



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Triennale in
SCIENZE BIOLOGICHE

**miRNA NEL CANCRO AL SENO: NUOVE FRONTIERE NELLA
DIAGNOSI, NELLA TERAPIA MIRATA E NELLA VALUTAZIONE DELLA
PROGNOSI**

**miRNAS IN BREAST CANCER: NEW FRONTIERS IN DIAGNOSIS,
TARGET THERAPY AND PROGNOSIS ASSESSMENT**

Docente Referente:

Chiar.ma Prof.ssa Anna La Teana

Laureanda:

Francesca Fontana Carlucci

Matricola 1095335

Sessione estiva

Anno Accademico 2025-2026

INDICE

INTRODUZIONE _____	3
1 - CAPITOLO PRIMO: PANORAMICA DEI miRNA _____	4
1.1 Biogenesi dei miRNA _____	4
1.2 Meccanismi d'azione _____	5
1.3. Regolazione della proliferazione e dell'apoptosi nelle cellule del cancro al seno da parte dei miRNA _____	7
1.4 Regolazione dell'invasione e delle metastasi nelle cellule del cancro al seno da parte dei miRNA _____	9
2 - CAPITOLO SECONDO: APPLICAZIONE DEI MIRNA NELLA DIAGNOSI E NEL TRATTAMENTO DEL CANCRO AL SENO _____	11
2.1 miRNA come biomarcatori diagnostici _____	11
2.2 Rilevamento nel sangue dei miRNA _____	12
2.3 Strategie terapeutiche mirate ai miRNA _____	18
2.4 Effetti sinergici dei Mirna con chemioterapia e radioterapia _____	25
3 - CAPITOLO TERZO: VALUTAZIONE PROGNOSTICA E CONTROVERSIE NELL'APPLICAZIONE DEI miRNA _____	27
3.1 miRNA come biomarcatori prognostici _____	27
3.2 Limiti e controversie _____	28
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE _____	29
BIBLIOGRAFIA _____	31

INTRODUZIONE

Il carcinoma mammario rappresenta una delle neoplasie più comuni tra le donne a livello mondiale, con un tasso di incidenza in costante aumento annuale, costituendo un grave pericolo per la salute femminile. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2022 ci sono stati 2,30 milioni di nuovi casi di cancro al seno a livello globale, rappresentando così uno dei tumori più diagnosticati.

La sua patogenesi complessa annessa all'alta eterogeneità stabilisce sfide rilevanti per la diagnosi precoce, strategie terapeutiche e valutazione prognostica.

I metodi diagnostici e terapeutici classici come l'imaging e l'analisi tissutale presentano dei limiti da affrontare per perfezionare sia la sopravvivenza che la prognosi dei pazienti. Anche le strategie terapeutiche mostrano pazienti con recidive, metastasi e resistenza ai farmaci, nonostante, chemioterapia e radioterapia migliorino i tassi di sopravvivenza. A tal proposito è stato impiegato l'utilizzo di miRNA come biomarcatori diagnostici e prognostici, e target terapeutici al fine di accrescere la diagnosi precoce e cambiare in meglio gli esiti clinici del cancro al seno; infatti, sono ritenuti potenziali biomarcatori non invasivi per la loro elevata stabilità e per la loro facilità di rilevamento, circolando nel sangue.

I miRNA sono dei piccoli RNA endogeni non codificanti, lunghi circa 20-24 nucleotidi che regolano l'espressione genica legandosi alla regione 3'(UTR) non tradotta degli mRNA bersaglio, impedendo la traduzione genica o favorendo la degradazione. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che i miRNA svolgono un duplice ruolo, agiscono sia da oncogeni che da oncosoppressori; infatti, la loro disregolazione è correlata all'inizio, alla progressione, all'invasione e alla metastasi del tumore.

Un esempio di miRNA oncogenico è miR-21 che favorisce la proliferazione e l'invasione delle cellule tumorali. I miRNA, dunque hanno un ruolo significativo nel cancro al seno. Difatti è importante l'analisi dei loro meccanismi d'azione e la regolazione della proliferazione, dell'apoptosi, dell'invasione e della metastasi delle cellule neoplastiche; viene esaminato, anche, il loro potenziale d'azione come biomarcatori diagnostici, considerando la rilevazione e applicazione dei miRNA circolanti; oggetto di analisi, infine, sono anche, le loro strategie terapeutiche e i loro effetti sinergici con chemioterapia e radioterapia. (1)

Capitolo primo

PANORAMICA DEI miRNA

1.1 BIOGENESI DEI miRNA

I miRNA sono molecole endogene di RNA a singolo filamento non codificanti, lunghi circa 20-24 nucleotidi che inibiscono l'espressione genica a livello post-trascrizionale legandosi alle regioni non tradotte 3' UTR dell'mRNA bersaglio. Essi hanno un ruolo centrale in diversi processi biologici cellulari come proliferazione, differenziamento apoptosi e metabolismo cellulare. Questo è stato dimostrato in alcuni studi, infatti, i primi miRNA scoperti furono lin-4 e let-7 in *Caenorhabditis elegans* attraverso screening genetici. (2)

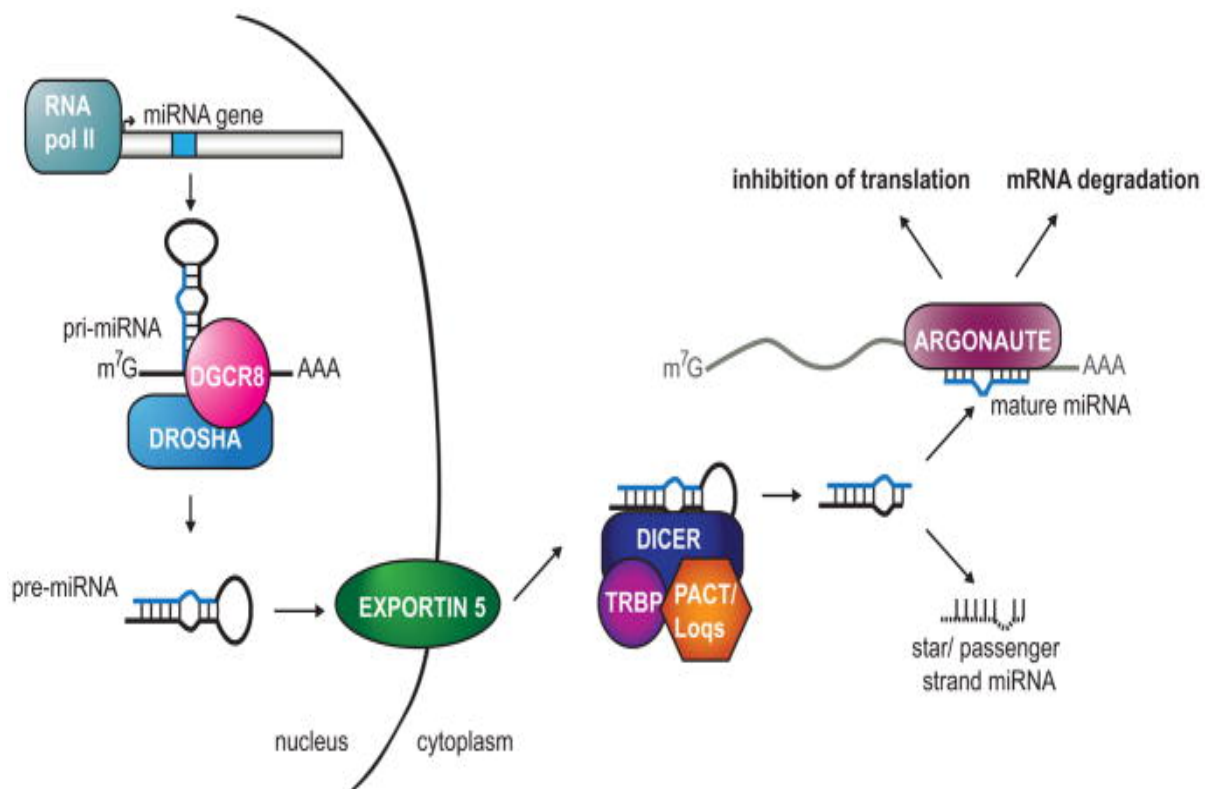


Figura 1 microRNA biogenesis: regulating the regulators (2)

La biogenesi dei miRNA comprende fasi sia nucleari che citoplasmatiche. Inizia nel nucleo ad opera della RNA polimerasi II che trascrive i pri-miRNA (miRNA primari) caratterizzato da una struttura a forcina contenente la sequenza matura. Successivamente, la struttura a forcina attraverso il Microprocessore viene escissa. Quest'ultimo include un enzima RNasi III, definito DROSHA, e il suo cofattore DGCR8 (conosciuto anche come PASHA) che produce il pre-miRNA, il precursore del miRNA di 60-70 nucleotidi. Il precursore a forcina attraverso EXPORTIN-5 viene esportato dal nucleo, dove DICER, un altro enzima RNasi III sviluppa il precursore trasformandolo nel duplex di miRNA di 20-24 nucleotidi. Su ARGONAUTE viene caricato il filamento che è destinato a diventare la sequenza matura, producendo il complesso di silenziamento generato da Mirna (miRISC) con altre proteine. I miRNA guidano il complesso RISC, tramite un appaiamento imperfetto, verso specifici mRNA per inibire l'espressione e innescando la destabilizzazione dell'mRNA o la repressione della traduzione. Il controllo della biogenesi dei miRNA è necessario per il normale mantenimento della biologia cellulare perché disregolazioni dei miRNA possono modificare la regolazione di geni bersaglio. La regolazione avviene attraverso proteine accessorie per assicurare una corretta stabilità dei miRNA. (2)

1.2 MECCANISMI D'AZIONE

I miRNA maturi legandosi alle regioni 3'UTR degli mRNA bersaglio regolano negativamente l'espressione genica. Difatti svolgono un ruolo cruciale in di vari tipi di processi biologici. I meccanismi regolatori dipendono dal grado di complementarietà tra il miRNA e l'mRNA target. La complementarietà si distingue in: complementarietà perfetta e complementarietà imperfetta. La prima conduce alla scissione e alla degradazione dell'mRNA, mentre la seconda porta alla repressione traslazionale. I miRNA possono svolgere la funzione di oncogeni o di soppressori tumorali in base alle condizioni dei loro geni bersaglio. Infatti, la loro disregolazione è rigorosamente legata allo sviluppo e alla progressione delle malattie, come il carcinoma mammario. Essa può contribuire alla proliferazione cellulare incontrollata, all'inibizione dell'apoptosi, alla metastasi e resistenza alle terapie. Gli oncogeni, ossia gli oncomiR sono sovraespressi nei tumori e

favoriscono la tumorigenesi impedendo l'espressione dei geni soppressori tumorali. Uno dei più conosciuti è il miR-21, spesso sovraespresso nel tumore al seno, bersaglia PTEN e TPM1 promuovendo la proliferazione e l'invasione cellulare. Un altro oncogeno è il miR-155, la sua sovraespressione è associata alla proliferazione cellulare bersagliando SOCS1, un soppressore tumorale. Invece i soppressori tumorali sono sottoregolati nel cancro, inducendo all'espressione incontrollata degli oncogeni. Un noto oncosoppressore è il miR-34a che bersaglia i geni come BCL2 e CDK6 arrestando il ciclo cellulare e l'apoptosi. Infine, i miRNA come miR-10b, modulano un processo quale la transizione dell'epitelio-mesenchimale (EMT) promuovendo le metastasi nel carcinoma mammario, così bersagliano HOXD10 e aumentano l'espressione del gene pro-metastatico RHOC. (1)

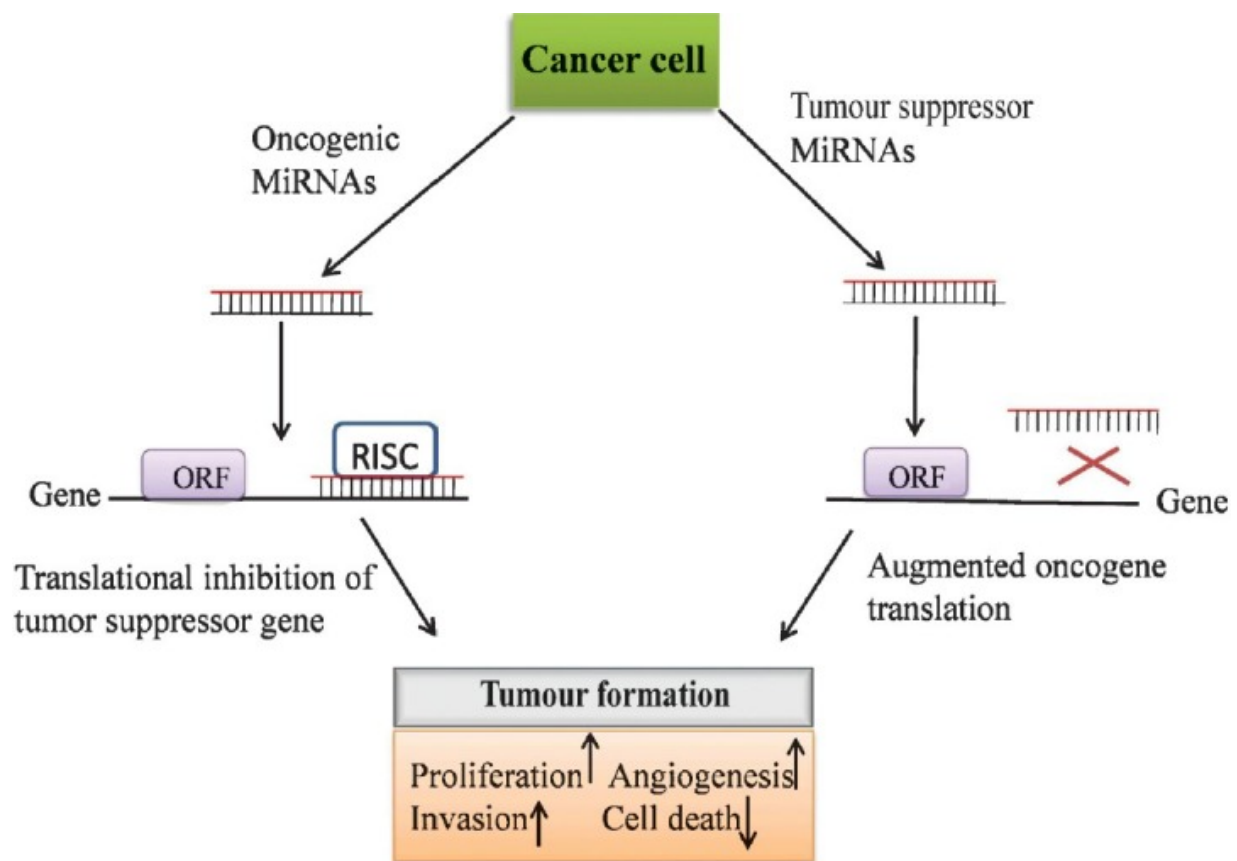


Figura 2 MicroRNA as oncogenes or tumor suppressor genes (3)

1.3 REGOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE E DELL'APOPTOSI NELLE CELLULE DEL CANCRO AL SENO DA PARTE DEI miRNA

I miRNA, sulla base di quanto sopra esposto, regolano l'espressione genica, influenzando la crescita, lo sviluppo e la morte cellulare programmata delle cellule neoplastiche funzionando o come oncogeni o come oncosoppressori.(1)

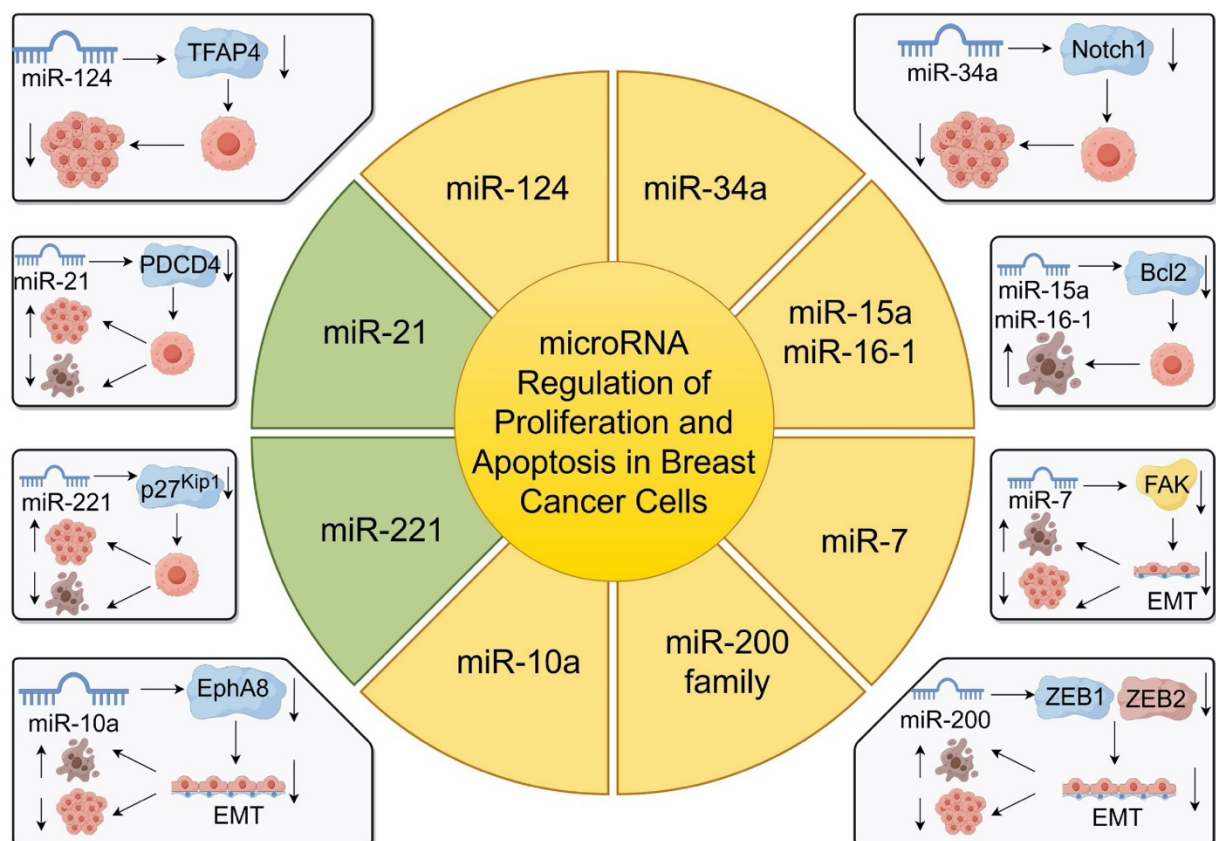


Figura 3 miRNA regulation of proliferation and apoptosis in breast cancer cells (1)

Il mir-124 è un bersaglio terapeutico, infatti la sua sovraespressione riduce la proliferazione cellulare e favorisce l'apoptosi. Esso colpisce il TFAP4, fattore di trascrizione *activating enhancer-binding protein 4*. (1)

Il mir-21 è un oncogeno la cui sovraespressione promuove la proliferazione delle cellule tumorali ma inibisce l'apoptosi. Esso bersaglia PDCD4 che ha il ruolo di oncosoppressore.(1)

Il miR-221 e miR-222 presentano una sovraespressione associata a maggiore invasività e a prognosi negativa nei pazienti affetti da cancro al seno. Essi favoriscono la proliferazione colpendo p27^{kip1} ed ERα, rispettivamente il regolatore del ciclo cellulare e il recettore degli estrogeni.(1)

Il miR10a modula EMT tramite EphA8, così regola la migrazione e invasione nel glioma.(1)

La famiglia dei miR-200 anch'essa regola EMT (*transizione epitelio-mesenchimale*) condizionando la proliferazione e apoptosi nelle cellule del cancro al seno.(1)

Il miR-7 presenta una sovraespressione che va ad eliminare la proliferazione e stimola apoptosi nelle cellule del cancro al seno; infatti, inibisce l'EMT e la metastasi delle cellule del tumore al seno operando sull'espressione della FAK (*focal adhesion kinase*). (1)

Il miR-15a e miR-16-1 agiscono sul gene anti-apoptotico BCL-2 portando apoptosi e inibendo la crescita delle cellule tumorali.(1)

1.4 REGOLAZIONE DELL'INVASIONE E DELLA METASTASI DELLE CELLULE DEL CANCRO AL SENO DA PARTE DEI miRNA

I miRNA svolgono anche un ruolo nell'invasione e nella metastasi delle cellule del cancro al seno. Essi agiscono da oncogeni o da oncosoppressori bersagliando mRNA che codificano per proteine importanti per l'adesione, migrazione e invasione cellulare. (1)

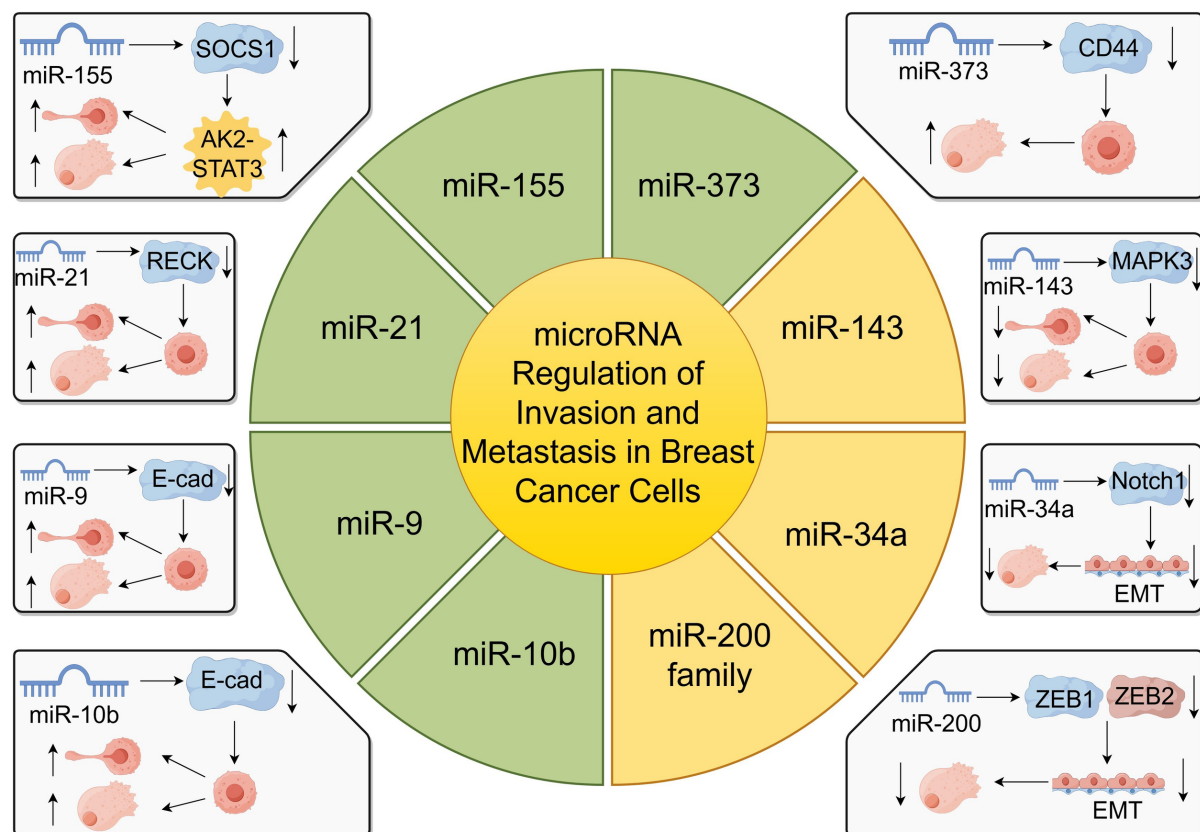


FIGURA 4 miRNA regulation of breast cancer cell invasion and metastasis (1)

Il miR-10b è il miRNA più studiato nelle metastasi del cancro al seno. Esso bersaglia, come dimostrato da Liu et al, E-cadherina, una proteina essenziale

nell'adesione cellula-cellula. La riduzione della sua espressione, quindi comporta un aumento della motilità cellulare, favorendo la diffusione delle metastasi. (1)

Il miR-9 bersaglia direttamente l'E-cadherina attivando la via del segnale della β -catenina, quindi promuove la metastasi. Esso, infatti, a livelli elevati è associato a stadi del tumore avanzati e a prognosi negativa per i pazienti. (1)

Il miR-21 bersaglia PTEN e RECK, geni soppressori tumorali. La sua sovraespressione favorisce l'invasione e l'aumento delle metastasi, quindi una prognosi sfavorevole. (1)

Il miR-155, anch'esso favorisce la metastasi, infatti, bersaglia SOCS1, attivando il segnale JAK2/STAT3 che incrementa la migrazione e l'invasione cellulare. (1)

Il miR-373 bersaglia geni essenziali nell'adesione cellulare e nel riarrangiamento del citoscheletro, aumentano l'invasione tumorale. Esso, quindi, bersaglia geni soppressori tumorali, identificandosi come promotore della metastasi. (1)

Il miR-143, invece, è sotto regolato nelle cellule del cancro al seno, per questo agisce come soppressore tumorale diminuendo la migrazione e l'invasione cellulare. Esso, infatti, sopprime la proliferazione cellulare e la metastasi bersagliando MAPK3. (1)

Il miR-34a anch'esso agisce come soppressore tumorale, bersagliando NOTCH1 e FRA-1, così riduce l'invasione e la metastasi delle cellule. (1)

La famiglia dei miR-200 funziona come soppressore della metastasi bersagliando i repressori trascrizionali ZEB1 e ZEB2 che sono regolatori dell'EMT, quindi, inibiscono la transizione epitelio-mesenchimale. (1)

Capitolo secondo

APPLICAZIONE DEI miRNA NELLA DIAGNOSI E NEL TRATTAMENTO DEL CANCRO AL SENO

2.1 miRNA COME BIOMARCATORI DIAGNOSTICI

I miRNA sono stati identificati come biomarcatori non invasivi ed efficaci per una diagnosi precoce del cancro al seno, migliorando la prognosi dei pazienti e il tasso di sopravvivenza; dato che i metodi diagnostici classici come la mammografia e la biopsia tissutale presentano dei limiti: invasività, costi, sensibilità e specificità non sufficienti. Questa proprietà è legata alla loro stabilità nei fluidi corporei che è assegnata alla loro incapsulazione all'interno di esosomi o all'associazione con proteine che legano l'RNA, proteggendoli, quest'ultima, dalla degradazione da parte delle RNAsi. (1)

I miRNA come potenziali strumenti diagnostici per il tumore al seno si distinguono in circolanti nel siero e nel plasma (1):

- **MIRNA CIRCOLANTI NEL SIERO**

miR-1246 e miR-1307-3p, unione di miRNA sierici che rilevano con efficacia il cancro al seno nelle fasi precoci.

miR-21 e miR-221 sovraespressi nei pazienti rispetto ai soggetti sani.

miR-17, miR-34a, miR-373 sono usati per controllare la progressione della malattia

miR-155 importante nella patogenesi del cancro

- **MIRNA CIRCOLANTI NEL PLASMA**

miR-195 individuato nel sangue dei pazienti con il cancro al seno.

miR-145 e miR-451 biomarcatori per rilevare la malattia.

Nonostante questi ottimi risultati, ci sono, però delle sfide da affrontare nella traduzione dei biomarcatori nella parte clinica. La variabilità nell'espressione dei miRNA dovuta al processamento dei campioni, all'eterogeneità dei pazienti e ai metodi di rilevazione può influenzare la riproducibilità. Di conseguenza, per confermare l'utilizzo clinico dei miRNA come biomarcatori diagnostici è fondamentale svolgere protocolli standardizzati e studi di validazione su larga scala. (1)

2.2 RILEVAMENTO NEL SANGUE DEI miRNA

I miRNA, come spiegato nel paragrafo precedente, sono emersi come promettenti biomarcatori per la diagnosi precoce e per monitorare il cancro al seno, grazie alla loro stabilità nei fluidi corporei. Perciò, per poter rilevare questi miRNA che circolano nei campioni di sangue, sono state sviluppate varie tecniche analitiche; quelle più comunemente utilizzate sono: qRT-PCR, MICROARRAY, NGS. (5)

- **qRT-PCR = PCR QUANTITATIVA IN TEMPO REALE**

La PCR QUANTITATIVA IN TEMPO REALE è un'importante evoluzione della tecnica di PCR, prevede la trascrizione inversa dei miRNA in cDNA associata all'amplificazione tramite primer specifici. Essa permette il rilevamento e la misurazione affidabili dei prodotti generati durante ogni ciclo del processo di PCR. Questa tecnologia è possibile grazie all'introduzione di una sonda oligonucleotidica predisposta ad ibridarsi all'interno della sequenza bersaglio. Questa sonda viene scissa durante la PCR per mezzo dell'attività nucleasica 5' della Taq Polimerasi e così utilizzata per rilevare l'amplificazione del prodotto specifico del bersaglio. (4)

COME FUNZIONA:

TaqMan® Applied Biosystems

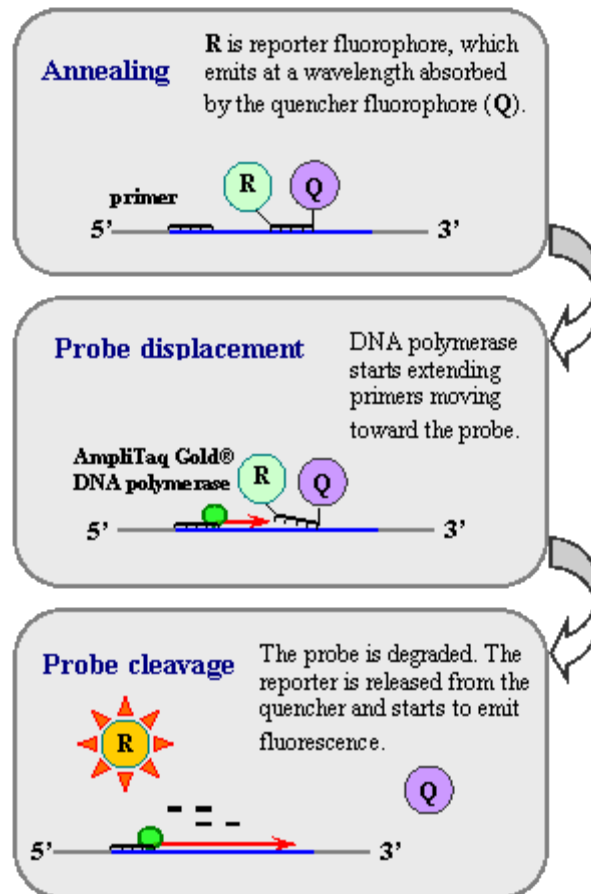


FIGURA 5 TaqMan Applied Biosystem (4)

Le tecniche per monitorare il degrado della sonda sono (4):

- ✓ intercalazione di coloranti che si legano al DNA a doppio filamento
- ✓ etichettatura della sonda 3' P
- ✓ etichettatura della sonda con fluorescenti

TaqMan, il cui nome deriva dalla DNA POLIMERASI TAQ, è stato uno dei primi metodi per il monitoraggio in tempo reale delle reazioni di PCR ed è stato utilizzato sia per la quantificazione degli mRNA che per il rilevamento delle

varianti. Il metodo sfrutta l'attività endonucleasica 5' della DNA POLIMERASI TAQ per scindere una sonda oligonucleotidica durante la PCR, generando così un segnale rilevabile. Le sonde sono marcate fluorescentemente all'estremità 5' e non sono estendibili all'estremità 3' mediante modificazione chimica. La specificità è conferita a tre livelli: tramite due primer PCR e la sonda. (4)

L'applicazione della RT-PCR quantitativa in tempo reale (4):

- ✓ quantificazione relativa e assoluta dell'espressione genica
- ✓ validazione dei risultati del microarray di DNA
- ✓ analisi delle varianti, inclusa l'identificazione e la validazione degli SNP (POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE)
- ✓ conteggio della carica batterica, virale o fungina

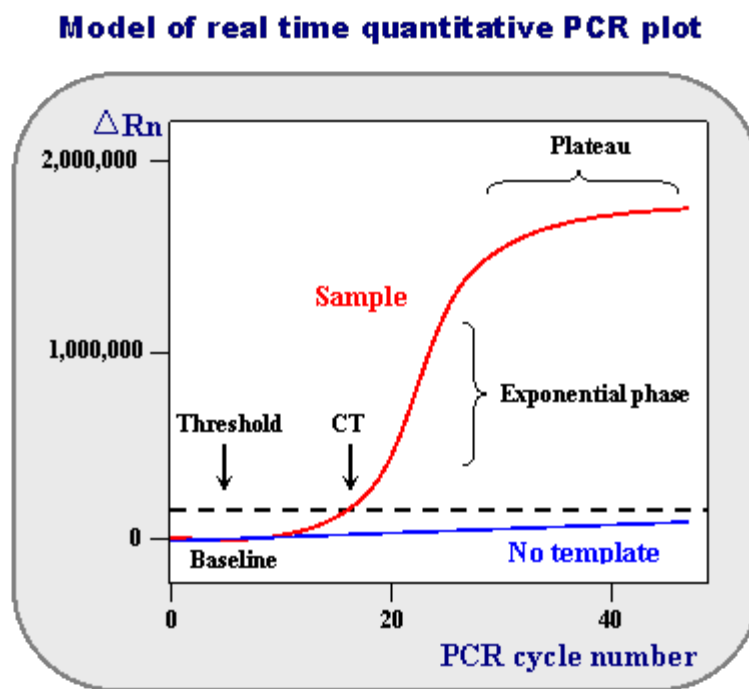


FIGURA 6 Model of real time quantitative PCR plot (4)

BASELINE: cicli di PCR in cui si accumula un segnale fluorescente reporter ma è al di sotto dei limiti di rilevamento. (4)

ΔRn : incremento del segnale di fluorescenza in ogni punto temporale. I suoi valori sono rappresentati graficamente in funzione del numero dei cicli. (4)

THRESHOLD: livello arbitrario di fluorescenza in base alla variabilità della linea di base. Un segnale al di sopra della linea di base è considerato un segnale reale che può essere utilizzato per definire il ciclo di soglia (CT) per un campione. La soglia può essere regolata per ogni esperimento in modo che si trovi nella regione di amplificazione esponenziale. (4)

CT: numero frazionario di cicli di PCR in cui la fluorescenza del reporter è maggiore della soglia. È un principio fondamentale della PCR in tempo reale ed è essenziale per la produzione di dati accurati e riproducibili. (4)

- **PIATTAFORME MICROARRAY:**

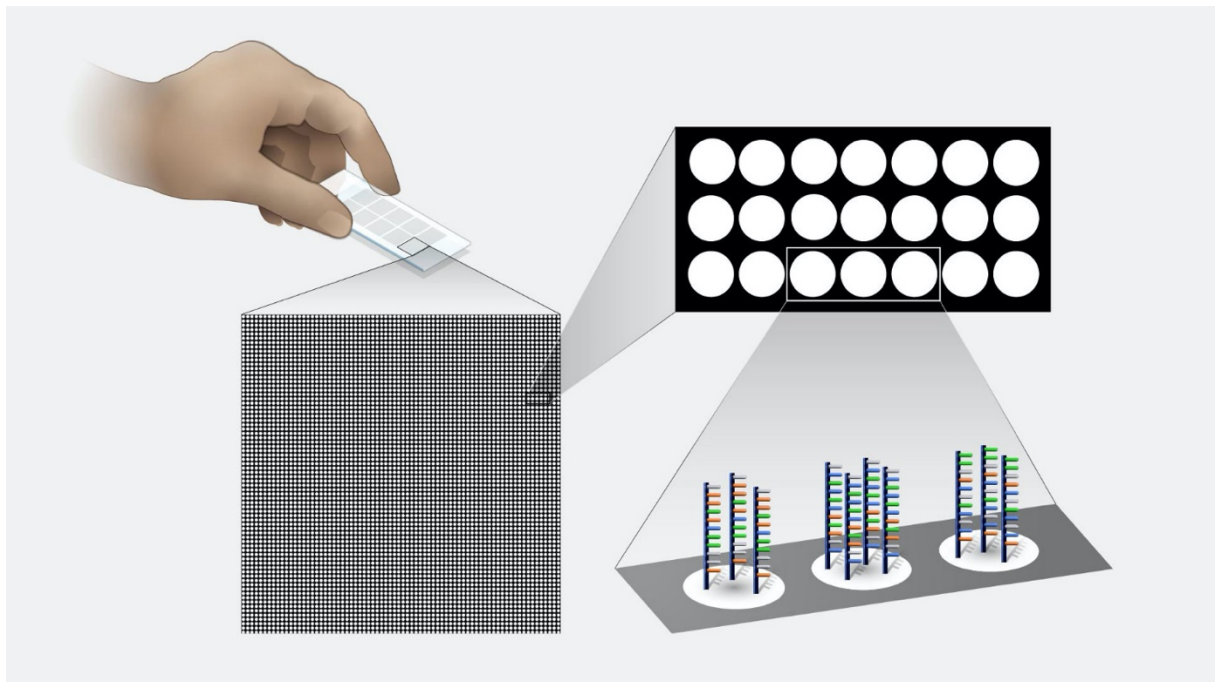


FIGURA 7. Microarray technology (5)

La tecnologia del microarray consente in laboratorio il legame di una serie di migliaia o milioni di frammenti di acidi nucleici su un “chip”, ossia una base solida. Esso viene immerso, quindi, in DNA o RNA isolati da cellule o tessuti (campione di studio). Viene prodotta luce tramite fluorescenza, grazie l'appaiamento complementare delle basi tra il campione e i frammenti immobilizzati sul chip ed è rilevata attraverso l'utilizzo di un apparecchio

specializzato. Questo metodo viene usato per vari motivi nella ricerca e negli studi clinici; infatti, riesce a rilevare simultaneamente centinaia di miRNA fornendo un profilo completo di espressione. Dunque, da un lato si può analizzare l'espressione genica, cioè la quantità di RNA prodotta da un determinato gene presente nella cellula, invece, dall'altro si possono studiare con facilità i polimorfismi a singoli nucleotidi (SNP). Tutte e due i metodi sono utilizzati per poter analizzare le principali malattie umane. (5)

- SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)

Il sequenziamento di nuova generazione detto anche sequenziamento massivo di parallelo, è una tecnologia di sequenziamento avanzata con la quale molteplici molecole di DNA vengono sequenziate nello stesso momento; poi queste molecole di DNA vengono assemblate comparando la loro sequenza con quella di riferimento, riuscendo così a rilevare l'intera sequenza di DNA che può essere molto lunga tanto quanto il nostro genoma. Ci sono diverse piattaforme per poter eseguire NGS e ognuna di esse utilizza una tecnica diversa per ottenere il sequenziamento del DNA. Un esempio è la tecnologia di terminatori reversibili impiegata da ILLUMINA. In questo metodo il DNA viene prima frammentato in dimensioni più piccole e due molecole brevi di DNA chiamate "Adattatori" vengono ligate ad ogni estremità del campione. Essi funzionano come siti di aggancio del primer per amplificare il DNA durante la PCR e legarlo alla cella di flusso. Le molecole di DNA marcate con gli adattatori e i primer vengono prima fissate a una cella di flusso, ossia una piastra e amplificate tramite la DNA POLIMERASI sviluppando colonie locali di DNA clonato, dette anche DNA CLUSTER, ognuno di essi presenta la stessa sequenza di DNA. In maniera simile alla tecnica per il sequenziamento di prima generazione, i nucleotidi vengono etichettati individualmente con un fluorescente; dopo che è stato aggiunto il nucleotide l'elongazione si blocca e viene scattata una foto, successivamente il bloccante all'estremità 3' viene rimosso chimicamente dal DNA, e così inizia un nuovo ciclo di aggiunta di nucleotidi.

Non appena il DNA viene estratto, esso deve essere elaborato e preparato per il sequenziamento attraverso dei passaggi che preparano il campione: frammentazione, riparazione delle estremità, adenilazione, ligazione degli adattatori, amplificazione tramite PCR. Essi sono seguiti dalla generazione dei

cluster e dal processo di sequenziamento, che produce un miliardo di letture ad ogni esecuzione.

Infine, il sequenziamento di nuova generazione è una tecnica ottima per diverse applicazioni come l'analisi dell'espressione genica, il rilevamento delle aberrazioni genetiche come le mutazioni e riarrangiamenti cromosomici. (6)

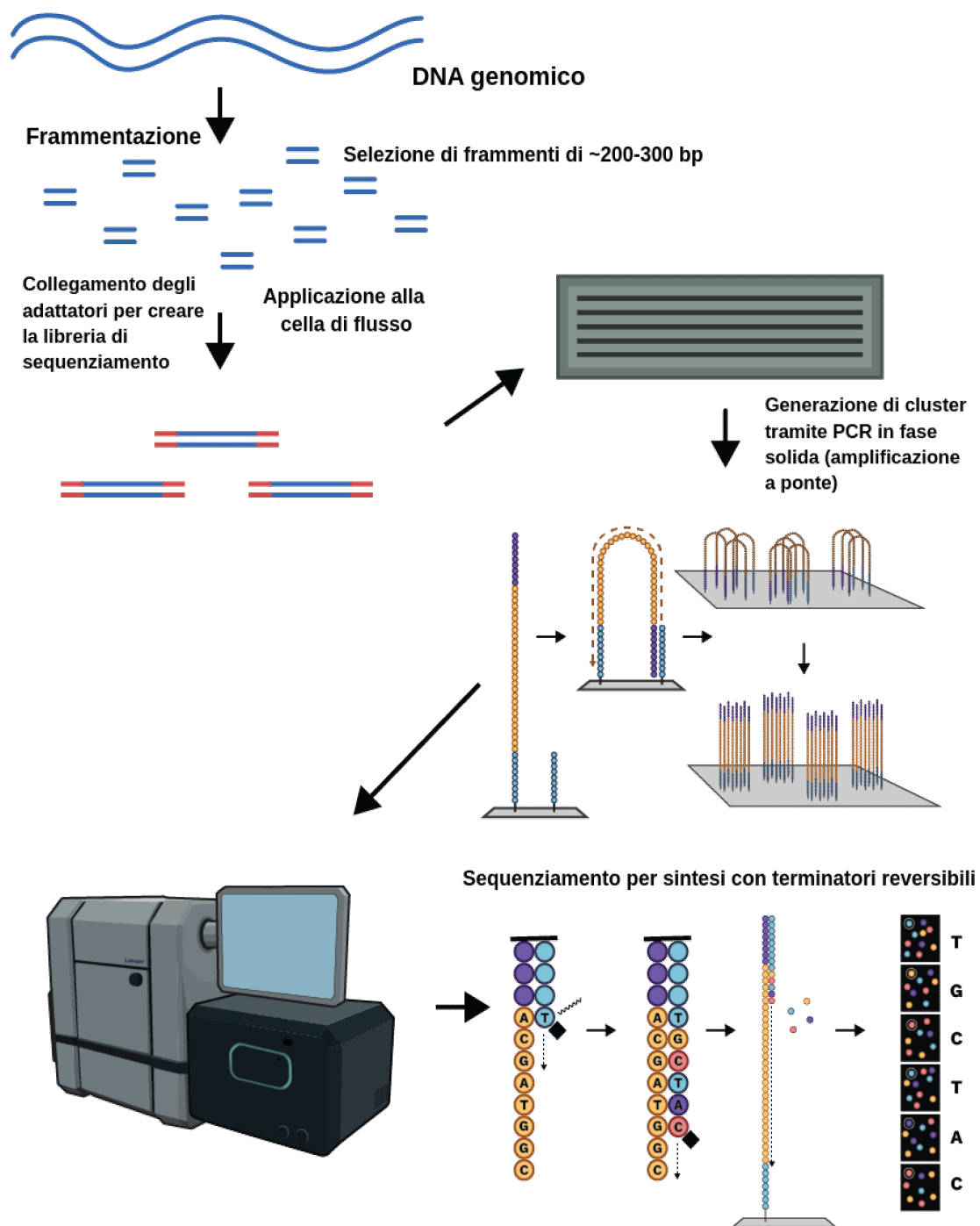


FIGURA 8 procedura di svolgimento della NEXT GENERATION SEQUENCING utilizzando la tecnologia ILLUMINA (6)

Nonostante il rilevamento dei miRNA circolanti nel sangue, quindi, rappresenta una promettente strategia per lo sviluppo di strumenti diagnostici non invasivi nel cancro al seno, comunque, esso presenta delle sfide da affrontare: la bassa abbondanza dei miRNA in circolazione che richiede metodi di rilevamento altamente sensibili e la presenza di emolisi che può rilasciare miRNA intracellulari delle cellule del sangue confondendo i risultati. (6)

2.3 STRATEGIE TERAPEUTICHE MIRATE AI miRNA

I miRNA disregolati nel cancro al seno sono stati la causa dello sviluppo di strategie terapeutiche mirati ai miRNA, per ripristinare la funzione normale dei miRNA o inibire gli oncomiR. (1)

La **terapia di sostituzione dei miRNA** prevede il ripristino dell'espressione genica dei miRNA soppressori tumorali che sono sottoregolati nelle cellule cancerose. Ad evidenziare questo potenziale della terapia di sostituzione sono i miRNA sintetici (mimics) progettati per replicare la funzione dei miRNA endogeni. Il ripristino di miR-34a, noto soppressore tumorale, presenta effetti antitumorali significativi nei modelli preclinici di cancro al seno. (1)

Il primo miRNA mimic usato negli studi clinici è stato **MRX34**, una formulazione liposomiale di miR34a. Quest'ultimo è un soppressore tumorale che viene perso o espresso a livelli ridotti in un'ampia gamma di tumori. Lo studio di fase 1 ha dato indicazioni importanti sulle sfide e considerazioni legate alla terapia con miRNA, nonostante gli eventi avversi al sistema immunitario. In questo studio di fase 1, il primo sull'uomo, di una terapia antitumorale basata sui microRNA, è stata determinata e valutata la dose raccomandata per la fase 2

(RPD2) di MRX34, in pazienti affetti da tumori solidi in stadi avanzati. Quindi, l'introduzione di un miRNA mimetic per ripristinare la funzionalità di un oncosoppressore la cui espressione è persa o ridotta nel tumore è un approccio terapeutico attualmente oggetto di valutazione. (7)

METODI

Pazienti e progettazione dello studio

I pazienti avevano un'età pari o superiore ai 18 anni e presentavano tumori solidi refrattari per i quali non esisteva un trattamento standard. In questo studio clinico di Fase 1 i pazienti hanno ricevuto, con aumento/espansione della dose, MRX34 due volte a settimana per 3 settimane in un ciclo di 4 settimane (BIW), pazienti nella Repubblica di Corea e negli Stati Uniti sono stati arruolati in coorti di aumento della dose di 3+3. In questa parte finale dello studio, MRX34 è somministrato per via endovenosa quotidianamente per 5 giorni insieme a una premedicazione con Desametasone (DEX) due volte al giorno (BID) per 7 giorni nella settimana 1, seguita da 2 settimane di riposo in cicli di 3 settimane. Il protocollo è stato modificato, sulla base della tossicità immuno-mediata, inclusi sia gli eventi avversi collegati all'infusione che quelli successivi osservati con lo schema BIW, per richiedere una premedicazione con DEX 10 mg BID nel primo ciclo, che poi poteva essere ridotta nei cicli successivi. Ogni dose di MRX34 è stata infusa in 2-4 ore con una pompa a infusione controllata senza filtrazione.

La dose di MRX34 è stata aumentata da 50 a 70, 93 e infine 110 mg/m². Le coorti di espansione sono state arruolate alle dosi raccomandate per la fase 2 (RPD2) identificate, che erano diverse per i tumori HCC e non-HCC. Alla fine di maggio 2016, il protocollo è stato nuovamente modificato per consentire un periodo di induzione di tre cicli seguito da un periodo di osservazione senza trattamento, con l'intento di mitigare qualsiasi attenuazione delle risposte immunitarie antitumorali associate al desametasone (DEX) innescata da MRX34.

Lo studio, però, è stato interrotto prima che venisse completamente esplorato lo schema. Il primo obiettivo era determinare RPD2, gli obiettivi secondari

includevano valutazioni di sicurezza e tollerabilità, farmacocinetica (PK), farmacodinamica e attività clinica. (7)

Valutazione dello studio

Tutti i pazienti trattati con MRX34 sono stati valutati per la sicurezza con gli eventi avversi. Gli eventi avversi e le terapie concomitanti sono stati registrati a ogni visita del paziente, mentre le anomalie di laboratorio sono state registrate separatamente. Un evento avverso è stato considerato una tossicità dose-limitante (DLT) se si è verificato durante il ciclo 1, era clinicamente significativo, di grado 3 o 4 e correlato al trattamento in studio. Nausea, vomito, diarrea o sindrome da rilascio delle citochine (CRS) di grado 3 correlati a reazioni all'infusione o associati a profilassi subottimale e altri trattamenti di supporto non sono stati considerati DLT. L'attività antitumorale è stata valutata mediante TC o RM eseguite allo screening, al termine del ciclo 2 e successivamente dopo ogni ciclo pari. Se si fosse riscontrato una risposta sarebbe stata eseguita una valutazione radiografica di follow-up a distanza di almeno 4 settimane (> 28 giorni) per conferma. (7)

Farmacocinetica

I campioni di sangue per l'analisi farmacocinetica di MRX34 somministrato secondo lo schema di trattamento giornaliero alternativo (QDx5) sono stati raccolti nel ciclo 1 prima dell'infusione e in diversi momenti dopo l'infusione nei giorni 1-5, e poi una volta al giorno nei giorni 6, 7,8 e 15. Le concentrazioni del mimetico miR-34a estratto dai campioni di sangue sono state misurate mediante un test di ibridazione-ELISA. I parametri farmacocinetici sono stati stimati dai profili di concentrazione ematica in funzione del tempo utilizzando un software commerciale e un modello non comportamentale. (7)

Farmacodinamica

Negli studi farmacodinamici pianificati, i globuli bianchi sono stati isolati dal sangue intero raccolto dai pazienti a ciascun livello di dosaggio. I campioni di globuli bianchi sono stati raccolti prima della somministrazione e in cinque diversi momenti, fino a 150 ore dopo la somministrazione di MRX34. L'RNA nei globuli bianchi è stato isolato e la sua qualità è stata valutata. I campioni di RNA, quindi, sono stati misurati e confrontati per l'espressione pre e post MRX34 di geni bersaglio diretti selezionati di miR-34a utilizzando sia qRT-PCR che sequenziamento di nuova generazione (NGS). Per il test NGS, la caratterizzazione dell'RNA e la profilazione molecolare sono state eseguite tramite selezione del poli(A) e RPKM (Reads per kilobase of transcript per milion mapped reads) è stato utilizzato per determinare i livelli di espressione genica relativi. Per determinare l'effetto globale del trattamento con MRX34 sull'espressione genica, è stata eseguita un'analisi di arricchimento valutando gli mRNA che trasportano presunti siti di legame per miRNA che risultavano significativamente arricchiti tra i trascritti downregolati 24 ore dopo con il trattamento di MRX34. Il set di dati per quest'analisi consisteva in dati provenienti da 70 campioni di tutte le coorti (33-100mg/m²), ma è stato limitato a 14.000 mRNA che mostravano un'espressione media di >0,5 RPKM trasformato in log. Inoltre, è stato sviluppato un metodo di colorazione con ibridazione in situ cromogenica (CISH) per visualizzare la localizzazione cellulare e subcellulare di miR34a in seguito al trattamento con MRX34, e tale metodo è stato applicato a biopsie epatiche pre e post trattamento a pazienti affetti da vari tipi di tumore in stadio avanzato.

In sintesi, i tessuti fissati con formalina e inclusi in paraffina su vetrini sono stati deparaffinati con xilene, lavati con etanolo al 70% e soluzione salina tamponata con fosfato, trattati con proteinasi k e disidratati con etanolo. I tessuti sono stati, quindi, incubati con una sonda di cattura specifica per miR-34a sotto un vetrino copraoggetti, risciacquati con tampone salino-citrato di sodio, marcati con anti-digossigenina e controcolorati con Fast Red.(7)

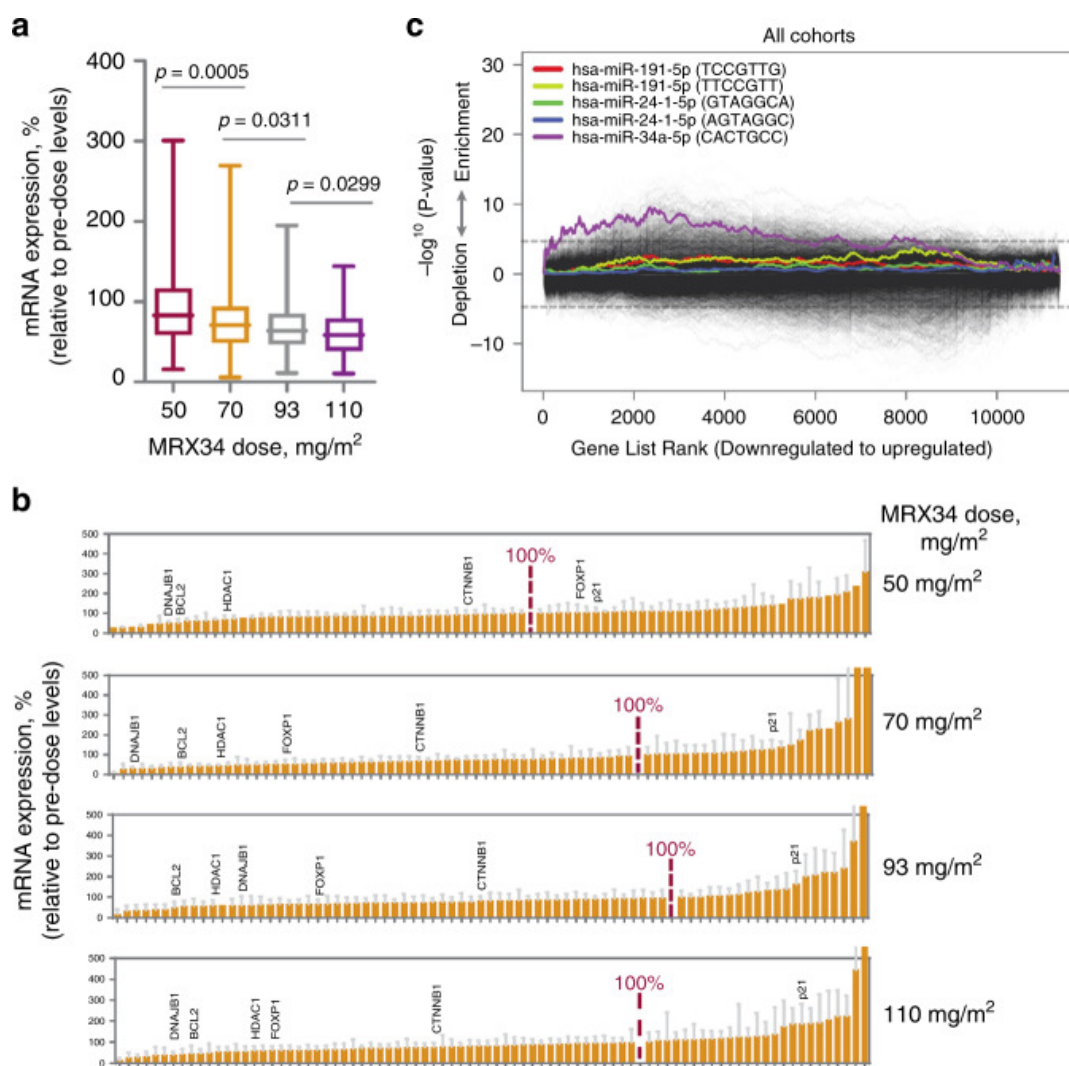


FIGURA 9. MRX34 pharmacodynamics (7)

Durante la valutazione preclinica di MRX34, è stata identificata una firma di mRNA a 5 geni come indicatore farmacodinamico molecolare nei globuli bianchi circolanti per la bioattività di MRX34 in vivo. Questi Mrna, BCL2, DNAJB1, CTNNB1, FOXF1 e HDAC1, presentano siti 3'UTR che sono bersaglio e repressi da miR-34. L'analisi qRT-PCR dell'RNA dei globuli bianchi nei campioni di sangue dei pazienti ha mostrato una down-regulation dei geni bersaglio di miR-34a che sembra essere dose-dipendente, e sia maggiore che più duratura a livelli di dose più elevati di MRX34 (Fig. A). Al contrario, i livelli di espressione di p21 (CDKN1A) un gene oncosoppressore specificatamente indotto da miR-34a, sono aumentati in modo dose dipendenti. Questi risultati sono confermati dalle analisi NGS (RNA-Seq) degli stessi campioni di globuli bianchi per quantificare

l'espressione di 99 geni bersaglio di diretti di miR-34 (Fig. B), e anche dall'analisi di arricchimento imparziale dei dati NGS (Fig. C). (7)

La colorazione CISH di biopsie epatiche pre e post-trattamento di pazienti con vari tipi di tumore ha mostrato un aumento di miR-34a nei tessuti tumorali dopo il trattamento con MRX34, localizzato nel citoplasma cellulare, verificando il rilascio miR-34a nel microambiente tumorale. (Fig. 10).(7)

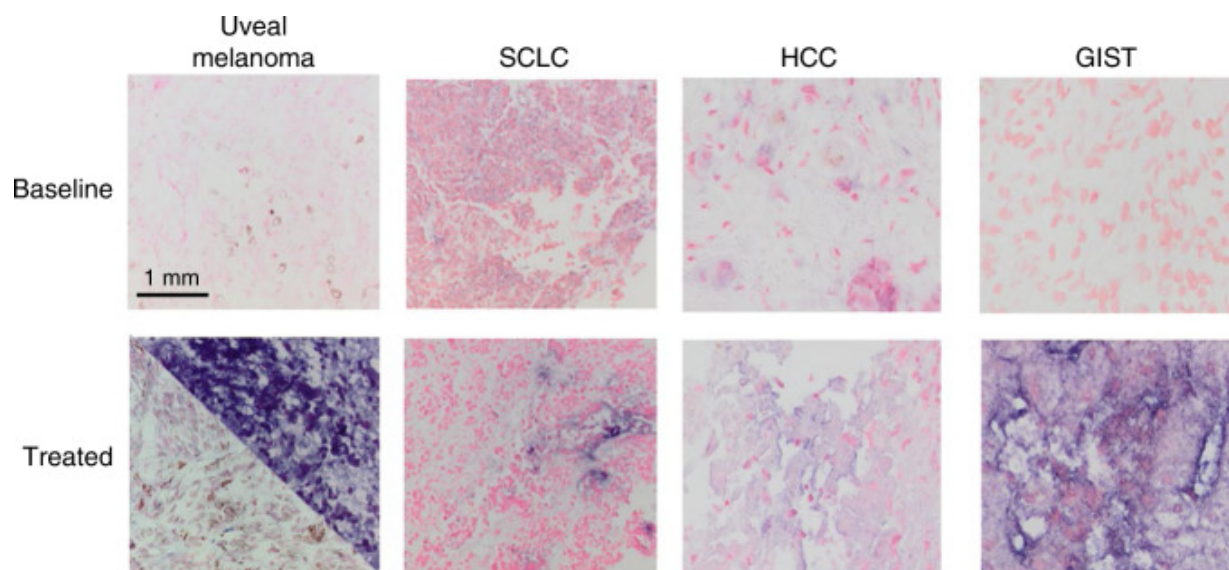


FIGURA 10. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) staining of pre- (baseline) and post-MRX34 treatment (treated) liver biopsies from patients with various advanced solid tumours (7)

Rispetto alla colorazione pre-trattamento, i risultati post-trattamento mostrano un aumento variabile della colorazione di miR-34a (blu/viola scuro) nel tessuto tumorale con localizzazione nel citoplasma cellulare. In tutti i casi, è stata eseguita una biopsia di una lesione epatica per l'analisi CISH. Melanoma uveale: la biopsia tumorale è stata eseguita 12 giorni dopo la prima dose (93 mg/m²), la biopsia ha mostrato un melanoma a cellule fusiformi (in basso) e a forma poligonale in alto (in alto). SCLC: la biopsia tumorale è stata eseguita 3 giorni dopo la somministrazione di MRX34 (93mg/m²). HCC: la biopsia tumorale è stata eseguita 3 giorni dopo la somministrazione di MRX34 (70 mg/m²). GIST: la biopsia tumorale è stata eseguita 4 giorni dopo la somministrazione di MRX34 (93mg/m²). (7)

RISULTATI

Gli eventi avversi comuni di qualsiasi causa osservati negli 85 pazienti includevano febbre (% di tutti i gradi/G3:72/4), brividi (53/14), affaticamento (51/9), dolore alla schiena/collo (36/5), nausea (36/1) e dispnea (25/4). La RP2D era di 70 mg/m² per il carcinoma epatocellulare (HCC) e di 93 mg/m² i tumori non-HCC. I risultati farmacodinamici hanno mostrato il rilascio di miR-34a ai tumori e la modulazione dose-dipendente dell'espressione del gene bersaglio nei globuli bianchi. Tre pazienti hanno avuto PR e 16 hanno avuto SD della durata di ≥ 4 cicli.(7)

CONCLUSIONE

Il trattamento con MRX34 premedicazione con desametasone ha dimostrato un profilo di tossicità gestibile nella maggior parte dei pazienti e una certa attività clinica. Sebbene lo studio sia stato interrotto precocemente a causa di gravi eventi avversi immuno-mediati che hanno causato la morte di quattro pazienti, la modulazione dose-dipendente dei geni bersaglio rilevanti fornisce una prova di principio per la terapia antitumorale basata sui miRNA.(7)

Gli **oncomiR** sono inibiti attraverso l'utilizzo di molecole in grado di legarsi specificatamente e inibire la funzione dei miRNA, quali gli oligonucleotidi antisenso (anti-miR), nucleotidi bloccanti (LNA) o spugne per miRNA.(1)

miR-21 è un oncomiR sovraespresso nelle cellule del cancro al seno ed è inibito mediante oligonucleotidi antisenso. Questo ha provocato la riduzione della crescita del tumore e un aumento dell'apoptosi negli studi preclinici.(1)

miR-155 un altro oncomiR, il cui targeting presenta favorevoli risultati nella riduzione della proliferazione e della metastasi del cancro al seno.(1)

Nonostante i risultati promettenti delle terapie mirate ai miRNA, ci sono delle sfide da affrontare come ad esempio, l'attivazione del sistema immunitario, effetti off-target e efficienza di veicolazione. Per migliorare l'efficacia dei miRNA nelle

terapie legate al cancro al seno, le strategie future potrebbero comprendere l'utilizzo di terapie combinatorie, approcci di medicina personalizzata e sistemi avanzati di veicolazione. (1)

2.4 EFFETTI SINERGICI DEI miRNA CON CHEMIOTERAPIA E RADIO-TERAPIA

I miRNA hanno un ruolo anche nell'influenzare in maniera significativa l'efficienza della chemioterapia e radioterapia nel cancro al seno variando punti importanti inclusi nella risposta ai farmaci e nella resistenza. Dunque, l'azione di specifici miRNA mostra una strategia promettente per migliorare gli esiti terapeutici e per superare la resistenza. I miRNA possono influenzare la risposta terapeutica mediante diversi meccanismi:

La regolazione dell'apoptosi, ad esempio miR-34a, un miRNA che promuove l'apoptosi in risposta a danni al DNA indotti da chemioterapia e radioterapia.

La modulazione dei trasportatori di farmaci, ad esempio miR-451 è implicato nella resistenza delle cellule del cancro al seno al farmaco chemioterapico doxorubicina. La sua sovraespressione nelle cellule MCF-7 aumenta la sensibilità alla doxorubicina attraverso il targeting della proteina della resistenza multi-farmaco MDR1. Invece, la sottoregolazione di miR-451 contribuisce alla chemioresistenza, avendo un ruolo nella modulazione della risposta ai farmaci.

Le vie di riparazione del DNA, ad esempio miR-21, che sovraespresso nel cancro al seno, è associato a prognosi sfavorevole e resistenza ai trattamenti. Inoltre, la sua sovraespressione promuove la proliferazione e metastasi delle cellule tumorali in vivo attraverso il targeting del Leucine zipper transcripton factor-like 1 (LZTFL1). Regola diversi target coinvolti nell'apoptosi e nella riparazione del DNA come PTEN e PDCD4, influenzando la risposta alla terapia.

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT), ad esempio miR-205 inibisce l'EMT, è un processo legato alla resistenza ai trattamenti.

Infine, miR-122 comporta l'inibizione della proliferazione cellulare e della tumorigenesi nel cancro al seno bersagliando il recettore del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1R), che è noto per conferire resistenza a chemioterapia e radioterapia.

Queste strategie terapeutiche da parte dei miRNA permettono di aprire nuove prospettive per trattamenti combinati. Infatti, in esse possono essere inclusi i miRNA mimici, soppressori tumorali che aumentano la sensibilità ai trattamenti, anti-miRNA che inibiscono l'espressione di oncomiR per ridurre la resistenza e biomarcatori per predire la risposta che comportano la profilazione dell'espressione dei miRNA per personalizzare i piani terapeutici.(1)

Capitolo terzo

VALUTAZIONE *PROGNOSTICA E CONTROVERSIE* *NELL'APPLICAZIONE DEI miRNA*

3.1 *miRNA COME BIOMARCATORI PROGNOSTICI*

I miRNA circolanti nel siero e nel plasma sono emersi come biomarcatori prognostici minimamente invasivi; infatti, la loro espressione alterata nei tessuti tumorali e la loro presenza nei fluidi corporei permettono una previsione non invasiva della progressione della malattia e degli esiti dei pazienti. Questa circolazione stabile dei miRNA deriva dalla loro incapsulazione all'interno di esosomi o all'associazione con proteine leganti l'RNA. Inoltre, questo potenziale dei miRNA come promettenti biomarcatori prognostici è emerso perché i fattori prognostici tradizionali come le dimensioni del tumore, lo stato dei linfonodi e l'espressione dei recettori ormonali non riescono ad afferrare la complessità della biologia del tumore. Ci sono diversi miRNA con significato prognostico identificati negli studi clinici:

miR-21, la sua sovraespressione è associata ad uno stadio tumorale avanzato, metastasi linfonodali e ridotti tassi di sopravvivenza. È considerato un biomarcatore prognostico importante perché promuove la proliferazione e inibizione dell'apoptosi.

miR-15, la sua sovraespressione è associata a fenotipi aggressivi del cancro al seno a esiti clinici sfavorevoli.

miR-210, correlato ad ipossia tumorale, condizione associata a prognosi sfavorevole e resistenza terapeutica.

miR-18a e miR-200c, correlati a maggiore aggressività tumorale e ridotta sopravvivenza globale.

Nonostante sia promettente questo ruolo dei miRNA come biomarcatori prognostici ci sono alcune sfide come la standardizzazione, la specificità e sensibilità, infine, la validazione su grandi coorti. (1)

3.2 LIMITI E CONTROVERSIE

L'applicazione dei miRNA mostra numerosi limiti e controversie collegati, ad esempio, ai meccanismi d'azione dei miRNA incerti e complessi; infatti, con precisione non sono chiare le loro funzioni biologiche. Un singolo miRNA può essere co-regolato da molteplici miRNA, lo stesso miRNA può svolgere ruoli opposti in diversi tessuti o stadi della malattia. Altre limitazioni sono nell'utilizzo dei miRNA come biomarcatori, in effetti, nonostante questo loro potenziale come indicatori della malattia, derivante dalla loro stabilità nei fluidi corporei, essi, comunque presentano il problema della standardizzazione dei metodi di rilevazione che non è stato risolto.

Un altro problema che non può essere tralasciato nel campo della ricerca sui miRNA è la frode accademica. Essa provoca una distorsione del reale valore dei miRNA come target diagnostici e terapeutici per il cancro al seno, dovuta a studi dove sono stati manipolati dati o falsificati i prodotti risultati; in questo modo si spreca risorse di ricerca e si hanno direzioni erranee per i successivi step della ricerca. Di fatto questi comportamenti possono mettere a rischio seriamente la credibilità della ricerca sui miRNA nella medicina di precisione per il cancro al seno e frenare il processo della ricerca di base alla traduzione clinica. Di conseguenza per fronteggiare queste frodi scientifiche nel campo della ricerca dei miRNA e per assicurare l'autenticità della ricerca sono necessari dei passi quali: un meccanismo di verifica dei dati, una standardizzazione dei metodi sperimentali e un rafforzamento della supervisione accademica.(1)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il carcinoma mammario è una delle neoplasie più complesse e più comuni tra le donne a livello mondiale; infatti, è una delle principali cause di mortalità tra tutti i tumori e coinvolge vari fattori, tra cui genetici, endocrini, ambientali e altri.

Questa sua elevata eterogeneità ha portato a varie sfide da affrontare che riguardano la diagnosi, il trattamento e la prognosi; perciò, è necessario l'utilizzo di biomarcatori e bersagli terapeutici in grado di migliorare i tassi di diagnosi precoci e risultati terapeutici nel cancro al seno. A tal proposito ci sono i miRNA che agiscono sia come oncosoppressori che come oncogeni. La loro disregolazione è collegata all'insorgenza, alla progressione, all'invasione e alla metastasi del tumore. I miRNA mostrano funzioni regolatorie nella proliferazione, nell'invasione, apoptosi e metastasi delle cellule neoplastiche. Un esempio è miR-10b che bersaglia l'E-cadherina, una proteina chiave per l'adesione cellulare, causando una riduzione dell'adesione e un aumento della motilità cellulare, facilitando la diffusione delle metastasi. Al contrario, la famiglia miR-200 regola i repressori trascrizionali ZEB1 e ZEB2, fungendo da soppressore. I miRNA, inoltre, grazie alla loro stabilità nei fluidi corporei sono circolanti nel siero e nel plasma; quindi, sono utilizzati come marcatori diagnostici per il carcinoma mammario, dato che i metodi diagnostici tradizionali presentano limiti. Un esempio è miR-1246 e miR-1307-3p riescono a rilevare in tumore al seno nelle fasi precoci. Inoltre, sono stati rilevati anche miR-21, miR-221, miR-195 diversamente espressi nei pazienti con tumore mammario. I miRNA possono fungere oltre che da biomarcatori diagnostici anche da biomarcatori prognostici, in particolare miR-21, miR-155 e miR-34 correlati nelle strategie terapeutiche. I miRNA, in aggiunta, possono interagire con chemioterapia e radioterapia, influenzando la risposta al trattamento e i meccanismi di resistenza. Un esempio è miR-451 sovraespresso nelle cellule MCF-7 aumenta la sensibilità alla doxorubicina, regolando la proteina nella resistenza multipla ai farmaci MDR1.

Pertanto, a causa della variabilità nella gestione dei campioni, dell'eterogeneità dei pazienti e dei metodi di rilevazione, la riproducibilità degli studi sui miRNA può risultare bassa. La ricerca futura dovrebbe affrontare problemi come la credibilità e il valore della ricerca dato che sono messi in discussione e la traslazione clinica che presenta sfide significative; quindi, con il proseguimento degli studi e il perfezionamento dei metodi analitici, i miRNA

potrebbero divenire rapidamente componenti integrali delle strategie terapeutiche adattate al tumore al seno, migliorando gli esiti dei pazienti attraverso una gestione più diretta ed efficiente. In conclusione, lo studio analizza i progressi più recenti nella ricerca sul ruolo dei miRNA nella diagnosi e nel trattamento del tumore al seno, focalizzandosi sulla loro applicazione come marcatori tumorali della risposta terapeutica e nella valutazione prognostica. Inoltre, analizza la parte clinica, quindi la profondità dei problemi che si hanno nel trasferire le tecnologie di rilevazione e le terapie mirate nella pratica clinica quotidiana, come la standardizzazione dei metodi di rilevazione, la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti, mostrando in questo modo indicazioni più specifiche nella parte clinica.(1)

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- 1) Xiao, Jinsuo & Zhang, Lanhui & Su, Ruifan & Zhao, Bo & Dang, Yuanyuan & Zhao, Chuanlin & Wang, Sujin & Qi, Teng & Ji, Fuqing. (2025). MicroRNAs in breast cancer—new frontiers in diagnosis, targeted therapy, and prognosis assessment. *Frontiers in Oncology*. 15. 10.3389/fonc.2025.1529907.
- 2) Finnegan, Emily F, and Amy E Pasquinelli. “MicroRNA biogenesis: regulating the regulators.” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* vol. 48,1 (2013): 51-68. doi: 10.3109/10409238.2012.738643
- 3) Ahmad J, Hasnain SE, Siddiqui MA, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. *Indian J Med Res*. 2013 Apr;137(4):680-94. PMID: 23703335; PMCID: PMC3724248.
- 4) Heid, CA,Stevens J, Livak, KJ, Williams, PM. 1996 Quantitative Real Time PCR. *Genome Res* 6:986-994. [PMID: 8908518](#)
- 5) <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Microarray-Technology>
- 6) https://theory.labster.com/it/next_generation_sequencing/
- 7) Hong, David S et al. “Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours.” *British journal of cancer* vol. 122,11 (2020): 1630-1637. doi:10.1038/s41416-020-0802-1