livelli di espressione di ogni miRNA (miR-206, -219, -132, -192, -194) sono stati splittati in alti (H) e bassi (L) livelli e associati con l'OS e la PFS dei pazienti. Le analisi di associazione dei livelli di miRNA con l'OS e la PFS dell'intero campione non hanno evidenziato differenze significative (dati non riportati); mentre quando la popolazione di studio è stata stratificata per sesso, le analisi di OS e di PFS hanno dato risultati significativi (tab.12 e 13). Le tabella 12 e 13 riportano le mediane, rispettivamente, dell'OS e della PFS; in entrambe le tabelle la popolazione è divisa per sesso e per livelli di miRNA.

		Maschi		Femmine		Log-Rank test p-value
		OS mediana	CI 95%	OS mediana	CI 95%	
	<b>Campione totale</b>	31	(22-39)	50	35-64	<b>0.03</b>
miR-206	L	32	(23-40)	31	(7-56)	0.67
	H	20	(8-33)	56	(46-66)	<b>0.003</b>
	Log-Rank test - p-value	0.24		0.22		
miR-219	L	31	(12-49)	50	(19-80)	0.81
	H	25	11-39	58	(55-61)	<b>0.002</b>
	Log-Rank test - p-value	0.30		0.10		
miR-132	L	31	(14-47)	57	(15-99)	<b>0.06</b>
	H	25	(16-35)	44	5-84	0.11
	Log-Rank test - p-value	0.39		0.19		
miR-192	L	24	(8-39)	50	(19-80)	0.28
	H	31	(23-38)	51	(14-88)	<b>0.03</b>
	Log-Rank test - p-value	0.63		0.44		
miR-194	L	24	(10-37)	50	(16-83)	0.22
	H	32	(20-43)	56	(35-77)	<b>0.02</b>
	Log-Rank test - p-value	0.81		0.95		

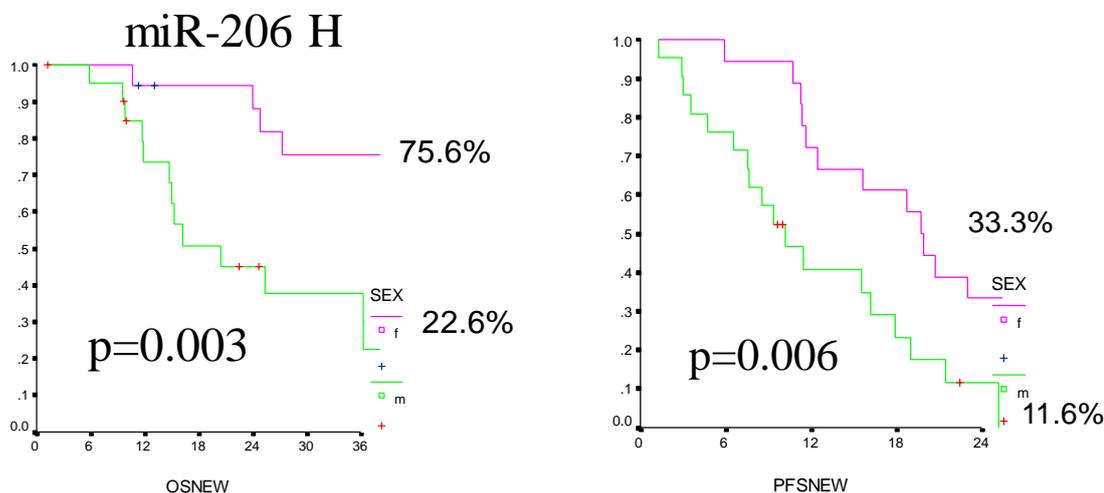
**Tabella 12:** la tabella mostra le mediane dell'OS riportate per i diversi livelli di espressione dei miRNA e stratificando la popolazione in base al sesso. Nella prima riga gialla vi sono i dati relativi all'OS del campione diviso solo per sesso. I livelli di espressione dei cinque miRNA analizzati sono suddivisi in bassi (L) e alti (H) livelli di espressione, e per ogni gruppo è riportata la mediana di sopravvivenza a 3 anni e l'intervallo di confidenza al 95% dei pazienti appartenenti a quel determinato gruppo. Il confronto fra le OS (log-rank test) è stato effettuato in due diversi modi: nelle righe bianche in basso rispetto alle righe azzurre dei microRNA è riportato il p-value del confronto fra L e H livelli di miRNA all'interno della popolazione maschile (M) e femminile (F); nelle celle bianche a destra è riportato, invece, il p-value del log-rank test effettuato fra M e F per ogni livello di miRNA. I valori statisticamente significativi e borderline sono segnati in rosso.

		Maschi		Femmine		Log-Rank test p-value
		PFS mediana	CI 95%	PFS mediana	CI 95%	
	<b>Campione totale</b>	12	8-16	19	11-27	<b>0.03</b>
miR-206	L	14	9-20	9	0-20	0.90
	H	10	6-14	20	17-22	<b>0.006</b>
	Log-Rank test - p-value	0.18		0.24		
miR-219	L	19	9-29	16	7-25	0.60
	H	11	10-12	20	10-30	<b>0.02</b>
	Log-Rank test - p-value	<b>0.07</b>		0.70		
miR-132	L	12	5-19	21	8-34	0.14
	H	11	9-13	16	4-27	0.19
	Log-Rank test - p-value	0.61		0.68		
miR-192	L	11	9-14	20	10-30	0.23
	H	12	6-17	16	2-29	<b>0.09</b>
	Log-Rank test - p-value	0.66		0.95		
miR-194	L	11	9-14	16	5-26	0.37
	H	12	6-17	19	13-24	<b>0.01</b>
	Log-Rank test - p-value	0.24		0.82		

**Tabella 13:** la tabella mostra le mediane della PFS riportate per i diversi livelli di espressione dei miRNA e stratificando la popolazione in base al sesso. Nella prima riga arancio vi sono i dati relativi alla PFS del campione diviso solo per sesso. I livelli di espressione dei cinque miRNA analizzati sono suddivisi in bassi (L) e alti (H) livelli di espressione, e per ogni gruppo è riportata la mediana di PFS a 2 anni e l'intervallo di confidenza al 95% dei pazienti appartenenti a quel determinato gruppo. Il confronto fra le PFS (log-rank test) è stato effettuato in due diversi modi: nelle righe bianche in basso rispetto alle righe verdi dei microRNA è riportato il p-value del confronto fra L e H livelli di miRNA all'interno della popolazione maschile (M) e femminile (F); nelle celle bianche a destra è riportato, invece, il p-value del log-rank test effettuato fra M e F per ogni livello di miRNA. I valori statisticamente significativi e borderline sono segnati in rosso.

**miR-206**

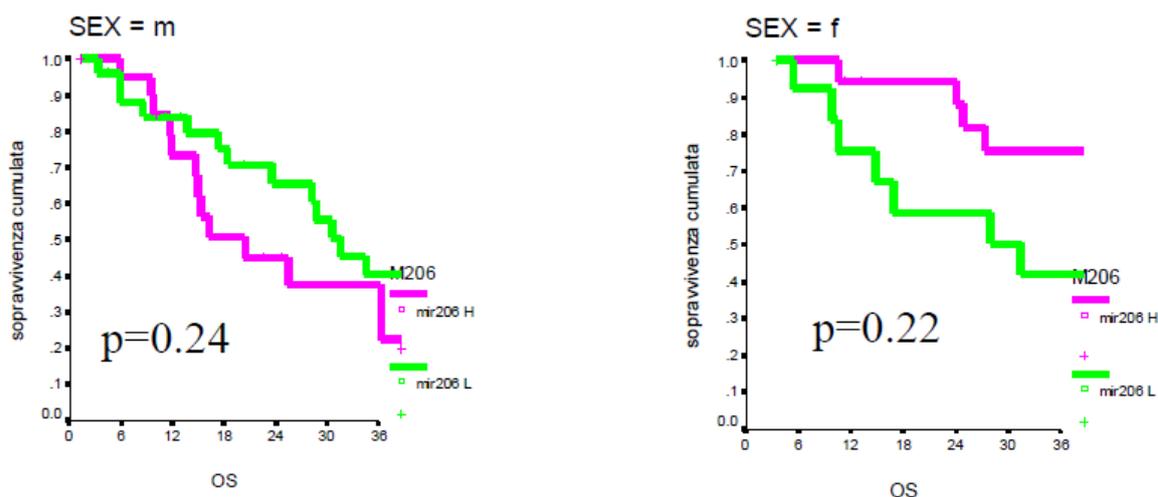
Per il miR-206 si può osservare che la frazione di popolazione con maggiore OS e PFS è rappresentata dalle donne con H miR-206 (OS mediana=56 mesi; PFS mediana=20 mesi) (tab.12 e 13).



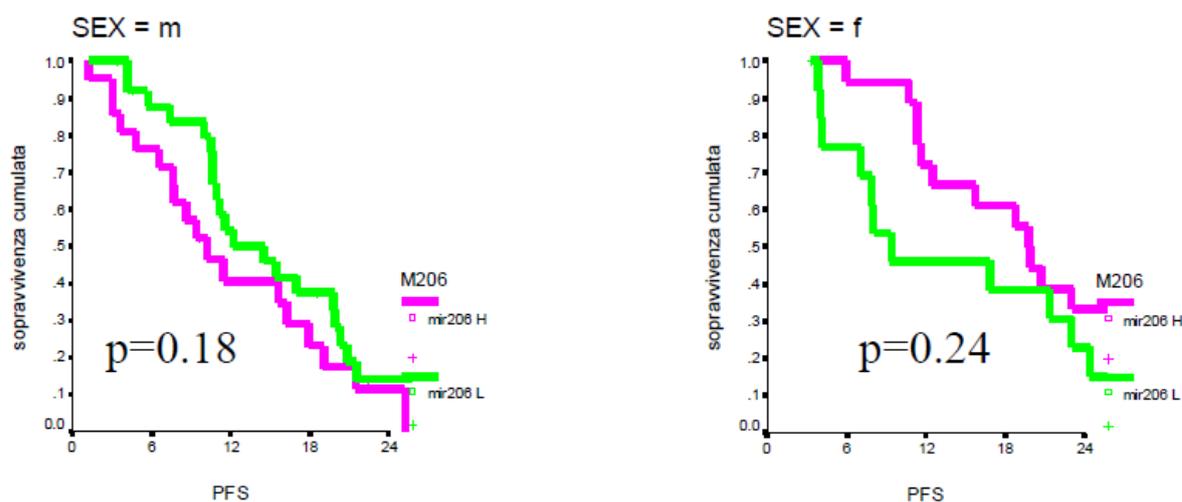
**Figura 28:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS relative a pazienti con H miR-206 stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

La differenza delle mediane di OS e di PFS fra maschi e femmine con H miR-206 risulta statisticamente significativa ( $p=0.003$  e  $p=0.006$ ) ed è pari rispettivamente a 36 mesi e 10 mesi (tab.12 e 13; fig.28): le donne con H miR-206 hanno una migliore OS e PFS rispetto ai maschi.

L'analisi di associazione mette in evidenza, anche se non raggiunge la significatività statistica, che le donne con H miR-206 hanno un vantaggio rispetto alle donne con L miR-206 sia in OS (differenza di 25 mesi) che in PFS (differenza di 11 mesi); mentre gli uomini con H miR-206 hanno invece una minore OS (differenza di 12 mesi) e una minore PFS (differenza di 4 mesi) in termini di mediana rispetto a quelli che esprimono L miR-206 (fig.29 e 30, tab.12 e 13). Dunque, H miR-206 si associa con OS e PFS in maniera opposta nei due sessi; infatti nelle figure 29 e 30 si può osservare, anche se non si raggiunge la significatività statistica, come le curve di sopravvivenza dei maschi e delle femmine abbiano andamenti opposti per H miR-206.



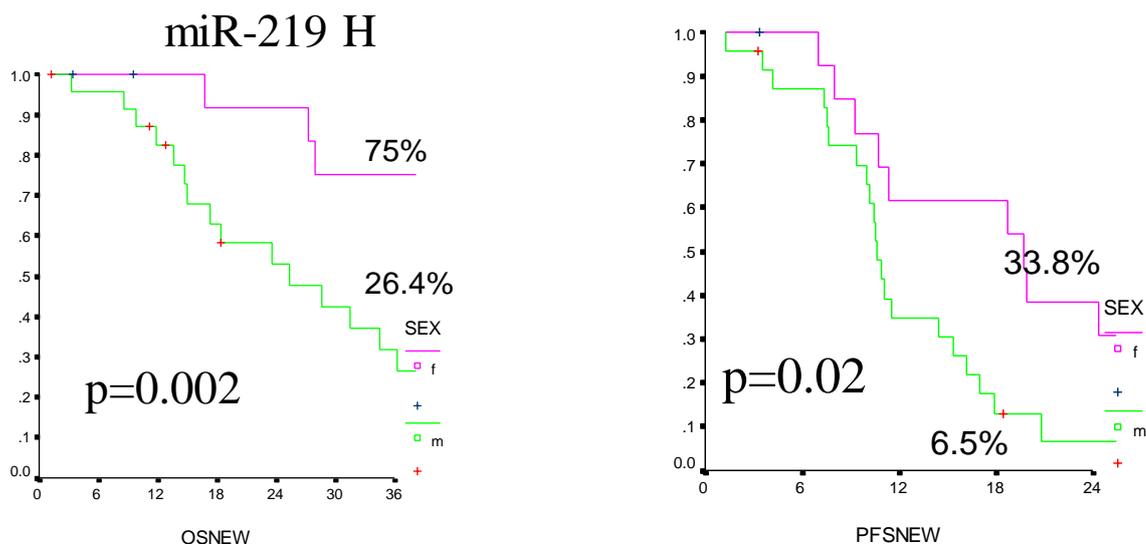
**Figura 29:** Curve Kaplan-Meier di OS a 3 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base ai livelli di espressione del miR-206.



**Figura 30:** Curve Kaplan-Meier di PFS a 2 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base ai livelli di espressione del miR-206.

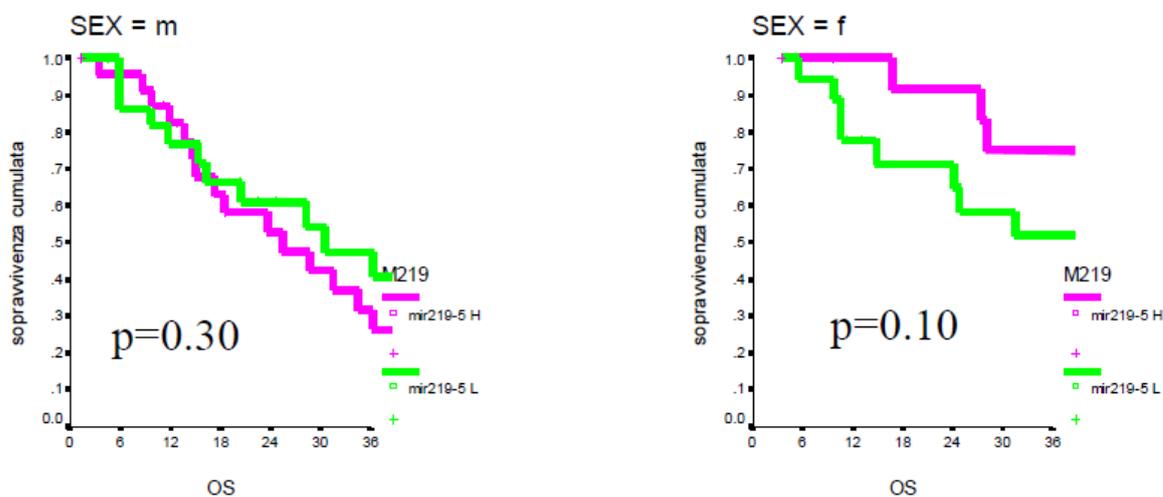
### **miR-219**

L'associazione fra H e L livelli del miR-219 con le sopravvivenze (tab.12 e 13) mostra che le donne con H miR-219 hanno una maggiore mediana di OS e di PFS (OS: 58 mesi; PFS: 20 mesi) sia rispetto alle donne con L miR-219 (OS: 50 mesi; PFS: 16 mesi), sia rispetto ai maschi con L miR-219 (OS: 31 mesi; PFS: 19 mesi). Le differenze fra le mediane di OS e di PFS registrate fra maschi e femmine con H miR-219 raggiungono i 33 mesi per l'OS e i 9 mesi per la PFS, e risultano statisticamente significative ( $p=0.002$  e  $p=0.02$ , rispettivamente) (fig.31).

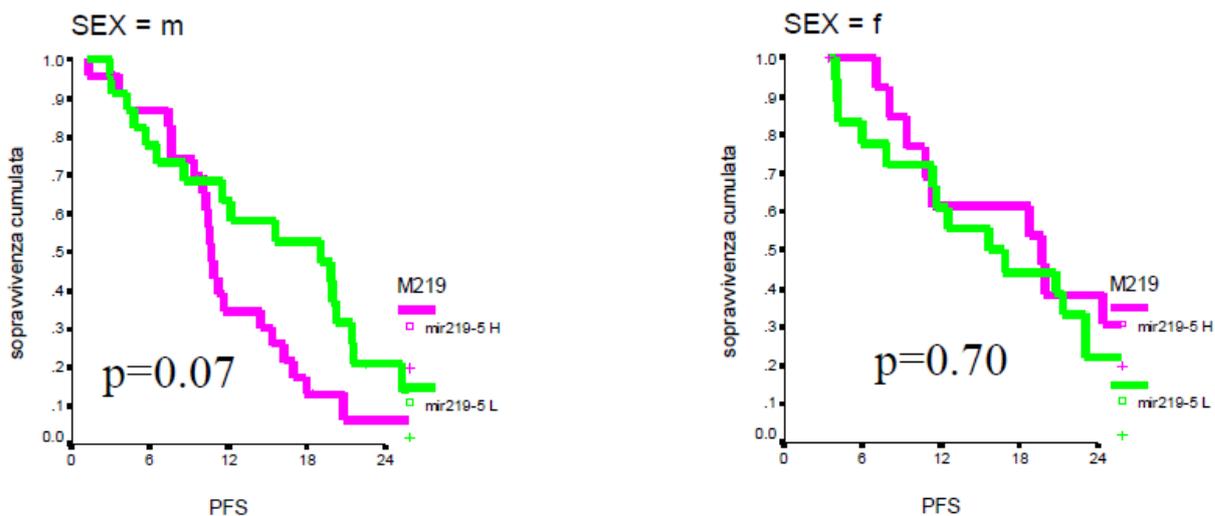


**Figura 31:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS relative a pazienti con H miR-219 stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

Anche in questo caso, come per il miR-206, le analisi di associazione dell'espressione del miR-219 con le sopravvivenze evidenziano un andamento opposto per la popolazione maschile e femminile, visibile nelle curve Kaplan-Meier sotto riportate (fig.32 e 33): i maschi che registrano maggiore OS e PFS sono quelli con L miR-219 (31 mesi e 19 mesi, rispettivamente), mentre le donne con una migliore OS e PFS sono quelle con H miR-219 (58 mesi e 20 mesi, rispettivamente) (tab.12 e 13).



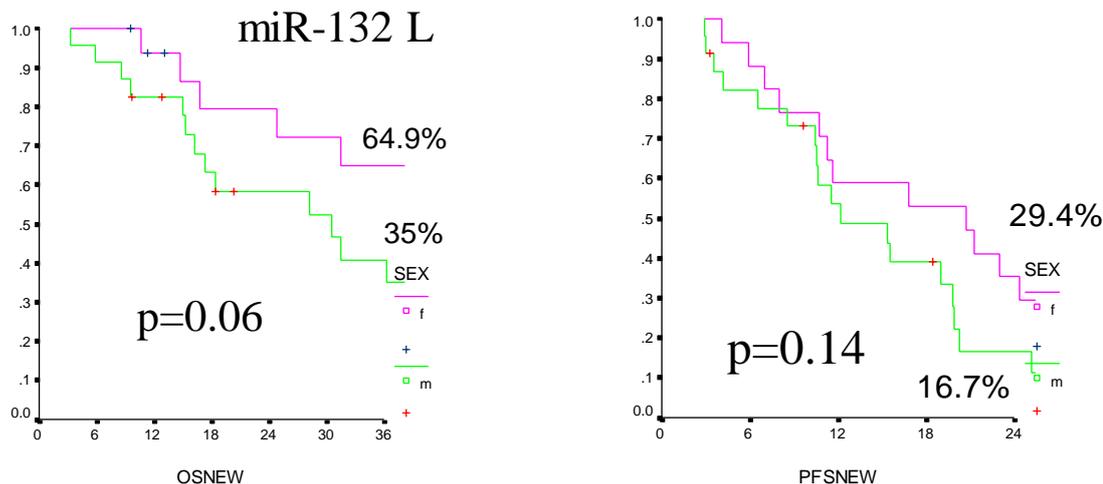
**Figura 32:** Curve Kaplan-Meier di OS a 3 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base ai livelli di espressione del miR-219.



**Figura 33:** Curve Kaplan-Meier di PFS a 2 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base ai livelli di espressione del miR-219.

### miR-132

Osservando i dati relativi al miR-132, le donne con bassi livelli di espressione mostrano delle mediane di OS e PFS maggiori rispetto ai maschi con L miR-132 (differenza di 26 mesi per OS e 9 mesi per PFS), con una significatività borderline per l'OS ( $p=0.06$ ) (fig.34 e tab.12 e 13).



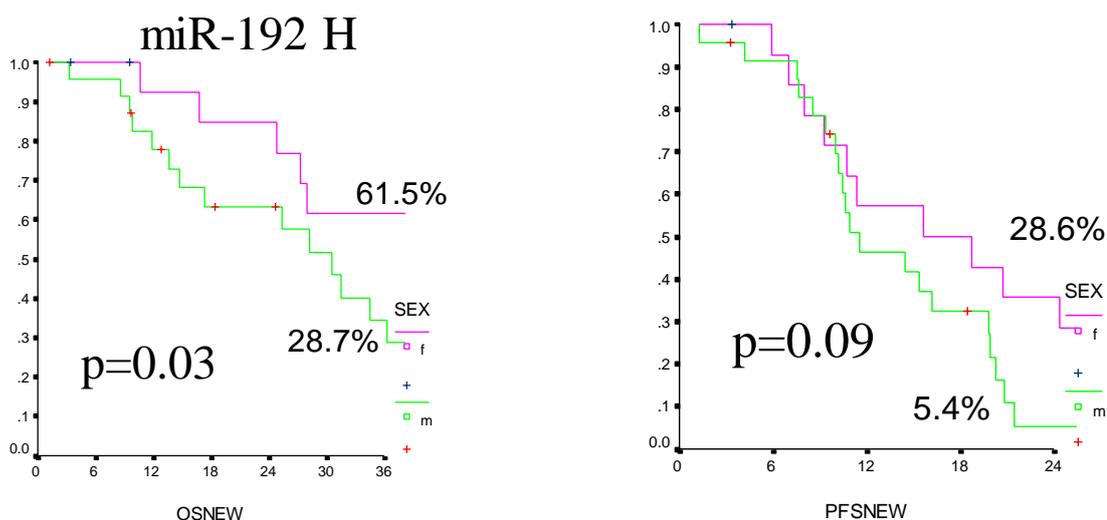
**Figura 34:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS relative a pazienti con L miR-132 stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

I bassi livelli di espressione del miR-132 rappresentano un fattore prognostico positivo rispetto agli alti livelli sia nei maschi (con una differenza di 6 mesi per l'OS

e 1 solo mese per la PFS) che nelle donne (con una differenza di 13 mesi per l'OS e 5 mesi per la PFS), anche se non vi è significatività statistica (tab.12 e 13).

### **miR-192**

I maschi con H miR-192 hanno una sopravvivenza migliore rispetto ai maschi con L miR-192 (OS mediana=31 vs 24 mesi), anche se il risultato non è staticamente significativo; mentre nessuna differenza viene evidenziata fra le donne con H e L livelli del miR-192 (OS mediana=51 vs 50 mesi) (tab.12). La sopravvivenza delle donne con H miR-192 risulta, però, significativamente più alta ( $p=0.03$ ) quando paragonata alla sopravvivenza dei maschi con gli stessi livelli di miR-192 (OS mediana=51 vs 31 mesi) (fig.35 e tab.12). La PFS risulta maggiore di 4 mesi per le donne con H miR-192 rispetto ai maschi con H miR-192, anche se il dato mostra solo un trend di significatività (0.09) (fig.35 e tab.13).

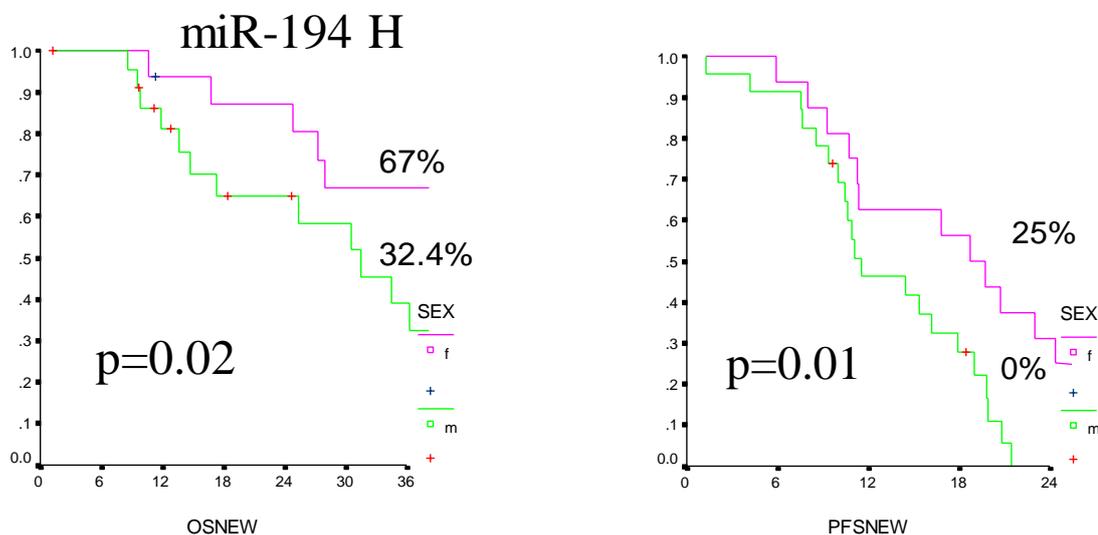


**Figura 35:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS relative a pazienti con H di miR-192 stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

### **miR-194**

Sia nel sottogruppo delle donne che nel sottogruppo degli uomini, H miR-194 si associa a una migliore OS e PFS rispetto a L miR-194 (OS mediana F:56 vs 50 mesi, M:32 vs 24 mesi) (tab.12 e 13), anche se il dato non raggiunge una significatività statistica. Le donne con H miR-194, però, mostrano una OS e una PFS significativamente maggiori in confronto ai maschi con H miR-194: si evidenzia una

differenza di 24 mesi per l'OS ( $p=0.02$ ) e di 7 mesi per la PFS ( $p=0.01$ ) per quanto riguarda i valori delle mediane (fig.36, tab.12 e 13).

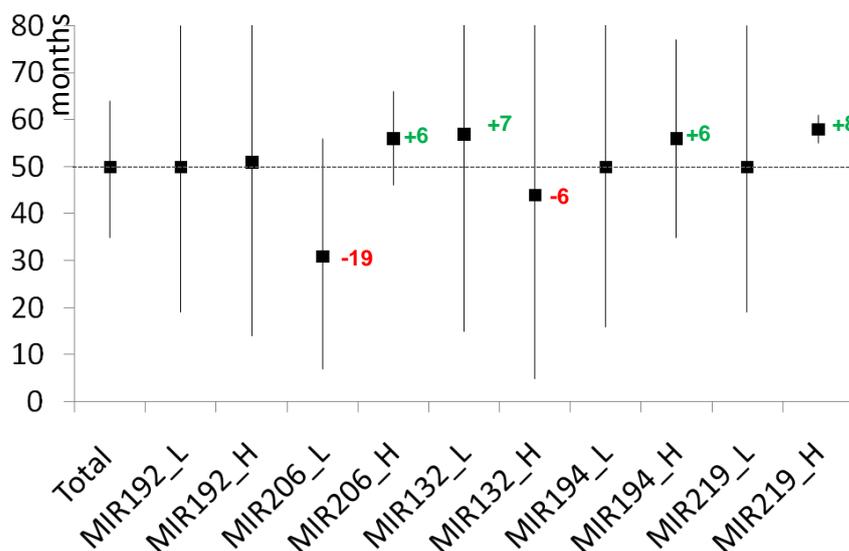


**Figura 36:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS relative a pazienti con alti livelli di miR-194 stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

### 3.4 Box-plot miRNA

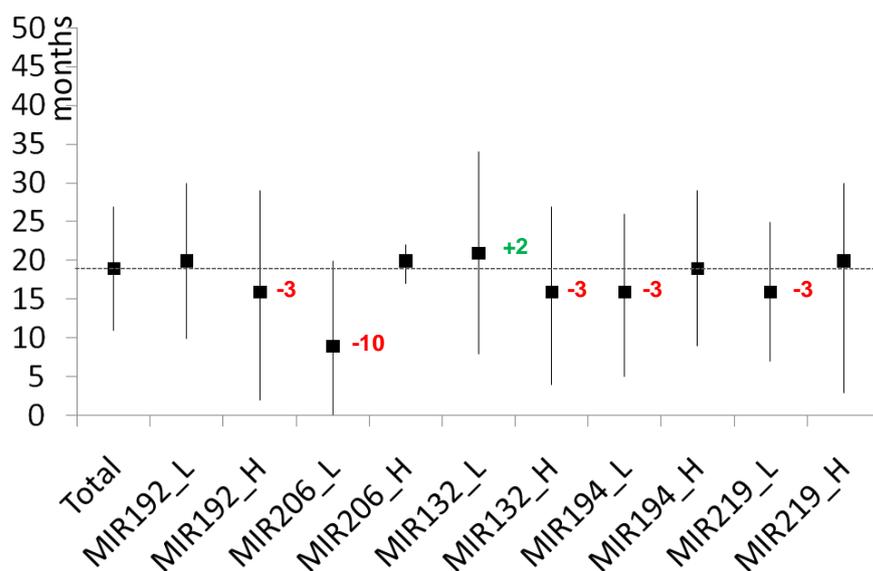
Al fine di evidenziare se le differenze di sopravvivenza, fin'ora osservate, fra maschi e femmine siano causate solo dal fattore gender (cioè dal fatto che le donne in generale hanno una maggiore OS rispetto ai maschi), oppure siano dovute anche alle variabili molecolari analizzate, è stato effettuato un altro tipo di rappresentazione grafica dei dati. Nel gruppo formato solo dalle donne è stato evidenziato, mediante box-plot, il confronto fra le sopravvivenze mediane ottenute per ogni livello di miRNA analizzato (H e L) e la sopravvivenza mediana delle donne in totale, sia per quanto riguarda l'OS che la PFS (fig.37 e 38).

## OS – miRNA nelle donne



**Figura 37:** il grafico rappresenta le mediane di OS delle donne del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 5 microRNA divisi per livelli di espressione, mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta l'OS mediana delle donne del campione (50 mesi), i box-plot rappresentano l'OS mediana delle donne per ciascun miRNA, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i miRNA che provocano un maggiore scostamento dell'OS dalla mediana di sopravvivenza generale è riportata sul grafico la differenza di OS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento della sopravvivenza.

## PFS – miRNA nelle donne



**Figura 38:** il grafico rappresenta le mediane di PFS delle donne del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 5 microRNA divisi per livelli di espressione, mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza libera da progressione. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la PFS mediana delle donne del campione (19 mesi), i box-plot rappresentano la PFS mediana delle donne per ciascun miRNA, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i miRNA che provocano un maggiore scostamento della PFS dalla PFS mediana generale è riportata sul grafico la differenza di PFS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

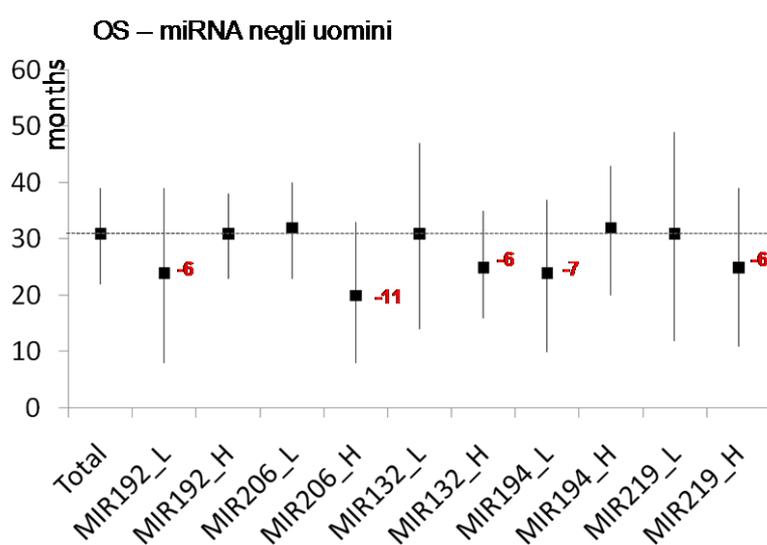
Guardando i box-plot per l'OS è evidente che H miR-206, H miR-219, H miR-194 e L miR-132 migliorino la sopravvivenza delle donne rispetto all'OS mediana misurata per tutte le donne del campione (50 mesi); in particolare il vantaggio è rispettivamente di 6 mesi per H miR-206 e H miR-194, 8 mesi per H miR-219 e 7 mesi per L miR-132 (fig.37; tab.12). Inoltre, è evidente che L miR-206 e H miR-132 hanno invece un potenziale effetto negativo nelle donne perché le donne con L miR-206 e le donne H miR-132 mostrano una sopravvivenza rispettivamente di 19 e 6 mesi in meno rispetto all'OS mediana delle donne (fig.37). Infatti, per il miR-206 e il miR-132 si registrano le più alte differenze di OS in termini di mediana fra alti e bassi livelli: in particolare una differenza di 25 mesi per il miR-206 e di 13 mesi per il miR-132. Al contrario, le OS mediane delle donne con alti e bassi livelli del miR-192 non mostrano differenze sostanziali (differenza di 1 mese fra H e L miR-192) né si discostano dall'OS mediana delle donne (fig.35 e tab.12).

Guardando il grafico relativo alla PFS si notano soprattutto marcatori negativi, che evidenziano un peggioramento della PFS. In particolare L miR-206, L miR-219, L miR-194, H miR-132 e H miR-192 correlano con una PFS minore rispetto alla mediana generale delle donne; in tutti i casi la PFS diminuisce di 3 mesi, eccetto per il L miR-206 che vede una diminuzione di 10 mesi (fig.38). Per le PFS il miR-206 evidenzia la maggiore differenza di OS mediana (11 mesi) fra alti e bassi livelli (fig.38, tab.13).

Il log-rank test fra la PFS di maschi e femmine con L miR-206, L miR-219, L miR-194, H miR-132 e H miR-192 (tab.13), però, non ha evidenziato con la significatività statistica queste diminuzioni di PFS per le donne. In effetti il log-rank test sembrerebbe più consono a sottolineare un miglioramento di PFS per le donne, che non un peggioramento (tab.13): ciò potrebbe essere dovuto al fatto che in presenza di fattori negativi per la prognosi delle donne, come nel caso di L miR-206, L miR-219, L miR-194, H miR-132 e H miR-192, le sopravvivenze mediane delle donne diminuiscono fino ad uguagliarsi con quelle degli uomini, annullando in tal modo la differenza significativa di PFS tra M e F già presente in partenza nella popolazione di studio ( $p=0.03$ ) (fig.27). Questo effetto risulta ancora più evidente per L miR-206 e L miR-219, perché in questi casi le tendenze delle Kaplan-Meier di M e F risultano invertite (fig.30 e 33): mentre per le donne con L miR-206 e L miR-219 si ha un peggioramento di PFS, nei maschi con L miR-206 e L miR-219, al contrario, si assiste a un miglioramento (fig.30 e 33, tab.13); quindi in questi due casi le Kaplan-Meier si avvicinano maggiormente azzerando la significatività statistica.

Questo discorso è importante perché indica che anche i risultati che non raggiungono la significatività statistica vanno presi in considerazione e valutati.

La stessa rappresentazione grafica dei dati è stata effettuata anche per il gruppo degli uomini. Analizzando il grafico dei box-plot per l'OS dei maschi la prima cosa evidente è che non si registra per nessun microRNA analizzato un miglioramento della sopravvivenza maschile; gli scostamenti di OS che si notano indicano soltanto un peggioramento della sopravvivenza maschile rispetto alla mediana generale di 31 mesi (fig.39).

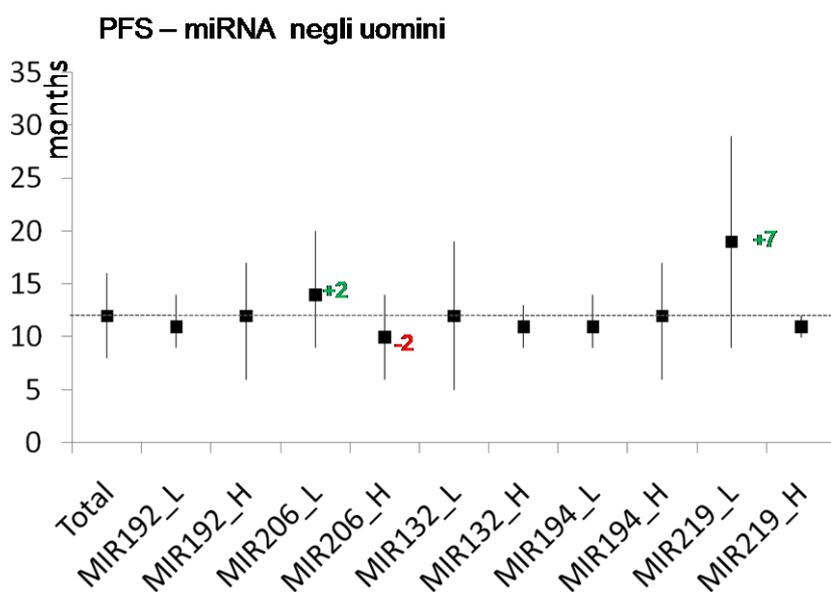


**Figura 39:** il grafico rappresenta le mediane di OS dei maschi del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 5 microRNA divisi per livelli di espressione, mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta l'OS mediana dei maschi del campione (31 mesi), i box-plot rappresentano l'OS mediana dei maschi per ciascun miRNA, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (CI95%). Per i miRNA che provocano un maggiore scostamento dell'OS dalla mediana di sopravvivenza generale è riportata sul grafico la differenza di OS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

Si può notare che H miR-206 e H miR-219, che nelle donne sono considerati fattori positivi, nei maschi si associano con una sopravvivenza mediana rispettivamente di 11 e 6 mesi in meno rispetto all'OS mediana di tutti i maschi del campione (fig.29 e 32, tab.12). Ciò spiega la profonda significatività statistica ( $p=0.003$  per H miR-206 e  $p=0.002$  per HmiR-219) che emerge dal confronto delle OS di M vs F con H miR-206 e H miR-219 (fig.28 e 31): infatti in questi due casi le curve di sopravvivenza maschile e femminile si allontanano ulteriormente, rimarcando la significatività di partenza fra OS di M e F (fig.27). Inoltre, come per le donne, anche nei maschi gli H miR-132 sono associati a un sottogruppo di maschi con un OS minore di 6 mesi rispetto all'OS mediana, ma i maschi con L miR-132, contrariamente a quanto

accade nelle donne, non sono associati a nessuna variazione di sopravvivenza. Infine, L miR-192 e L miR-194 si associano nei maschi con una diminuzione di sopravvivenza pari a 6 e 7 mesi, rispettivamente. Come nelle femmine, anche nei maschi la maggiore differenza di OS mediana fra alti e bassi livelli si misura per il miR-206, ed è pari a 12 mesi (fig.39, tab.12).

Per quanto riguarda l'analisi dei box-plot delle PFS della coorte maschile (fig.40) si nota che i miRNA analizzati non sono associati a un forte scostamento dalla PFS mediana del campione, eccetto il miR-206 e L miR-219.



**Figura 40:** il grafico rappresenta le mediane di PFS dei maschi del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 5 microRNA divisi per livelli di espressione, mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza libera da progressione. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la PFS mediana dei maschi del campione (12 mesi), i box-plot rappresentano la PFS mediana dei maschi per ciascun miRNA, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i miRNA che provocano un maggiore scostamento della PFS dalla PFS mediana generale è riportata sul grafico la differenza di PFS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

I bassi livelli di miR-206 e miR-219, come già evidenziato dalle curve Kaplan-Meier (fig.30 e 33), diversamente da quanto evidenziato nelle donne, risultano essere un fattore potenzialmente positivo per i maschi rispetto agli alti livelli, con un valore borderline per il miR-219 ( $p=0.07$ ). Potrebbe essere questo il motivo per cui la differenza fra M e F con L miR-206 e L miR-219 non è statisticamente significativa (tab.13): la diminuzione della PFS mediana femminile e l'aumento di quella maschile azzerano la differenza statistica presente nel campione di partenza (fig.27). In particolare, la mediana di PFS nei maschi fra H e L miR-206 differisce di 4 mesi: 2 mesi in più per L miR-206, e 2 mesi in meno per H miR-206, rispetto alla mediana generale dei maschi (12 mesi) (fig.40, tab.13). La mediana di PFS fra H e L

miR-219 differisce di 8 mesi: 7 mesi in più per L miR-219, e 1 mese in meno per H miR-219, rispetto alla mediana generale dei maschi (12 mesi) (fig.40, tab.13).

I risultati fin qui esposti per gli uomini e le donne possono essere così sintetizzati:

- **miR-206 e miR-219.** Per quanto riguarda l'OS, H miR-206 e H miR-219 risultano potenziali fattori prognostici di sopravvivenza positivi per le donne e negativi per i maschi; infatti nelle donne si associano con un aumento dell'OS rispettivamente di 6 e 8 mesi rispetto all'OS mediana generale delle donne, negli uomini si associano con una diminuzione dell'OS rispettivamente di 11 e 6 mesi (tab.12). Di conseguenza la forbice fra le curve di sopravvivenza dei due sessi, già presente in partenza nel campione ( $p=0.03$ ), in questi due casi diventa sempre più ampia e raggiunge un'importante significatività statistica ( $p=0.003$  e  $0.002$ , rispettivamente). Inoltre, L miR-206 sembrerebbe un fattore prognostico negativo per le donne in quanto è stato riscontrato in un sottogruppo di donne con un OS di 19 mesi in meno rispetto alla mediana di sopravvivenza delle donne. La differenza di OS fra le donne con alti e bassi livelli di miR-206 è di 25 mesi (OS mediana=56 e 31 mesi rispettivamente; tab.12).

Per quanto riguarda la PFS, invece, L miR-206 e L miR-219 potrebbero essere considerati potenziali fattori prognostici negativi per le donne, perché associati a una PFS più breve, rispettivamente di 10 e 3 mesi rispetto alla PFS mediana delle donne, e potenziali fattori prognostici positivi per gli uomini, in quanto associati a una PFS maggiore rispettivamente di 2 e 7 mesi rispetto alla PFS mediana dei maschi del campione.

- **miR-132.** Nelle donne, sia per l'OS che per la PFS, L miR-132 risulterebbe un fattore prognostico positivo (OS aumenta di 7 mesi; PFS aumenta di 2 mesi), mentre H miR-132 sembrerebbe essere un fattore prognostico negativo (OS diminuisce di 6 mesi; PFS diminuisce di 3 mesi). Nei maschi si evidenzia una situazione analoga per l'OS: gli uomini con H miR-132 mostrano un OS minore di 6 mesi rispetto all'OS generale dei maschi.
- **miR-192.** Per l'OS non si registrano scostamenti della sopravvivenza fra le femmine, mentre nella coorte maschile si nota che i maschi con L miR-192 si associano a un OS minore di 6 mesi rispetto all'OS mediana di tutti i maschi del campione. Infine, H miR-192 si associa a una diminuzione della PFS delle femmine.
- **miR-194.** Per quanto riguarda l'OS, le donne con H miR-194 evidenziano un aumento di 6 mesi rispetto all'OS mediana generale; mentre gli uomini con L

miR-194 mostrano una diminuzione di 7 mesi rispetto all'OS mediana degli uomini. Inoltre, il sottogruppo di donne con L miR-194 è associato anche a una minore PFS (3 mesi in meno rispetto alla mediana delle donne).

### 3.5 Associazioni gender-related di SNP e OS/PFS

Le analisi dei polimorfismi sono state condotte sul DNA genomico estratto da campioni di tessuto sano: 77 pz (46 maschi e 31 femmine) su 83 sono stati genotipizzati mentre 6 campioni sono risultati degradati e non valutabili. Nella popolazione italiana (TSI) le frequenze alleliche registrate per i polimorfismi scelti sono elencate nella tabella 14:

SNP	Frekuensi allele	Frekuensi allele
	maggiore (p)	minore (q)
rs11133373	C=0.74	G=0.26
rs1801260	T=0.71	C=0.29
rs11133391	T=0.68	C=0.32

**Tabella 14:** frequenze alleliche nella popolazione italiana (<http://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html>).

Le frequenze dei genotipi del campione sono risultate in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ), e non sono state riscontrate differenze significative con le frequenze genotipiche della popolazione italiana (TSI) come mostrato nella tabella 15.

SNP	p	q	Freq genotipiche nel campione			p-value H-W*	p-value TSI**
			pp (%)	pq (%)	qq (%)		
<b>rs11133373</b> C>G	C	G	35 (45.5)	37 (48)	5 (6.5)	0.2431	0.62
<b>rs1801260</b> T>C	T	C	36 (47)	34 (44)	7 (9)	0.7985	0.89
<b>rs11133391</b> T>C	T	C	30 (39)	42 (54.5)	5 (6.5)	0.0541	0.4

**Tabella 15:** frequenze genotipiche riscontrate nel campione. p e q indicano rispettivamente l'allele maggiore e minore per ogni SNP.

\* p-value del Fisher's exact test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

\*\*p-value del  $\chi^2$ -test per il confronto con le frequenze genotipiche della popolazione italiana TSI (<http://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html>).

I risultati dell'analisi di associazione dei polimorfismi rs11133373 C>G, rs1801260 T>C e rs11133391 T>C con le sopravvivenze dell'intera popolazione non hanno dato nessun risultato significativo (dati non riportati). La stratificazione del campione per

Sesso ha evidenziato sia differenze di OS fra maschi e femmine, statisticamente significative per rs11133373 C>G e borderline per rs1801260 T>C e rs11133391 T>C, sia differenze di PFS fra i due sessi statisticamente significative per tutti i polimorfismi analizzati (tab.16 e 17).

		Maschi		Femmine		Log-Rank test p-value
		OS mediana	CI 95%	OS mediana	CI 95%	
	<b>Campione totale</b>	31	(22-39)	50	(35-64)	<b>0.03</b>
rs11133373	CC	18	(14-23)	57	(31-84)	<b>0.01</b>
	CG + GG	32	(23-40)	44	(16-73)	0.35
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	0.24		0.35		
rs1801260	TT	35	(27-42)	57	(46-68)	<b>0.07</b>
	TC + CC	17	(5-29)	50	(21-78)	<b>0.06</b>
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	0.10		0.54		
rs11133391	TT	25	(14-37)	87	(28-147)	<b>0.06</b>
	TC + CC	29	(19-38)	44	(14-75)	0.31
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	0.88		0.08		

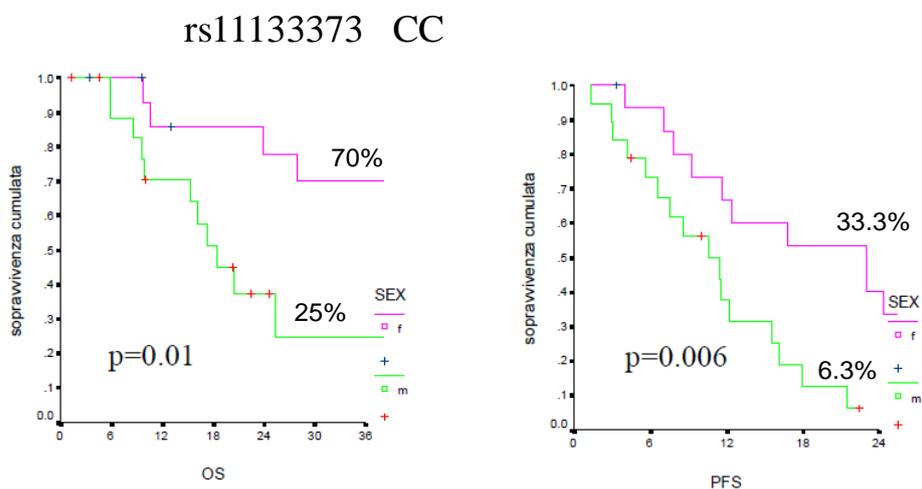
**Tabella 16:** la tabella mostra le mediane dell'OS riportate per i genotipi di ciascun polimorfismo e stratificando la popolazione in base al sesso. Nella prima riga gialla vi sono i dati relativi all'OS del campione diviso solo per sesso. I genotipi sono suddivisi secondo un modello dominante in *pp vs pq+qq*, e per ogni genotipo è riportata la mediana di sopravvivenza a 3 anni e l'intervallo di confidenza al 95% dei pazienti con quel determinato profilo genetico. Il confronto fra le OS (log-rank test) è stato effettuato in due diversi modi: nelle righe bianche in basso rispetto alle righe azzurre degli SNP è riportato il p-value del confronto fra i diversi genotipi all'interno della popolazione maschile (M) e femminile (F); nelle celle bianche a destra è riportato, invece, il p-value del log-rank test effettuato fra M e F per ogni profilo genetico. I valori statisticamente significativi o borderline sono segnati in rosso.

		Maschi		Femmine		Log-Rank test p-value
		PFS mediana	CI 95%	PFS mediana	CI 95%	
	<b>Campione totale</b>	12	8-16	19	11-27	<b>0.03</b>
rs11133373	CC	11	6-17	23	10-36	<b>0.006</b>
	CG + GG	14	9-20	16	6-25	0.41
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	0.19		0.45		
rs1801260	TT	14	8-21	17	8-25	0.17
	TC + CC	11	7-14	20	7-33	<b>0.03</b>
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	<b>0.07</b>		0.32		
rs11133391	TT	10	7-13	23	9-37	<b>0.04</b>
	TC + CC	12	7-16	16	9-23	0.29
	<b>Log-Rank test - p-value</b>	0.72		0.39		

**Tabella 17:** la tabella mostra le mediane della PFS riportate per i genotipi di ciascun polimorfismo e stratificando la popolazione in base al sesso. Nella prima riga arancio vi sono i dati relativi alla PFS del campione diviso solo per sesso. I genotipi sono suddivisi secondo un modello dominante in *pp vs pq+qq*, e per ogni genotipo è riportata la mediana di PFS a 2 anni e l'intervallo di confidenza al 95% dei pazienti con quel determinato profilo genetico. Il confronto fra le PFS (log-rank test) è stato effettuato in due diversi modi: nelle righe bianche in basso rispetto alle righe verdi degli SNP è riportato il p-value del confronto fra i diversi genotipi all'interno della popolazione maschile (M) e femminile (F); nelle celle bianche a destra è riportato, invece, il p-value del log-rank test effettuato fra M e F per ogni profilo genetico. I valori statisticamente significativi e borderline sono segnati in rosso.

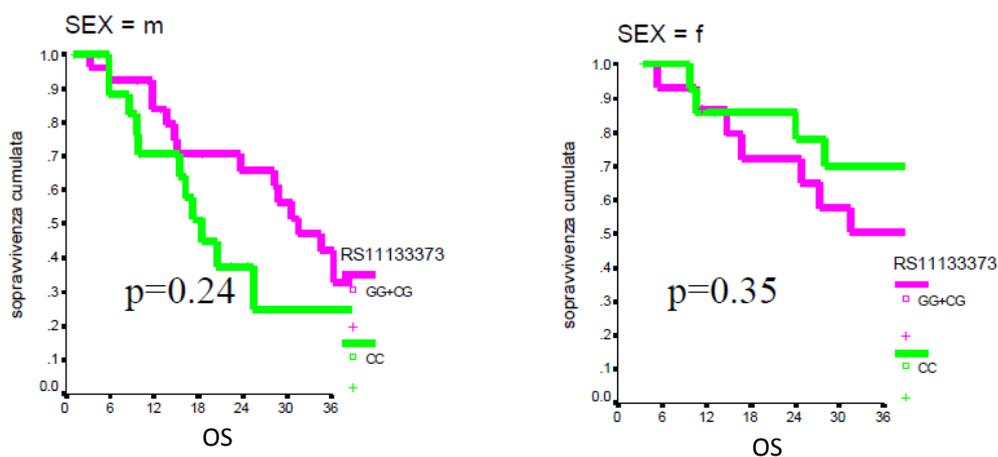
**rs11133373**

Il genotipo rs11133373 CC nel sottogruppo delle donne è associato con maggiore OS e PFS rispetto agli uomini con genotipo rs11133373 CC in modo statisticamente significativo, con una differenza di 39 mesi per l'OS ( $p=0.01$ ) e di 13 mesi per la PFS ( $p=0.006$ ) (fig.41; tab.16 e 17).

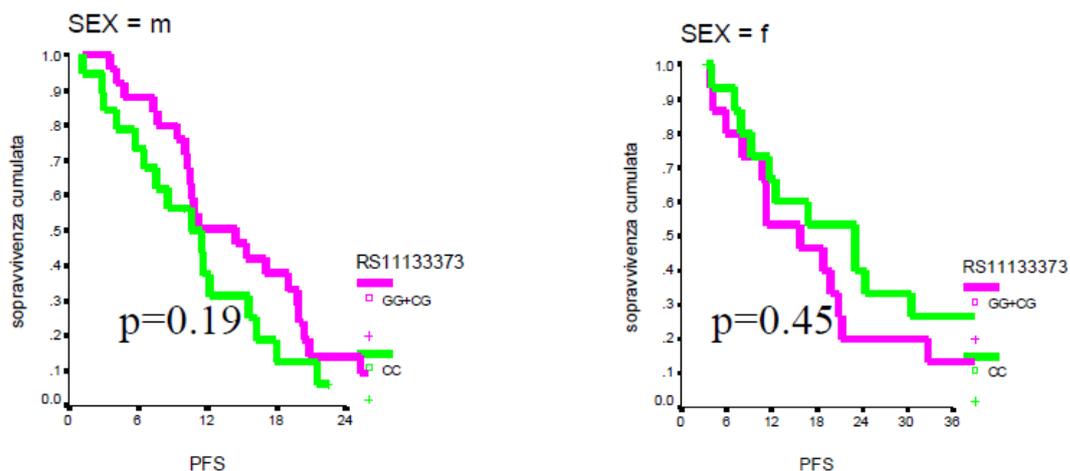


**Figura 41:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS per lo SNP rs11133373 relative a pazienti con genotipo CC stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

In particolare, le donne con genotipo rs11133373 CC riportano una maggiore OS e PFS anche rispetto alle donne con i genotipi CG+GG (OS: 57 vs 44 mesi; PFS: 23 vs 16 mesi) (tab.16 e 17). Nei maschi, al contrario di quanto si è evidenziato nelle femmine, il genotipo rs11133373 CC risulta sfavorevole ed è associato ad una mediana di 18 mesi per l'OS (con una differenza di 14 mesi rispetto ai maschi CG+GG) e ad una mediana di 11 mesi per la PFS (tab.16 e 17). L'associazione opposta del genotipo rs11133373 CC nei due sessi è evidente nelle figure 42 e 43: anche se non si raggiunge la significatività statistica le figure mostrano come le curve di sopravvivenza nei maschi e nelle femmine si invertano.



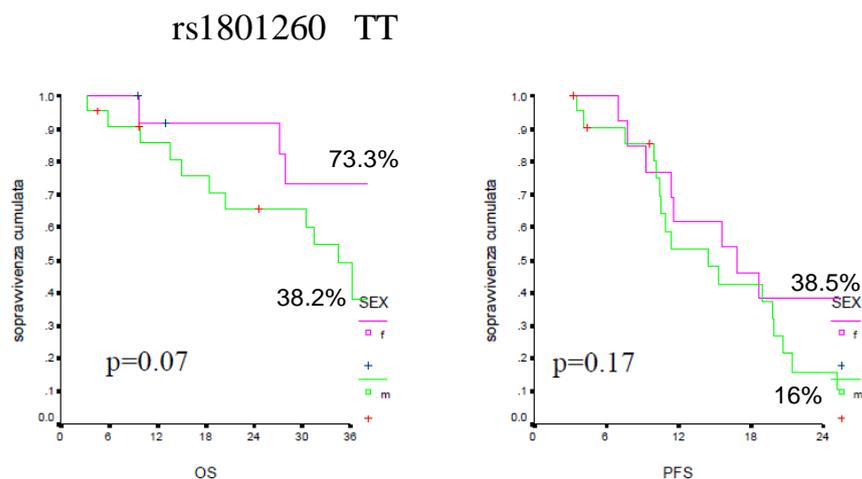
**Figura 42:** Curve Kaplan-Meier di OS a 3 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base al genotipo per lo SNP rs11133373.



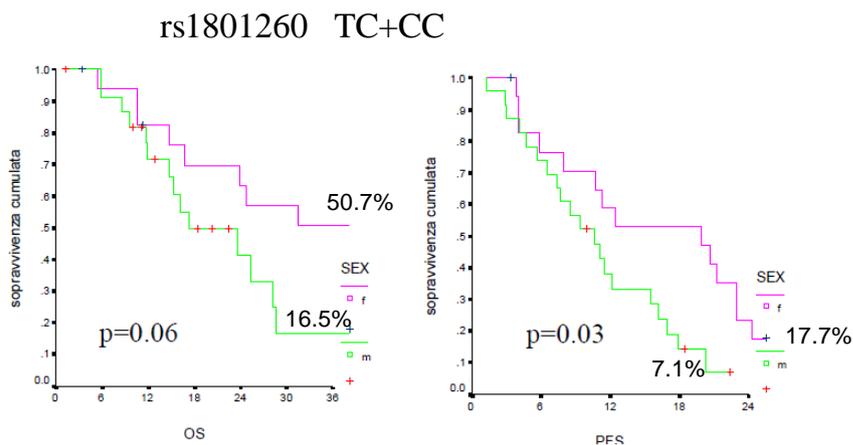
**Figura 43:** Curve Kaplan-Meier di PFS a 2 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base al genotipo per lo SNP rs11133373.

### **rs1801260**

Le analisi di associazioni tra lo SNP rs1801260 e l'OS e la PFS mostrano con una significatività borderline che le donne hanno una migliore OS rispetto ai maschi in entrambi i gruppi di genotipi (TT: 57 vs 35 mesi,  $p=0.07$ ; TC+CC: 50 vs 17,  $p=0.06$ ) (tab.16, fig.44 e 45) e una migliore PFS rispetto ai maschi statisticamente significativa solo per il genotipo TC+CC (20 vs 11 mesi,  $p\text{-value}=0.03$ ) (tab.17, fig.45).



**Figura 44:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS per lo SNP rs1801260 relative a pazienti con genotipo TT stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

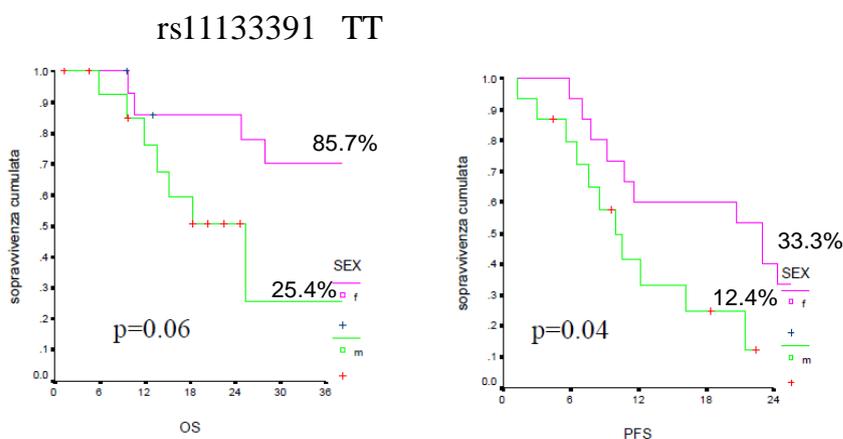


**Figura 45:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS per lo SNP rs1801260 relative a pazienti con genotipo TC+CC stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

Analizzando i due rispettivi sottogruppi di maschi e femmine, il genotipo rs1801260 TT mostra un vantaggio in OS in entrambi i sottogruppi (tab.16) anche se questo dato non raggiunge la significatività statistica né nelle donne (differenza di 7 mesi) né negli uomini (differenza di 18 mesi). Il genotipo rs1801260 TT si associa a una maggiore PFS rispetto al genotipo rs1801260 TC+CC solo nel sottogruppo maschile (tab.17), con un trend di significatività ( $p=0.07$ ).

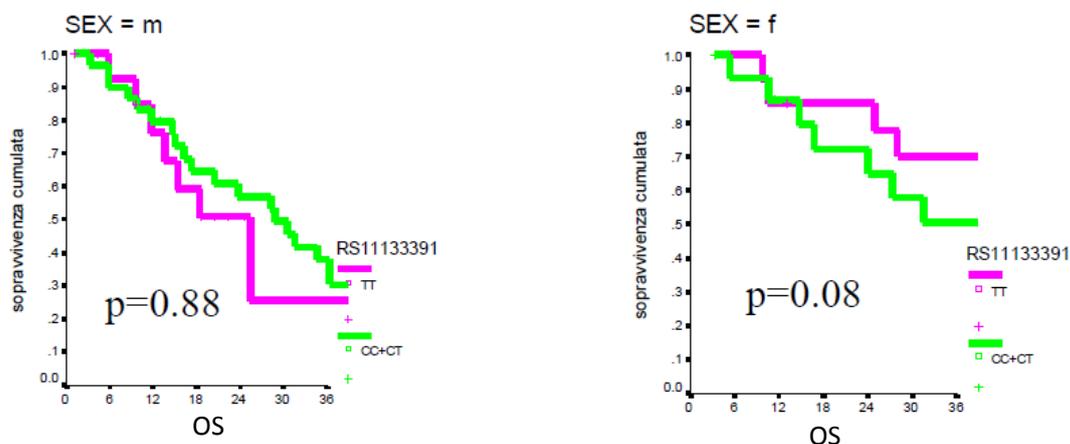
### **rs11133391**

Le donne con genotipo rs11133391 TT, rispetto ai maschi, mostrano una maggiore sopravvivenza (differenza di 62 mesi; tab.16), con una significatività borderline ( $p=0.06$ ), e una migliore PFS (differenza di 13 mesi; tab.17), statisticamente significativa ( $p=0.04$ ) (fig.46).

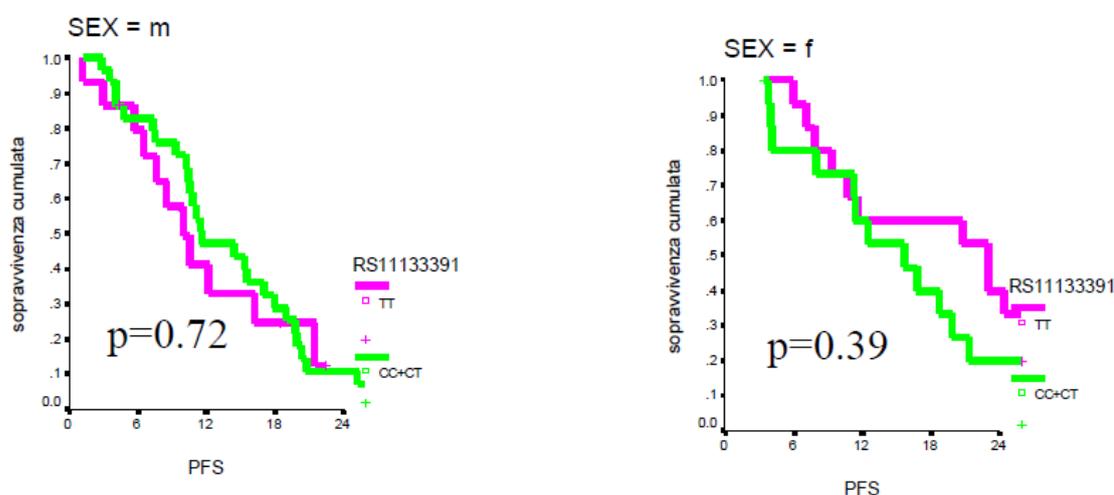


**Figura 46:** Curve Kaplan-Meier di OS e PFS per lo SNP rs11133391 relative a pazienti con genotipo TT stratificati in base al sesso. Le percentuali riportano rispettivamente l'OS a 3 anni e la PFS a 2 anni per maschi (m) e femmine (f).

In particolare, le curve Kaplan-Meier delle figure 47 e 48 evidenziano, seppur senza significatività statistica, che il genotipo rs11133391 TT, rispetto ai genotipi TC+CC, risulterebbe un potenziale fattore prognostico positivo per le donne ma negativo per gli uomini, sia per l'OS (fig.47, tab.16) che per la PFS (fig.48, tab.17).



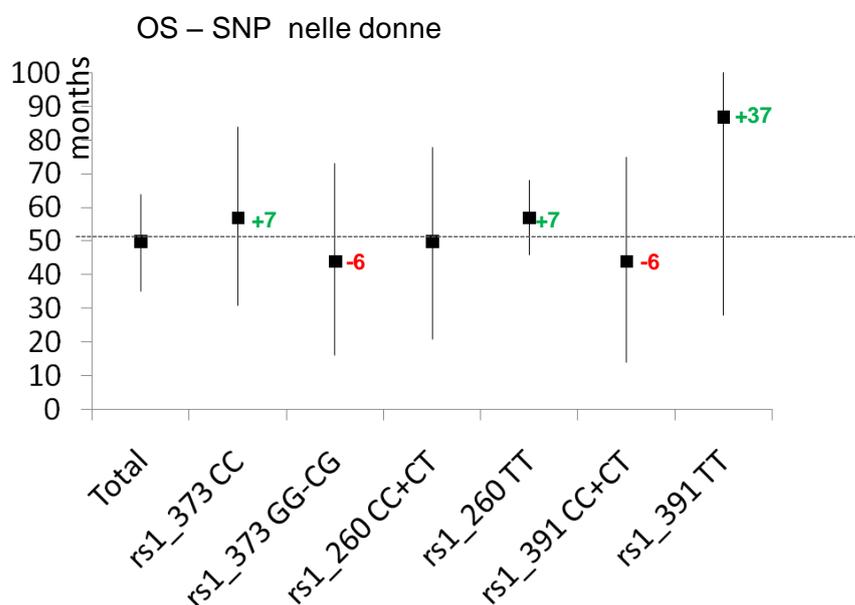
**Figura 47:** Curve Kaplan-Meier di OS a 3 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base al genotipo per lo SNP rs11133391.



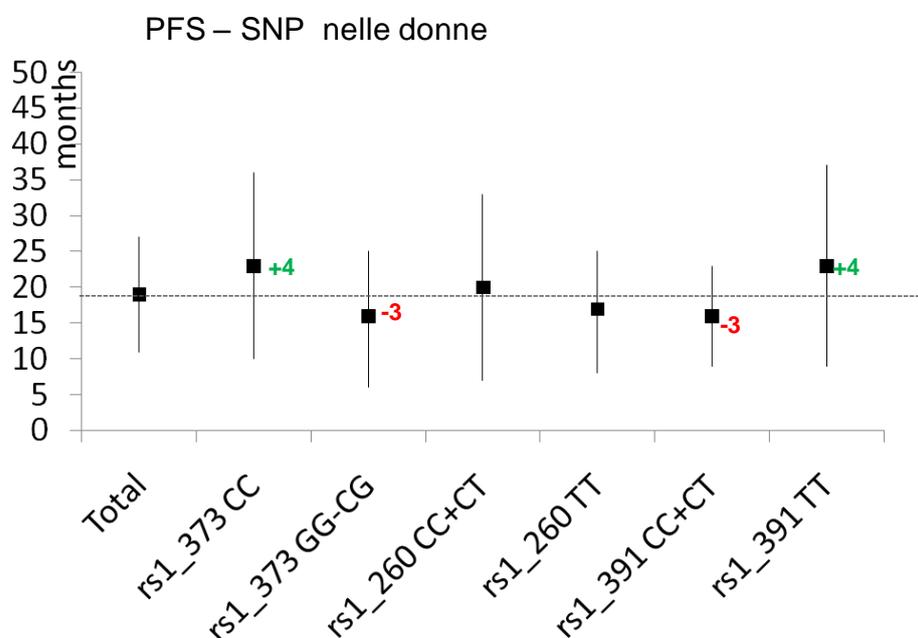
**Figura 48:** Curve Kaplan-Meier di PFS a 2 anni di pazienti maschi (m) e femmine (f) stratificati in base al genotipo per lo SNP rs11133391.

### 3.6 Box-plot SNP

Osservando i box-plot degli SNP per l'OS (fig.49) e la PFS (fig.50) delle donne si può evidenziare quanto segue.



**Figura 49:** il grafico rappresenta le mediane di OS delle donne del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 3 SNP analizzati, divisi per gruppi di genotipi ( $pp$  vs  $pq+qq$ ), mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta l'OS mediana delle donne del campione (50 mesi), i box-plot rappresentano l'OS mediana delle donne per ciascun genotipo, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i genotipi che provocano un maggiore scostamento dell'OS dalla mediana di sopravvivenza generale è riportato sul grafico la differenza di OS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

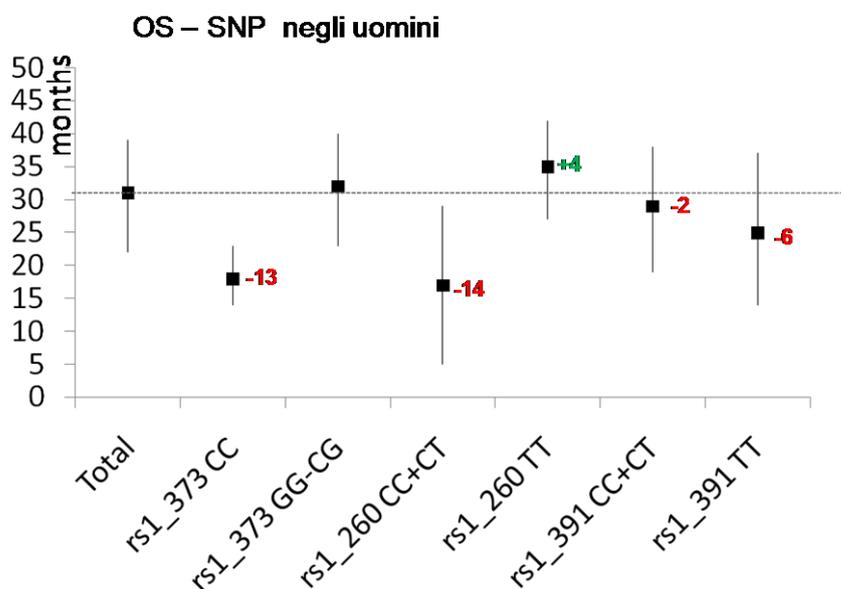


**Figura 50:** il grafico rappresenta le mediane di PFS delle donne del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 3 SNP analizzati, divisi per gruppi di genotipi ( $pp$  vs  $pq+qq$ ), mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza libera da progressione. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la PFS mediana delle donne del campione (19 mesi), i box-plot rappresentano la PFS mediana delle donne per ciascun genotipo, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i genotipi che provocano un maggiore scostamento della PFS dalla PFS mediana generale è riportato sul grafico la differenza in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

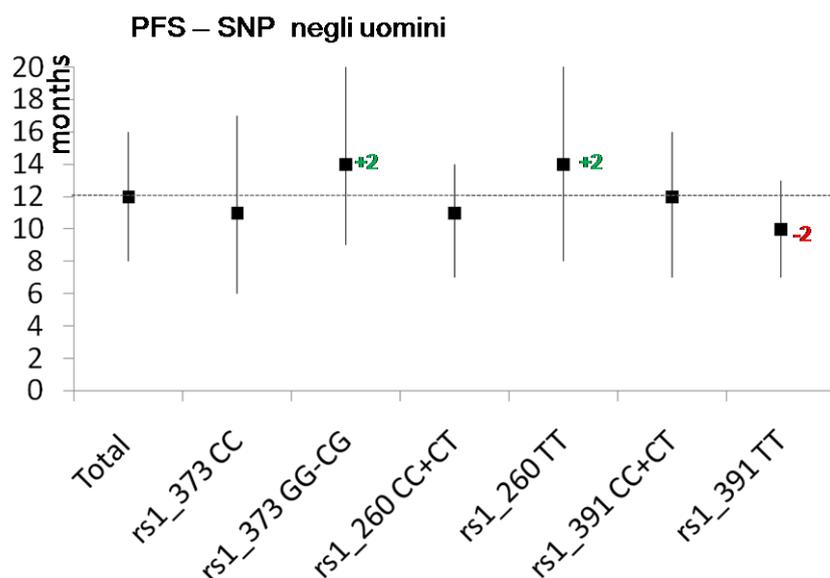
Sia per l'OS che per la PFS, gli SNP che evidenziano maggiore differenza fra le sopravvivenze mediane dei genotipi sono rs11133373 e rs11133391 (fig.49 e 50). I sottogruppi di donne con i genotipi rs11133373 CC e rs11133391 TT mostrano un OS maggiore rispettivamente di 13 e 43 mesi rispetto ai genotipi rs11133373 GC+GG e rs11133391 TC+CC. In particolare, rispetto alla sopravvivenza mediana delle donne, l'OS aumenta di 7 e 37 mesi per rs11133373 CC e rs11133391 TT, rispettivamente; e diminuisce di 6 mesi sia per rs11133373 GC+GG che per rs11133391 TC+CC (fig.49, tab.16).

Per la PFS la situazione non varia. I genotipi rs11133373 CC e rs11133391 TT mostrano una PFS maggiore rispetto ai genotipi rs11133373 GC+GG e rs11133391 TC+CC di 4 mesi in entrambi i casi. In particolare, rispetto alla PFS mediana delle donne, il sottogruppo di donne con rs11133373 CC e rs11133391 TT registra un aumento di 4 mesi; mentre per rs11133373 GC+GG e rs11133391 TC+CC vi è una diminuzione di 3 mesi. Per lo SNP rs1801260 l'unico scostamento che si può evidenziare è l'aumento di OS di 7 mesi per le donne con genotipo rs1801260 TT (fig.50, tab.16).

Nelle figure 51 e 52 sono riportati i grafici box-plot di OS e PFS degli uomini.



**Figura 51:** il grafico rappresenta le mediane di OS dei maschi del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 3 SNP analizzati, divisi per gruppi di genotipi (*pp* vs *pq+qq*), mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta l'OS mediana dei maschi del campione (31 mesi), i box-plot rappresentano l'OS mediana dei maschi per ciascun genotipo, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i genotipi che provocano un maggiore scostamento dell'OS dalla mediana di sopravvivenza generale è riportata sul grafico la differenza di OS in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.



**Figura 52:** il grafico rappresenta le mediane di PFS dei maschi del campione. Sull'asse delle ascisse sono indicati i 3 SNP analizzati, divisi per gruppi di genotipi ( $pp$  vs  $pq+qq$ ), mentre sull'asse delle ordinate sono indicati i mesi di sopravvivenza libera da progressione. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la PFS mediana dei maschi del campione (12 mesi), i box-plot rappresentano la PFS mediana dei maschi per ciascun genotipo, come riportato sull'ascissa; su ogni box-plot è riportato l'intervallo di confidenza al 95% (Ci95%). Per i genotipi che provocano un maggiore scostamento della PFS dalla PFS mediana generale è riportata sul grafico la differenza in mesi, in particolare in rosso quando vi è un peggioramento e in verde quando vi è un miglioramento.

Per quanto riguarda l'OS è evidente che alcuni genotipi sono associati con una diminuzione della sopravvivenza dei maschi rispetto alla mediana generale della coorte maschile (fig.51). In particolare, diversamente dalle donne, gli uomini con i genotipi rs11133373 CC e rs11133391 TT mostrano una diminuzione dell'OS rispettivamente di 13 e 6 mesi rispetto alla mediana generale (fig.51, tab.16); mentre i gli uomini con i genotipi rs11133373 CG+GG e rs11133391 TC+CC hanno una OS mediana che non si discosta dall'OS generale dei maschi. Anche il genotipo rs1801260 CC+TT mostra un'associazione con la diminuzione dell'OS dei maschi, di 14 mesi rispetto all'OS mediana di tutti i maschi (fig.51, tab.16).

La PFS per ciascun genotipo non differisce molto dalla mediana generale di PFS dei maschi (fig.52).

I risultati fin qui esposti per gli uomini e le donne possono essere così sintetizzati:

- rs11133373.** Il genotipo rs11133373 CC risulta un potenziale fattore prognostico positivo nelle donne, perché associato con l'aumento di OS di 7 mesi (da 50 a 57 mesi; tab.16), ma negativo per i maschi, perché associato con una diminuzione dell'OS mediana di 13 mesi (da 31 a 18 mesi; tab.16) (fig.42):

aumentando l'OS delle femmine e diminuendo quella dei maschi, la forbice già esistente fra le sopravvivenze maschili e femminili (fig.27) si allarga ulteriormente e raggiunge una significatività pari a  $p\text{-value}=0.01$  (fig.41). Questa tendenza è presente anche nell'associazione con la PFS con una significatività statistica fra maschi e femmine pari a  $p\text{-value}=0.006$  (fig.41). I genotipi rs11133373 CG+GG, invece, risultano potenziali fattori negativi per l'OS delle donne: la sopravvivenza da 50 mesi diminuisce a 44 mesi (fig.49; tab.16).

- **rs1801260.** Nel confronto fra M e F entrambi i genotipi (TT e TC+CC) di questo SNP mostravano, con significatività borderline, un miglioramento dell'OS delle donne (fig.44 e 45; tab.16); tuttavia i box-plot evidenziano come solo il genotipo rs1801260 TT potrebbe essere potenzialmente favorevole per le donne, in quanto associato con un OS mediana maggiore di 7 mesi rispetto all'OS mediana della coorte femminile (fig.49). I genotipi rs1801260 TC+CC risultano, invece, potenziali fattori negativi solo per i maschi (fig.51), in quanto il sottogruppo di maschi con questo genotipo (TC+CC) mostra un OS minore di 14 mesi rispetto all'OS mediana generale dei maschi (da 31 a 17 mesi; tab.16). Osservando i box-plot della PFS non sono evidenti spostamenti rilevanti rispetto alla mediana né nel gruppo dei maschi, né in quello delle femmine (fig.50 e 52).
- **rs11133391.** Il genotipo rs11133391 TT è associato a una maggiore OS nelle donne (l'OS nelle F aumenta di 37 mesi, da 50 a 87 mesi) (fig.49, tab.16), e ad una minore OS negli uomini (diminuisce di 6 mesi l'OS nei M da 31 a 25 mesi) (fig.51, tab.16). Il genotipo rs11133391 TC+CC è stato riscontrato in un sottogruppo di donne con un OS mediana minore di 6 mesi rispetto all'OS mediana generale femminile (fig.49, tab.16); in questo caso si perde la significatività fra OS di maschi e femmine perché l'apertura della forbice tra maschi e femmine (fig.27) diminuisce ( $p=0.31$ ) (tab.16). La stessa tendenza si riconferma nell'analisi delle PFS (fig.50 e 52): il genotipo rs11133391 TT è associato con una maggiore PFS nelle donne (la PFS delle donne con genotipo rs11133391 TT è maggiore rispetto alla PFS mediana delle donne di 4 mesi), e una minore PFS negli uomini (la PFS degli uomini con genotipo rs11133391 TT è minore rispetto alla PFS mediana dei maschi di 2 mesi) (tab.17). Il genotipo rs11133391 TC+CC si riscontra in un sottogruppo di donne con una PFS mediana minore di 3 mesi rispetto alla PFS mediana generale femminile (fig.50, tab.17).

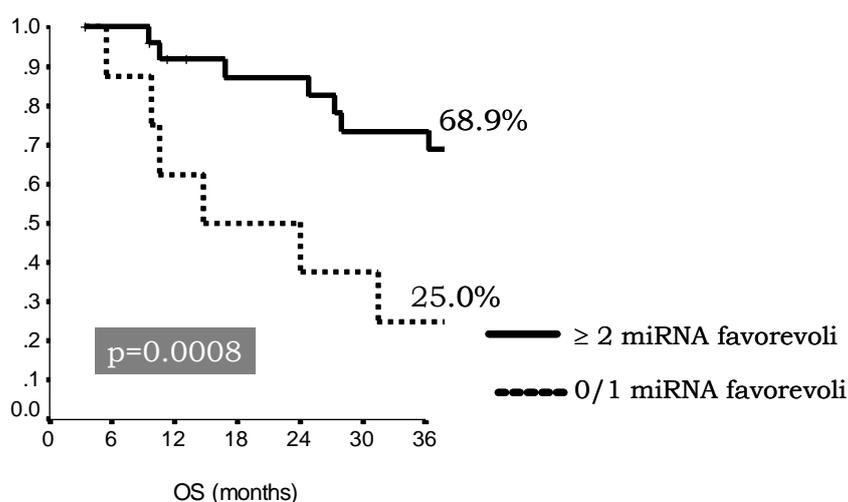
Tutti i dati ottenuti suggeriscono che le donne con H miR-206, -219, -194, L miR-132, e con i genotipi rs11133373 CC, rs1801260 TT, rs11133391 TT hanno una prognosi migliore sia rispetto agli uomini, in modo statisticamente significativo, sia rispetto all'OS mediana delle donne del campione.

Al contrario, gli uomini con H miR-206, H miR-219, H miR-132, L miR-192, L miR-194, con i genotipi rs11133373 CC, rs11133391 TT e con la presenza dell'allele C per lo SNP rs1801260 evidenziano una prognosi peggiore e una minore sopravvivenza.

Dopo aver valutato attentamente questi risultati, sono state effettuate delle analisi statistiche esplorative in cui sono stati combinati due o più dei potenziali biomarcatori studiati. Queste analisi hanno evidenziato un sottogruppo di pazienti donne con una prognosi migliore.

### 3.7 Sottogruppo di donne con prognosi migliore

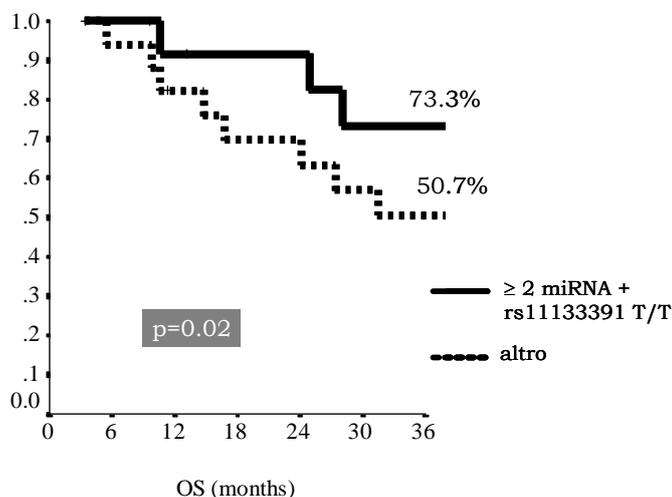
L'OS delle donne che presentano simultaneamente "l'espressione favorevole" di 2 o più miRNA (cioè miRNA associati con migliore prognosi nelle donne, ovvero H miR-206, H miR-219, H miR-194, L miR-132) risulta statisticamente migliore rispetto all'OS delle altre donne ( $p=0.0008$ ). La mediana di sopravvivenza aumenta fino a 58 mesi, ovvero 43 mesi in più rispetto alle donne con 0/1 miRNA ad "espressione favorevole" e 8 mesi in più rispetto alla mediana generale delle donne (fig.53, tab.18).



**Figura 53:** Curve Kaplan-Meier di sopravvivenza per pazienti donne stratificate in base alla presenza o meno dell'espressione favorevole di  $\geq 2$  miRNA. Le percentuali riportano l'OS a 3 anni.

Inoltre se alla presenza simultanea di 2 o più miRNA con "espressione favorevole" si somma la presenza del genotipo rs11133391 TT, anch'esso associato nelle donne

con migliore OS, gli effetti benefici aumentano ulteriormente e l'OS mediana di queste donne raggiunge gli 87 mesi (fig.54, tab.18).



**Figura 54:** Curve Kaplan-Meier di sopravvivenza per le pazienti donne stratificate in base alla presenza contemporanea del genotipo rs11133391 TT e di  $\geq 2$  miRNA con espressione favorevole. Le percentuali riportano l'OS a 3 anni.

	sesto	OS a 3 anni	Mediana	p-value
<b>donne del campione</b>	F	61.5	50	
$\geq 2$ miRNA favorevoli	F	68.9	58	<b>0.0008</b>
0/1 miRNA favorevole	F	25.0	15	
$\geq 2$ miRNA favorevole + rs11133391TT	F	73.3	87	<b>0.02</b>
altre donne	F	50.7	44	

**Tabella 18:** la tabella sintetizza le due Kaplan-Meier precedenti; riporta l'OS a 3 anni e la mediana di sopravvivenza per i sottogruppi di donne che godono di una prognosi migliore.

Queste ultime analisi indicano che gli effetti di questi potenziali biomarcatori positivi si possono sommare e aumentare ulteriormente il loro effetto nelle donne.

### 3.8 Associazione fra caratteristiche clinico-patologiche e microRNA

I livelli di espressione dei microRNA (H e L) sono stati associati con le caratteristiche clinico-patologiche degli 81 pazienti. Inoltre, le associazioni che nel campione totale sono risultate statisticamente significative e le associazioni con le proteine PER2, ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 2 sono state ricalcolate stratificando il campione per sesso (tab.19).

		miR-206			miR-219			miR-132			miR-192			miR-194		
		L	H	p-value ( $\chi^2$ test)												
Sesso	M vs F	26/15	22/18	0.44	23/18	25/15	0.56	23/18	25/15	0.56	24/17	24/16	0.89	25/16	23/17	0.75
Età	≤59 vs >59	20/21	21/19	0.74	24/17	17/23	0.15	22/19	19/21	0.58	21/20	20/20	0.91	23/18	18/22	0.32
Performance status	0 vs 1/2	32/9	32/8	0.83	32/9	32/8	0.99	34/7	30/10	0.38	32/9	32/8	0.83	31/10	33/7	0.45
KRAS	wt vs mut	35/6	31/9	0.36	32/9	34/6	0.42	36/5	30/10	0.14	33/8	33/7	0.82	34/7	32/8	0.74
Sede metastasi	solo fegato vs fegato+altre sedi	21/20	26/14	0.21	24/17	23/17	0.93	27/14	20/20	0.15	25/16	22/18	0.59	23/18	24/16	0.72
Resezione met epatiche	no vs si	25/16	20/20	0.32	23/18	22/18	0.92	21/20	24/16	0.43	24/17	21/19	0.58	29/12	16/24	<b>0.005</b>
	M													20/5	10/13	<b>0.009</b>
	F													9/7	6/11	<b>0.23</b>
	neg vs pos	18/23	16/24	0.72	20/21	14/26	0.21	21/20	13/27	<b>0.09</b>	18/23	16/24	0.72	18/23	16/24	0.72
PER2	M	5/21	8/14	0.21	8/15	5/20	0.25	7/16	6/19	0.74	10/14	3/21	<b>0.02</b>	9/16	4/19	0.19
	F	8/7	5/13	0.16	8/10	5/10	0.16	7/11	6/9	0.51	6/11	7/9	0.62	6/10	7/10	0.99
	neg vs pos	17/24	21/19	0.32	15/26	23/17	<b>0.06</b>	18/23	20/20	0.58	18/23	20/20	0.58	20/21	18/22	0.73
EGFR	M				8/15	14/11	0.14									
	F				7/11	9/6	0.23									
Ciclina D1	≤20 vs >20	20/21	17/23	0.57	16/25	21/19	0.23	18/23	19/21	0.74	18/23	19/21	0.74	13/28	24/16	<b>0.01</b>
	M													9/16	13/10	0.15
	F													4/12	11/6	<b>0.02</b>
β-catenina	≤20 vs >20	11/30	14/26	0.43	13/28	12/28	0.87	12/29	13/27	0.75	12/29	13/27	0.75	9/32	16/24	<b>0.08</b>
	M													5/20	5/18	0.99
	F													4/12	11/6	<b>0.02</b>
Ki-67	<15 vs ≥15	16/25	15/25	0.89	14/27	17/23	0.44	14/27	17/23	0.44	15/26	16/24	0.75	10/31	21/19	<b>0.009</b>
	M													7/18	11/12	0.16
	F													3/13	10/7	<b>0.02</b>
ERβ1	neg vs pos	14/27	15/25	0.75	16/25	13/27	0.54	13/28	16/24	0.44	15/26	14/26	0.88	16/25	13/27	0.54
	M	9/17	10/12	0.44	10/13	9/16	0.59	10/13	9/16	0.59	9/15	10/14	0.76	10/15	9/14	0.95
	F	5/10	5/13	0.99	6/12	4/11	0.72	3/15	7/8	0.12	6/11	4/12	0.52	6/10	4/13	0.46
ERβ2	neg vs pos	14/27	18/22	0.32	14/27	18/22	0.32	13/28	19/21	0.15	16/25	16/24	0.93	14/27	18/22	0.32
	M	9/17	6/16	0.58	5/18	10/15	0.17	5/18	10/15	0.17	8/16	7/17	0.75	8/17	7/16	0.90
	F	5/10	12/6	<b>0.06</b>	9/9	8/7	0.85	8/10	9/6	0.37	8/9	9/7	0.60	6/10	11/6	0.12

**Tabella 19:** associazioni statistiche fra livelli H e L di ciascun miRNA con le caratteristiche clinico-patologiche. Nelle righe evidenziate in verde è riportata l'associazione gender-related, quando effettuata. Le associazioni con risultati statisticamente significativi ( $p \leq 0.05$ ) o con una significatività statistica borderline sono riportati in rosso.

Come si può notare dalla tabella, i miR-192 e -194 sono gli unici microRNA a dare risultati statisticamente significativi nell'associazione con le caratteristiche clinico-patologiche.

In particolare, la minore espressione di PER2 risulta più frequente nei maschi con **L miR-192** rispetto ai maschi con H miR-192 ( $p=0.02$ ). **H miR-194** è significativamente associato nel campione totale con una maggior frequenza di resezioni delle metastasi epatiche ( $p=0.005$ ), con l'espressione di Ciclina D1  $\leq 20$  ( $p=0.01$ ) e con Ki-67  $<15$  ( $p=0.009$ ); infine correla anche con l'espressione di β-catenina  $\leq 20$ , seppur con una significatività borderline ( $p=0.08$ ). Quando il campione viene stratificato in base al sesso, l'associazione fra il miR-194 e la resezione delle metastasi epatiche rimane significativa solo fra i maschi ( $p=0.009$ ); mentre le associazioni con la Ciclina D1, Ki-67 e β-catenina evidenziano una significatività statistica pari a  $p=0.02$  solo nelle femmine.

Sono degne di nota anche le associazioni con una significatività borderline che riguardano il **miR-219** e il **miR-132**, i cui alti livelli si associano nel campione totale rispettivamente con EGFR negativo ( $p=0.06$ ) e con PER2 positivo ( $p=0.09$ ). Infine, **miR-206**, nonostante non dia risultati significativi quando associato con l'espressione di ERβ2 nell'intero campione, mostra un'associazione statisticamente borderline nel sottogruppo delle donne, dove gli alti livelli si associano con ERβ2 negativo ( $p=0.06$ ).

### 3.9 Associazione fra caratteristiche clinico-patologiche e SNP

La tabella 20 riporta le associazioni fra le caratteristiche clinico-patologiche e i polimorfismi nei 77 pazienti e anche nel campione stratificato per sesso nel caso di PER2, ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 e per tutte le associazioni risultate significative nel campione intero.

		rs11133373		p-value ( $\chi^2$ test)	rs1801260		p-value ( $\chi^2$ test)	rs11133391		p-value ( $\chi^2$ test)
		CC	CG+GG		TT	TC+CC		TT	TC+CC	
Sesso	M vs F	19/16	27/15	0.51	23/13	23/17	0.74	15/15	31/16	0.24
Età	≤59 vs >59	20/15	21/21	0.53	19/17	22/19	0.90	17/13	24/23	0.63
Performance status	0 vs 1/2	27/8	34/8	0.68	26/10	35/6	0.17	27/3	34/13	<b>0.04</b>
	M							14/1	21/10	<b>0.08</b>
	F							13/2	13/3	0.68
KRAS	wt vs mut	29/6	34/8	0.82	30/6	33/8	0.74	25/5	38/9	0.78
Sede metastasi	solo fegato vs fegato+altre sedi	23/1	22/20	0.23	19/17	26/15	0.35	21/9	24/3	0.08
Resezione met epatiche	no vs si	17/18	24/18	0.45	20/16	21/20	0.70	14/16	27/20	0.37
PER2	neg vs pos	17/18	18/24	0.82	18/18	17/24	0.74	15/15	20/27	0.78
	M	6/13	8/19	0.89	9/14	5/18	0.20	4/11	10/21	0.99
	F	8/8	5/10	0.35	3/10	10/8	<b>0.07</b>	7/8	6/10	0.60
EGFR	neg vs pos	14/21	21/21	0.38	11/25	24/17	<b>0.02</b>	10/20	25/22	0.11
	M				6/17	14/9	<b>0.02</b>			
	F				5/8	10/8	0.35			
Ciclina D1	≤20 vs >20	13/22	20/22	0.36	14/22	19/22	0.51	11/19	22/25	0.39
$\beta$ -catenina	≤20 vs >20	12/23	11/31	0.44	9/27	14/27	0.38	9/21	14/33	0.98
Ki-67	<15 vs ≥15	13/22	17/25	0.76	11/25	19/22	0.17	12/18	18/29	0.88
ER $\beta$ 1	neg vs pos	15/20	13/29	0.30	12/24	16/25	0.60	11/19	17/30	0.99
	M	9/10	9/18	0.34	8/15	13/13	0.55	6/9	12/19	0.93
	F	6/10	4/11	0.70	4/9	6/12	0.99	5/10	5/11	0.99
ER $\beta$ 2	neg vs pos	10/25	18/24	0.20	10/26	18/23	0.15	9/21	19/28	0.36
	M	5/14	8/19	0.81	4/19	9/14	0.10	3/12	10/21	0.50
	F	5/11	10/5	<b>0.05</b>	6/7	9/9	0.83	6/9	9/7	0.37

**Tabella 20:** associazioni statistiche fra i genotipi di ciascun polimorfismo con le caratteristiche clinico-patologiche. Nelle righe evidenziate in azzurro è riportata l'associazione gender-related, quando effettuata. Le associazioni con risultati statisticamente significativi ( $p \leq 0.05$ ) o con una significatività statistica borderline sono riportati in rosso.

Dalla tabella si evidenzia che gli SNP rs11133373, rs1801260 e rs11133391 sono significativamente associati rispettivamente con ER $\beta$ 2, EGFR e il Performance Status. In particolare, l'associazione fra il polimorfismo rs11133373 e il recettore per gli estrogeni ER $\beta$ 2 non dà risultati statisticamente significativi nel campione totale ( $p=0.29$ ); tuttavia con la stratificazione per sesso il genotipo rs11133373 CC risulta associato con ER $\beta$ 2 positivo soltanto nella coorte femminile ( $p=0.05$ ). Il genotipo rs1801260 TT è associato con l'espressione di EGFR in maniera significativa sia nel campione totale ( $p=0.02$ ), che nel sottogruppo dei maschi ( $p=0.02$ ), ma non delle femmine. Il genotipo rs11133391 TT è associato nell'intero campione con un performance status uguale a zero ( $p=0.04$ ); l'associazione diventa statisticamente borderline quando effettuata nel sottogruppo dei maschi ( $p=0.07$ ). E' degna di nota anche l'associazione statisticamente borderline che si evidenzia solo nella coorte femminile fra il genotipo rs1801260 TT e PER2 positivo ( $p=0.07$ ).

#### 4. DISCUSSIONE

Il presente studio ha evidenziato che l'espressione dei microRNA (miR-206, -219, -132, -192 e -194) e i polimorfismi (rs11133373 C>G, rs1801260 T>C e rs11133391 T>C) correlati ai *clock-genes*, possono essere associati ad una diversa sopravvivenza negli uomini e nelle donne; ovvero, i potenziali biomarcatori studiati influenzano la prognosi degli uomini e delle donne in maniera diversa.

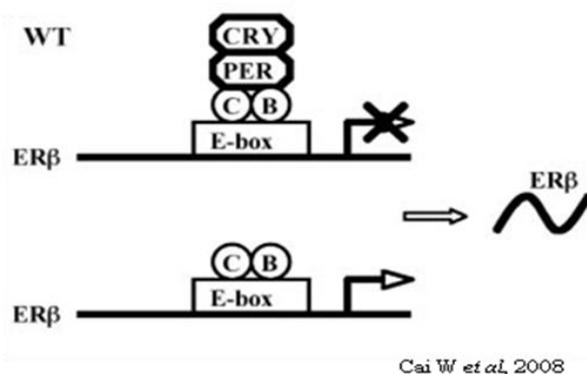
Anche altri studi hanno evidenziato associazioni diverse nei due sessi, non solo fra marcatori molecolari e sopravvivenza, ma anche fra fattori di rischio e incidenza di una particolare patologia. In letteratura, infatti, è riportato che le differenze *gender-related* sono un importante fattore di rischio da tenere in considerazione nella pratica clinica, perché hanno un impatto significativo sull'incidenza di alcune patologie, sulla predittività di risposta ad una determinata terapia e sulla prognosi in diversi tumori, compreso il CRC (Hendifar A *et al*, 2009; Koo J *et al*, 2008; Nelson RL *et al*, 1997).

Ad esempio, nel CRC, alcuni studi indicano fattori che riescono a ridurre il rischio di incidenza solo nelle donne: ovvero l'elevato consumo di fibre e l'apporto di magnesio possono prevenire il tumore al colon solo nelle donne (Vulcan A *et al* 2015; Gorczyca AM *et al* 2015); un altro studio, invece, evidenzia marcatori genetici prognostici diversi per maschi e femmine: in particolare, *XPD156*, *EGFR* (CA)<sub>n</sub> repeat, *PLA2* C/T, *SCN1A* T1067A sono predittivi dell'outcome clinico delle femmine, mentre *ERβ* (CA)<sub>n</sub> repeat, *ERβ* A730G, *SCN1A* IVS591 sono associati con l'outcome dei maschi (Gordon MA *et al* 2011).

Sebbene, nel CRC le differenze di incidenza e prognosi fra i due sessi risultino evidenti, la base molecolare che influisce sul meccanismo *gender-related*, però, non è stata ancora chiarita. Alcuni studi ipotizzano come responsabili di questo meccanismo i diversi stili di vita fra maschi e femmine (l'abuso di alcol, il fumo, l'attività fisica e una corretta alimentazione), mentre altri studi si concentrano sui diversi livelli ormonali fra uomini e donne, e in particolare indicano i recettori degli estrogeni  $\beta$  (*ERβ*) come i mediatori più probabili di questa differenza *gender-related*, anche se non è ancora ben chiaro il ruolo degli estrogeni nella tumorigenesi del CRC (Campbell-Thompson M *et al*, 2001; Wada-Hiraike O *et al*, 2006).

I recettori  $ER\beta$ , che sono normalmente espressi nell'epitelio del colon, probabilmente hanno un ruolo protettivo contro lo sviluppo e la progressione del cancro colorettales, soprattutto nelle donne. La perdita dei recettori  $ER\beta$ , infatti, è un evento comune nella trasformazione del colon e nella progressione del tumore (Campbell-Thompson M *et al*, 2001; Wada-Hiraike O *et al*, 2006; Foley EF *et al*, 2000). E' stato dimostrato che all'aumentare dell'età della donna, e alla conseguente diminuzione dei livelli di estrogeni (come avviene nella menopausa), l'espressione dei recettori  $ER\beta$  viene down-regolata (Murillo-Ortiz B *et al*, 2008; Bardin A *et al*, 2004); infatti dopo la menopausa il rischio di incidenza di CRC aumenta per le donne e diventa uguale a quello degli uomini. Nel CRC i livelli di espressione di  $ER\beta$  diminuiscono in relazione allo stadio del tumore (Hartman J & Gustafsson JA, 2010) e questa diminuzione nelle donne è più marcata rispetto agli uomini (Campbell-Thompson M *et al*, 2001). Questo dato è confermato anche in questo studio, in quanto nel campione si registra una differenza di espressione del recettore  $ER\beta$  (sottotipo  $ER\beta 2$ ) fra i due sessi:  $ER\beta$  risulta più espresso nei pazienti maschi che nelle femmine (tab.11). Poiché la diminuzione dei recettori  $ER\beta$  è associata con la tumorigenesi del CRC principalmente nelle donne, si potrebbe ipotizzare che  $ER\beta$  medii gli effetti benefici e preventivi degli estrogeni nel colon, soprattutto nelle donne (Campbell-Thompson M *et al*, 2001).

Inoltre, è stato anche evidenziato che  $ER\beta$  risulta sotto il controllo del sistema circadiano e, in particolare, la sua espressione risulta inibita dalle proteine della famiglia PER (Cai W *et al*, 2008). E' stato dimostrato che sul promotore del gene codificante  $ER\beta$  vi sono delle sequenze enhancer (CACGTG) che reclutano le proteine CLOCK e BMAL1, le quali attivano l'espressione del gene a valle. Successivamente CLOCK e BMAL1, legate al promotore, reclutano il dimero PER-CRY, il quale funge da regolatore negativo e reprime la trascrizione di  $ER\beta$  (fig.55) (Cai W *et al*, 2008).



**Figura 55:** modello schematico della regolazione circadiana dell'espressione di  $ER\beta$ . L'eterodimero CLOCK-BMAL1 media la regolazione circadiana di  $ER\beta$  legandosi alle sequenze enhancer nel promotore, ma sono i regolatori negativi a guidare principalmente l'espressione ritmica di  $ER\beta$ . Il reclutamento dei regolatori negativi PER-CRY causa un'inibizione dell'espressione di  $ER\beta$  indotta da CLOCK-BMAL1.

Questo meccanismo di down-regolazione tramite le proteine PER potrebbe spiegare il motivo per il quale H miR-194 correla con una prognosi migliore nelle donne. Infatti, il **miR-194**, insieme al **miRNA-192**, è descritto in letteratura come un potente inibitore della famiglia dei geni *PER* e un'alterata espressione di questi microRNA può compromettere la periodicità del sistema circadiano nei Mammiferi (Nagel R *et al*, 2009). Poiché PER sembra inibire l'espressione di ER $\beta$  (Cai W *et al*, 2008), si può ipotizzare che nelle donne gli alti livelli di espressione del miR-194, reprimendo la traduzione dei geni PER, permettano indirettamente l'espressione di ER $\beta$ , che migliorerebbe la prognosi delle donne. L'effetto positivo di H miR-194 sulla sopravvivenza nelle donne trova conferma anche in uno studio di Chiang e collaboratori del 2012, il quale, analizzando i livelli di questi 2 microRNA nel CRC, ha evidenziato che i miR-192 e -194 sono frequentemente down-regolati nel CRC e che l'aumento delle dimensioni del tumore nel CRC è strettamente correlato con una bassa espressione dei questi due miRNA (Chiang Y *et al*, 2012). Inoltre Chiang e collaboratori ipotizzano che i bassi livelli di espressione di questi microRNA potrebbero in qualche modo contribuire alla proliferazione cellulare e quindi alla progressione del CRC (Chiang Y *et al*, 2012). Il presente studio, nel gruppo delle donne, sembra confermare anche quest'ultima ipotesi, in quanto, dall'associazione dei livelli di miRNA con le caratteristiche clinico-patologiche, risulta che L miR-194 correla con una maggiore espressione di  $\beta$ -catenina, Ciclina D1 e Ki-67, proteine coinvolte nella proliferazione cellulare; mentre, H miR-194, correlato a una maggiore OS alle donne, è associato a una minore espressione di  $\beta$ -catenina, Ciclina D1 e Ki-67 (tab.19).

Anche le analisi di associazione ottenute nella coorte maschile sembrano confermare quanto riportato da Chiang e collaboratori: infatti, L miR-192 e L miR-194 si associano negli uomini a una minore OS. Inoltre, i maschi con L miR-194 correlano con una minore frequenza di resezioni epatiche, ciò sottolinea l'effetto prognostico negativo di questo marcatore; mentre i maschi con L miR-192 correlano con una minore espressione di PER2, la quale risulta fortemente associata alla formazione delle metastasi ed a una prognosi sfavorevole di CRC (Karantanos T *et al*, 2014; Iacobelli S *et al*, 2008) (tab.19).

Resta da chiarire, però, l'associazione nei maschi fra L miR-192 e la diminuzione di PER2 perché questa correlazione sembra contraddire quanto riportato in letteratura, poiché il miR-192 dovrebbe inibire l'espressione dei geni *PER* (Nagel R *et al*, 2009).

I risultati ottenuti mostrano altri marcatori prognostici positivi per le donne: H **miR-206** e H **miR-219** sembrano associati con una maggiore OS; si può ipotizzare che l'elevata espressione di questi due microRNA coadiuvi, insieme ad altri fattori, nel ristabilire il corretto ritmo circadiano. In letteratura è riportato che i miR-206 e miR-219 sono coinvolti nel sistema di regolazione dei ritmi circadiani, perché influenzano rispettivamente i livelli di *CLOCK* e *BMAL1* (Zhou W *et al*, 2011; Liu K e Wang R, 2012; Cheng H-Y M & Obrietan K, 2007).

Gli studi riguardanti il ritmo circadiano riportano che *CLOCK* inibisce la progressione del ciclo cellulare e promuove la riparazione di danni al DNA, che *BMAL1* attiva l'espressione dell'oncosoppressore *p53* e che l'eterodimero *CLOCK/BMAL1* attiva il pathway di Wee, che sopprime la proliferazione cellulare (Karantanos T *et al*, 2014; Mullenders J *et al*, 2009; Grechez-Cassiau *et al*, 2008). Sebbene i dati molecolari suggeriscano un'attività antiproliferativa per questi *clock-genes*, le correlazioni cliniche presenti in letteratura mostrano che *CLOCK* è ampiamente espresso nel tessuto tumorale del colon (Karantanos T *et al*, 2014) e che *BMAL1* nel CRC promuove la proliferazione cellulare, mediante l'attivazione del pathway di Wnt e  $\beta$ -catenina, (Lin F *et al*, 2013) e correla con l'inizio del CRC e con un outcome sfavorevole (Karantanos T *et al*, 2014). Le attività tumorigeniche di *CLOCK* e *BMAL1* nell'intestino potrebbero trovare una spiegazione solo considerando che il sistema circadiano che regola l'intestino (FEO) è del tutto indipendente dal pacemaker centrale; quindi i *clock-genes* nel colon potrebbero funzionare in modo diverso. I risultati del presente studio suggeriscono che H miR-206 e H miR-219, reprimendo la trascrizione rispettivamente di *CLOCK* e *BMAL1*, potrebbero ristabilire nel colon i normali valori di espressione di queste proteine. Poiché, diversamente dalle donne, gli uomini con H miR-206 e H miR-192 mostrano una diminuzione dell'OS, sarà importante effettuare ulteriori studi per comprendere il meccanismo che porta a una diversa associazione fra i 2 miRNA e l'OS nei due sessi.

Il **miR-132**, sembra anch'esso un potenziale marcatore di sopravvivenza nelle donne. In letteratura è riportato che il miR-132 è un microRNA luce-inducibile che, agendo indirettamente a livello del SCN, sembra modulare il resetting di *CLOCK* indotto dalla luce (Pegoraro M & Tauber E, 2008). Allo stato attuale, non vi è un'ipotesi plausibile che aiuti a capire perché L miR-132 è associato a un aumento dell'OS solo nelle donne, mentre H miR-132 correla con una peggiore OS sia negli uomini che nelle donne.

Tutte le ipotesi formulate per i miRNA analizzati in questo studio, ovviamente, dovranno essere validate da ricerche future, soprattutto alla luce del fatto che i microRNA hanno diversi target, quindi in realtà potrebbero non agire esclusivamente sugli RNA messaggeri dei *clock-genes*, ma andare a regolare l'espressione di altri geni non coinvolti nel ritmo circadiano.

I polimorfismi scelti per questa ricerca, sono stati analizzati anche in altri studi, e in particolare è stato dimostrato che lo **SNP rs11133373 C>G** è significativamente associato con la suscettibilità del cancro alla prostata e al seno (Zhu Y et al, 2009; Zienolddiny S et al, 2013), **rs1801260 T>C** potrebbe essere utilizzato come potenziale marker per l'outcome dei pazienti con CRC (Zhou F et al, 2012; Hoffman AE et al, 2010) e **rs11133391 T>C** è associato significativamente con il rischio di sviluppare glioma e cancro al seno (Madden MH et al, 2014; Hoffman AE et al, 2010). Le analisi di associazione fra i polimorfismi e le sopravvivenze, in questo studio, mostrano che i genotipi rs11133373 CC, rs1801260 TT e rs11133391 TT si associano ad una maggiore sopravvivenza solo nelle donne. Siccome gli SNP studiati sono localizzati in regioni non codificanti del gene *CLOCK* (due SNP al 3'-UTR e uno SNP intronico), potrebbero questi modificare siti di legame per proteine o microRNA e, quindi, essere coinvolti nella regolazione dell'espressione genica di *CLOCK* (Zhou F et al, 2012). Un'ipotesi suggestiva per lo SNP rs11133373 C>G potrebbe rifarsi alla teoria di *CLOCK* come regolatore positivo dell'espressione di ER $\beta$ 2 nelle donne (fig.55); infatti le donne con genotipo rs11133373 CC, oltre a mostrare un aumento dell'OS, risultano anche associate con una maggiore espressione del recettore ER $\beta$ 2 (tab.20), il quale media effetti protettivi per il CRC; ovviamente si tratta di un'ipotesi da valutare.

In tutti i casi analizzati, ciò che è evidente è la potenziale presenza di fattori di sopravvivenza positivi per le femmine e negativi per i maschi. Come riportato in letteratura, anche in questo studio le donne hanno una prognosi migliore rispetto agli uomini (Hendifar A et al, 2009). Ciò spiega anche perché nel campione vi è una differenza di distribuzione, fra maschi e femmine, statisticamente significativa per  $\beta$ -catenina, e statisticamente borderline per le resezioni epatiche (tab.11). In particolare,  $\beta$ -catenina, la quale indica attivazione del pathway Wnt e proliferazione cellulare, è più espressa nei maschi, che effettivamente hanno una prognosi peggiore, rispetto alle femmine; la resezione delle metastasi epatiche, invece, che è un fattore positivo, avviene più frequentemente nelle donne che negli uomini.

Questi dati confermano a livello molecolare la miglior prognosi delle donne del campione analizzato.

Infine, l'analisi statistica esplorativa ha individuato un sottogruppo di donne, con due o più marcatori positivi, che mostra una prognosi migliore. La presenza simultanea nelle donne di 2 o più miRNA con "espressione favorevole" e del genotipo rs11133391 TT fa aumentare ulteriormente la sopravvivenza mediana (fino a 87 mesi) rispetto alle donne con nessun o un solo marcatore positivo (fig.54, tab.18).

L'ulteriore aumento in termini di sopravvivenza in questo sottogruppo di donne suggerisce che l'associazione di più marcatori positivi nelle donne potrebbe prolungare il vantaggio in OS delle femmine rispetto ai maschi anche dopo la menopausa, quando i livelli di estrogeni calano e la sopravvivenza delle donne diventa simile a quella degli uomini. Ulteriori studi dovranno essere effettuati per confermare questa ipotesi.

Tutte le ipotesi e i risultati di questo studio pilota dovranno essere confermati su un numero di pazienti tali da poter raggiungere una potenza statistica sufficiente per la validazione dei dati. Un nuovo progetto AIRC è stato recentemente proposto al fine di validare i risultati ottenuti, di comprendere le interazioni fra i miRNA e gli SNP studiati con l'espressione dei *clock-genes* (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1* e *CRY2*), oltre che delle proteine coinvolte nello sviluppo del cancro (ER $\beta$ , Wnt,  $\beta$ -catenina, Ciclina D1, EGFR), tentando di chiarire le basi molecolari della differenza di sopravvivenza fra maschi e femmine.

Nel caso i dati ottenuti venissero confermati, questo studio andrebbe a sottolineare il potenziale utilizzo dei microRNA, sia come marcatori prognostici di sopravvivenza, sia come possibili bersagli terapeutici: recentemente, infatti, è stata avviata la sperimentazione di un nuovo metodo che colpisce le cellule tumorali attraverso la modificazione di specifici microRNA, identificandoli come la nuova classe di oncogeni e oncosoppressori, da utilizzare non solo per la diagnosi ma anche per il trattamento del cancro (Esquela-Kerscher A and Slack FJ, 2006).

Inoltre, se questi dati saranno confermati, e i miRNA e gli SNP studiati saranno utilizzati come biomarcatori di sopravvivenza, sarà possibile individuare un sottogruppo di pazienti donne con una prognosi migliore che potrà beneficiare di un approccio terapeutico mirato, che riduca il rischio di eventi avversi correlati alla tossicità della terapia, nell'ottica della medicina personalizzata.

L'identificazione precoce di pazienti a minore rischio di progressione, oltre a consentire una scelta di trattamento più adeguata alle esigenze del singolo paziente, rappresenta anche una strategia importante per affrontare il problema sanitario. Infatti, il costo dell'assistenza sanitaria, che sostiene spese di screening, diagnosi, trattamento e follow-up, è in incremento per via dell'aumento dell'invecchiamento della popolazione e ciò sta ponendo non pochi problemi di sostenibilità della spesa farmaceutica da parte del Servizio Sanitario Nazionale (Progetto ASSR). Solo l'appropriatezza della diagnosi e della conseguente scelta terapeutica può consentire di limitare gli sprechi delle risorse economiche e di ottimizzare i risultati.

## 5. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti suggeriscono che il profilo genetico e il profilo di espressione dei microRNA che predicono la prognosi dei pazienti affetti da cancro al colon-retto metastatico, trattati con chemioterapia a base di 5-FU, può dipendere dal sesso.

E' dunque importante nella pratica clinica tenere in considerazione sia i marcatori prognostici che il sesso del paziente, in quanto i biomarcatori possono influenzare la prognosi in maniera *gender-related*.

Soltanto in questo modo il clinico potrà scegliere la terapia ottimale per ciascun paziente, il quale potrà godere di tutti i benefici della medicina personalizzata, che consistono in una ridotta incidenza di reazioni avverse, in migliori esiti clinici ed in costi ridotti.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- **Anderson LE**, Morris JE, Sasser LB, Stevens RG. Effect of constant light on DMBA mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett* 2000; 148(2):121-6.
- **Andrade-Silva J**, Cipolla-Neto J, Peliciari-Garcia RA. The in vitro maintenance of clock genes expression within the rat pineal gland under standard and norepinephrine-synchronized stimulation. *Neurosci Res* 2014; 81-82:1-10.  
*Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:377-421.
- **Baker SJ**, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50(23):7717-7722.
- **Bardin A**, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:537-51.
- **Barford A**, Dorling D, Davey Smith G, Shaw M. Life expectancy: women now on top everywhere. *BMJ* 2006;332(7545):808.
- **Belle MDC**. Circadian tick-talking across the neuroendocrine system and suprachiasmatic nuclei circuits: the enigmatic communication between the molecular and electrical membrane clocks. *Journal of Neuroendocrinology* 2015; 27:567-576.
- **Beltrán-Sánchez H**, Finch CE, Crimmins EM. Twentieth century surge of excess adult male mortality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(29):8993-8.
- **Bittman EL**, Doherty L, Huang L, Paroskie A. Period gene expression in mouse endocrine tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R561-R569.
- **Boer GJ**, van Esseveldt LE, Rietveld WJ. Cellular requirements of suprachiasmatic nucleus transplants for restoration of circadian rhythm. *Chronobiol Int* 1998; 15(5):551-566.
- **Bokemeyer C**, Bondarenko I, Hartmann JT, De Braud FG, Volovat C, Nippgen J, Stroh C, Celikl, Koralewski P. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 2008; 26 suppl 20:4000.
- **Boland CR**, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2073-2087.
- **Borgs L**, Beukelaers P, Vandenbosch R, Belachew S, Nguyen L, Malgrange B. "Cell "circadian" cycle: new role for mammalian core clock genes". *Cell Cycle* 2009; 8(6):832-7.
- **Bredesen DE**, Mehlen P and Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1031-1043.
- **Brown TM**, Piggins HD. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog Neurobiol* 2007; 82:229-255.
- **Buhr ED** & Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* 2013; (217):3-27.
- **Butterworth AS**, Hignins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42:216-227.
- **Cai W**, Rambaud J, Teboul M, Masse I, Benoit G, Gustafsson JA, Delaunay F, Laudet V and Pongratz I. Expression levels of estrogen receptor  $\beta$  are modulated by components of the molecular clock. *Molecular and cellular biology* 2008; 28(2):784-793.
- **Campbell-Thompson M**, Lynch IJ and Bhardwai B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER $\beta$  isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61:632-640.
- **Cao Q**, Gery S, Dashti A, Yin D, Zhou Y, Gu J, Koeffler HP. A role for the clock gene per1 in prostate cancer. *Cancer Res* 2009. 69:7619-7625.
- **Castells A**, Castellví-Bel S, Balaguer F. "Concepts in familial colorectal cancer: where do we stand and what is the future?". *Gastroenterology* 2009; 137(2):404-409.

- **Cervantes A**, Macarulla T, Martinelli E, Rodriguez-Braun E, Ciardiello F, Stroh C, Nippgen J, Baselga J, Tabernero J. Correlation of KRAS status (wild type [wt] vs. mutant [mt]) with efficacy to first-line cetuximab in a study of cetuximab single agent followed by cetuximab + FOLFIRI in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26 suppl 20:4129.
- **Chan AT**, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2029-43.
- **Chen K**, Dai H, Cao M, Song F, Wei Q, Zhang W. The associations between polymorphisms of clock genes and the susceptibility to breast cancer. *100<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR, Denver, CO, USA, 2009.*
- **Chen R**, Zhu J, Dong Y, He C, Hu X. Suppressor of Ty homolog-5, a novel tumor-specific human telomerase reverse transcriptase promoter-binding protein and activator in colon cancer cells. *Oncotarget* 2015. Epub.
- **Chen ST**, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ, Chang JG. Deregulated expression of the PER1; PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 2005; 26:1241-1246.
- **Cheng H-Y M** and Obrietan K. Revealing a Role of MicroRNAs in the Regulation of the Biological Clock. *Cell Cycle* 2007; 6(24):3034-3035.
- **Chiang Y**, Song Y, Wang Z, Liu Z, Gao P, Liang J, Zhu J, Xing C and Xu H. microRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2012;3:560-566.
- **Choe HK**, Kim HD, Park SH, Lee HW, Park JY, Seong JY, Lightman SL, Son GH, Kim K. Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:5677-5682.
- **Chu C**, Zhao Z. MicroRNA in the molecular mechanism of the circadian clock in mammals. *Front Biosci* 2013; 18:441-446.
- **Ciardiello F**, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008; 358(11):1160-1174.
- **Ciarleglio CM**, Ryckman KK, Servick SV, Hida A, Robbins S, Wells N, Hicks J, Larson SA *et al.* Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide population. *J Biol Rhythms* 2008; 23:330-340.
- **Colwell CS**. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12:553-569.
- **Cruz-Bustillo Clarens**. Molecular Genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enfem Dig.* 2004; 96:48-59.
- **Cunningham D**, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375(9719):1030-1047.
- **Cutolo M**, Straub RH. Circadian rhythms in arthritis: hormonal effects on the immune/inflammatory Reaction. *Autoimmun Rev* 2008; 7(3):223-8.
- **Czene K**, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* 2002; 99: 260-266.
- **Damiola F**, Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 2000; 14:2950-2961.
- **Dempke WC**, Heinemann V. Ras mutational status is a biomarker for resistance to EGFR inhibitors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2010; 30(11):4673-4677.
- **Dibner C**, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 2010; 72:517-49.
- **Eaden JA**, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001; 48(4):526-535.
- **Engelhardt M**, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3(11):1931-1941.
- **Esquela-Kerscher A** and Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259-269.

- **Fearon ER.** Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:479-507.
- **Filipski E,** Innominato PF, Wu M, Li XM, Iacobelli S, Xian LJ, Lévi F. Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:507-517.
- **Filipski E,** King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, Claustrat B, Hastings MH, Lévi F. Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:690–697.
- **Foley EF,** Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 2000;60:245–248.
- **Foulkes NS,** Cermakian N, Whitmore D, Sassone-Corsi P. Rhythmic transcription: the molecular basis of oscillatory melatonin synthesis. *Novartis Found Symp* 2000; 227:5-14; discussion 15-8.
- **Franken P,** Thomason R, Heller HC, O'Hara BF. A non-circadian role for clock-genes in sleep homeostasis: a strain comparison. *BMC Neurosci* 2007; 8:87.
- **Freeman HJ.** Colorectal cancer risk in Crohn disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1810-11
- **Freeman TJ,** Smith JJ, Chen X, Washington MK, Roland JT, Means AL, Eschrich SA, Yeatman TJ, Deane NG, Beauchamp RD. Smad4-mediated signaling inhibits intestinal neoplasia by inhibiting expression of  $\beta$ -catenin. *Gastroenterology* 2012; 142(3):562-571.
- **Fu L,** Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:350–361.
- **Fu L,** Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002; 111(1):41-50.
- **Gaudi S,** Zoraqi G, Falbo V, Taruscio D. Circadian biological clocks: molecular self-generating mechanisms which keep the rhythm. *Ann Ist Super Sanita* 2000; 36(1):99-109.
- **Gear H,** Williams H, Kemp EG, Roberts F. BRAF mutations in conjunctival melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. 45 (8):2484–8.
- **Gery S,** Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* 2006; 22(3):375-82.
- **Gillespie JM,** Chan BP, Roy D, Cai F, Belsham DD. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. *Endocrinology* 2003; 144:5285–5292.
- **Gorczyca AM,** He K, Xun P, Margolis KL, Wallace JP, Lane D, Thomson C, Ho GY, Shikany JM, Luo J. Association between magnesium intake and risk of colorectal cancer among postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 2015 [Epub ahead of print].
- **Gordon MA,** Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiery A, Nagashima F, Lurje G, Labonte M, Wilson P, Sherrod A, Ladner RD and Lenz H-J. Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics* 2011; 12(1):1-20.
- **Granda TG,** Liu XH, Smaaland R, Cermakian N, Filipki E, Sassone-Corsi P, Lévi F. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumour. *FASEB J* 2005; 19:304–306.
- **Granda TG,** Lévi F. Tumor-based rhythms of anticancer efficacy in experimental models. *Chronobiol Int* 2002; 19:21–41.
- **Gréchez-Cassiau A,** Rayet B, Guillaumond F, Teboul M, Delaunay F. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283(8):4535-42.
- **Gryfe R,** Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21(5):233-300.
- **Guescini M,** Sisti D, Rocchi MB, Stocchi L, Stocchi V. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics* 2008; 9:326.

- **Hadjihannas MV**, Brückner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, Behrens J. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(28):10747-10752.
- **Hagggar FA** and Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22(4):191-197.
- **Harrison**, *Principi di Medicina Interna (il manuale - 16<sup>a</sup> edizione)*. Ed. McGraw-Hill, New York - Milano 2006).
- **Hartman J**, Gustafsson JA. Estrogen receptors in colorectal cancer: goalkeepers, strikers, or bystanders? *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(8):897-9.
- **He TC**, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382):1509-1512.
- **Hendifar A**, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, Ning Y, Zhang W, Lenz HJ. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(20):6391-6397.
- **Hoffman AE**, Yi CH, Zheng T, Stevens RG, Leaderer D, Zhang Y, Holford TR, Hansen J, Paulson J eZhu Y. CLOCK in breast tumorigenesis: evidence from genetic, epigenetic, and transcriptional profiling analyses. *Cancer Res* 2010; 70(4):1459-1468.
- **Hoffman AE**, Zheng T, Stevens RG, Ba Y, Zhang Y, Leaderer D, Yi C, Holford TR et al. Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochromr 2. *Cancer Res* 2009; 69:3605-3613.
- **Hsu CM**, Lin SF, Lu CT, Lin PM, Yang MY: Altered expression of circadian clock-genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2012; 33:149-155.
- **Hua H**, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, Wang X, Wang Z, Cornelissen-Guillaume G, Halberg F. Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer Sci* 2006; 97(7):589-96.
- **Hughes AT**, Piggins HD. Feedback actions of locomotor activity to the circadian clock. *Prog Brain Res* 2012; 199:305-336.
- **I numeri del cancro in Italia 2014**. AIOM, AIRTUM onlus. Intermedia Editore, Brescia 2014 –  
[http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2014/I\\_numeri\\_del\\_cancro\\_2014.pdf](http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2014/I_numeri_del_cancro_2014.pdf)
- **Iacobelli S**, Innominato P, Piantelli M, Bjarnason GA, Coudert B, Focan C, Giacchetti S, Poncet A, Garufi C, Lévi F and the ARTBC Chronotherapy Group. Tumor clock protein PER2 as a determinant of survival in patients (pts) receiving oxaliplatin-5-FU-leucovorin as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer (MCC). *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)* 2008; Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 11032.
- **Innominato PF**, Focan C, Gorlia T, Moreau T, Garufi C, Waterhouse J, Giacchetti S, Coudert B, Iacobelli S, Genet D, Tampellini M, Chollet P, Lentz MA, Mormont MC, Lévi F, Bjarnason GA, Chronotherapy Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Circadian rhythm in rest and activity: a biological correlate of quality of life and a predictor of survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Res* 2009; 69(11):4700-4707
- **Innominato PF**, Lévi FA, Bjarnason GA. Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62(9-10):979-1001.
- **Ionov Y**, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429):558-561.
- **Jasperson KW**, Tuohy TM, Neklason DW, et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2044-2058.
- **Kanthan R**, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int* 2012; 2012:5974-97.
- **Karantanos T**, Theodoropoulos G, Pektasides D, Gazouli M. Clock genes: their role in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(8):1986-1992.
- **Kloog I**, Haim A, Stevens RG, Portnov BA. Global co-distribution of light at night (LAN) and cancers of prostate, colon, and lung in men. *Chronobiol Int* 2009; 26(1):108-25.

- **Kobayashi M**, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(10):1689-1693.
- **Köhne CH**, Lenz HJ. Chemotherapy with targeted agents for the treatment of metastatic colorectal Cancer. *Oncologist*. 2009; 14(5):478-488.
- **Kojima S**, Shingle DL, Green CB. Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 3):311-320.
- **Koo JH**, Jalaludin B, Wong SK, Kneebone A, Connor SJ and Leong RW. Improved survival in young women with colorectal cancer. *The American Journal of Gastroenterology* 2008; 103:1488-1495.
- **Kopetz S**, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009; 27(22):3677-3683.
- **Kopp C**, Albrecht U, Zheng B, Tobler I. Homeostatic sleep regulation is preserved in mPer1 and mPer2 mutant mice. *Eur J Neurosci* 2002; 16(6):1099-106.
- **Krugluger W**, Brandstaetter A, Kallay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S, Bonner E, Cross HS. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: Reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. *Cancer Res* 2007; 67:7917-7922.
- **Kuo SJ**, Chen ST, Yeh KT, Hou MF, Chang YS, Hsu NC, Chang JG. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. *Virchows Arch* 2009; 454:467-474.
- **Lamia KA**, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(39):15172-7.
- **Lavebratt C**, Sjöholm LK, Partonen T, Schalling M, Forsell Y. PER2 variantion is associated with depression vulnerability. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B(2):570-81.
- **Lee CC**. Tumor suppression by the mammalian Period genes. *Cancer Causes Control* 2006; 17:525-530.
- **Lee S**, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L. Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS One* 2010; 5(6):e10995.
- **Lenos K**, Goos J, Vuist IM, den Uil SH, Delis-van Diemen PM, Belt E, Stockmann H, Bril H, de Wit M, Carvalho B, et al. MGL ligand expression is correlated to BRAF mutation and associated with poor survival of stage III colon cancer patients. *Oncotarget* 2015; 6(28):26278-26290.
- **Lévi F**, Filipinski E, Iurisci I, Li XM, Innominato P. Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72:465-475.
- **Lévi F**, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:377-421.
- **Li A**, Lin X, Tan X, Yin B, Han W, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. Circadian gene Clock contributes to cell proliferation and migration of glioma and is directly regulated by tumor-suppressive miR-124. *FEBS Lett* 2013; 587(15):2455-2460.
- **Lièvre A**, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66(8):3992-3995.
- **Lim C**, Allada R. Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1544-1550.
- **Lin F**, Chen Y, Li X, Zhao Q, Tan Z. Over-expression of circadian clock gene Bmal1 affects proliferation and the canonical Wnt pathway in NIH-3T3 cells. *Cell Biochem Funct* 2013; 31(2):166-72.
- **Lin YM**, Chang JH, Yeh KT, Yang MY, Liu TC, Lin SF, Su WW, Chang JG. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2008; 47:925-933.
- **Linee guida AIOM** - *Tumori del colon-retto*. Associazione Italiana di Oncologia Medica. Edizione 2014.  
<http://www.aiom.it/area+pubblica/area+medica/prodotti+scientifici/linee+guida/1%2C333%2C1%2C>

- **Liu J**, Malkani G, Shi X, Meyer M, Cunningham-Runddles S, Ma X, Sun ZS. The circadian clock Period 2 gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Infect Immun* 2006; 74(8):4750-4756.
- **Liu K**, Wang R. MicroRNA-mediated regulation in the mammalian circadian rhythm. *Journal of Theoretical Biology* 2012; 304:130-110.
- **Los M**, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *The Oncologist*. 2007; 12(4):443-450.
- **Lowrey PL**, Takahashi JS. Genetics of the mammalian circadian system: photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annu Rev Genet* 2000; 34:533-562.
- **Lucas RJ**, Peirson SN, Berson DM, Brown TM, Cooper HM, Czeisler CA, Figueiro MG, Gamlin PD, Lockley SW, O'Hagan JB, Price LL, Provencio I, Skene DJ, Brainard GC. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends Neurosci* 2014; 37:1-9.
- **Madden MH**, Anic GM, Thompson RC, Nabors LB, Olson JJ, Browning JE, Melissa H. Madden MH, Anic GM, Thompson RC, Nabors LB, Olson JJ, Browning JE, Monteiro AN and Egan KM. Circadian pathway genes in relation to glioma risk and outcome. *Cancer Causes Control* 2014; 25(1):25-32.
- **Markey K**, Axel L, Ahnen D. Basic concepts for genetic testing in common hereditary colorectal cancer syndromes. *Curr Gastroenterol Rep*. 2002; 4(5):404-413.
- **Markowitz SD** and Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer. *Molecular Basis of Colorectal Cancer*. *N Engl J Med*. 2009; 361(25): 2449-2460.
- **Marshall JR**. Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37:73-82.
- **Masi G**, Vasile E, Loupakis F, Cupini S, Fornaro L, Baldi G, Salvatore L, Cremolini C, et al. Randomized trial of two induction chemotherapy regimens in metastatic colorectal cancer: an updated analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103(1):21-30.
- **Matsuo T**, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 2003; 302:255-9.
- **Mehlen P**, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*. 1998 Oct 22; 395(6704):801-804.
- **Mehta N**, Cheng HY. Micro-Managing the Circadian Clock: The Role of microRNAs in Biological Timekeeping. *J Mol Biol* 2012; 425(19):3609-3624.
- **Mellemkjaer L**, Olsen JH, Frisch M, et al. Cancer in ulcerative colitis. *Int J Cancer* 1995; 60:330-333.
- **Merrow M**, Spoelstra K & Roenneberg T. The circadian cycle: daily rhythms from behavior to genes. *EMBO Reports* 2005; 6(10):930-935.
- **Migita H**, Morser J, Kawai K. Rev-erbalpha upregulates NF-kappaB-responsive genes in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 2004; 561(1-3):69-74.
- **Miyaki M**, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306(4):799-804.
- **Miyazaki K**, Wakabayashi M, Hara Y, Ishida N. Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes Cells*. 2010; 15(4):351-8.
- **Mohawk JA**, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* 2012; 35:445-462.
- **Monteiro AN** and Egan KM. Circadian pathway genes in relation to glioma risk and outcome. *Cancer Causes Control* 2014; 25(1):25-32.
- **Moore RY**, Card JP. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Ann N Y Acad Sci*. 1985; 453:123-33.
- **Mostafaie N**, Kallay E, Sauerzapf E, Bonner E, Kriwanek S, Cross HS, Huber KR, Krugluger W. Correlated downregulation of estrogen receptor beta and the circadian clock gene Per1 in human colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2009; 48:642-647.
- **Mullenders J**, Fabius AW, Madiredjo M, Bernards R, Beijersbergen RL. A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway. *PLoS One* 2009; 4(3):e4798.

- **Murillo-Ortiz B**, Perez-Luque E, Malacara JM, Daza-Benitez L, Hernandez-Gonzalez M, BenitezBribiesca L. Expression of Estrogen Receptor Alpha and Beta in Breast Cancers of Pre- and Postmenopausal Women. *Pathol Oncol Res* 2008.
- **Nagel R**, Clijsters L and Agami R. The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock. *FEBS Journal* 2009; 276:5447-5455.
- **Najdi R**, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis: beyond APC. *J Carcinog* 2011; 10:5.
- **Nelson RL**, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 80(2):193-197.
- **Nishide SY**, Honma S, Nakajima Y, Ikeda M, Baba K, Ohmiya Y, Honma K. New reporter system for Per1 and Bmal1 expression revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes Cells* 2006; 11:1173-1182.
- **Oishi K**, Shirai H, Ishida N. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* 2005; 386(Pt 3):575-81.
- **Pardini L**, Kaeffer B, Trubuil A, Bourreille A, Galmiche JP. Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol Int* 2005; 22:951-961.
- **Partonen T**, Treutlein J, Alpman A, Frank J, Johansson C, Depner M, Aron L, Rietschel M *et al*. Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression. *Ann Med* 2007; 39(3):229-38.
- **Pegoraro M** and Tauber E. The role of microRNAs (miRNA) in circadian rhythmicity. *J Genet* 2008; 87:505-511.
- **Pelengaris S**, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416:129-136.
- **Peltomaki P**. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1174-79.
- **Perez-Roger I**, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J* 1999; 18:5310-5320.
- **Pogue-Geile KL**, Lyons-Weiler J, Whitcomb DC. Molecular overlap of fly circadian rhythms and human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2006; 243:55-57.
- **Polakis P**. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(1):15-21.
- **Pontieri GM**, Russo MA, Frati L. *Patologia generale*. 3<sup>a</sup> ed. Piccin, Padova 2005.
- **Ponz De Leon M**, Benatti P, Rossi G *et al*. *Epidemiology of tumors of the colon and rectum*. Ed. Ufficio Attività Grafiche, Modena 2006.
- **Progetto ASSR** (Agenzia per i servizi sanitari regionali) - "Valutazione sperimentale costo efficacia delle linee guida su screening, diagnosi precoce e trattamento multidisciplinare del cancro del colon retto" - [http://www.agenas.it/images/agenas/ricerca/agenas\\_ccm\\_corrente\\_finalizzata/innovazione\\_hta/2004/Sintesi\\_progetto\\_di\\_ricerca\\_finalizzata\\_colon\\_retto.pdf](http://www.agenas.it/images/agenas/ricerca/agenas_ccm_corrente_finalizzata/innovazione_hta/2004/Sintesi_progetto_di_ricerca_finalizzata_colon_retto.pdf)
- **Ripperger JA**, Albrecht U. The circadian clock component PERIOD2: from molecular to cerebral functions. *Prog Brain Res* 2012; 199:233-45.
- **Robbins e Cotran**. *Le basi patologiche delle malattie*. 7<sup>a</sup> ed. Elsevier Masson, Torino-Milano 2008.
- **Ronaghi M**. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research* 2001;11:3-11.
- **Rosty C**, Parry S, Young JP. Serrated polyposis: an enigmatic model of colorectal cancer predisposition. *Patholog Res Int*. 2011; 2011:1570-1573.
- **Savvidis C**, Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Mol Med* 2012; 18:1249-1260.
- **Schernhammer ES**, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:825-828.
- **Schernhammer ES**, Razavi P, Li TY, Qureshi AA, Han J. Rotating night shifts and risk of skin cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(7):602-606.

- **Shende VR**, Neuendorff N, Earnest DJ. Role of miR-142-3p in the Post-Transcriptional Regulation of the Clock Gene *Bmal1* in the Mouse SCN. *PLoS One* 2013; 8(6):e65300.
- **Shin KH**, Park YJ, Park JG. Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early-onset colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):536-540.
- **Siegel R**, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013. *Cancer J Clin* 2013; 63:11-30.
- **Stevens RG**. Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock-genes. *Epidemiology* 2005; 16:254-258.
- **Sukumaran S**, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(9-10):904-17.
- **Tan X**, Zhang P, Zhou L, Yin B, Pan H, Peng X. Clock-controlled mir-142-3p can target its activator, *Bmal1*. *BMC Mol Biol* 2012; 13:27.
- **Van Cutsem E**, Borràs JM, Castells A, Ciardiello F, Ducreux M, Haq A, Schmoll HJ, Tabernero J. Improving outcomes in colorectal cancer: where do we go from here? *Eur J Cancer* 2013; 49(11):2476-85.
- **Van Cutsem E**, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011; 29(15):2011-9.
- **van der Horst GT**, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, et al. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398:627-630.
- **Vella L**. *Enciclopedia medica italiana - II aggiornamento della Seconda Edizione*. USES Edizioni Scientifiche, Firenze 2000. Ed. 2, pp. 5203-5221.
- **Viswanathan AN**, Hankinson SE, Schernhammer ES. Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer Res* 2007; 67(21):10618-10622.
- **Viswanathan AN**, Schernhammer ES. Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women. *Cancer Lett* 2009; 281(1):1-7.
- **von Roon AC**, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. Review. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(6):839-855.
- **Vulcan A**, Brändstedt J, Manjer J, Jirström K, Ohlsson B, Ericson U. Fibre intake and incident colorectal cancer depending on fibre source, sex, tumour location and Tumour, Node, Metastasis stage. *Br J Nutr*. 2015:1-11 [Epub ahead of print].
- **Wada-Hiraike O**, Imamov O, Hiraike H, et al. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2959-64.
- **Wang J**, Yin L, Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erb alpha regulates circadian expression of plasminogen activator inhibitor type. *J Biol Chem* 2006; 281(45):33842-33848.
- **Wang Y**, Hua L, Lu C and Chen Z. Expression of circadian clock gene human *Period2* (*hPer2*) in human colorectal carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* 2011; 9:166.
- **Wicki A**, Herrmann R, Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:w13112.
- **Xia HC**, Niu ZF, Ma H, Cao SZ, Hao SC, Liu ZT, Wang F. Deregulated expression of the *Per1* and *Per2* in human gliomas. *Can J Neurol Sci* 2010; 37:365-370.
- **Yang X**, Wood PA, Ansell C, Hrushesky WJ. Circadian time-dependent tumor suppressor function of *Period* genes. *Integr Cancer Ther* 2009; 8:309-316.
- **Yang MY**, Chang JG, Lin PM, Tang KP, Chen YH, Lin HY, Liu TC, Hsiao HH, Liu YC, Lin SF. Downregulation of circadian clock-genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of *hPER3*. *Cancer Sci* 2006; 97(12):1298-1307.
- **Yang MY**, Yang WC, Lin PM, Hsu JF, Hsiao HH, Liu YC, Tsai HJ, Chang CS, Lin SF: Altered expression of circadian clock-genes in human chronic myeloid leukemia. *J Biol Rhythms* 2011; 26(2):136-148.

- **Yang X**, Wood PA, Ansell CM, Quiton DF, Oh EY, Du-Quiton J, Hrushesky WJ. The circadian clock gene *Per1* suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiol Int* 2009; 26:1323-1339.
- **Yashiro M**, Hirakawa K, Boland CR. Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer* 2010;10:303.
- **Yeh KT**, Yang MY, Liu TC, Chen JC, Chan WL, Lin SF, Chang JG. Abnormal expression of period 1 (*PER1*) in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005; 206(1):111-20.
- **Yin L**, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA. Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* 2007; 318(5857):1786-9.
- **Yokota T**. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers?. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12(2):163-171.
- **Young A**, Rea D. Treatment of advanced disease. *BMJ* 2000; 321:1278.
- **Zeng ZL**, Wu MW, Sun J, Sun YL, Cai YC, Huang YJ, Xian LJ. Effects of the biological clock gene *Bmal1* on tumour growth and anti-cancer drug activity. *J Biochem* 2010; 148(3):319-26.
- **Zhou F**, He X, Liu H, Zhu Y, Jin T, Chen C, Qu F, Li Y, Bao G, Chen Z and Xing J. Functional Polymorphisms of Circadian Positive Feedback Regulation Genes and Clinical Outcome of Chinese Patients With Resected Colorectal Cancer. *Cancer* 2012; 118:937-946.
- **Zhou W**, Li Y, Wang X, Wu L and Wang Y. MiR-206-mediated dynamic mechanism of the mammalian circadian clock. *BMC Systems Biology* 2011;5:141.
- **Zhu Y**, Stevens RG, Hoffman AE, Fitzgerald LM, Kwon EM, Ostrand EA, Davis S, Zheng T *et al.* Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study. *Cancer Res* 2009; 69 (24):9315-9322.
- **Zhu Y**, Zheng T, Stevens RG, Zhang Y, Boyle P. Does "clock" matter in prostate cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(1):3-5.
- **Zienolddiny S**, Haugen A, Lie J-A S, Kjuus H, Anmarkrud KH and Kjærheim K. Analysis of polymorphisms in the circadian-related genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working night shifts. *Breast Cancer Research* 2013;15:R53.