



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

**Corso di Laurea Magistrale  
In  
Biologia Molecolare e Applicata**

**STUDIO DELL'IPONATRIEMIA NEI PAZIENTI CON  
TUMORE AL POLMONE: RICERCA DI POTENZIALI  
BIOMARCATORI**

**STUDY OF HYPONATREMIA IN LUNG CANCER PATIENTS:  
RESEARCH FOR POTENTIAL BIOMARKERS**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:  
Eva Julie Obringer

Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa  
Rossana Berardi

Correlatore:  
Dott.ssa  
Elisa Ambrosini

Sessione Estiva  
Anno Accademico 2023/2024

# SOMMARIO

RIASSUNTO .....	1
1. INTRODUZIONE .....	4
1.1 Iponatriemia .....	4
1.1.1 Classificazione e diagnosi dell'iponatriemia .....	5
1.1.2 <i>ADH</i> e <i>SIADH</i> .....	9
1.1.3 Trattamento dell'iponatriemia e della <i>SIADH</i> .....	12
1.1.4 L'iponatriemia nei pazienti oncologici ed il suo possibile ruolo prognostico .....	15
1.2 Biomarcatori .....	17
1.2.1 I <i>micro-RNA</i> : biogenesi, funzioni ed applicazioni .....	18
1.2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide .....	21
1.2.3 Funzione ed applicazione degli <i>SNPs</i> .....	21
2. OBIETTIVO .....	23
3. MATERIALI E METODI .....	25
3.1 Pazienti .....	25
3.2 Analisi di genotipizzazione dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide .....	27
3.2.1 Estrazione del <i>DNA</i> da campioni <i>FFPE</i> .....	27
3.2.2 Estrazione del <i>DNA</i> da campioni di sangue intero mediante <i>Qiacube</i> .....	29
3.2.3 Valutazione della purezza del <i>DNA</i> estratto mediante <i>Nanodrop</i> .....	32
3.2.4 Quantificazione del <i>DNA</i> al <i>Qubit</i> .....	33
3.2.5 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide su campioni di <i>DNA</i> estratti da <i>FFPE</i> .....	35
3.2.6 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide su campioni di <i>DNA</i> estratti da sangue intero .....	37
3.3 Analisi di espressione dei <i>miRNA</i> .....	39
3.3.1 Raccolta dei campioni plasmatici .....	39
3.3.2 Estrazione dei <i>miRNA</i> da campioni di plasma .....	39
3.3.3 Sintesi del <i>cDNA</i> .....	41
3.3.4 Analisi di <i>Real-time PCR</i> per la valutazione della qualità dell' <i>iter</i> laboratoristico e del grado di emolisi dei campioni plasmatici .....	43
3.3.5 <i>Real-time PCR</i> per l'analisi di espressione dei <i>miRNA</i> .....	45
3.4 Analisi statistiche .....	47
4. RISULTATI .....	49
4.1 Risultati dei polimorfismi a singolo nucleotide .....	49
4.1.1 Studio e ricerca dei polimorfismi a singolo nucleotide .....	49
4.2 Risultati statistici della fase retrospettiva .....	54
4.2.1 Caratteristiche ed <i>outcome</i> clinici dei pazienti .....	54
4.2.2 Correlazione dello stato di natriemia con gli <i>outcome</i> clinici dei pazienti .....	55

4.2.3	Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con gli <i>outcome</i> clinici dei pazienti .....	56
4.2.4	Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con lo stato natriemico .....	61
4.2.5	Correlazione dei recettori della vasopressina con gli <i>outcome</i> clinici e lo stato natriemico dei pazienti.....	61
4.3	Risultati della fase prospettica .....	62
4.3.1	Caratteristiche ed <i>outcome</i> clinici dei pazienti .....	62
4.3.1	Correlazione dello stato di natriemia con gli <i>outcome</i> clinici dei pazienti.....	64
4.3.2	Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con gli <i>outcome</i> clinici e lo stato di natriemia dei pazienti .....	67
4.4	Risultati laboratoristici dei <i>miRNA</i> .....	69
5.	DISCUSSIONE .....	72
6.	BIBLIOGRAFIA.....	86
7.	RINGRAZIAMENTI.....	106

*Studio finanziato dal progetto PRIN (Progetti di ricerca di Rilevante Interesse*

*Nazionale) 2017.*

## RIASSUNTO

L'iponatriemia è una condizione definita da una concentrazione sierica del sodio inferiore a 135mmol/L e rientra tra i disordini elettrolitici più riscontrati nella pratica clinica. Presenta un'incidenza del 14% tra i pazienti ricoverati in ambito ospedaliero e del 24% durante la degenza. Questo disturbo, caratterizzato da una variegata sintomatologia, rappresenta per i pazienti oncologici un fattore prognostico negativo, in quanto risulta essere associato ad una minore sopravvivenza globale (OS), ad un'inferiore risposta alla terapia ed a una maggior durata complessiva dell'ospedalizzazione, con conseguente impatto sui costi a carico del Sistema Sanitario Nazionale (SSN).

Il presente studio, suddiviso in due fasi (retrospettiva e prospettica), ha l'obiettivo di valutare biomarcatori, tra cui *micro-RNA (miRNA)*, polimorfismi a singolo nucleotide (*SNPs*) e recettori della vasopressina: *Arginine Vasopressin Receptor 1A (AVPR1A)*, *Arginine Vasopressin Receptor 1B (AVPR1B)* e *Arginine Vasopressin Receptor 2 (AVPR2)*, potenzialmente correlabili con questo disturbo elettrolitico nei pazienti con tumore al polmone.

Inoltre, si è analizzato il loro possibile ruolo predittivo e prognostico, correlandoli con gli *outcome* clinici presi in esame, ovvero la sopravvivenza globale (*Overall Survival, OS*), la progressione libera da recidiva alla prima linea di trattamento (*Progression-Free Survival in the First Line Treatment, PFS1*), la progressione libera da recidiva alla seconda linea di trattamento (*Progression-Free Survival in the Second Line*

*Treatment, PFS2*) e la sopravvivenza libera da recidiva (*Relapse-Free Survival, RFS*) per la fase retrospettiva ed *OS*, sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival, PFS*) e la risposta al trattamento per la fase prospettica.

Nella prima fase di questo studio (retrospettiva) sono stati utilizzati campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*FFPE*) di 20 pazienti con tumore al polmone, 10 dei quali hanno sviluppato iponatriemia e 10 eunatriemici.

Su questi campioni tissutali sono state effettuate le analisi immunoistochimiche e quelle di genotipizzazione di 17 *SNP* relativi ai geni *Arginine Vasopressin (AVP)*, *AVPR1A*, *Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha (HIF-1 $\alpha$ )*, *Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)*, *Kinase Insert Domain Receptor (KDR)* e *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 4 (FLT4)*.

Nella fase prospettica dello studio, sono stati arruolati 100 pazienti con diagnosi di neoplasia polmonare, a cui sono stati prelevati, a 3 tempistiche differenti, campioni di sangue intero e sottoposti poi alle analisi di genotipizzazione mediante *Real Time PCR* e saggi *TaqMan*.

Inoltre, dalla relativa porzione plasmatica di tali campioni sono state eseguite delle analisi di espressione, tramite *Real Time PCR* e chimica del *SYBR Green*, di un *set* di *micro-RNA (miRNA)* potenzialmente correlato alla condizione di iponatriemia. Tale *set* di *miRNA* era stato precedentemente identificato mediante un'analisi di *miRNA-Sequencing* eseguita sui campioni della fase retrospettiva.

In conclusione, questa ricerca si propone di fornire ulteriori dati alla comunità scientifica in merito al valore prognostico e predittivo dell'iponatriemia nei pazienti con tumore al polmone.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Iponatriemia

L'iponatriemia, anche denominata iposodiemia è un disturbo elettrolitico caratterizzato da una concentrazione sierica del sodio  $< 135$  mmol/L<sup>1,2</sup> ed è causato da un effettivo *deficit* di sodio o da una emodiluizione per eccesso di liquidi nel comparto extracellulare<sup>3</sup>.

Questa condizione rappresenta uno dei disordini elettrolitici più riscontrati nella pratica clinica e si verifica nel 15-30% dei pazienti ospedalizzati<sup>4</sup>.

Il sodio è l'osmolita più rappresentativo del liquido extracellulare ed è implicato al centro di vari meccanismi omeostatici che regolano l'equilibrio idro-elettrico; il suo apporto fisiologico corrisponde a circa 130-260 mEq/die<sup>3</sup>.

Clinicamente, l'iponatriemia può essere suddivisa in acuta o cronica in base a se siano passate rispettivamente più o meno di 48 ore dalla documentata insorgenza<sup>5</sup>. Questa suddivisione spesso risulta difficile da effettuare, specialmente nei pazienti che si presentano al pronto soccorso, in quanto è solitamente complicato stabilire con certezza quando la concentrazione di sodio abbia iniziato a diminuire<sup>6</sup>. Nei casi in cui non è possibile definire se l'iponatriemia è acuta o cronica, questa viene considerata cronica, a meno che non ci siano delle altre ragioni per supporre il contrario<sup>6</sup>.

Distinguere tra iponatriemia acuta e cronica è molto importante soprattutto per la gestione del paziente a livello clinico. Nel primo caso, si ha infatti, un rischio maggiore di sviluppare edema cerebrale in quanto il cervello non ha il tempo di adattarsi quando

si viene ad instaurare un ambiente ipotonico (in cui la minore osmolarità extracellulare favorisce lo spostamento di acqua nelle cellule) e questo può portare a coma e morte<sup>3,6</sup>.

A seconda del livello di gravità, l'iponatriemia si può classificare in lieve (concentrazione di sodio sierico pari a 130-135 mmol/L), moderata (125-129 mmol/L) o severa (<125 mmol/L)<sup>6</sup>. La sintomatologia associata all'iponatriemia è variabile e dipende sia dal livello di gravità che dalla velocità con cui si modifica la concentrazione ematica di sodio<sup>7</sup>. Nei casi lievi-moderati, si riscontrano principalmente pazienti asintomatici, mentre nelle forme più severe si possono mostrare molteplici sintomi tra cui: malessere generale, cefalea, nausea, riduzione della capacità motoria e sintomi neurologici con un ampio grado di varietà, tra cui disturbi della parola, confusione e convulsioni, fino al coma<sup>6</sup>.

### **1.1.1 Classificazione e diagnosi dell'iponatriemia**

La diagnosi differenziale dell'iponatriemia viene formulata tenendo in considerazione differenti parametri, tra cui: l'osmolalità sia plasmatica che urinaria, da valutare a non più di 12 ore di distanza l'una dall'altra, e la sodiuria; talora può rendersi necessario il dosaggio di ormoni come quelli tiroidei dell'aldosteronemia ed un *test* di stimolazione rapida con l'*ACTH*<sup>2</sup>.

Uno degli aspetti più critici nel diagnosticare questo disturbo è la valutazione clinica dello stato di replezione dei liquidi corporei che comporta nel 50% dei casi una diagnosi sbagliata della condizione di iponatriemia<sup>2</sup>.



Un altro parametro che è necessario attenzionare è la presenza di una nefropatia, in quanto essa può complicare o confondere la diagnosi di iponatriemia dato che i reni perdono la capacità di regolare l'osmolarità urinaria e la sodiuria<sup>8</sup>.

Durante l'*iter* diagnostico, è importante effettuare un'anamnesi più completa possibile, tenendo in considerazione ad esempio l'eventuale assunzione di farmaci diuretici, (soprattutto nei pazienti anziani)<sup>2</sup>, oppure farmaci che stimolano l'attività dell'*ADH*, come alcuni chemioterapici e lassativi o l'eventuale presenza di patologie concomitanti<sup>2,8</sup>.

Sulla base dell'osmolalità, ossia la quantità di osmoliti attivi presenti nel siero, l'iponatriemia viene suddivisa in ipotonica, quando il valore di osmolalità del siero è inferiore a 275 mOsm/kg ed iponatriemia non-ipotonica, quando tale livello risulta superiore a 275 mOsm/kg<sup>9</sup>.

L'iponatriemia ipotonica, inoltre, sulla base del volume extracellulare del paziente, può essere sotto classificata in ipovolemica, euvolemica ed ipervolemica<sup>10</sup>.

La forma ipovolemica si manifesta a causa di una diminuzione dell'acqua e del sodio a livello corporeo, con un eccesso relativo nella perdita del sodio<sup>10</sup>. La perdita di soluti può essere legata a problematiche renali, quali nefropatie da perdita di sale o *deficit* di mineralcorticoidi, o non renali, come ustioni, eccessiva sudorazione, vomito e diarrea, spesso associate ad infezioni<sup>9,10</sup>. L'iponatriemia ipovolemica può essere secondaria all'utilizzo di farmaci diuretici; un esempio è rappresentato dai diuretici tiazidici che possono indurre uno squilibrio idro-elettrico<sup>2</sup>.

Anche la Sindrome da Perdita di Sali Cerebrale (*Cerebral salt wasting Syndrome; CSWS*) può essere causa di insorgenza di questo tipo di iponatriemia<sup>6</sup>; questa sindrome si verifica occasionalmente in pazienti affetti da patologie intracraniche e una serie di infezioni del sistema nervoso centrale come la poliomelite o la meningite tubercolare sono state collegate a questa condizione<sup>9</sup>.

I segni clinici dell'iponatriemia ipovolemica comprendono secchezza delle mucose, diminuzione del turgore cutaneo, tachicardia e aumento dei livelli di urea e creatinina nel siero<sup>10</sup>.

La forma euvolemica è la causa più comune ed eterogenea di iponatriemia tra i pazienti ospedalizzati ed è causata da un incremento di acqua corporea<sup>10</sup>. La causa più frequente di questa condizione è la Sindrome da Inappropriata Secrezione dell'Ormone Antidiuretico, patologia comunemente conosciuta come *SIADH (Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion)*<sup>10</sup>; (questo aspetto verrà approfondito nel sottocapitolo 1.1.2).

L'ultima tipologia di iponatriemia ipotonica è quella ipervolemica, che si verifica soprattutto in pazienti con uno scompenso cardiaco, malattia epatica avanzata o in caso di malattia a livello del rene<sup>9</sup>. In questa condizione, sia il sodio che l'acqua sono aumentati, ma l'incremento di acqua "prevale" su quello del sodio, con conseguente diluizione del plasma e livelli bassi di sodio<sup>10,11</sup>.

Per quanto concerne, invece, l'iponatriemia non ipotonica, esistono due forme: la pseudoiponatriemia e l'iponatriemia ipertonica<sup>6,10</sup>.

La prima, si manifesta tramite un'apparente diminuzione di sodio in corrispondenza dell'aumento della concentrazione plasmatica di sostanze ad alto peso molecolare come proteine e lipidi<sup>2,10</sup>; dunque, riducendosi il volume di acqua plasmatica, la natriemia misurata appare ridotta, nonostante sia l'osmolarità che la concentrazione del sodio nel plasma siano fisiologiche e spesso anche ottimali<sup>9</sup>.

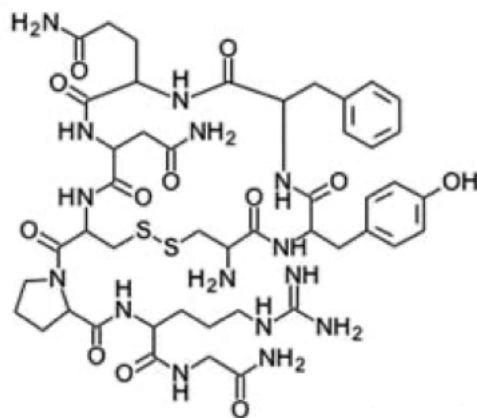
La seconda forma, ossia quella ipertonica, si verifica a causa di un'aumentata concentrazione di agenti osmotici attivi, come il mannitolo ed il glucosio, che non attraversando liberamente la cellula, richiamano acqua dal compartimento intracellulare a quello extracellulare, diluendo quindi il sodio presente<sup>9</sup>.

In genere, non si richiede il dosaggio di *ADH* perché innanzitutto, l'osmolalità urinaria riflette accuratamente l'attività della vasopressina e, pertanto, è possibile utilizzare questo parametro più facilmente disponibile<sup>5,12</sup>. Inoltre, la vasopressina è difficile da misurare in modo affidabile in laboratori non esperti, perché si lega alle piastrine, è instabile nel plasma e i *test* commerciali non sono molto sensibili per basse concentrazioni<sup>12</sup>. Queste limitazioni, tuttavia, potrebbero essere in gran parte risolte dallo sviluppo di un dosaggio per la coeptina, che è il frammento c-terminale che viene ottenuto in seguito al taglio enzimatico del precursore dell'ormone; essendo quindi presente nelle stesse concentrazioni dell'*AVP* ed essendo anche più stabile e più facilmente misurabile di quest'ultimo, la coeptina potrebbe fornire informazioni utili nell'ambito della valutazione clinica<sup>12,13</sup>.

Da quanto detto si deduce quindi che, avendo l'iponatriemia un'eziologia molto complessa, al momento della diagnosi è fondamentale raccogliere più informazioni possibili per ottimizzare il *management* e il trattamento del paziente che presenta tale disturbo elettrolitico<sup>2,7</sup>.

### 1.1.2 ADH e SIADH

L'ormone antidiuretico (*ADH*), anche chiamato Arginina Vasopressina (*AVP*), è un neuropeptide costituito da 9 amminoacidi con un ponte disolfuro tra i residui di cisteina<sup>14</sup> (**Figura 1**), sintetizzato dai neuroni del nucleo sopraottico e paraventricolare dell'ipotalamo ed il cui rilascio è controllato dal lobo posteriore dell'ipofisi, in risposta ad un'aumentata osmolarità del siero o ad una diminuzione nel volume sanguigno (volemia)<sup>14</sup>. Questo ormone contribuisce alla regolazione dell'equilibrio idrico dell'organismo, in quanto, in condizioni fisiologiche, aiuta a mantenere costante il volume plasmatico, favorendo il riassorbimento di acqua da parte dei reni<sup>14</sup>.



**Figura 1.** Struttura chimica della Vasopressina<sup>15</sup>.

I geni *AVPR* (*Arginine Vasopressin Receptor*) codificano per i recettori della vasopressina, di cui si distinguono 3 tipologie: *V1a*, *V1b* e *V2*<sup>16</sup>. Questi recettori appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (*G protein-coupled receptors, GPCRs*)<sup>16</sup>.

Il recettore *V1a* si trova in diverse tipologie di cellule e media l'effetto dell'*ADH* a livello cardiovascolare e regola la glicogenolisi, l'aggregazione piastrinica, l'ansia e lo stress<sup>16</sup>.

I recettori *V1b* si trovano prevalentemente nell'ipofisi anteriore e una loro stimolazione modula l'azione del fattore di rilascio delle corticotropine in risposta a stimoli di stress<sup>17</sup>.

Infine, i recettori *V2* sono localizzati sulla membrana basolaterale delle cellule dei dotti collettori a livello renale e nelle cellule endoteliali, dove la loro attivazione induce la secrezione del fattore di *Von Willebrand*<sup>17</sup>. Il legame dell'*AVP* al recettore *V2* induce l'attivazione di una proteina G che va a stimolare l'Adenilato Ciclastasi (*AC*), con conseguente aumento dell'Adenosina Monofosfato Ciclico (*cAMP*) e l'attivazione di una protein chinasi A (*PKA*)<sup>14,18</sup>. L'attivazione di queste molecole produce un segnale a cascata che porta ad una maggiore espressione e alla traslocazione dell'*AQP2* nella membrana apicale<sup>16</sup>; inoltre, si verificano molteplici eventi di fosforilazione che portano ad una maggiore permeabilità del canale dell'*AQP2*<sup>16</sup>. Oltre alla fosforilazione, l'*AQP2* subisce ulteriori modifiche *post-traslazionali*, tra cui l'ubiquitinazione e la glutationilazione, che, probabilmente, risultano essere fondamentali per il controllo della localizzazione cellulare, della stabilità e della corretta funzionalità di tale proteina<sup>15</sup>. Secondo studi recenti, sono state identificate altre proteine che partecipano

al controllo del traffico di *AQP2* dipendente dal *cAMP*, tra cui le *SNAP REceptor* (*SNARE*) e le proteine di ancoraggio della Chinasi A (*AKAP*)<sup>16,19</sup>.

La Sindrome da inappropriata secrezione di *ADH* (*SIADH*) rappresenta una condizione caratterizzata da iponatriemia ipotonica euvolemica e da una iperosmolarità urinaria dovuta al rilascio inappropriato di ormone antidiuretico, anche in assenza di stimoli<sup>20</sup>. Questa condizione è risultata essere la causa più comune di iponatriemia, sia nei pazienti ospedalizzati che in quelli ambulatoriali<sup>21</sup>; inoltre è responsabile del 5-10% di tutti i ricoveri ospedalieri, specialmente nelle unità neurochirurgiche<sup>4</sup>. Uno studio condotto da Cuesta e Thompson sui pazienti ricoverati all'Ospedale Beaumont di Dublino riporta che la *SIADH* è responsabile del 46% dei casi di iponatriemia<sup>4</sup>.

Le cause della *SIADH* sono molteplici: malattie che riguardano il sistema polmonare, neoplasie, disordini del sistema nervoso o l'utilizzo perpetuo di farmaci come antinfiammatori non steroidei o chemioterapici<sup>22</sup>. Inoltre, risulta essere una condizione comunemente riscontrata nei pazienti affetti da tumore al polmone, in particolar modo in quello a piccole cellule (*SCLC*)<sup>20</sup>. La *SIADH* può anche insorgere anche come sindrome paraneoplastica in diversi tipi di tumore, con una produzione ectopica di ormone antidiuretico<sup>22</sup>.

In base al rilascio anomalo di *AVP*, è possibile distinguere la *SIADH* in quattro differenti classi: A, B, C e D<sup>4</sup>.

La classe A rappresenta la categoria più comune di rilascio dell'*AVP* (40% degli affetti) ed è stata prevalentemente osservata nel cancro al polmone a piccole cellule (*SCLC*),

in quanto in questo caso, il tumore stesso può sintetizzare e secernere *AVP* nella sua forma attiva<sup>4</sup>. Quello che accade in questo *pattern* è la completa mancanza di correlazione fisiologica tra l'osmolalità e la concentrazione plasmatica di *AVP*<sup>4</sup>.

La classe B interessa solo una piccola parte di pazienti affetti da *SIADH* ed è caratterizzata da una soglia osmotica per la secrezione di *AVP* inferiore a quella fisiologica. Pertanto, sono percepiti come normali valori di sodiemia di 125-135 mmol/L. A valori superiori di questa soglia, viene mantenuta la relazione lineare tra osmolalità plasmatica e concentrazione plasmatica di *AVP*<sup>4</sup>.

La classe rappresentata dal *pattern* C, invece, rappresenta una forma molto rara di *SIADH*, in cui a livelli inferiori della soglia fisiologica, la secrezione di *ADH* non viene soppressa, probabilmente a causa di una disfunzione dei neuroni inibitori ipotalamici. Al di sopra di tale soglia, la correlazione lineare tra concentrazione plasmatica di *AVP* e osmolarità viene mantenuta<sup>4,14</sup>.

L'ultima classe, ossia la D, è una tipologia molto rara in cui vengono soddisfatti i criteri clinici per la diagnosi di *SIADH*, ma l'*AVP* non è rilevabile nel plasma; questo può essere spiegato da un'ipotetica secrezione di una sostanza antidiuretica, non ancora identificata, da parte delle cellule tumorali<sup>4</sup>. Inoltre, il sottotipo D, è stato recentemente associato alla presenza di mutazioni “*gain-of-function*” del recettore *V2*<sup>16</sup>.

### **1.1.3 Trattamento dell'iponatriemia e della *SIADH***

Per quanto concerne il trattamento dell'iponatriemia è opportuno stabilire se si tratta di una forma acuta, cronica, asintomatica o sintomatica<sup>9</sup>. Come è stato già descritto in precedenza, per differenziare l'iponatriemia cronica da quella acuta, si utilizza un

valore limite di 48 ore<sup>12</sup>. Questa classificazione è utile in quanto l'iponatriemia acuta può causare edema cerebrale a causa del tempo ridotto che hanno le cellule per adattarsi all'ambiente ipotonico, pertanto è consigliabile intervenire tempestivamente<sup>12</sup>. Allo stesso modo, nella condizione di iponatriemia cronica, sebbene le cellule abbiano avuto tempo di adattarsi a questa condizione, si può verificare la sindrome da demielinizzazione osmotica a causa di un eccessivo incremento della tonicità extracellulare a seguito del trattamento; dunque, risulta estremamente importante correggere la concentrazione di sodio in maniera graduale, specialmente nelle prime 24 ore<sup>12,23</sup>.

Per formulare al meglio una terapia è importante tener conto, innanzitutto, di eventuali condizioni predisponenti quali malattie croniche, assunzione di determinati farmaci o l'eventuale stato oncologico del paziente<sup>2,12</sup>.

Per quanto concerne l'iponatriemia acuta o sintomatica, sia le linee guida europee che statunitensi, raccomandano la somministrazione di soluzione salina ipertonica al 3%, volta ad incrementare il livello di sodio<sup>12,23</sup>. Questa tipologia di trattamento risulta essere efficace e potenzialmente salvavita in caso di edema cerebrale secondario all'iponatriemia<sup>12</sup>. Inizialmente, veniva usata la formula di Adrogé-Madias per poter stabilire la quantità necessaria di soluzione salina ipertonica utile a correggere questo disordine; sebbene questa formula sia piuttosto accurata, oggi si utilizza un bolo fisso, di 100mL (linee guida statunitensi) o di 150mL (linee guida europee) per evitare potenziali errori di calcolo<sup>12</sup>. Questo trattamento, di norma, viene sospeso quando si verifica una delle seguenti condizioni: il paziente diventa asintomatico o quando il



sodio raggiunge il livello fisiologico<sup>12</sup>. La raccomandazione principale è di continuare a monitorare il paziente così da evitare una ipercorrezione dell'iponatriemia<sup>12,23</sup>.

Il trattamento dell'iponatriemia cronica sia ipervolemica che per la *SIADH*, invece, si basa sulla restrizione dei fluidi; qualora questo trattamento fallisse, le linee guida statunitensi suggeriscono l'utilizzo dei vaptani, ossia una classe di farmaci che agisce bloccando i recettori della vasopressina di tipo 2 nelle cellule del dotto collettore, inducendo l'escrezione renale di sola acqua<sup>12,20</sup>. Un esempio di questi farmaci sono il *Tolvaptan* ed il *Conivaptan* (quest'ultimo ha anche come bersaglio i recettori della vasopressina di tipo 1)<sup>12</sup>.

Durante uno studio condotto da Berardi *et al.*, sono stati arruolati 90 pazienti oncologici (prevalentemente con cancro al polmone) provenienti da differenti ospedali, che hanno sviluppato *SIADH* tra il 2010 e il 2015, l'84% dei pazienti sono stati ricoverati in ospedale a causa della *SIADH* e il 41% di essi è stato trattato con il *Tolvaptan*<sup>25</sup>. In questo studio è emerso che la durata dell'ospedalizzazione per i pazienti che hanno assunto il farmaco è stata significativamente più breve, dunque l'utilizzo di farmaci adeguati, come in questo caso il *Tolvaptan* giova sicuramente sulla salute del paziente ed inoltre, riduce anche i costi apportati al Sistema Sanitario Nazionale<sup>25</sup>.

Relativamente alla *SIADH*, sia la linea guida europea che quella statunitense, suggeriscono un'interessante alternativa all'utilizzo di questa classe di farmaci, ossia l'urea, in quanto induce una diuresi osmotica andando ad aumentare l'escrezione renale di acqua<sup>12</sup>.

Il trattamento con l'urea, unito alla somministrazione di preparati orali antidiuretici a basso dosaggio di cloruro di sodio, nonostante il costo accessibile, ha mostrato però un'efficacia discutibile ed effetti collaterali gastrointestinali<sup>20</sup>.

Invece, per quanto riguarda l'iponatriemia ipovolemica, il trattamento consiste nella somministrazione di una soluzione isotonica (NaCl 0.9%)<sup>12</sup>.

#### **1.1.4 L'iponatriemia nei pazienti oncologici ed il suo possibile ruolo prognostico**

L'iponatriemia è una condizione molto frequente nei pazienti oncologici, infatti, il 14% di tutti i casi in *setting* ospedaliero è legato a questa situazione; inoltre, il 47% dei pazienti oncologici, alla prima ospedalizzazione, presenta iposodiemia e il 24% la sviluppa durante il periodo di degenza<sup>26</sup>. In generale, nei casi severi, questa problematica aumenta il rischio di mortalità, specialmente nei pazienti affetti da tumore e raddoppia quasi il periodo della degenza<sup>26</sup>.

La causa principale di questo disturbo elettrolitico nei pazienti oncologici è la *SIADH*, in quanto può insorgere anche come sindrome paraneoplastica in diversi tipi di tumore, con una produzione ectopica di ormone antidiuretico (*pattern A*)<sup>27</sup>.

Inoltre, l'iponatriemia nel paziente oncologico può essere correlata direttamente al cancro oppure alla terapia antitumorale e altri trattamenti secondari concomitanti o a comorbidità che spesso ne costituiscono la difficile gestione<sup>26</sup>.

Tra le varie tipologie di tumore, quelli al polmone, alla prostata, al fegato, al pancreas e ai reni, sembrano essere associati, con una frequenza elevata, a condizioni di iponatriemia moderata-grave<sup>22,27</sup>. Ad emergere maggiormente, tra le varianti tumorali

sopracitate, risulta essere il carcinoma polmonare a piccole cellule (*SCLC*), con una frequenza del 15%<sup>22</sup>.

I pazienti con diagnosi di tumore maggiormente esposti a questo disturbo sono i pazienti anziani (>65 anni), in quanto aumentano le alterazioni idro-elettrolitiche in relazione ai fisiologici cambiamenti nell'omeostasi degli elettroliti ed anche per la presenza di ulteriori patologie secondarie oppure a causa dell'utilizzo di farmaci diuretici<sup>5</sup>.

Studi recenti hanno suggerito che l'iponatriemia rappresenti un fattore prognostico negativo per i pazienti affetti da cancro, pertanto un'individuazione precoce, un attento monitoraggio ed una efficace gestione del paziente risultano di fondamentale importanza<sup>5</sup>.

Uno studio condotto da Petereit *et. al*, ha preso in esame 2048 pazienti affetti da cancro al polmone e 97 di essi presentavano iponatriemia. È stata osservata la sopravvivenza globale (*overall survival, OS*) e i dati derivati dallo studio confermano che l'*OS* è inferiore nei pazienti iponatriemici se posta a confronto con i pazienti eunatriemici<sup>28</sup>.

Hansen *et. al*, su una coorte di 453 pazienti con *SCLC* ha mostrato una sopravvivenza inferiore per i pazienti iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici di rispettivamente 7,2 e 11 mesi<sup>29</sup>.

In un ulteriore studio, sono stati analizzati 62 pazienti, 42 dei quali presentanti mesotelioma pleurico maligno avanzato dal punto di vista istologico. Tutti i pazienti hanno effettuato la chemioterapia e quello che è emerso è che l'insorgenza di

iponatriemia durante il trattamento è correlata ad un peggioramento della sopravvivenza globale mediana<sup>27</sup>.

## 1.2 Biomarcatori

Il termine “biomarcatore” fa riferimento ad un indicatore biologico che può essere messo in relazione con l’insorgenza o lo sviluppo di una patologia<sup>30</sup>. Un biomarcatore può essere distinto, in base al suo ruolo, in: diagnostico, prognostico o predittivo<sup>30,31</sup>.

Si definisce diagnostico quando risulta essere una caratteristica che distingue un individuo in base alla presenza o all’assenza di un preciso stato fisiologico o patologico<sup>30</sup>.

Un biomarcatore prognostico è capace di distinguere i pazienti per grado di rischio di insorgenza della malattia o in base alla progressione di un aspetto specifico della malattia<sup>30</sup>, mentre si utilizza il termine “predittivo” quando è possibile riconoscere i pazienti in base alla loro probabilità di risposta ad uno specifico trattamento o meno<sup>30</sup>.

Grazie alla loro scoperta, nel corso degli anni, sono stati fatti enormi passi in avanti per quanto concerne la diagnostica, la valutazione del rischio, la prognosi, l’efficacia del trattamento o la sua tossicità<sup>32</sup>.

L’obiettivo futuro è quello di mettere a punto dei metodi “*point-of-care*” per la diagnosi di patologie tumorali che comprendano solo *test* non invasivi e convenienti<sup>32</sup>.

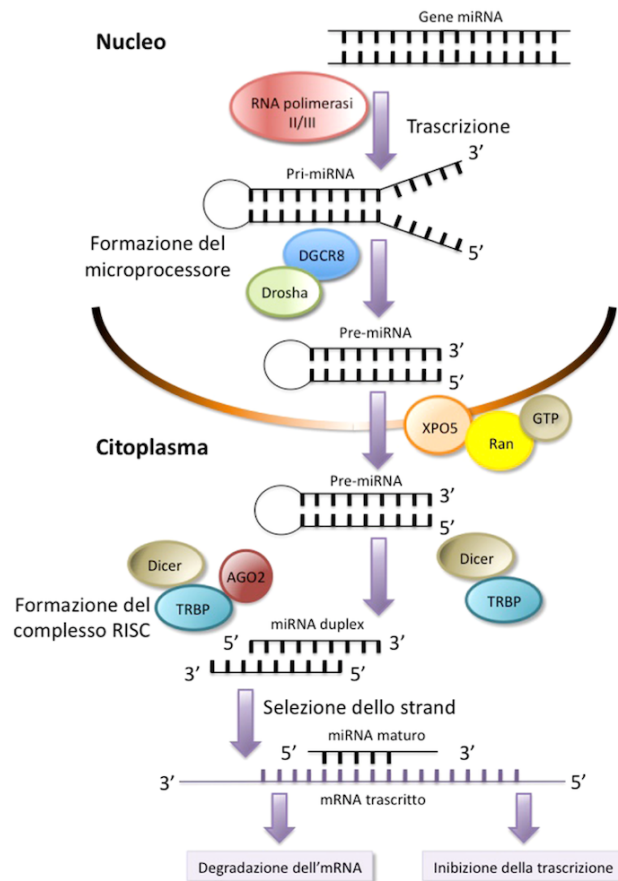
L’importanza dei biomarcatori in oncologia è stata solo recentemente riconosciuta, ma il loro impiego è stato cruciale nella diagnosi precoce del cancro, riducendo significativamente la mortalità causata dalla patologia stessa<sup>31</sup>.

Esempi di biomarcatori studiati ed analizzati in campo oncologico troviamo i *micro-RNA (miRNA)*<sup>33</sup> ed i polimorfismi a singolo nucleotide (*SNPs*)<sup>34</sup>.

### **1.2.1 I *micro-RNA*: biogenesi, funzioni ed applicazioni**

I *micro-RNA* sono piccole sequenze di *RNA* di circa 22 nucleotidi, organizzate in un singolo filamento. Non codificano per alcuna proteina, ma rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione genica; infatti, controllano circa il 30% dell'espressione dei geni a livello post-trascrizionale<sup>35,36</sup>. Il loro coinvolgimento nei processi biologici ha spinto i ricercatori di tutto il mondo ad investigarne gli aspetti molecolari, essi infatti possono funzionare come soppressori tumorali o oncogeni, favorire l'apoptosi selettiva, promuovere la differenziazione e regolare il ciclo cellulare<sup>35</sup>.

Queste piccole sequenze di *RNA* possono originarsi da una via biosintetica classica (**Figura 2**) oppure da *pathway* non canonici<sup>37</sup>. La via biosintetica classica dei *miRNA* inizia con la trascrizione dei corrispondenti geni ad opera dell'*RNA* polimerasi II in un *pri-miRNA*, avente una struttura a forcina (*stem-loop*) e che costituisce il trascritto primario del *miRNA*, con estensioni a singolo filamento al 3' e 5'<sup>36</sup>.



**Figura 2.** Illustrazione dei principali processi e delle molecole coinvolte nella biogenesi dei *MicroRNA*<sup>38</sup>.

Il trascritto primario viene processato da una *RNAsi* di tipo III (*Drosha*)<sup>39</sup>, aiutata anche da una proteina che ha il compito di legare il doppio filamento (*DGCR8*), che lo converte in un precursore definito *pre-miRNA*. Successivamente, il complesso Esportina-5-*Ran-GTP* trasporta il precursore nel citoplasma dove, grazie all'azione di un'altra *RNAsi* di tipo III (*Dicer*)<sup>40,41</sup>, viene tagliato in modo tale da perdere il *loop* terminale ed ottenere un *duplex*<sup>37</sup>. Il *duplex* formato viene accoppiato ad una proteina Argonauta (*AGO*)<sup>36</sup>, formando il complesso *mi-RISC* (*miRNA-induced silencing complex*) che possiede attività endonucleasica<sup>36</sup>. Solitamente, solo uno dei due

filamenti del *duplex* rimane ancorato al complesso (5p o 3p), ovvero il *guide strand* (filamento guida) che rappresenta il *micro-RNA* maturo<sup>40</sup>.

La scelta del filamento guida si basa sulla ridotta stabilità termodinamica al 5' e presenza dell'Uracile in posizione 1 al 5' in quanto questi aspetti permettono una maggiore associazione con le proteine *AGO*<sup>36</sup>.

Affinché i *miRNA* possano svolgere le loro funzioni, è importantissima la formazione del *miRISC*: all'interno di questo complesso, i *micro-RNA* vengono diretti verso specifiche regioni a livello del 3'-*UTR* degli *RNA* messaggeri e qui esercitano la loro attività di repressione post-trascrizionale, degradando o inattivando la traduzione<sup>37</sup>. Quindi i *miRNA* funzionano come dei “direttori d'orchestra”, silenziando l'attività di determinati geni e favorendone quella di altri<sup>42</sup>.

Per quanto concerne la biogenesi non canonica, essa può essere suddivisa in due vie: *Drosha/DGCR8*- indipendente e *Dicer*-indipendente<sup>37</sup>. Nella prima delle due vie i *pre-miRNA* prodotti, nonostante non abbiano subito il processamento da parte di *Drosha*, assomigliano ai substrati per *Dicer*; pertanto, questi possono essere direttamente esportati nel citoplasma ed entrare quindi nella via canonica. Un esempio di questi *pre-miRNA*, sono rappresentati dai mirtroni, che vengono prodotti dagli introni dell'*mRNA* durante lo *splicing*<sup>37</sup>.

La seconda via, ossia quella *Dicer*-indipendente, si basa sul processamento dei *miRNA* da parte di *Drosha* partendo da trascritti endogeni di *short hairpin RNA (shRNA)*<sup>37</sup>. Questi *pre-miRNA*, non essendo dei substrati idonei per *Dicer*, effettuano la loro

maturazione grazie da *AGO2* e possono diventare quindi maturi all'interno del citoplasma<sup>37</sup>.

### 1.2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide

I polimorfismi a singolo nucleotide (*SNPs*) consistono nella sostituzione di una singola base di *DNA*<sup>43</sup> e sono presenti nella popolazione con una frequenza allelica minore pari o superiore all'1%<sup>44</sup>. Essi costituiscono la più comune tipologia di variazione genetica riscontrata nell'uomo, rappresentando, il 90% di tutti i polimorfismi<sup>45</sup> e sono localizzati sia nelle regioni genomiche non codificanti che quelle codificanti<sup>46,47</sup>. Nell'uomo, la maggior parte dei polimorfismi a singolo nucleotide rientra nell'equilibrio di *Hardy-Weinberg (HWE)*, un principio fondamentale della genetica di popolazione secondo il quale i genotipi AA, AB e BB di un *marker* genetico di-allelico dovrebbero manifestarsi con una frequenza rispettivamente di  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$ , dove p e q indicano, nell'ordine, la frequenza dell'allele A e dell'allele B<sup>48</sup>.

### 1.2.3 Funzione ed applicazione degli *SNPs*

Gli *SNPs* possono causare variazioni missenso (25%) o silenti (25%)<sup>47</sup>: il primo caso determina un cambiamento della sequenza amminoacidica data dalla sostituzione di una singola base all'interno della sequenza nucleotidica, il secondo caso prevede che non si verifichi alcun effetto nella sequenza amminoacidica nonostante la medesima sostituzione<sup>46</sup>.



Gli *SNPs* possono essere responsabili della suscettibilità alle malattie, della risposta ai farmaci e dell'evoluzione del genoma; sebbene essi influenzino le funzioni geniche, molti di essi non risultano deleteri per gli organismi<sup>47</sup>. Negli ultimi anni, il mondo della ricerca ha intrapreso numerosi sforzi per sviluppare metodi di genotipizzazione degli *SNPs* e grazie a questi, oggi, è disponibile un'ampia collezione di *SNPs*<sup>47</sup> da poter usare come *markers* nello studio della genetica delle malattie oppure nello studio di reazione ai farmaci<sup>49</sup>.

## 2. OBIETTIVO

L'obiettivo del presente studio è quello di ricercare possibili biomarcatori correlati con la condizione di iponatriemia in pazienti affetti da carcinoma polmonare ed indagarne il loro possibile ruolo prognostico e predittivo.

Per giungere a questo obiettivo, è stato effettuato sia uno studio di 17 polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP*) localizzati nei geni *AVP*, *AVPR1A*, *HIF- $\alpha$* , *VEGF-A*, *KDR* e *FLT4*, mediante *Real-Time PCR* e saggi *TaqMan*, sia delle analisi di immunoistochimica dei recettori dell'*AVP* (*AVPR1A*, *AVPR1B* e *AVPR2*), che una valutazione dell'espressione di un *set* di *micro-RNA* (*miRNA*) mediante *Real-Time PCR* e chimica del *SYBR Green*.

Per la fase retrospettiva dello studio, sono stati utilizzati campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*Formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE*) di 20 pazienti con tumore al polmone, di cui 10 che hanno sviluppato iponatriemia e 10 eunatriemici.

In particolare, sui campioni di tessuto tumorale sono state effettuate le analisi immunoistochimiche e quelle analisi di genotipizzazione degli *SNP*.

Per quanto riguarda invece la fase prospettica, sono stati arruolati 100 pazienti con diagnosi di neoplasia polmonare, a cui sono stati prelevati campioni di sangue a diverse tempistiche di trattamento.

Tali campioni sono stati sottoposti alle analisi di genotipizzazione dei 17 *SNP* citati precedentemente. Inoltre, sulla relativa porzione plasmatica sono state condotte delle

analisi di espressione di un *set* di *miRNA*, potenzialmente correlato alla condizione di iponatriemia, che era stato identificato precedentemente nella fase retrospettiva del progetto mediante *miRNA-Sequencing*, confrontando sia campioni *FFPE* tumorali che peritumorali dei 20 pazienti.

Infine, mediante analisi statistiche, saranno effettuate delle correlazioni tra i biomarcatori analizzati in entrambe le fasi del progetto, lo stato natriemico e gli *outcome* clinici dei pazienti.

Questo studio si propone dunque di identificare dei biomarcatori utili dal punto di vista diagnostico e/o terapeutico, nonché di apportare nuovi risultati alla comunità scientifica, implementando le conoscenze che stanno alla base dell'iponatriemia in pazienti con tumore al polmone.

Attualmente, in letteratura, non ci sono evidenze di biomarcatori correlabili con l'iponatriemia nel tumore al polmone; pertanto, tale ricerca risulta di estrema importanza, soprattutto se si pensa al fatto che questo disturbo elettrolitico è correlato ad un aumento della morbilità e della mortalità nei pazienti oncologici, nonché della durata dei ricoveri negli ospedali<sup>2,9</sup>.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Pazienti**

Nella fase retrospettiva di questo studio, è stata presa in considerazione una casistica di 20 pazienti con carcinoma non a piccole cellule polmonari (*Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC*) composta da 10 pazienti eunatriemici e 10 che hanno sviluppato iponatriemia.

Le analisi di questa prima fase del progetto sono state eseguite sui campioni tumorali *FFPE* di questi pazienti. Tali campioni sono stati forniti dall'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche e sono stati raccolti dal 2004 al 2019.

Nella fase prospettica del progetto, dal 2020 al 2023 sono stati arruolati 100 pazienti consecutivi con diagnosi di neoplasia polmonare, sia con malattia localmente avanzata (stadio III) non operabili chirurgicamente al momento della diagnosi, sia pazienti con neoplasia metastatica (stadio IV). Per quanto concerne i trattamenti terapeutici, i pazienti sono stati sottoposti a chemioterapia, immunoterapia o una combinazione di entrambi. Nello specifico, i pazienti con stadio IIIB sono stati sottoposti a trattamento chemioterapico di induzione e radioterapia, concomitante o sequenziale, ed eventuale terapia di consolidamento con immunoterapia.

Di questi pazienti, è stato raccolto il sangue intero in provette dal tappo viola contenenti l'anticoagulante acido etilendiamminotetraacetico (*EthylenDiaminoTetracetyc Acid, EDTA*), da parte del personale infermieristico della Clinica Oncologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche in tre tempi successivi: al *baseline*, ossia prima

di iniziare l'*iter* terapeutico antitumorale (T0), prima dell'inizio del terzo ciclo di terapia (T1) e prima della rivalutazione strumentale della malattia, ovvero prima del quinto ciclo di trattamento (T2).

Per tutti i pazienti arruolati per il progetto sono stati raccolti i dati clinico-laboratoristici (compreso lo stato di natriemia), nonché i dati relativi alle caratteristiche istologiche, biomolecolari di malattia e agli *outcome* clinici.

Lo stato di natriemia è stato valutato nel periodo compreso tra il *baseline* ed il T2 ed i pazienti sono stati definiti iponatriemici qualora la concentrazione di sodio sierica fosse risultata pari o inferiore a 135 mEq/L.

Inizialmente, i pazienti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- Pazienti eunatriemici nell'intero periodo considerato;
- Pazienti con almeno una misurazione di iponatriemia nel periodo preso in considerazione.

Per quanto riguarda il gruppo degli iponatriemici, i pazienti sono stati successivamente sottoclassificati in:

- Pazienti eunatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2;
- Pazienti iponatriemici solo al *baseline*;
- Pazienti iponatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione Marche (*CERM*) in data 01/10/2020 (numero di riferimento: 2020 248).

## **3.2 Analisi di genotipizzazione dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide**

### **3.2.1 Estrazione del *DNA* da campioni *FFPE***

Per l'estrazione del *DNA* da campioni *FFPE* è stato utilizzato il *QIAmp DNA FFPE Advanced UNG kit (Qiagen)*, seguendo il seguente protocollo:

1. Inserire le sezioni *FFPE* in un'*eppendorf* da 1.5mL
2. Aggiungere 300µl di *Deparaffinization Solution*, agitare mediante *vortex* per 10 secondi e centrifugare brevemente;
3. Incubare a 56°C per 3 min e successivamente lasciare raffreddare a temperatura ambiente;
4. Aggiungere 25µl del *Buffer FTB*, 55µl di acqua *RNase-free* e 20µl di Proteasi K. Agitare mediante *vortex* e centrifugare brevemente;
5. Incubare per 1 ora a 56°C a 1000rpm e successivamente per 1 ora a 90°C;
6. Centrifugare brevemente per far cadere eventuali gocce di campione rimaste sulla parete delle provette;
7. Rimuovere accuratamente la fase blu che si è creata sovrastante e tenere il lisato acquoso sottostante;
8. Aggiungere 115µl di acqua *RNase-free* e 35µl di *UNG*, agitare mediante *vortex* ed incubare a 50°C per 5 minuti. Centrifugare brevemente;
9. Aggiungere 2µl di *RNase A*, agitare mediante *vortex* ed incubare a temperatura ambiente per 2 minuti. Centrifugare brevemente;

- 10.** Aggiungere 20µl di Proteasi K, agitare mediante *vortex* ed incubare per 15 minuti a 65°C a 450rpm. Centrifugare brevemente;
- 11.** Aggiungere 250µl del *Buffer AL* e 250µl di etanolo (96-100%) in ogni campione, agitare mediante *vortex* e centrifugare brevemente;
- 12.** Trasferire 450µl del lisato in una *QIAamp UCP MinElute column* e centrifugare a 15.000xg per 30 secondi;
- 13.** Trasferire la restante parte di lisato nella *QIAamp UCP MinElute column* e centrifugare a 15.000xg per 1 minuto. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
- 14.** Aggiungere 500µl del *Buffer AW1* in ogni colonnina e centrifugare a 15.000xg per 30 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
- 15.** Aggiungere 500µl del *Buffer AW2* in ogni colonnina e centrifugare a 15.000xg per 30 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
- 16.** Aggiungere 250µl di etanolo (96-100%) alla colonnina e centrifugare a 15.000xg per 30 secondi. Scartare il liquido ed il tubo di raccolta e mettere la colonnina in un nuovo tubo da 2mL. Centrifugare per 3 minuti alla massima velocità;
- 17.** Traferire la *QIAamp UCP MinElute column* in una nuova provetta da 1,5mL. Aliquotare 20-100µl del *Buffer ATE* al centro della membrana;
- 18.** Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
- 19.** Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto;
- 20.** Stoccare i campioni di *DNA* a -20°C.

### 3.2.2 Estrazione del *DNA* da campioni di sangue intero mediante *Qiacube*

L'estrazione del *DNA* da campioni di sangue intero è stata effettuata tramite lo strumento *QIAcube* (**Figura 3**) utilizzando il *Qiamp DNA Blood Mini Kit*, entrambi della ditta *Qiagen*. Il sangue intero da cui si è effettuata tale procedura deriva da una delle provette con tappo viola raccolte al basale (T0) e successivamente conservata a -20°C.

La procedura di estrazione di seguito descritta permette di effettuare l'estrazione del *DNA* fino a 12 campioni simultaneamente, riducendo notevolmente i tempi di esecuzione della procedura che potrebbe essere effettuata anche manualmente dall'operatore.

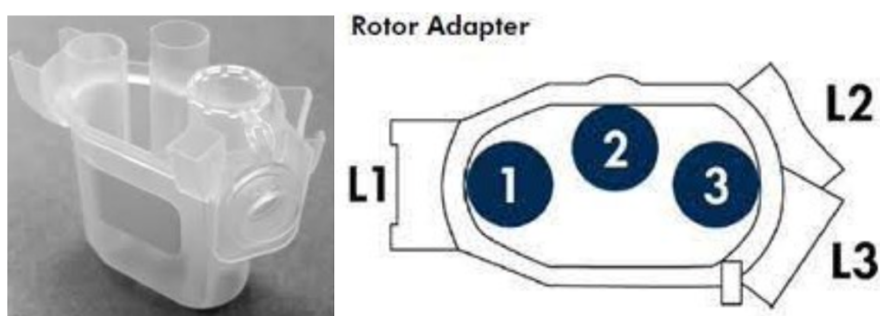


**Figura 3.** Rappresentazione dello strumento *QIACube*, utilizzato per l'estrazione automatizzata del *DNA* da campioni di sangue intero<sup>50</sup>.



Prima dell'estrazione, l'operatore deve effettuare le seguenti operazioni:

1. Scongelare le provette di sangue intero a temperatura ambiente;
2. Trasferire 200µl di sangue in ogni *Sample Tube*;
3. Allestire gli adattatori (**Figura 4**) inserendo una colonnina in posizione 1 e nella posizione 3 un tubo di eluizione da 1.5mL, contrassegnate in maniera opportuna. La provetta inserita nella posizione 3, come indica il suo nome, verrà utilizzata per l'eluizione, che con il protocollo eseguito per il progetto avverrà in un volume di 100µl. La posizione 2 invece rimane vuota in quanto viene utilizzata dallo strumento per lo scarico del materiale durante la procedura;



**Figura 4.** Immagini dell'adattatore per il *Qiacube*. A sinistra, l'adattatore da inserire nell'apposita centrifuga dello strumento, mentre a destra lo stesso adattatore schematizzato con indicate le 3 postazioni descritte nel testo<sup>50</sup>.

4. Controllare che la quantità dei reagenti sia sufficiente per portare a termine l'estrazione, altrimenti rabboccare fino al segno indicativo;
5. Controllare che la quantità di puntali sia sufficiente, altrimenti aggiungerne altri da 200µl e da 1000µl;

6. Allestire lo *shaker* inserendo i gommini secondo quanto indicato nella scheda tecnica e parallelamente aggiungere gli adattatori nella centrifuga del macchinario, posizionandoli seguendo lo stesso ordine utilizzato per allestire lo *shaker* e confrontandosi sempre con quanto riportato nella scheda tecnica;
7. Aggiungere la proteinasi K in una provetta da 1.5mL che verrà posizionata poi all'interno dello strumento nella postazione A (guardare sempre la scheda tecnica per capirne le quantità richieste);
8. Chiudere lo strumento ed impostare il protocollo di estrazione desiderato.

Lo strumento provvederà ad effettuare l'estrazione in automatico tramite i seguenti passaggi:

1. Aggiunta di 20µl di proteinasi K in ogni *Sample Tube* contenente il campione;
2. Aggiunta di 200µl di *Buffer AL* e agitazione per 15 secondi;
3. Incubazione a 56°C per 10 minuti;
4. Aggiunta di 200µl di Etanolo (96-100%) in ciascun campione e agitazione per 15 secondi;
5. Applicazione della miscela ottenuta dallo *step 4* alla *QIAmp Mini spin column* e centrifuga a 6.000xg per 1 minuto;
6. Aggiunta di 500µl di *Buffer AW1* alla colonnina e centrifuga a 6.000xg per 1 minuto;
7. Aggiunta di 500µl di *Buffer AW2* alla colonnina e centrifuga alla massima velocità per 3 minuti;
8. Aggiunta di 100µl di *Buffer AE* alla colonnina posizionata nella provetta di eluizione;

9. Incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifuga a 6.000xg per 1 minuto.

Una volta terminato il processo, il *DNA* ottenuto verrà conservato a -20°C.

### 3.2.3 Valutazione della purezza del *DNA* estratto mediante *Nanodrop*

Per valutare la purezza dei campioni di *DNA* è stato utilizzato lo spettrofotometro *NanoDrop 2000C* (*ThermoFisher*), mostrato in **Figura 5**, prendendo in considerazione il rapporto tra l'assorbanza misurata a 260nm e quella a 280nm, che corrispondono rispettivamente alla lunghezza d'onda di assorbimento degli acidi nucleici e delle proteine. Il campione di interesse viene considerato con un buon grado di purezza quando tale rapporto è circa 1,8-2,0.



**Figura 5.** *NanoDrop 2000C*. Il piedistallo, indicato dalla freccia, rappresenta la parte dello strumento adibita al caricamento dei campioni da analizzare.

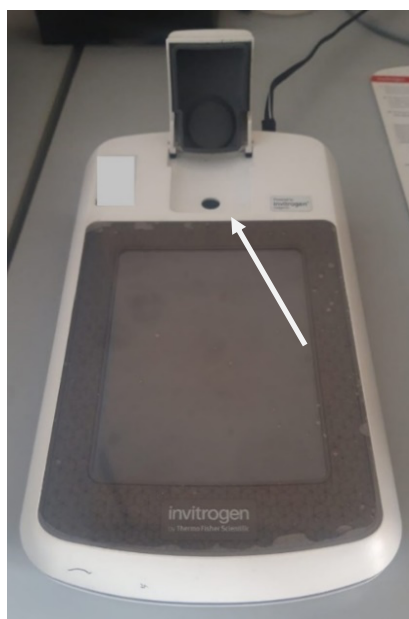
La procedura utilizzata per la valutazione della purezza del *DNA* estratto è la seguente:

1. Effettuare un lavaggio del piedistallo dello strumento con acqua *MilliQ*;
2. Pulire il piedistallo con carta assorbente;
3. Effettuare il bianco posizionando 2 $\mu$ l del *Buffer*, utilizzato per l'eluizione dei campioni durante il protocollo di estrazione, sull'apposito piedistallo;
4. Pulire il piedistallo con carta assorbente;
5. Posizionare 2 $\mu$ l di campione sull'apposito piedistallo e procedere con la lettura;
6. Pulire il piedistallo con carta assorbente;
7. Ripetere l'operazione per tutti i campioni di interesse;
8. Effettuare nuovamente il lavaggio del piedistallo con acqua *MilliQ*.

### 3.2.4 Quantificazione del *DNA* al *Qubit*

Il *DNA* estratto è stato quantificato mediante il fluorimetro *Qubit* (**Figura 6**) utilizzando il kit *Qubit IX dsDNA HS Assay Kit*, entrambi della ditta *Invitrogen*.

Mediante quest'ultimo, lo strumento permette di effettuare la quantificazione rilevando la fluorescenza emessa da un reagente quando si intercala nel *DNA* a doppio filamento (*dsDNA*). Inizialmente, si effettua la lettura di due *Standard* a concentrazione nota (rispettivamente 0 ng/ $\mu$ l e 10 ng/ $\mu$ l) per creare una retta di calibrazione, la quale verrà utilizzata per determinare, sulla base della fluorescenza rilevata, la concentrazione dei campioni d'interesse.



**Figura 6.** Fluorimetro *Qubit*. Nella rappresentazione viene indicata con una freccia la parte dello strumento adibita all'alloggiamento dei campioni da quantificare.

Il protocollo utilizzato viene riportato a seguire:

1. Siglare gli *Qubit Assay Tubes* da 0.5mL;
2. Aggiungere la *Qubit 1X dsDNA Working Solution* ed i *Standard/campioni* di interesse in ciascun *Qubit Assay Tube* come indicato a seguire. Il volume finale di ogni provetta deve essere di 200 $\mu$ l.
  - Per gli *Standard 1* e *2*: aliquotare 190 $\mu$ l di *Working Solution* e 10 $\mu$ l del rispettivo *Standard*,
  - Per i campioni: aliquotare 198 $\mu$ l della *Working Solution* e 2 $\mu$ l del campione di *DNA*;
3. Agitare mediante *vortex* tutti i tubicini per 3-5 secondi e centrifugare brevemente (evitando la formazione di bolle che potrebbero influire negativamente con il processo di quantificazione);

4. Incubare i tubicini allestiti a temperatura ambiente per 2 minuti.

Per quanto concerne la lettura allo strumento, si è utilizzata la seguente procedura:

1. Nella pagina “*Home*” cliccare “*dsDNA*” e “*1X dsDNA High Sensivity*”;
2. Inserire lo *Standard 1* e procedere alla lettura selezionando “*Read standard*”;
3. Ripetere il precedente *step* anche per lo *Standard 2*;
4. Inserire il campione di interesse e procedere alla lettura cliccando su “*Run samples*”. Ripetere l’operazione per tutti i campioni.

### **3.2.5 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide su campioni di *DNA* estratti da *FFPE***

Relativamente alla fase retrospettiva, l’analisi di genotipizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide è stata condotta sul *DNA* estratto da campioni *FFPE* tumorali dei 20 pazienti arruolati.

Il genotipo degli *SNP* selezionati è stato determinato mediante lo strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* utilizzando la *TaqPath ProAmp Master Mix* ed i *TaqMan SNP Genotyping Assays*, entrambi della ditta *ThermoFisher*.

La procedura utilizzata è riportata di seguito:

1. Diluire i campioni di *DNA* in acqua *nuclease-free* in modo tale da ottenere una concentrazione finale di 0.5ng/μl;

2. Preparare la *mix* di reazione basandosi sul numero totale dei campioni, tenendo conto di un 10% di eccesso e di almeno 2 controlli negativi (*NTC*), come riportato nella seguente tabella

Reagente	Quantità per reazione
<i>TaqPath™ ProAmp™ Master Mix</i>	5µl
Saggio <i>TaqMan</i> 20X	0.5µl
Acqua <i>nuclease-free</i>	0.5µl
<b>Volume totale per pozzetto</b>	<b>6µl</b>

3. Agitare mediante *vortex* la *mix* di reazione e centrifugare brevemente;
4. Dispensare 6µl della *mix* di reazione in ogni pozzetto della piastra *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ThermoFisher)*;
5. Agitare mediante *vortex* i campioni di *DNA* precedentemente diluiti e centrifugare brevemente;
6. Aggiungere 4µl di *DNA* (2ng totali) ad ogni pozzetto della piastra (volume finale di 10µl);
7. Sigillare la piastra tramite l'apposito *film* ottico *MicroAmp Optical Adhesive Film (ThermoFisher)* e centrifugarla brevemente;
8. Caricare la piastra nello strumento ed impostare il seguente profilo termico in modalità "*Standard*":

<i>Step</i>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cicli</b>
<i>Pre-read</i>	60°C	1 minuto	
Attivazione della polimerasi	95°C	10 minuti	<i>Hold</i>
Denaturazione	95°C	15 secondi	<b>40</b>
<i>Annealing</i> /Estensione	60°C	1 minuto	
<i>Post-read</i>	60°C	1 minuto	

9. Analizzare i dati tramite il *TaqMan Genotyper Software*.

### 3.2.6 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide su campioni di *DNA* estratti da sangue intero

Per la fase prospettica dello studio, l'analisi di genotipizzazione degli *SNP* è stata condotta sul *DNA* estratto da campioni di sangue intero dei 100 pazienti arruolati. La determinazione dei genotipi è stata effettuata mediante lo strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* utilizzando la *TaqMan Genotyping Master Mix* ed i *TaqMan SNP Genotyping Assays*, entrambi della ditta *ThermoFisher*.

La procedura utilizzata è riportata di seguito:

1. Diluire i campioni di *DNA* in acqua *nuclease-free* per avere una concentrazione finale di 5ng/μl;
2. Preparare la *mix* di reazione basandosi sul numero totale dei campioni, tenendo conto di un 10% di eccesso e di almeno 2 controlli negativi (*NTC*), come riportato nella tabella:



Reagente	Quantità per reazione
<i>TaqMan Genotyping Master Mix</i>	5µl
Saggio <i>TaqMan 20X</i>	0.5µl
Acqua <i>nuclease-free</i>	2.5µl
<b>Volume totale per pozzetto</b>	<b>8µl</b>

3. Agitare mediante *vortex* la *mix* di reazione e centrifugare brevemente;
4. Dispensare 8µl della *mix* di reazione in ogni pozzetto della piastra *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ThermoFisher)*;
5. Agitare mediante *vortex* i campioni di *DNA* precedentemente diluiti e centrifugare brevemente;
6. Aggiungere 2µl di *DNA* (10ng totali) ad ogni pozzetto della piastra (volume finale di 10µl);
7. Sigillare la piastra tramite l'apposito *film* ottico *MicroAmp Optical Adhesive Film (ThermoFisher)* e centrifugarla brevemente;
8. Caricare la piastra nello strumento ed impostare il seguente profilo termico in modalità "*Standard*":

<i>Step</i>	Temperatura	Tempo	Cicli
<i>Pre-read</i>	60°C	1 minuto	
Attivazione della polimerasi	95°C	10 minuti	<i>Hold</i>
Denaturazione	95°C	15 secondi	<b>40</b>
<i>Annealing/Estensione</i>	60°C	1 minuto	
<i>Post-read</i>	60°C	1 minuto	

9. Analizzare i dati tramite il *TaqMan Genotyper Software*.

### **3.3 Analisi di espressione dei *miRNA***

#### **3.3.1 Raccolta dei campioni plasmatici**

Per ciascun paziente arruolato per la fase prospettica del progetto, sono stati raccolti prelievi di sangue a specifici *timepoints* utilizzando delle provette contenenti l'anticoagulante *EDTA* (tappo viola). Entro circa 2 ore dall'esecuzione del prelievo da parte del personale infermieristico, le provette sono state processate in laboratorio, al fine di ottenere campioni plasmatici, mediante il seguente protocollo:

1. Invertire delicatamente le provette di sangue intero per 8-10 volte
2. Centrifugare le provette a 1.100xg per 20 minuti
3. Prelevare il surnatante (plasma) con una pipetta *Pasteur* monouso *RNase-free* da 3mL, tenendosi ad una distanza di circa 1cm dal *buffy coat* e dai globuli rossi;
4. Trasferire il plasma in un tubo da 5-15mL e miscelare attraverso l'utilizzo della *Pasteur*;
5. Aliquotare il plasma in delle provette *RNase-free* da 2mL e centrifugare a 4°C per 7 minuti a 10.000xg;
6. Trasferire il surnatante in delle nuove provette da 2mL *RNase-free*, precedentemente siglate, senza disturbare il *pellet*;
7. Stoccare i campioni plasmatici nel congelatore a -80°C.

#### **3.3.2 Estrazione dei *miRNA* da campioni di plasma**

L'estrazione dei *miRNA* da campioni di plasma è stata effettuata mediante l'utilizzo del *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen)*. Questo *kit* permette di purificare l'*RNA* totale circolante, principalmente *miRNA* ed altri piccoli *RNA*. Inoltre, si è utilizzata una *Mix* di 3 *Spike-in (Unisp2, Unisp4 e Unisp5)*, aventi diverse

concentrazioni note, del *kit miRCURY RNA Spike-in kit*, al fine di poter effettuare un controllo-qualità della procedura.

A seguire viene riportato il protocollo eseguito per effettuare la procedura di estrazione:

1. Scongellare i campioni di plasma a temperatura ambiente;
2. Miscelarli adeguatamente e centrifugare;
3. Trasferire 200µl di plasma in una provetta da 2mL;
4. Aggiungere 60µl del *Buffer RPL*, agitare mediante *vortex* per almeno 5 secondi e incubare a temperatura ambiente per 3 minuti;
5. Aggiungere 1µl di *Spike-in mix (Unisp2, Unisp4 e Unisp5)*;
6. Aggiungere 20µl del *Buffer RPP*, agitare mediante *vortex* per almeno 20 secondi ed incubare a temperatura ambiente per 3 minuti;
7. Centrifugare le provette a 12.000xg per 3 minuti a temperatura ambiente e controllare che il surnatante sia limpido ed incolore;
8. Trasferire il surnatante (circa 230µl) in una nuova provetta da 2mL;
9. Aggiungere 1 volume di isopropanolo, agitare mediante *vortex* e centrifugare brevemente;
10. Trasferire l'intero campione in una colonnina *RNeasy UCP MinElute spin column* e centrifugare a 8.000xg per 15 secondi. Scartare il liquido;
11. Posizionare la colonnina in un nuovo tubo di raccolta. Aggiungere 700µl del *Buffer RWT* e centrifugare a 8.000xg per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;

12. Posizionare la colonnina in un nuovo tubo di raccolta. Aggiungere 500µl del *Buffer RPE* centrifugare a 8.000xg per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
13. Posizionare la colonnina in un nuovo tubo di raccolta. Aggiungere 500µl di etanolo (80%) e centrifugare per 2 minuti a 8.000xg;
14. Rimuovere la colonnina dal tubo sottostante e posizionarla in un nuovo tubo di raccolta da 2mL;
15. Aprire il tappo e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti;
16. Posizionare la colonnina in una nuova provetta da 1.5mL e aggiungere 20µl di acqua *RNase-free* al centro della membrana;
17. Incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
18. Centrifugare per 1 minuto alla massima velocità;
19. Stoccare i campioni di *RNA* a -80°C.

### 3.3.3 Sintesi del *cDNA*

L'*RNA* estratto, per poter essere sottoposto ad amplificazione mediante *PCR*, deve essere retrotrascritto in *cDNA*. Il *kit* che è stato utilizzato è il *miRCURY LNA RT* della *Qiagen*, che permette di effettuare la poliadenilazione dei *miRNA* e di conseguenza il processo della retrotrascrizione utilizzando dei *primer oligo-dT*. Per controllare che anche questo processo avvenga correttamente, durante la procedura viene aggiunto un volume ben preciso di un *RNA* esogeno a concentrazione nota, ovvero lo *Spike-in* denominato *Unisp6*.

Di seguito viene riportato il protocollo di retrotrascrizione (da eseguire in ghiaccio):

1. Siglare i tubicini da 200 $\mu$ L per *PCR*;
2. Preparare una *mix* di reazione considerando il numero totale di campioni, della necessità di un controllo negativo e di un 10% di eccesso, seguendo quanto indicato nella seguente tabella:

<b>Reagenti</b>	<b>Volume per ogni campione</b>
<i>5X miRCURY SYBR Green RT Reaction Buffer</i>	2 $\mu$ l
<i>Acqua RNase-free</i>	3.3 $\mu$ l
<i>10X miRCURY RT Enzyme Mix</i>	1 $\mu$ l
<i>Unisp6 RNA Spike-in</i>	0.5 $\mu$ l
<b>Volume totale per reazione</b>	<b>6.8<math>\mu</math>l</b>

3. Miscelare e centrifugare brevemente la *mix* di reazione;
4. Distribuire 6.8 $\mu$ l di *mix* in ogni provetta da *PCR* da 200 $\mu$ l;
5. Aggiungere 3.2 $\mu$ l di campione di *RNA* in ogni provetta;
6. Miscelare e centrifugare brevemente;
7. Posizionare le provette di reazione nel termociclatore *SimplyAmp Thermal Cycler* (*Applied Biosystem*) impostando il seguente profilo termico:

<b>Step</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Retrotrascrizione	60 minuti	42°C
Inattivazione della reazione	5 minuti	95°C
Stoccaggio	$\infty$	4°C

8. Centrifugare brevemente le provette;
9. Trasferire il *cDNA* ottenuto in provette *DNA-Low binding* (ovvero con basso legame per gli acidi nucleici);
10. Stoccare i campioni di *cDNA* a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.4 Analisi di *Real-time PCR* per la valutazione della qualità dell'iter laboratoristico e del grado di emolisi dei campioni plasmatici**

Per valutare l'affidabilità dei processi di estrazione e retrotrascrizione e per stimare il grado di emolisi dei campioni, è stata effettuata una corsa di *Real-Time PCR*. Per questo processo si utilizzano il *miRCURY LNA SYBR Green PCR kit* ed i *miRCURY LNA miRNA PCR Assays*, entrambi della *Qiagen*. In particolare, con questa analisi vengono testati i controlli esogeni inseriti nei passaggi precedenti, ovvero gli *Unisp2,4* e *5*, durante l'estrazione, e l'*Unisp6*, durante la retrotrascrizione, in modo da decretare la buona riuscita o meno dei due processi. Inoltre, per avere un'idea del grado di emolisi dei campioni, vengono testati anche i *miRNA* miR-451a e miR-23a-3p<sup>51</sup>. Il *miRNA* miR-451a è presente negli eritrociti mentre il miR-23a-3p è noto essere relativamente stabile nel plasma, perciò effettuare un rapporto (*miR-Ratio*) tra questi 2 *miRNA* ci permette di dire se il campione è caratterizzato da emolisi (valore di  $\text{delta-Ct} > 7$ ) o meno (valore di  $\text{delta-Ct} < 7$ )<sup>51</sup>.

Il protocollo per la *Real-Time PCR* viene riportato a seguire:

1. Scongellare i campioni a temperatura ambiente
2. Preparare una diluizione del *cDNA* 1:30 utilizzando acqua *RNAse-free*;

3. Preparare la *mix* di reazione considerando il numero totale di campioni, includendo i controlli negativi e un 10% di eccesso, secondo quanto indicato dalla seguente tabella:

Reagenti	Volume per ogni campione
<i>2X miRCURY SYBR Green Master Mix + ROX Reference Dye</i>	5 $\mu$ l
<i>Primer di PCR risospesi</i>	1 $\mu$ l
<i>Acqua RNase-free</i>	1 $\mu$ l
<b>Volume di reazione totale</b>	<b>7<math>\mu</math>l</b>

4. Miscelare la *mix* di reazione e centrifugare brevemente;
5. Dispensare 7 $\mu$ l di *mix* in ciascun pozzetto della piastra *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ThermoFisher)*;
6. Aggiungere 3 $\mu$ l di ogni campione di *cDNA* e mescolare;
7. Sigillare la piastra con l'apposito *film* ottico *MicroAmp Optical Adhesive Film (ThermoFisher)*;
8. Centrifugare brevemente la piastra e cariarla nello strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystem)*, impostando il seguente profilo termico:

Step	Tempo	Temperatura	Ramp rate	Numero di cicli	Note
Attivazione iniziale	2 minuti	95°C	<i>Fast Mode</i>		
Denaturazione	10 secondi	95°	<i>Fast Mode</i>	40	
<i>Annealing</i> /Estensione	60 secondi	56°C	<i>Fast Mode</i>		Raccolta dei dati di fluorescenza
Analisi della curva di <i>melting</i>		60-95°C			

9. Utilizzare il *ThermoFisher Cloud* per una prima analisi dei dati ottenuti.

### 3.3.5 *Real-time PCR* per l'analisi di espressione dei *miRNA*

L'analisi di espressione dei *miRNA*, selezionati dal *miRNA sequencing* effettuato precedentemente per la fase retrospettiva dello studio, è stata eseguita tramite *RealTime-PCR* mediante lo strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystem)*, utilizzando il kit *miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen)* e i *miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels (Qiagen)*, (**Tabella 1**). Questi ultimi consistono in delle piastre, precedentemente progettate dal laboratorio, in modo tale da avere specifici *primer* di interesse pre-aliquotati all'interno di ciascun pozzetto. Oltre ai *miRNA* selezionati nella prima fase dello studio, con queste piastre *Custom* sono stati analizzati altri 4 *miRNA* noti in letteratura per il loro coinvolgimento nel tumore al polmone (miR-21-5p<sup>52</sup>, miR-126-3p<sup>53</sup>, miR128-3p<sup>54</sup> e miR-339-5p<sup>55</sup>), 4 possibili normalizzatori (miR-16-5p, miR191-5p, miR-103a-3p e miR-30e-5p), i 4 *Spike-in* aggiunti durante gli *step* precedenti per monitorare la buona riuscita del *work-flow* e l'*Interplate Calibrator (IPC, Unisp3)*.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hsa-miR-147b-3p	hsa-miR-432-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-4695-3p	hsa-miR-147b-3p	hsa-miR-432-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-4695-3p	hsa-miR-147b-3p	hsa-miR-432-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-4695-3p
B	hsa-miR-147b-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-5100	hsa-miR-147b-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-5100	hsa-miR-147b-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-5100
C	hsa-miR-539-3p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-6073	hsa-miR-539-3p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-6073	hsa-miR-539-3p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-6073
D	hsa-miR-625-3p	hsa-miR-32-3p	hsa-miR-30e-5p	Unisp6	hsa-miR-625-3p	hsa-miR-32-3p	hsa-miR-30e-5p	Unisp6	hsa-miR-625-3p	hsa-miR-32-3p	hsa-miR-30e-5p	Unisp6
E	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-1260a	Unisp2	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-1260a	Unisp2	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-1260a	Unisp2
F	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-1260b	Unisp4	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-1260b	Unisp4	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-1260b	Unisp4
G	hsa-miR-937-3p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-1275	Unisp5	hsa-miR-937-3p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-1275	Unisp5	hsa-miR-937-3p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-1275	Unisp5
H	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4454	Unisp3	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4454	Unisp3	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4454	Unisp3

**Tabella 1.** Piastra *Custom*. Ogni colore fa riferimento ai *target* testati per ciascun campione.

A seguire il protocollo utilizzato:

1. Diluire 4  $\mu$ l di *cDNA* in 156 $\mu$ l di acqua *RNase-free*;
2. Preparare la *Reaction mix* seguendo la tabella sottostante per ciascun campione:

Componenti	Volume per campione
2X <i>miRCURY SYBR Green Master Mix</i> + <i>ROX Referenced Dye</i>	200 $\mu$ l
<i>cDNA</i> diluito 1:40	160 $\mu$ l
Acqua <i>RNase-free</i>	40 $\mu$ l
<b>Volume totale per ciascun campione</b>	<b>400<math>\mu</math>l</b>

3. Agitare mediante *vortex* la reazione e centrifugare brevemente;
4. Dispensare 10 $\mu$ l della reazione nei pozzetti contenenti i *target* da analizzare per quello specifico campione;

5. Sigillare la piastra tramite l'utilizzo delle apposite *strip* ottiche *Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (Qiagen)*;
6. Agitare mediante *vortex* e centrifugare brevemente;
7. Attendere 5 minuti per permette ai *primer* di dissolversi nella *Reaction mix*;
8. Inserire la piastra nello strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystem)* ed impostare il seguente profilo termico:

<i>Step</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Ramp rate</i>	<b>Numero di cicli</b>	<b>Note</b>
Attivazione iniziale	2 minuti	95°C	<i>Fast Mode</i>		
Denaturazione	10 secondi	95°	<i>Fast Mode</i>	<b>40</b>	
<i>Annealing</i> /Estensione	60 secondi	56°C	<i>Fast Mode</i>		Raccolta dei dati di fluorescenza
Analisi della curva di <i>melting</i>		60-95°C			

9. Effettuare l'analisi dei dati tramite il programma *ThermoFisher Cloud*.

### **3.4 Analisi statistiche**

Per effettuare le analisi di questo progetto sono stati utilizzati i seguenti *test* statistici:

Regressione di *Cox*, Regressione Logistica, Curve di *Kaplan-Meier*, Tabelle di Contingenza e *Test T*.

Tali analisi statistiche sono state utilizzate per poter correlare i potenziali *target* molecolari, lo stato natriemico e gli *outcome* clinici dei pazienti.

I risultati ottenuti con un  $p\text{-value} \leq 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi, mentre sono stati definiti con un *trend* di significatività i risultati con  $0.05 < p\text{-value} < 0.10$ .

Per tali analisi, i gruppi che sono stati confrontati sono i seguenti:

- Pazienti eunatriemici nell'intero periodo considerato vs pazienti con almeno una misurazione di iponatriemia nel periodo preso in considerazione;
- Pazienti eunatriemici nell'intero periodo considerato vs pazienti eunatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2;
- Pazienti iponatriemici solo al baseline vs pazienti iponatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Risultati dei polimorfismi a singolo nucleotide

#### 4.1.1 Studio e ricerca dei polimorfismi a singolo nucleotide

I 17 polimorfismi a singolo nucleotide presi in esame sono i seguenti: rs2282018 (gene *AVP*), rs11174811, rs7308855 (gene *AVPR1A*), rs11158358, rs2057482, rs1951795, rs2301113, rs10873142, rs12434438, rs11549465, rs11549467 (gene *HIF-1  $\alpha$* ), rs2010963, rs699947 (gene *VEGF-A*), rs1870377, rs2305948 (gene *KDR*), rs307826, rs307821 (gene *FLT4*).

Nella **Tabella 2** vengono riportate tutte le loro caratteristiche principali, ricavate tramite il *database Ensembl*.

SNP	Tipologia di variante	Alleli	Gene	Localizzazione Cromosomica	Highest Population MAF	Genotipo	Conta Genotipica Popolazione Generale CEU	Conta Genotipica Popolazione Generale TSI
rs2282018	Intronica	C	AVP	20:3084303	0.49	T/T	33	38
		T				C/C	17	24
rs11174811	3' UTR	C	AVPRI	12:63146696	0.26	C/T	49	45
		A				C/C	78	82
rs7308855	Intergenica	C	AVPRI	12:63154276	0.2	A/A	2	0
		T				A/C	19	25
rs11158358	Intronica	G	HIF -1 $\alpha$	14:61732236	0.47	T/T	1	0
		C				C/C	83	94
rs2057482	3' UTR	C	HIF -1 $\alpha$	14:61747130	0.47	C/T	15	13
		T				G/G	1	7
rs1951795	Intronica	C	HIF -1 $\alpha$	14:61704708	0.41	C/C	76	54
		A				C/G	22	46
rs2301113	Intronica	C	HIF -1 $\alpha$	14:61739830	0.46	T/T	1	7
		A				C/C	80	65
rs10873142	Intronica	C	HIF -1 $\alpha$	14:61736744	0.41	C/T	20	35
		T				A/A	2	12
rs12434438	Intronica	G	HIF -1 $\alpha$	14:61730580	0.42	C/C	74	48
		A				A/C	23	47
rs11549465	Missenso	C	HIF -1 $\alpha$	14:61740839	0.19	A/A	65	45
		T				C/C	2	12
rs11549467	Missenso	G	HIF -1 $\alpha$	14:61740857	0.06	A/C	32	50
		A				T/T	74	48
rs2010963	5' UTR	G	VEGF-A	6:43770613	0.45	C/C	2	12
		C				C/T	23	47
rs699947	Regione Regolatrice	C	VEGF-A	6:43768652	0.50	G/G	3	15
		A				A/A	70	40
rs1870377	Missenso	T	KDR	5:5106807	0.50	A/G	26	52
		A				T/T	86	72
rs2305948	Missenso	C	KDR	4:55113391	0.29	C/C	0	5
		T				C/T	13	30
rs307821	Missenso	C	FLT4	5:180603313	0.30	G/G	98	105
		A				A/G	1	2
rs307826	Missenso	C	FLT4	5:180624003	0.30	A/A	0	0
		T				C/C	10	15
						C/C	44	47
						C/G	45	45
						A/A	20	30
						C/C	29	28
						A/C	50	49
						T/T	56	71
						A/A	7	2
						A/T	36	34
						C/C	81	87
						T/T	0	1
						C/T	18	19
						A/A	ND	ND
						C/C	ND	ND
						A/C	ND	ND
						C/C	1	0
						T/T	81	82
						C/T	17	25

**Tabella 2.** In questa tabella sono riportati i 17 *SNP* analizzati con le corrispondenti caratteristiche ricavate da *Ensembl*, quali: tipologia di variante, localizzazione cromosomica, *MAF*, alleli, genotipi e le conte genotipiche delle popolazioni *CEU* e *TSI* (Europea e Toscana). Per l'rs307821, non sono disponibili le informazioni riguardanti la conta genotipica della popolazione generale *CEU* e *TSI*.

(*ND*=non disponibile).

Come già citato in precedenza, la genotipizzazione degli *SNP* è stata effettuata tramite la tecnica della *Real Time PCR* e mediante saggi *TaqMan*.

La *Real Time PCR* è basata su tecnologie che comprendono sistemi di amplificazione *PCR* in grado di ottenere simultaneamente sia il processo di amplificazione sia di rilevazione dell'amplificato tramite reazioni cicliche.

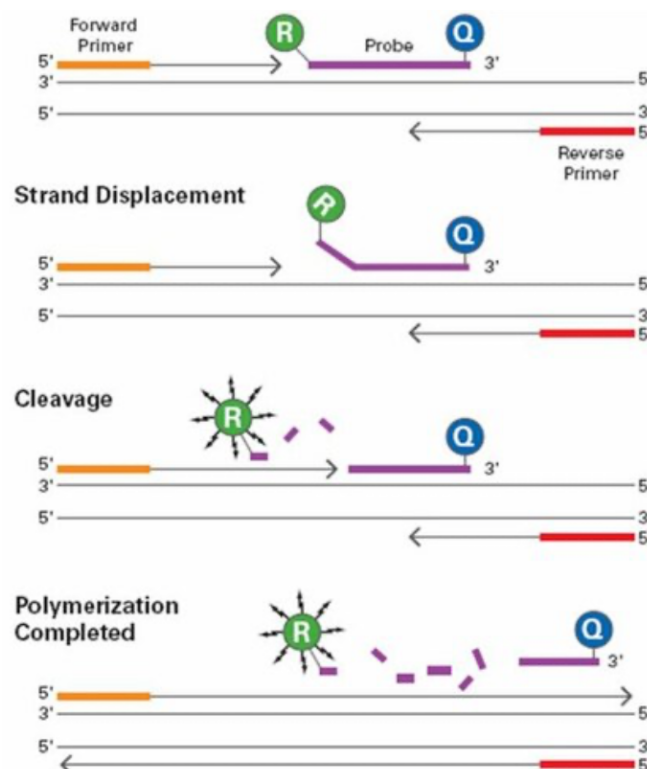
La sonda di tipo *TaqMan* consiste in un oligonucleotide che viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare, mediante *PCR*, e che presenta alle estremità due tipologie di fluorocromi: uno al 5', detto anche *Reporter (R)*, e uno al 3', detto anche *Quencer (Q)*. Il primo è un fluorocromo ad alta energia ed è in grado di emettere fluorescenza quando colpito da un raggio *laser*, mentre il secondo è un fluorocromo a bassa energia che è in grado di assorbire la fluorescenza del *Reporter*, quando si trova vicino ad esso.

Ad ogni ciclo di *PCR*, durante la fase di *annealing*, sia i *primers* che la sonda *TaqMan* si legano alla sequenza bersaglio da amplificare; ne consegue che nella fase successiva, ovvero quella di estensione, affinché la *DNA* Polimerasi possa proseguire nella polimerizzazione del filamento, la sonda dovrà essere necessariamente degradata, grazie all'attività esonucleasica 5'-3' dell'enzima. Questo porterà dunque ad allontanare il *Quencer* dal *Reporter*, che non potendo più spegnere la fluorescenza emessa da quest'ultimo, permetterà allo strumento di registrare il segnale corrispondente (**Figura 7**). Tanto maggiore sarà quindi il quantitativo di ampliconi, tanto più alta sarà la fluorescenza registrata dallo strumento.

Le sonde *TaqMan* possono essere utilizzate per effettuare delle analisi di genotipizzazione di polimorfismi a singolo nucleotide in quanto è possibile utilizzare

una miscela di due tipologie di oligonucleotidi, ognuna delle quali sarà dotata di uno specifico fluorocromo al 5' e specifica per una delle due possibili sequenze *target*, a seconda del genotipo presente.

Nel mio caso, i fluorocromi che sono stati utilizzati per la progettazione delle sonde *TaqMan* sono il *VIC* e il *FAM*. Questi fluorocromi emettono a diverse lunghezze d'onda, pertanto, a seconda della fluorescenza registrata dallo strumento, sarà possibile distinguere i genotipi omozigoti per un allele (solo fluorescenza *VIC* o solo fluorescenza *FAM* rilevata, a seconda che siano omozigoti per l'allele1 o l'allele2 rispettivamente) e i genotipi eterozigoti (entrambe le fluorescenze rilevate, con intensità all'incirca dimezzata rispetto ai genotipi omozigoti).



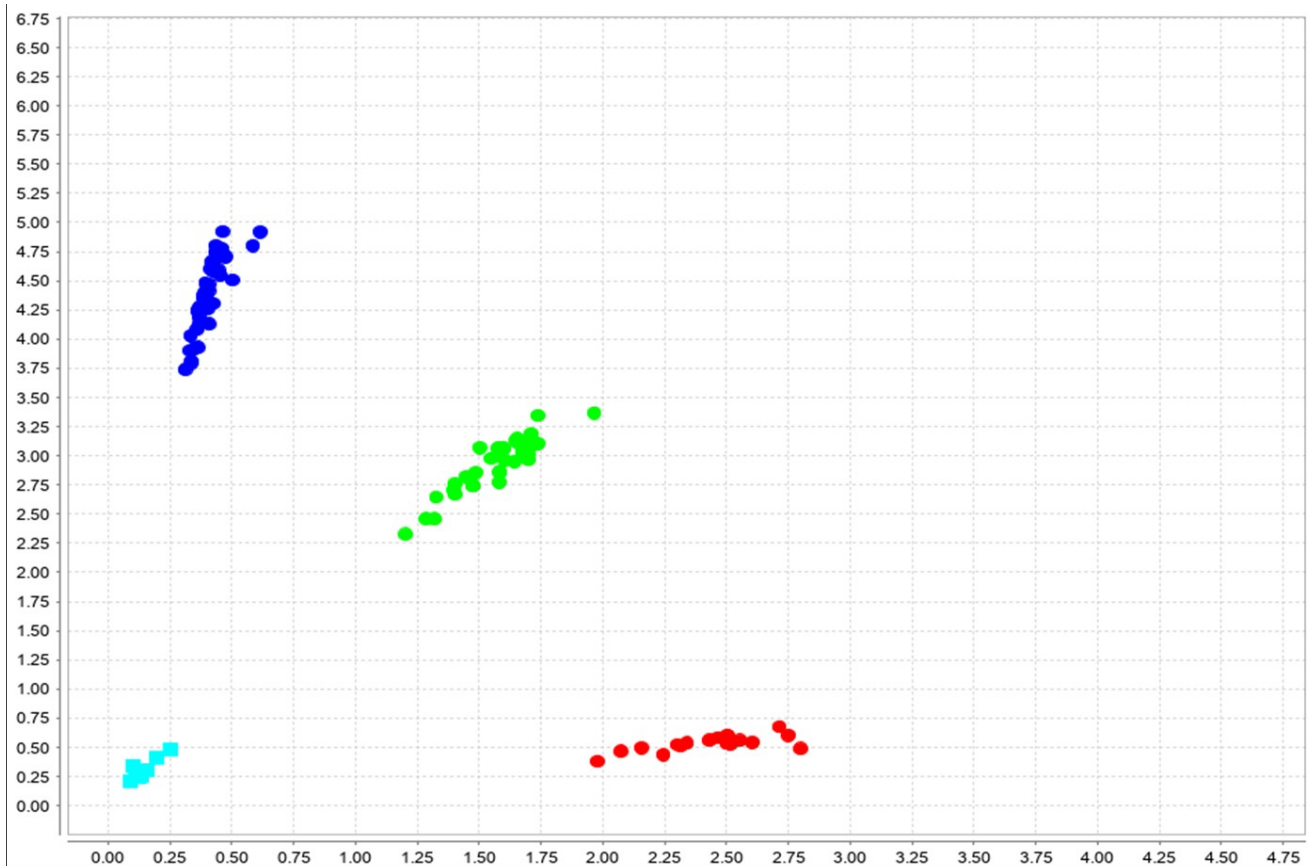
**Figura 7.** Schema sintetico del funzionamento delle sonde *TaqMan* (*R*=Reporter, *Q*=Quencher).

Come raccomandato dalla guida *TaqMan SNP Genotyping Assay (ThermoFisher)*, è necessario condurre una fase di *pre-read* ed una fase di *post-read*. Queste due fasi precedono e seguono l'amplificazione vera e propria: durante il *pre-read* viene misurata la fluorescenza di partenza, la quale verrà sottratta alla fluorescenza emessa durante la reazione, nella fase finale del *post-read*.

Al termine della corsa, il *software* elabora un grafico, definito *Allelic Discrimination Plot*, dove sull'asse X è riportata la fluorescenza emessa dal fluoroforo *VIC* (corrispondente all'allele 1), mentre sull'asse Y la fluorescenza emessa dal fluoroforo *FAM* (corrispondente all'allele 2). La **Figura 8** rappresenta un esempio di grafico ottenuto dalle nostre analisi per l'rs2282018; in particolare i campioni appaiono distribuiti in *cluster* differenti posti in aree diverse del *plot*: una che corrisponde all'allele 1 (fluorescenza rilevata per *VIC*), un'altra che corrisponde all'allele 2 (fluorescenza rilevata per *FAM*) ed infine, una relativa ai campioni eterozigoti, ossia con livelli di fluorescenza paragonabili sia per *VIC* che per *FAM*.

Inoltre, è possibile vedere anche i controlli negativi (*NTC*), composti da acqua, che come atteso, presentano la fluorescenza emessa prossima allo zero, dimostrando che il controllo negativo non ha subito contaminazioni prima o durante il protocollo.





**Figura 8.** Esempio di *Allelic Discrimination Plot* per l'rs2282018: i punti rossi corrispondono ai campioni omozigoti per l'allele 1 (C), quelli blu ai campioni omozigoti per l'allele 2 (T) e quelli verdi ai campioni eterozigoti. I quadratini azzurri rappresentano i controlli negativi (*NTC*).

## 4.2 Risultati statistici della fase retrospettiva

### 4.2.1 Caratteristiche ed *outcome* clinici dei pazienti

Nella prima fase del progetto (fase retrospettiva) sono stati analizzati i campioni tumorali *FFPE* di 20 pazienti, 10 eunatriemici e 10 che hanno sviluppato iponatriemia.

Nella **Tabella 3** vengono riportate le caratteristiche e gli *outcome* clinici relative ai pazienti.

<b>Outcome Clinico/caratteristiche</b>	<b>Pazienti eunatriemici</b>	<b>Pazienti che hanno sviluppato iponatriemia</b>	<b>Pazienti totali</b>
Numero pazienti	10	10	20
<b>OS</b>			
Mediana OS (mesi)	30.2	18.0	30.2
<b>RFS</b>			
Mediana RFS (mesi)	14.0	9.9	13.5
<b>PFS1</b>			
Mediana PFS1 (mesi)	3.7		4.5
<b>PFS2</b>			
Mediana PFS2 (mesi)	6.0	3.7	4.3
<b>Età</b>			
Mediana età (anni)	70	70	70
<b>Sesso</b>			
Maschio	8	8	16
Femmina	2	2	4
<b>Fumo</b>			
Pazienti fumatori	3	3	6
Pazienti non fumatori	2	2	4
Pazienti ex -fumatori	5	4	9
ND	0	1	1
<b>Istotipo</b>			
Squamocellulare	4	4	8
Adenocarcinoma	6	6	12

**Tabella 3.** Outcome e caratteristiche cliniche dei pazienti della fase retrospettiva.

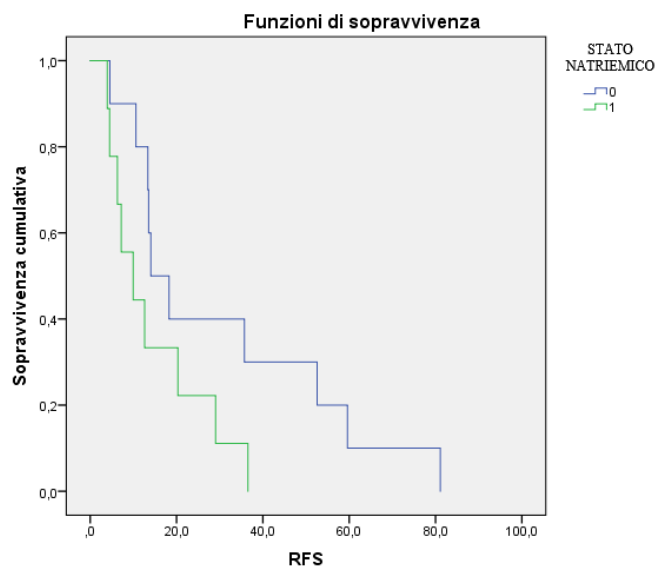
(ND= non disponibile).

#### **4.2.2 Correlazione dello stato di natriemia con gli outcome clinici dei pazienti**

Come prima analisi statistica, si è deciso di ricercare una correlazione tra lo stato di natriemia dei pazienti arruolati ed i relativi outcome clinici, ovvero OS (sopravvivenza globale), PFS1 (sopravvivenza libera da progressione alla prima linea di trattamento), PFS2 (sopravvivenza libera da progressione alla seconda linea di trattamento) ed RFS (sopravvivenza libera da recidiva).

Attraverso le analisi di *Kaplan-Meier*, è emerso che lo stato natriemico correla globalmente con la *RFS* ( $p=0.077$ ); in particolare, i pazienti iponatriemici hanno una *RFS* mediana di 9.9 mesi, rispetto agli eunatriemici che ce l'hanno di 14.0 mesi (**Figura 9**).

Nessun dato statisticamente significativo è stato ottenuto per gli altri *outcome* clinici valutati.



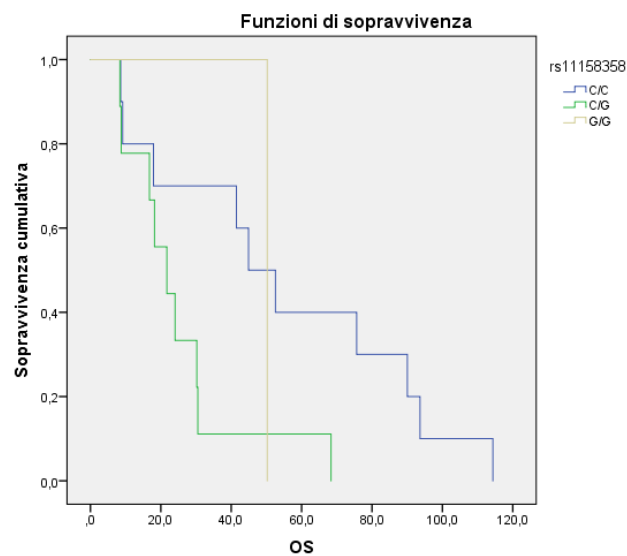
**Figura 9.** Curva di *Kaplan-Meier* relativa alla correlazione tra lo stato natriemico dei pazienti e la *RFS* ( $p\text{-value}=0.077$ ). Nella legenda la linea blu (0) fa riferimento ai pazienti eunatriemici mentre quella verde (1) riguarda i pazienti che hanno sviluppato iponatriemia.

#### 4.2.3 Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con gli *outcome* clinici dei pazienti

Le curve di *Kaplan-Meier* sono state utilizzate anche per correlare gli *SNP* con gli *outcome* clinici dei pazienti oncologici (*OS*, *PFS1*, *PFS2* ed *RFS*).

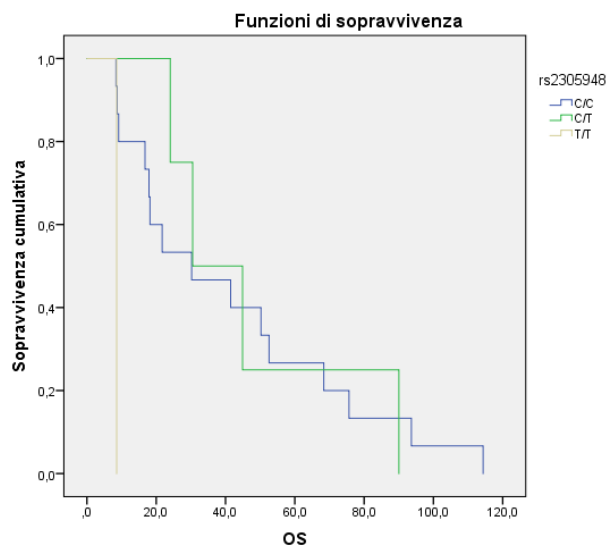
Per quanto riguarda la sopravvivenza globale, due *SNP* sono emersi essere statisticamente significativi, ovvero l'rs11158358 ( $p=0.070$ ) e l'rs2305948 (0.016).

Nello specifico, per l'rs11158358 i portatori C/G hanno un'*OS* mediana di 21.7 a confronto con i portatori C/C e G/G che hanno rispettivamente una mediana di 44.9 e 50.2 mesi (*Figura 10*).



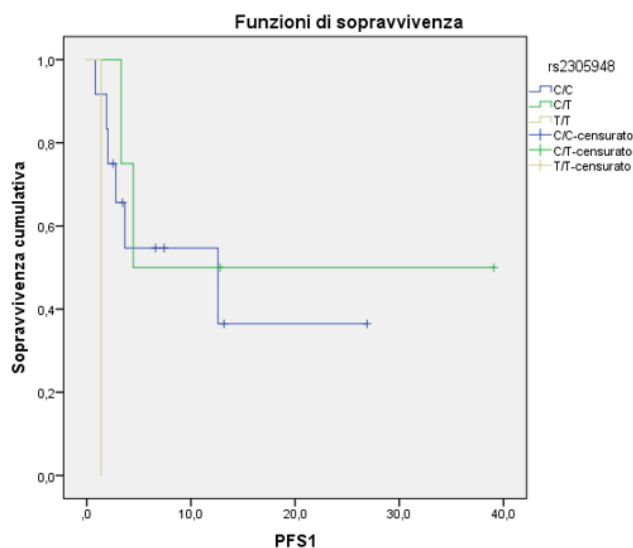
**Figura 10.** Curva di *Kaplan-Meier* relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs11158358 e l'*OS* ( $p\text{-value}=0.070$ ).

Per l'rs2305948, è emerso che i portatori T/T hanno un'*OS* mediana di 8.6 mesi a confronto con i portatori C/C e C/T che hanno rispettivamente una mediana di 30.2 e 30.5 mesi (*Figura 11*).



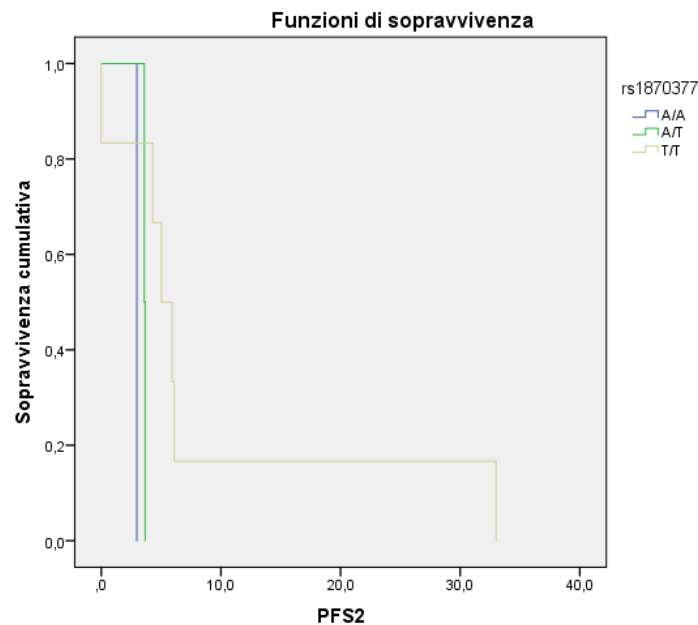
**Figura 11.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs2305948 e l'*OS* ( $p$ -value=0.016).

Inoltre, quest'ultimo *SNP* incide globalmente anche sulla *PFS1* ( $p$ =0.031); nello specifico, i portatori T/T hanno una *PFS1* mediana di 1.4 mesi a confronto con i portatori C/C e C/T che hanno rispettivamente una mediana di 12.6 e 4.5 mesi (**Figura 12**).



**Figura 12.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs2305948 e la *PFS1* ( $p$ -value=0.031).

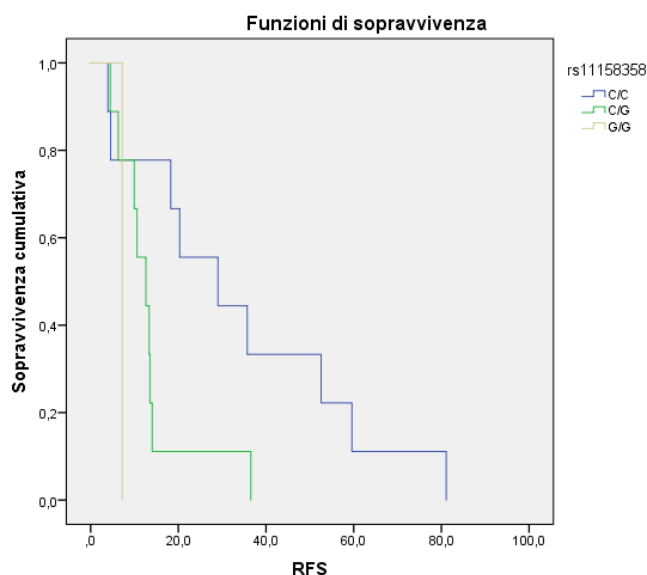
Per quanto riguarda la *PFS2*, le analisi condotte hanno evidenziato che l'rs1870377 correla globalmente con questo *outcome* ( $p=0.075$ ) e, nello specifico, i portatori T/T hanno una *PFS2* mediana di 5.0 a confronto con i portatori A/A e A/T che hanno rispettivamente una mediana di 3.0 e 3.6 mesi (*Figura 13*).



**Figura 13.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs1870377 e la *PFS2* ( $p\text{-value}=0.075$ ).

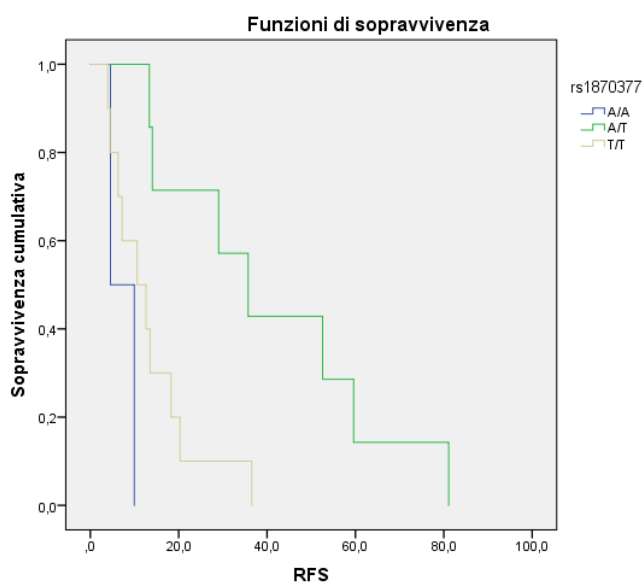
Infine, per quanto riguarda le analisi di correlazione degli *SNP* con l'*RFS*, due *SNP* sono risultati statisticamente significativi, ovvero l'rs11158358 ( $p=0.044$ ) e l'rs1870377 ( $p=0.005$ ).

Nello specifico, per l'rs11158358, i portatori G/G hanno una *RFS* mediana di 7.2 mesi a confronto con i portatori C/C e C/G che hanno rispettivamente una mediana di 29.0 e 12.6 mesi (*Figura 14*).



**Figura 14.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo SNP rs11158358 e la RFS ( $p\text{-value}=0.044$ ).

Per l'rs1870377, è emerso che i portatori A/A hanno una RFS mediana di 4.6 mesi a confronto con i portatori T/T e A/T che hanno rispettivamente una mediana di 10.6 e 35.7 mesi (**Figura 15**).



**Figura 15.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo SNP rs1870377 e la RFS ( $p\text{-value}=0.005$ ).

#### **4.2.4 Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con lo stato natriemico**

La correlazione tra gli *SNP* e lo stato natriemico dei pazienti è stata indagata attraverso il *test* della Regressione logistica.

Da queste analisi, è emerso che l'rs11174811 e l'rs1870377 correlano globalmente predicendo lo stato di natriemia, con un *p-value* rispettivamente di 0.074 e 0.093.

In particolare, per l'rs11174811, i portatori C/C correlano con un rischio diminuito di sviluppare iponatriemia rispetto ai portatori A/C ( $p=0.074$ ).

Invece, per l'rs1870377, i portatori A/T correlano con un rischio diminuito di sviluppare iponatriemia rispetto ai portatori T/T ( $p=0.030$ ).

#### **4.2.5 Correlazione dei recettori della vasopressina con gli *outcome* clinici e lo stato natriemico dei pazienti**

Dalle analisi di correlazione condotte, mediante *test* di Regressione di Cox, tra i recettori della vasopressina (*AVPR1A*, *AVPR1B*, *AVPR2*) con gli *outcome* clinici dei pazienti, è emerso che il recettore *AVPR1A* correla sia con l'*OS* ( $p=0.098$ ) sia con la *PFSI* ( $p=0.027$ ). In particolare, all'aumentare dell'espressione di questo recettore, aumenta sia l'*OS* che la *PFS*.

Non è emerso invece alcun risultato statisticamente significativo correlando i recettori dell'*AVP* con lo stato natriemico dei pazienti. Queste ultime analisi sono state condotte mediante *test* di Regressione logistica.



## 4.3 Risultati della fase prospettica

### 4.3.1 Caratteristiche ed *outcome* clinici dei pazienti

Nella seconda fase del progetto sono stati arruolati 100 pazienti suddivisi nella seguente modalità:

- Pazienti eunatriemici nell'intero periodo considerato (gruppo A);
- Pazienti con almeno una misurazione di iponatriemia nel periodo preso in considerazione (gruppo B).

Per quanto riguarda il gruppo degli iponatriemici, i pazienti sono stati successivamente sottoclassificati in:

- Pazienti eunatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2 (gruppo C);
- Pazienti iponatriemici solo al baseline (gruppo D);
- Pazienti iponatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2 (gruppo E).

Le caratteristiche e gli *outcome* clinici dei pazienti sono riportate nella **Tabella 4**.

Outcome clinico/ caratteristiche	Pazienti					
	gruppo A	gruppo B	gruppo C	gruppo D	gruppo E	Totali
Numero pazienti	66	34	19	4	11	100
<b>OS</b>						
Mediana OS (mesi)	14.0	4.2	4.8	4.0	4.2	10.1
<b>PFS</b>						
Mediana PFS (mesi)	8.4	2.7	3.8	1.5	2.5	6.1
<b>Età</b>						
Mediana età (anni)	70.0	71.0	71.0	70.5	74.0	70.5
<b>Sesso</b>						
Maschio	44	28	16	3	9	72
Femmina	22	6	3	1	2	28
<b>Istotipo</b>						
Squamocellulare	9	9	4	0	5	18
Adenocarcinoma	48	25	15	4	6	73
Adenosquamoso	1	0	0	0	0	1
Microcitoma	8	0	0	0	0	8
<b>Schema</b>						
Chemioterapia	23	15	7	0	8	38
Chemioterapia + Immunoterapia	22	6	4	0	2	28
Immunoterapia	16	11	6	4	1	27
Chemioterapia + Radioterapia	4	2	2	0	0	6
ChemioRadioterapia seguita da immunoterapia	1	0	0	0	0	1

**Tabella 4.** Outcome e caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nella fase prospettica.

### 4.3.1 Correlazione dello stato di natriemia con gli *outcome* clinici dei pazienti

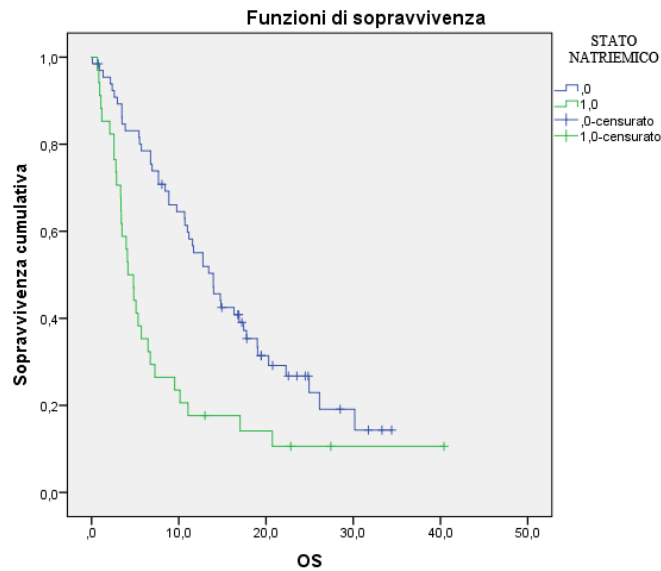
Le prime analisi statistiche della fase prospettica si propongono di andare a ricercare una possibile correlazione tra lo stato natriemico dei pazienti e specifici *outcome* clinici, quali *OS*, *PFS* (mediante analisi di *Kaplan-Meier*) e risposta al trattamento (mediante tabelle di Contingenza).

Inizialmente, sono stati presi in esame due gruppi di pazienti: il primo costituito da coloro a cui la condizione di iponatriemia è stata riscontrata almeno una volta (gruppo B), ed il secondo rappresentato da pazienti che non hanno mai sviluppato questo disturbo elettrolitico (eunatriemici; gruppo A), considerando come lasso temporale il periodo compreso tra il *baseline* e il T2.

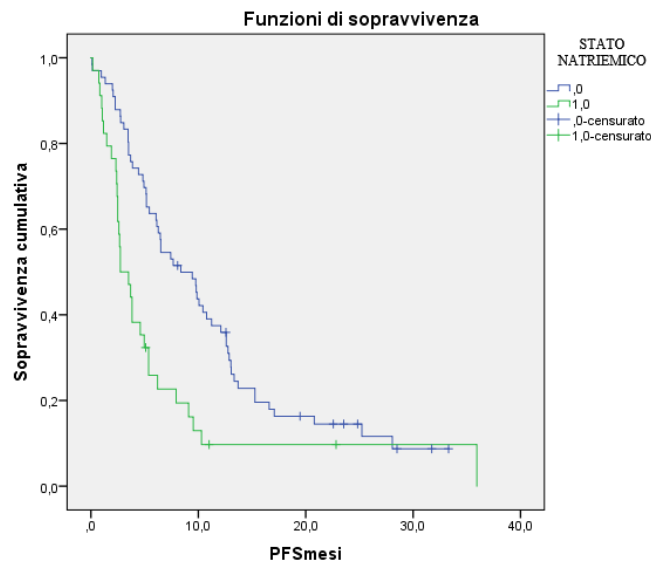
Dalle analisi statistiche effettuate, i due gruppi hanno mostrato una differenza statisticamente significativa sia per l'*OS* ( $p < 0.0005$ ) che per la *PFS* ( $p = 0.001$ ).

Per quanto riguarda l'*OS*, i pazienti che hanno sviluppato iponatriemia presentano rispettivamente una mediana di 4.2, rispetto agli eunatriemici la cui mediana di 14.0 mesi (**Figura 16**).

Relativamente alla *PFS*, i pazienti che hanno sviluppato iponatriemia hanno invece una mediana di 2.7 mesi, rispetto agli eunatriemici la cui mediana è di 8.4 mesi (**Figura 17**).



**Figura 16.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo stato natriemico dei pazienti e l'OS nel confronto tra gruppo A e gruppo B ( $p\text{-value}<0.0005$ ). Nella legenda, la linea blu (0) fa riferimento ai pazienti eunatriemici (gruppo A) mentre quella verde (1) riguarda i pazienti con almeno una misurazione di iponatriemia nel periodo preso in considerazione (gruppo B).



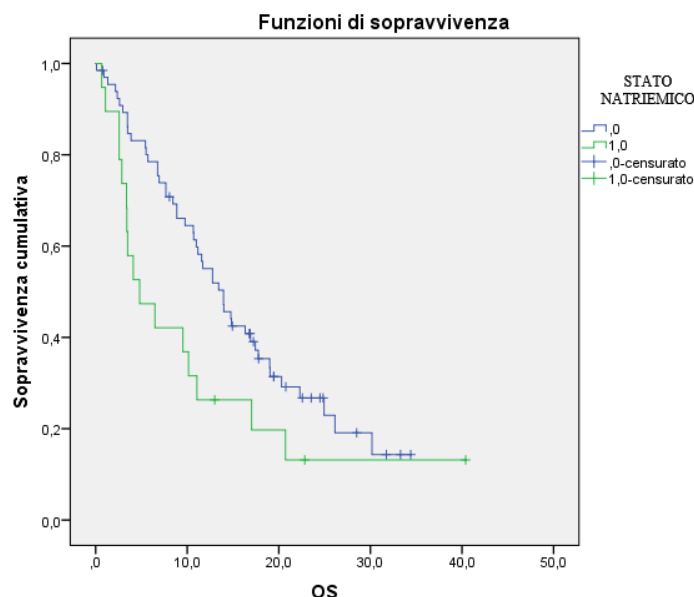
**Figura 17.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo stato natriemico dei pazienti e la PFS nel confronto tra gruppo A e gruppo B ( $p\text{-value}=0.001$ ). Nella legenda la linea blu (0) fa riferimento ai pazienti eunatriemici (gruppo A) mentre

quella verde (1) riguarda i pazienti con almeno una misurazione di iponatriemia nel periodo preso in considerazione (gruppo B).

Nessun risultato statisticamente significativo è stato riscontrato invece per le analisi relative alla risposta al trattamento.

Successivamente, si è deciso di confrontare il gruppo dei pazienti che ha sviluppato almeno una volta iponatriemia durante il corso di terapia considerando fino al T2, ad eccezione del basale (gruppo C), con il gruppo di pazienti che sono rimasti sempre eunatriemici nel periodo compreso tra il basale e il T2 (gruppo A).

In questo caso, soltanto l'*OS* si è osservata essere statisticamente significativa con un *p-value* di 0.042. In particolare, il primo gruppo presenta una mediana di 4.8 mesi e rispetto al secondo gruppo che ha una mediana di 14.0 mesi (**Figura 18**).



**Figura 18.** Curva di Kaplan-Meier relativa alla correlazione tra lo stato natriemico dei pazienti e la *OS* nel confronto tra gruppo A e gruppo C (*p-value*=0.042). Nella legenda la linea blu (0) fa riferimento ai pazienti eunatriemici (gruppo A) mentre

quella verde (1) riguarda i pazienti eunatriemici al basale e con almeno una misurazione di iponatriemia durante il corso della terapia fino al T2 (gruppo C).

Infine, è stato effettuato il confronto tra il gruppo di pazienti iponatriemici solo al basale (gruppo D) e il gruppo di pazienti iponatriemici sia al basale che ad almeno una misurazione effettuata fino al T2 (gruppo E).

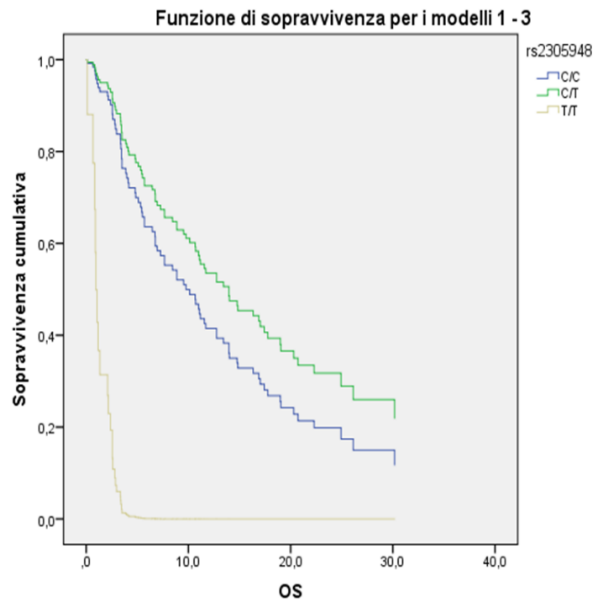
Nessun risultato statisticamente significativo è stato riscontrato per gli *outcome* clinici analizzati.

#### **4.3.2 Correlazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con gli *outcome* clinici e lo stato di natriemia dei pazienti**

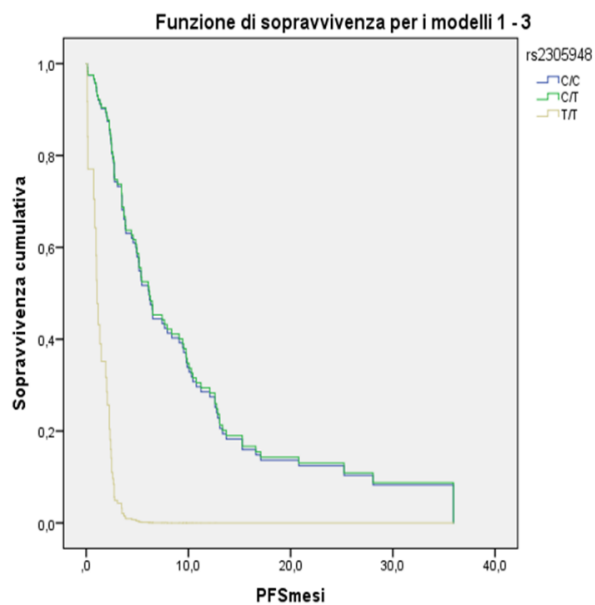
Le analisi correlazione tra gli *SNP* e gli *outcome* clinici dei pazienti quali, *OS* e *PFS* sono state effettuate tramite *test* di Regressione di *Cox* mentre quelle relative alla risposta al trattamento sono state eseguite con il *test* di Regressione Logistica.

Nello specifico, dai risultati ottenuti l'rs2305948 è stato associato in maniera statisticamente significativa con l'*OS* e la *PFS* con *p-value* rispettivamente di 0.001 e 0.010 (**Figura 19**).

In particolare, i portatori T/T, confrontati i portatori C/C e C/T, hanno un rischio maggiore di morte con un *p-value* <0.0005 ed un rischio maggiore di andare in progressione rispettivamente di 0.002 e 0.004 (**Figura 20**).



**Figura 19.** Curva di Regressione di Cox relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs2305948 e la *OS* ( $p$ -value=0.001).



**Figura 20.** Curva di Regressione di Cox relativa alla correlazione tra lo *SNP* rs2305948 e la *PFS* ( $p$ -value=0.010).

Nessun risultato statisticamente significativo è stato riscontrato invece per le analisi relative alla risposta al trattamento.

Inoltre, non sono stati ottenuti risultati statisticamente significativi neanche nelle correlazioni tra gli *SNP* e i gruppi di pazienti proposti precedentemente.

#### **4.4 Risultati laboratoristici dei *miRNA***

L'analisi dei *miRNA* è avvenuta mediante la progettazione di piastre *Custom* in modo tale da poter attenzionare contemporaneamente l'espressione dei vari *miRNA* e valutarla mediante *Real Time PCR*. La rilevazione è avvenuta mediante il *SYBR Green*, un colorante fluorescente che s'intercala nel doppio filamento di *DNA* quando esso è presente. Per ciascun campione si ottiene una curva di amplificazione il cui *CT* (*Threshold Cycle*) è inversamente proporzionale alla quantità di *DNA* presente.

Il set di *miRNA* analizzati deriva da un'analisi di *miRNA sequencing* condotta precedentemente per la fase retrospettiva del progetto, in cui sono stati confrontati campioni sia tumorali che peritumorali tra pazienti eunatriemici e quelli che hanno sviluppato iponatriemia. Alcuni dei risultati preliminari sono stati accettati come *abstract* e presentati al Congresso dell'*European Society for Medical Oncology* (*ESMO*) nel 2022 come *poster presentation*<sup>56</sup>.

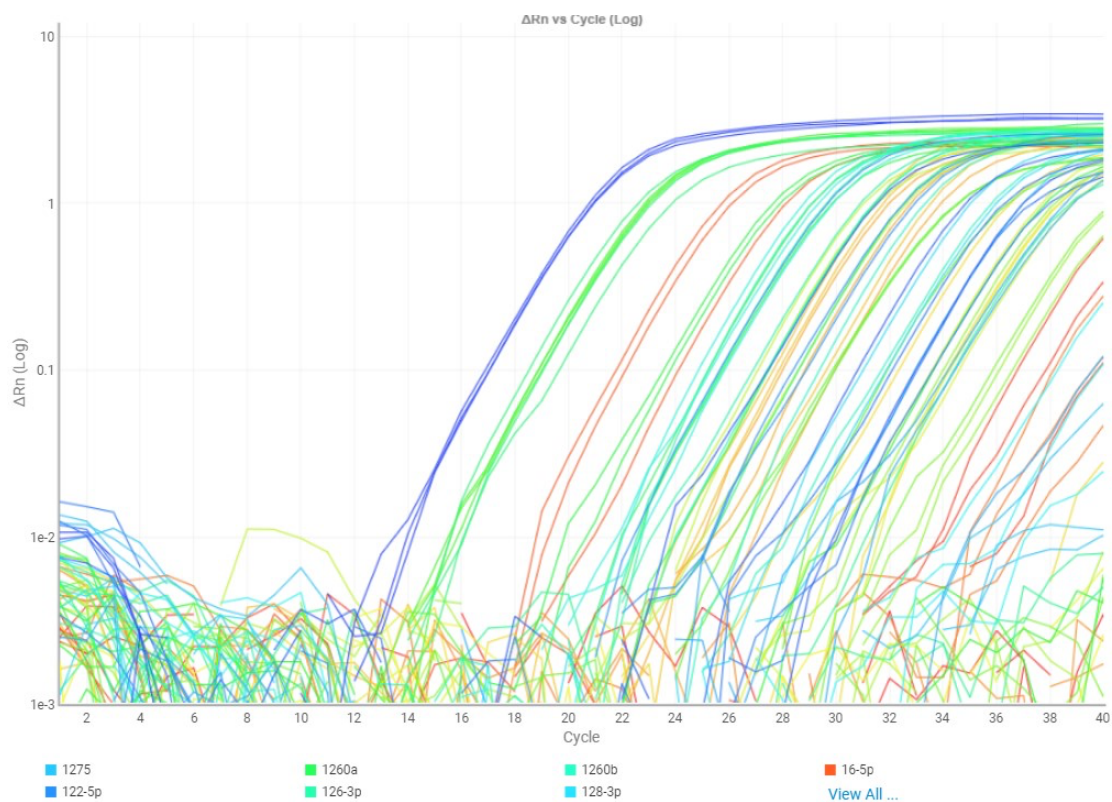
Nella categoria dei tumorali troviamo i seguenti *miRNA*: hsa-miR-147b-3p, hsa-miR-147b-5p, hsa-miR-539-3p, hsa-miR-625-3p, hsa-miR-9-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-937-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-32-3p.



Mentre, alla categoria dei peritumorali appartengono i seguenti *miRNA*: hsa-miR-1260a, hsa-miR-1260b, hsa-miR-1275, hsa-miR-4454, hsa-miR-4695-3p, hsa-miR-5100, hsa-miR-6073.

Inoltre, come accennato precedentemente, nella piastra *Custom*, sono stati inseriti altri 4 *miRNA* selezionati dalla letteratura, ovvero l': hsa-miR-21-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-339-5p, 4 possibili normalizzatori (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-30e-5p) e gli *Spike-in*.

Il grafico (**Figura 21**) è rappresentativo delle curve di amplificazione di tutti i *target* mediante l'analisi con piastra *Custom*.



**Figura 21.** Esempio di curve di amplificazione ottenute tramite un'analisi di *Real-Time PCR* relative ai *miRNA* presi in esame per questo studio.

Un'ulteriore analisi che è stata condotta per garantire la qualità dello studio è la valutazione del grado di emolisi dei campioni plasmatici. L'emolisi, ossia la rottura degli eritrociti è un parametro che risulta necessario valutare in quanto può influenzare notevolmente la qualità delle analisi, poiché il rilascio dei *miRNA* contenuti negli eritrociti può alterare i risultati delle analisi dei *miRNA* circolanti.

Per questo scopo, sono stati messi in relazione il *miR-23a-3p*, noto per essere molto espresso negli eritrociti ed il *miR-451a* ritenuto stabile nei campioni plasmatici e non influenzabile da fenomeni di emolisi ed è stato effettuato il delta *Ct*, noto anche come "*miR-ratio*". Un *cut-off* superiore a 7-8 indica un'elevata probabilità di emolisi<sup>57</sup> e pertanto, i *miRNA* con un valore di 7 sono stati esclusi dalla nostra analisi.

Le analisi statistiche di questi possibili biomarcatori, volti a ricerca una correlazione con lo stato natriemico e gli *outcome* clinici dei pazienti sono ancora in corso.

## 5. DISCUSSIONE

Con il termine iponatriemia si intende una condizione clinica caratterizzata da una concentrazione sierica di sodio inferiore a 135 mmol/L<sup>2</sup>. L'iponatriemia rappresenta l'alterazione elettrolitica più riscontrata nella pratica clinica, specialmente in campo oncologico<sup>26</sup>. Questo disturbo può presentarsi clinicamente con un'ampia varietà di sintomi che dipendono dalla tipologia iponatriemia e dal tempo che hanno a disposizione i neuroni per mettere in atto meccanismi di compensazione all'ipotonicità creatasi<sup>58</sup>.

Tale disordine elettrolitico viene classificato in base all'osmolalità in: ipotonica e non ipotonica. L'iponatriemia ipotonica può essere, a sua volta, sottoclassificata in ipovolemica, euvolemica ed ipervolemica, mentre quella non ipotonica si suddivide in pseudoiponatriemia e iponatriemia ipertonica<sup>10,11</sup>.

Le cause di questo disordine sono molteplici, tra le più comuni troviamo la Sindrome da Inappropriata Secrezione di Ormone Antidiuretico (*SIADH*) caratterizzata da iponatriemia ipotonica euvolemica e da iperosmolarità urinaria<sup>59</sup>.

È importante stabilire la tipologia di iponatriemia in atto (se ipotonica o ipertonica e se acuta o cronica), così da poter intervenire tempestivamente con un trattamento mirato e risolutivo, tenendo sempre in considerazione eventuali patologie concomitanti che possano alterare l'esito della diagnosi<sup>2,12</sup>.

Tra le più comuni opzioni terapeutiche disponibili, la soluzione salina ipertonica al 3% viene utilizzata per il trattamento dell'iponatriemia acuta<sup>12</sup>, mentre per l'iponatriemia cronica ipervolemica ed euvolemica si ricorre alla restrizione di fluidi<sup>12</sup>. Qualora quest'ultimo trattamento fallisse, le linee guida statunitensi consigliano l'utilizzo dei vaptani<sup>12</sup>. Nel caso in cui il paziente mostrasse invece la forma cronica ipovolemica, il trattamento dell'iponatremia consiste nella somministrazione di una soluzione isotonica (NaCl 0.9%)<sup>12</sup>.

L'iponatriemia è un disturbo ampiamente studiato in campo oncologico, in quanto è riscontrata in varie tipologie di tumore, tra cui il cancro alla prostata, ai reni, al fegato ed al polmone, in particolar modo il carcinoma polmonare a piccole cellule (*SCLC*)<sup>22</sup>. Essa può essere causata direttamente dal tumore primitivo oppure dalla terapia antineoplastica, da altri trattamenti secondari concomitanti o da altre comorbidità che spesso ne complicano il trattamento<sup>26</sup>.

Studi recenti hanno dimostrato che questo disturbo elettrolitico rappresenta un fattore prognostico negativo per i pazienti oncologici, specialmente per i pazienti affetti da tumore al polmone (*SLCS*), diminuendo la sopravvivenza globale (*OS*) rispetto ai pazienti eunatriemici<sup>29</sup> o aumentando la durata dell'ospedalizzazione degli stessi, gravando sul Sistema Sanitario Nazionale (*SSN*)<sup>60</sup>.

L'obiettivo principale di questo studio è quello di ricercare dei biomarcatori, quali *micro-RNA*, *SNPs* e recettori della vasopressina, potenzialmente correlabili a questo

disturbo elettrolitico nei pazienti con tumore al polmone ed investigarne il loro possibile ruolo prognostico e predittivo.

Questo studio è stato diviso in due fasi: una retrospettiva ed una prospettica.

La fase retrospettiva dello studio ha preso in considerazione 20 pazienti con tumore al polmone, di cui 10 che hanno sviluppato iponatriemia e 10 eunatriemici, sui cui campioni *FFPE* sono state effettuate le analisi immunoistochimiche relative ai recettori della vasopressina (*AVPR1A*, *AVPR1B* e *AVPR2*) e le analisi di genotipizzazione degli *SNP* relativi ai geni *AVP*, *AVPR1A*, *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF-A*, *KDR* e *FLT4*.

Nella fase prospettica, invece, sono stati arruolati 100 pazienti con tumore al polmone sui cui campioni di sangue sono state effettuate le analisi di genotipizzazione degli *SNP* citati in precedenza e sulla relativa porzione plasmatica, le analisi di espressione dei *miRNA*.

I primi risultati ottenuti da questa ricerca riguardano la correlazione tra la natremia e gli *outcome* clinici. Ciò che è emerso è che, per quanto riguarda la fase retrospettiva, lo stato natriemico correla con la *RFS* ( $p=0.077$ ); nello specifico i pazienti iponatriemici presentano una mediana inferiore rispetto ai pazienti eunatriemici (9.9 mesi rispetto a 14.0 mesi). Da queste prime analisi, non sono stati riscontrati dati statisticamente significativi per *OS*, *PFS1* e *PFS2*.

Per quanto riguarda, invece, la fase prospettica, inizialmente sono stati presi in considerazione due gruppi, ossia pazienti la cui la condizione di iponatriemia è stata riscontrata almeno una volta nel periodo di osservazione (gruppo B) e pazienti

eunatriemici (gruppo A). Da questa analisi è emerso che i due gruppi hanno mostrato una differenza statisticamente significativa sia per l'*OS* ( $p < 0.0005$ ) che per la *PFS* ( $p = 0.001$ ).

Per entrambi gli *outcome* è emerso che la mediana del gruppo B risulta inferiore rispetto agli eunatriemici (gruppo A), sia per quanto riguarda l'*OS* (4.2 mesi rispetto a 14.0) sia per la *PFS* (2.7 mesi rispetto a 8.4).

Successivamente, è stato confrontato il gruppo di pazienti che hanno sviluppato iponatriemia almeno una volta durante il corso della terapia ad eccezione del basale (gruppo C), con il gruppo di pazienti eunatriemici (gruppo A). Dal confronto tra i due gruppi l'*OS* risulta essere statisticamente significativa, con una  $p$  pari a 0.042 e con una mediana per i pazienti del gruppo C inferiore rispetto a quelli del gruppo A (4.8 mesi rispetto a 14.0 mesi).

Infine, è stato effettuato il confronto tra i pazienti iponatriemici solo al basale e pazienti iponatriemici sia al basale che ad almeno un'altra misurazione (rispettivamente gruppo D e E), ma non sono emersi dati statisticamente significativi.

Nessun risultato statisticamente significativo è emerso per la risposta al trattamento ed in letteratura non sono presenti studi analoghi. Nonostante ciò, rimane importante proseguire ed implementare le analisi sulle correlazioni con gli *outcome* clinici poiché risulta implicito pensare che i pazienti caratterizzati da questo disturbo elettrolitico e che presentano una condizione neoplastica, rispondano meno alla terapia o siano

caratterizzati da una sopravvivenza libera da progressione alla prima o seconda linea di trattamento inferiore.

In linea con quanto è emerso sulla sopravvivenza globale, in letteratura sono presenti numerosi studi che confermano che presentare uno stato di iponatriemia aumenta la mortalità dei pazienti; un esempio è quello condotto da Martin-Grace *et.al* che afferma che l'iponatriemia, specialmente se acuta, comporta un alto tasso di mortalità se non trattata correttamente e nelle tempistiche adeguate<sup>59</sup>.

Tra i biomarcatori oggetto di studio troviamo i seguenti polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP*): rs2282018 (gene *AVP*), rs11174811, rs7308855 (gene *AVPR1A*), rs11158358, rs2057482, rs1951795, rs2301113, rs10873142, rs12434438, rs11549465, rs11549467 (gene *HIF-1 $\alpha$* ), rs2010963, rs699947 (gene *VEGF-A*), rs1870377, rs2305948 (gene *KDR*), rs307826, rs307821 (gene *FLT4*).

Questi *SNP* sono stati correlati con gli *outcome* clinici e con lo stato natriemico dei pazienti arruolati per entrambe le fasi del progetto.

Inizialmente, nella fase retrospettiva, due *SNP* si sono dimostrati statisticamente significativi correlandoli con l'*OS*, ossia l'rs11158358 ( $p=0.070$ ) e l'rs2305948 ( $p=0.016$ ).

In particolare, per l'rs11158358 i portatori C/G mostrano un'*OS* mediana di 21.7 mesi, dunque inferiore rispetto ai portatori C/C e G/G, che sono rispettivamente di 44.9 e

50.2 mesi; analogamente, per l'rs2305948 è emerso che i portatori T/T risultano avere una mediana inferiore (8.6 mesi) rispetto ai portatori C/C e C/T (30.2 e 30.5 mesi rispettivamente). Quest'ultimo *SNP*, inoltre, correla anche con la *PFSI* ( $p=0.031$ ), e i portatori T/T hanno una sopravvivenza libera da progressione alla prima linea di terapia mediana inferiore rispetto i portatori C/C e C/T (1.4 mesi rispetto a 12.6 e 4.5).

Anche nella fase prospettica del progetto, l'rs2305948 ha mostrato dei risultati statisticamente significativi nelle analisi di correlazione relative agli *outcome* clinici; in particolare, la significatività è emersa sia per quanto riguarda l'*OS*, che la *PFS*, con una  $p$  rispettivamente di 0.001 e di 0.010.

In particolare, i portatori T/T hanno un rischio maggiore di morte e progressione rispetto ai portatori C/C e C/T con  $p < 0.0005$  per l'*OS* e di 0.002 e 0.004 rispettivamente per la *PFS*.

Questo *SNP* aveva già mostrato dei risultati statisticamente significativi per l'*OS* e la *PFS* quando erano state condotte le analisi preliminari riguardanti la fase prospettica del progetto<sup>61</sup>.

Nessun dato è risultato statisticamente significativo per la risposta al trattamento.

Per quanto concerne la *PFS2* e la *RFS*, le analisi svolte nel retrospettivo hanno mostrato che l'rs1870377 correla globalmente con questi *outcome* clinici ( $p=0.075$  e  $p=0.005$  rispettivamente). Nello specifico, per quanto riguarda la *PFS2*, i portatori T/T hanno una mediana maggiore rispetto ai portatori A/A e A/T (5.0 mesi rispetto a 3.0 e 3.6),



mentre per quanto riguarda la *RFS* è emerso che i portatori A/A hanno una *RFS* mediana di 4.6 mesi a confronto con i portatori T/T e A/T che hanno rispettivamente una mediana di 10.6 e 35.7 mesi. Inoltre, anche lo *SNP* rs11158358 ha mostrato una correlazione statisticamente significativa con la *RFS* e nello specifico, i portatori G/G presentano una mediana inferiore rispetto ai portatori C/C e C/G (7.2 mesi rispetto a 29.0 e 12.6).

Infine, per quanto riguarda le correlazioni degli *SNP* con lo stato natriemico dei pazienti, solo per la fase retrospettiva sono emersi dei risultati statisticamente significativi; nello specifico, è stato osservato che l'rs11174811 e l'rs1870377 correlano globalmente predicendo lo stato di natriemia, con un *p-value* rispettivamente di 0.074 e 0.093.

In particolare, per l'rs11174811, i portatori C/C correlano con un rischio diminuito di sviluppare iponatriemia rispetto ai portatori A/C ( $p=0.074$ ).

Invece, per l'rs1870377, i portatori A/T correlano con un rischio diminuito di sviluppare iponatriemia rispetto ai portatori T/T ( $p=0.030$ ).

In letteratura, non esistono evidenze che correlino questi polimorfismi a singolo nucleotide con lo stato di iponatriemia in pazienti con tumore al polmone, però tra quelli citati, alcuni risultano interessanti da attenzionare poiché associati ad altre tipologie tumorali o altre condizioni patologiche.

Un esempio è l'rs11158358, dove l'allele C è considerato un fattore di rischio per le donne cinesi con il cancro alla cervice<sup>62</sup>.

Per quanto concerne l'rs2305948, Dronova *et.al* sostengono che ci sia una migliore prognosi di sopravvivenza in pazienti con genotipo eterozigote caratterizzati da tumore al seno estrogeno-positivo che rispondono al Tamoxifene<sup>63</sup>. Un altro studio ha dichiarato che l'allele T dello stesso *SNP* risulta un fattore di rischio per l'insorgenza di tumori neuroendocrini<sup>64</sup>.

L'rs2305948 potrebbe anche essere associato ad un maggior suscettibilità allo sviluppo del glioma nelle popolazioni asiatiche, ma sono necessari altri studi di controllo<sup>65</sup>.

Inoltre, questo *SNP* insieme ad altri 3 relativi al gene *KDR* sono stati visti essere associati all'*OS* nei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare (*Hepatocellular carcinoma, HCC*), risultando quindi dei potenziali marcatori prognostici in questa specifica tipologia tumorale<sup>66</sup>.

L'rs1870377 risulta un altro interessante *SNP* da indagare in quanto, in letteratura, tramite una meta-analisi è stato visto che potrebbe essere utilizzato per identificare individui con elevata suscettibilità alle malattie coronariche e ictus ischemico<sup>67</sup>. Inoltre, il genotipo A/T di questo polimorfismo ha mostrato un effetto protettivo nei confronti dell'astrocistoma<sup>68</sup>.

Uno studio condotto da Paradowska-Gorycka *et.al* ha dimostrato che la frequenza del genotipo T/T dello *SNP* rs1870377 è più elevata nei pazienti con artrite reumatoide rispetto ai controlli sani<sup>69</sup>. Questa pubblicazione risulta interessante in quanto è comune riscontrare pazienti affetti da tumore al polmone con metastasi ossee<sup>70</sup>, dunque, sarebbe importante proseguire con le analisi di questi *SNP*.

Un lavoro altrettanto interessante in cui sono stati ottenuti dei risultati statisticamente significativi analizzando alcuni degli *SNP* esaminati nel nostro studio, è quello di Zhang *et.al*; ad esempio, viene riportato che l'rs2305948 (genotipo T/T) è associato ad una maggiore predisposizione a problemi cardiovascolari gravi come l'infarto del miocardio ricorrente, nei pazienti sottoposti ad intervento coronarico percutaneo<sup>71</sup>.

Gli *SNP* relativi ai geni *KDR* e *VEGF-A*, essendo implicati in numerosi processi sia fisiologici che patologici come la vascolarizzazione, risultano molto interessanti da investigare in quanto potrebbero trovarsi nuovi collegamenti per la condizione iponatriemica o per la neoplasia polmonare.

Inoltre, il genotipo T/T dell'rs1870377, nella popolazione asiatica presenta maggiori *OS* e *PFS* per i pazienti con carcinoma gastrico avanzato rispetto ai pazienti con genotipo A/A e A/T<sup>72</sup>. Un ulteriore studio condotto ha inoltre dichiarato che per l'rs1870377, i pazienti con carcinoma gastrico e con genotipo A/A presentano una sopravvivenza globale inferiore (mediana di 2.93 anni) rispetto ai genotipi T/T e A/T (rispettivamente 4.78 e 4.27 anni)<sup>73</sup>.

Per ciò che riguarda lo *SNP* rs11174811, uno studio riportava che il genotipo eterozigote poteva essere associato, dai risultati preliminari raccolti, ad una pressione arteriosa più elevata, ma al completamento dell'indagine, non sono stati ottenuti dei dati statisticamente significativi<sup>74</sup>.

Per quanto concerne gli altri *SNP* analizzati, vorrei menzionare l'rs699947 in quanto, nonostante non sia stata riscontrata la significatività per le nostre analisi, un lavoro di Tu *et.al* ha dichiarato che il genotipo A/A di questo polimorfismo conferisce maggiore suscettibilità al cancro al polmone nella popolazione asiatica, ma non in quella caucasica<sup>75</sup>. Le differenze sono legate alla genetica delle due popolazioni prese in esame<sup>75</sup>.

Altri biomarcatori presi in considerazione sono i recettori della vasopressina, i quali sono stati correlati con gli *outcome* clinici e lo stato natriemico dei pazienti. Ciò che è emerso è che il recettore *AVPR1A* correla con l'*OS* e la *PFSI* ( $p=0.098$  e  $0.027$ ). Nessun risultato statisticamente significativo è stato ottenuto con lo stato natriemico dei pazienti.

In letteratura non sono noti veri e propri collegamenti tra questa classe di recettori e la condizione di iponatriemia nei pazienti con tumore al polmone, però i dati raccolti tramite questo elaborato potrebbero risultare interessanti da approfondire, visto il ruolo della vasopressina in questo disordine.

Nella fase prospettica dello studio è stata effettuata anche l'analisi di espressione di un *set* di *miRNA*, selezionato da un'analisi di *miRNA-sequencing* eseguita sui campioni della fase retrospettiva, e 4 *miRNA* selezionati dalla letteratura (hsa-miR-21-5p, il hsa-miR-126-3p, il hsa-miR-128-3p ed il hsa-miR-339-5p).

Le analisi che correlano questi biomarcatori con lo stato natriemico dei pazienti e con gli *outcome* clinici sono ancora in corso.

Il *set* di *miRNA* è composto in questo modo:

-*miRNA* tumorali (hsa-miR-147b-3p, hsa-miR-147b-5p, hsa-miR-539-3p, hsa-miR-625-3p, hsa-miR-9-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-937-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-32-3p);

-*miRNA* peritumorali (hsa-miR-1260a, hsa-miR-1260b, hsa-miR-1275, hsa-miR-4454, hsa-miR-4695-3p, hsa-miR-5100, hsa-miR-6073).

Tra i *miRNA* tumorali analizzati, il miR-9-5p risulta interessante da investigare in quanto, in letteratura, è stato visto promuovere la progressione cellulare dell'adenocarcinoma polmonare (*Lung adenocarcinoma, LUAD*)<sup>76</sup>; in modo simile, un altro lavoro di Ma *et.al* ha osservato che anche una *over*-espressione del miR-937-3p nelle linee cellulari di *LUAD* sembra correlare con la progressione tumorale, partecipando all'invasione cellulare e alle metastasi<sup>77</sup>.

Uno studio condotto da Wang *et. al* ha dimostrato la differente espressione di 4 *micro-RNA* in pazienti affetti da *NSCLC* rispetto ai controlli sani<sup>78</sup>. I *markers* in questione sono: miR-9-3p, miR-205-5p, miR-210-5p e miR-1269a, i quali risultano essere maggiormente espressi negli esosomi sierici dei pazienti con *NSCLC*<sup>78</sup>.

Al momento, in letteratura, non sono presenti studi che identificano i *miRNA* come biomarcatori correlabili all' iponatriemia in pazienti con tumore al polmone; perciò, i risultati che si potranno ottenere dalla ricerca condotta in questo elaborato potrebbero rappresentare un notevole punto di partenza per collegarli alla condizione iponatriemica o alla neoplasia tumorale.

Ciò che occorre sottolineare, in merito alle analisi condotte su questi biomarcatori, è la necessità di adottare metodi standardizzati e coerenti a molteplici livelli, tra cui: modalità di esecuzione del prelievo e manipolazione del sangue intero, conservazione dei campioni ed estrazione dell'*RNA*.

Durante l'analisi dei suddetti *miRNA*, soprattutto se si prendono in considerazione i *miRNA* circolanti, la valutazione del grado di emolisi dei campioni rappresenta un altro aspetto molto importante da attenzionare, dato che i *miRNA* sono contenuti anche nei globuli rossi<sup>57</sup>.

Uniformare questi aspetti ci permette quindi di poter ridurre le differenze interlaboratorio e poter usufruire di questi biomarcatori.

Tra gli obiettivi futuri sarebbe importante portare avanti studi già esistenti che sono pertinenti con lo scopo di questo elaborato; un esempio è rappresentato dalla ricerca condotta da Bijkerk *et. al.* Questo studio è volto infatti alla dimostrazione del ruolo del miR-132 nella regolazione dell'omeostasi dell'acqua nell'organismo, in quanto è stato dimostrato che il silenziamento di questo *miRNA*, che è altamente espresso a livello

dell'ipotalamo, aumenta l'espressione di *MECP2*, ovvero del repressore del gene che codifica per l'*AVP*. La mancata produzione e rilascio di *AVP* determina la diminuzione della proteina *AQP2* e l'aumento dell'osmolarità plasmatica<sup>79</sup>.

Un altro aspetto che sarebbe interessante approfondire per poter implementare le ricerche sulla condizione iponatriemica in ambito oncologico, riguarda l'identificazione dei possibili *target* correlati ai *miRNA* analizzati nel nostro studio, mediante analisi di laboratorio o analisi bioinformatiche. A questo proposito, nella letteratura scientifica è pubblicato uno studio in cui, tramite analisi bioinformatiche su popolazioni asiatiche, si è osservato che tra i geni *target* di un *set* di *miRNA* e *lncRNA* (*Long- Non Coding RNA*) analizzato confrontando campioni tumorali (*NSCLC*) e campioni sani, sono presenti quelli dell'*AQP2* e dell'*AVPR2*<sup>80</sup>. Questo studio ipotizza che questi geni possono rappresentare dei possibili bersagli per il trattamento dell'*NSCLC*, dato che possono avere un ruolo nello sviluppo di questo tumore. Inoltre, suggerisce che anche i *lncRNA* potrebbero essere importanti da attenzionare per ricercare una possibile correlazione tra i *lncRNA* e iponatriemia<sup>80</sup>.

Un altro esempio di *markers* che potrebbe essere studiato in relazione alla condizione di iponatriemia è rappresentato dall'apelina, un piccolo peptide conosciuto come ligando del recettore accoppiato alle proteine *G APJ* e codificato dal gene *APLN*<sup>81</sup>. Quando tradotta, questa proteina, da origine frammenti differenti e tra questi, l'apelina 13 sembra possa essere implicata in diversi meccanismi a livello tumorale, come

l'angiogenesi e la metastatizzazione di alcuni tumori, tra cui ad esempio l'adenocarcinoma polmonare<sup>82</sup>.

I risultati ottenuti da questo studio innovativo forniscono quindi un notevole punto di partenza alla comunità scientifica per ulteriori ricerche e analisi future che mirano a identificare dei potenziali biomarcatori predittivi e prognostici correlati all'iponatriemia in pazienti affetti da tumore al polmone. Tali marcatori risultano particolarmente interessanti, soprattutto se si pensa alla non invasività delle procedure di reperimento del materiale biologico.

Infine, risulta necessario progredire con lo studio dell'iponatriemia, così da poter apportare nuove conoscenze che permettano di far luce sui vari aspetti che ancora non sono stati del tutto chiariti, e migliorare la gestione di questi pazienti, al fine di incrementare la sopravvivenza e di efficientare i costi che gravano sul Sistema Sanitario Nazionale (SSN).



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Biswas, M., & Davies, J. S. (2007). Hyponatraemia in clinical practice. In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 83, Issue 980, pp. 373–378).  
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.056515>.
2. Naticchia, A., Ferraro, P. M., Alonzo, S. d', & Gambaro, G. (2011). IPONATRIEMIE: APPROCCIO PRATICO ALLA DIAGNOSI E ALLA TERAPIA. *G Ital Nefrol*, 28(3), 305–313.
3. Urso, C., & Caimi, G. (2012). Sindrome iponatriemica. In *Clin Ter* (Vol. 163, Issue 1).
4. Cuesta, M., & Thompson, C. J. (2016). The syndrome of inappropriate antidiuresis (SIAD). In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 30, Issue 2, pp. 175–187). Bailliere Tindall Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.02.009>.

5. Berardi, R., Meletani, T., Fiordoliva, I., Baleani, G., Savini, A. In: L'importanza dell'iponatriemia in oncologia geriatrica. *Argomenti di Oncologia Geriatrica* vol. 2, issue 2, pag 21-31. (2017).
  
6. Spasovski, G., Vanholder, R., Allolio, B., Annane, D., Ball, S., Bichet, D., Decaux, G., Fenske, W., Hoorn, E. J., Ichai, C., Joannidis, M., Soupart, A., Zietse, R., Haller, M., van der Veer, S., van Biesen, W., & Nagler, E. (2014). Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of hyponatraemia. In *European Journal of Endocrinology* (Vol. 170, Issue 3). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-1020>.
  
7. Sjöblom, E., Höjer, J., Ludwigs, U., & Pirskanen, R. (1997). Fatal hyponatraemic brain oedema due to common gastroenteritis with accidental water intoxication. *Intensive Care Medicine*, 23(3), 348–350. <https://doi.org/10.1007/s001340050340>.
  
8. Florio, G., Iervolino, A., Simeoni, M., Perna, A. F., & Trepiccione, F. (2023). *Giornale Italiano di Nefrologia. In depth review Corrispondenza a.*
  
9. Giuseppe, Regolisti, R., Bozzoli, L., & Fiaccadori, E. (2015). *Iponatremia: Dalle linee guida alla pratica clinica.*

- 10.** Krajewska, M., Kruczkowska, A., Kuształ, M. A., & Królicka, A. L. (2020). Hyponatremia in infectious diseases—a literature review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 15, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155320>.
- 11.** Dineen, R., Thompson, C. J., & Sherlock, M. (2017). Hyponatraemia - Presentations and management. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 17(3), 263–269. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-3-263>.
- 12.** Hoorn, E. J., & Zietse, R. (2017). Diagnosis and treatment of hyponatremia: Compilation of the guidelines. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 28, Issue 5, pp. 1340–1349). American Society of Nephrology. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016101139>.
- 13.** Refardt, J., Winzeler, B., & Christ-Crain, M. (2019). Copeptin and its role in the diagnosis of diabetes insipidus and the syndrome of inappropriate antidiuresis. In *Clinical Endocrinology* (Vol. 91, Issue 1, pp. 22–32). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cen.13991>.

**14.** Peri, A., Parenti, G., Giuliani, A., Scrivano, J., Pettorini, L., Festuccia, F., Pirozzi, N., Menè, P., endocrinologia, S., Biomedicina, dal, & careggi, aou. (2012). IpoNatriemIa e SINDrome da INapproprIata SecrezIoNe dI ormoNe aNtIdIuretIco (SIadH). *G Ital Nefrol*, 29(6), 661–673.

**15.** M. Buemi, D. Bolignano, G. Coppolino, A. Sturiale, S. Campo, E. Crascì, C. Aloisi, N. Frisina. (2017). ReviewAcquareticiGIN. *Giornale Italiano Di Nefrologia*, PP. 371-380.

**16.** Ranieri, M., di Mise, A., Tamma, G., & Valenti, G. (2019). Vasopressin–aquaporin-2 pathway: Recent advances in understanding water balance disorders. In *F1000Research* (Vol. 8). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16654.1>.

**17.** Esposito, P., Piotti, G., Bianzina, S., Malul, Y., & Dal Canton, A. (2011). The syndrome of inappropriate antidiuresis: Pathophysiology, clinical management and new therapeutic options. In *Nephron - Clinical Practice* (Vol. 119, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000324653>.

- 18.** Kwon, T. H., Frøkiær, J., & Nielsen, S. (2013). Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. In *Kidney Research and Clinical Practice* (Vol. 32, Issue 3, pp. 96–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2013.07.005>.
- 19.** Centrone, M., Ranieri, M., di Mise, A., D'Agostino, M., Venneri, M., Ferrulli, A., Valenti, G., & Tamma, G. (2022). AQP2 trafficking in health and diseases: an updated overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106261>.
- 20.** Mentrasti, G., Scortichini, L., Torniai, M., Giampieri, R., Morgese, F., Rinaldi, S., & Berardi, R. (2020). Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (Siadh): Optimal management. In *Therapeutics and Clinical Risk Management* (Vol. 16, pp. 663–672). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S206066>.
- 21.** Peri, A., Grohé, C., Berardi, R., & Runkle, I. (2017). SIADH: differential diagnosis and clinical management. *Endocrine*, 55(1), 311–319. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0936-3>.

**22.** Berardi, R., Rinaldi, S., Caramanti, M., Grohè, C., Santoni, M., Morgese, F., Torniai, M., Savini, A., Fiordoliva, I., & Cascinu, S. (2016). Hyponatremia in cancer patients: Time for a new approach. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 102, pp. 15–25). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.010>.

**23.** Varaldo, E., Berton, A. M., Prencipe, N., & Benso, A. (2023). Gestione dell'iponatriemia acuta in ambiente ospedaliero. *L'Endocrinologo*, 24(S1), 35–37. <https://doi.org/10.1007/s40619-023-01298-3>.

**24.** Decaux, G. (2012). SIADH et traitement par vaptans. *Annales d'Endocrinologie*, 73(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2012.04.005>.

**25.** Berardi, R., Mastroianni, C., Io Russo, G., Buosi, R., Santini, D., Montanino, A., Carnaghi, C., Tiseo, M., Chiari, R., Camerini, A., Barni, S., de Marino, V., Ferrari, D., Cristofano, A., Doni, L., Freddari, F., Fumagalli, D., Portalone, L., Sarmiento, R., ... Arvat, E. (2019). Syndrome of inappropriate anti-diuretic hormone secretion in cancer patients: results of the first multicenter Italian study. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11. <https://doi.org/10.1177/1758835919877725>.

- 26.** Florio, G., Iervolino, A., Simeoni, M., Perna, A. F., & Trepiccione, F. (2013). SUPPLEMENTO S81-IN DEPTH REVIEW Iposodiemia e disordini elettrolitici nel paziente oncologico Corrispondenza a. <https://doi.org/10.1111/j.1365>.
- 27.** Berardi, R., Caramanti, M., Fiordoliva, I., Morgese, F., Savini, A., Rinaldi, S., Torniai, M., Tiberi, M., Ferrini, C., Castagnani, M., Rovinelli, F., Onofri, A., & Cascinu, S. (2024). Hyponatraemia is a predictor of clinical outcome for malignant pleural mesothelioma. <https://doi.org/10.1007/s00520-014>.
- 28.** Petereit, C., Zaba, O., Teber, I., & Grohé, C. (2011). Ist die Hyponatriämie (HN) ein Prognosefaktor für das Gesamtberleben der Patienten mit Lungenkarzinom? *Pneumologie*, 65(9), 565–571. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1256668>.
- 29.** Hansen, O., Sørensen, P. & Hansen, K. H. The occurrence of hyponatremia in SCLC and the influence on prognosis. A retrospective study of 453 patients treated in a single institution in a 10-year period. *Lung Cancer* 68, 111–114 (2010).

- 30.** Agenzia Italiana del Farmaco. I biomarcatori, strumento prezioso per lo sviluppo di nuovi farmaci.
- 31.** Normanno, N. La medicina di precisione tra laboratorio e clinica in oncologia (2024).
- 32.** Wu, L., & Qu, X. (2015). Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chemical Society Reviews*, 44(10), 2963–2997. <https://doi.org/10.1039/c4cs00370e>.
- 33.** Lobera, E. S., Varela, M. A., Jimenez, R. L., & Moreno, R. B. (2023). miRNA as biomarker in lung cancer. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 50, Issue 11, pp. 9521–9527). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08695-9>.
- 34.** Deng, N., Zhou, H., Fan, H., & Yuan, Y. (2017). Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 66, pp. 110635–110649). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22372>.



- 35.** Budakoti, M., Panwar, A. S., Molpa, D., Singh, R. K., Büsselberg, D., Mishra, A. P., Coutinho, H. D. M., & Nigam, M. (2021). Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cellular Signalling*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109995>.
- 36.** Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Cite this article 100k Accesses 3708 Citations 67 Altmetric Metrics. In *Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15).
- 37.** O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- 38.** Corbetta, S. (2020). Ruolo dei microRNA nel carcinoma paratiroideo. Volume 21, pages 139–141.
- 39.** Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 9, pp. 597–610). <https://doi.org/10.1038/nrg2843>.

40. Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>.

41. Biol, G. M., Palmero, I., Gisele, S., de Campos, P., Campos, M., Nogueira De Souza, N. C., Dale, I., Guerreiro, C., Carvalho, A. L., & Marques, M. M. C. (2011). *Log in An official website of the United States government Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression.* 34(3), 363–370. <https://doi.org/10.1590/S1415>.

42. Fondazione AIRC per la Ricerca sul cancro, MicroRNA per il controllo delle metastasi (2010).

43. Marth, G. T., Korf, I., Yandell, M. D., Yeh, R. T., Gu, Z., Zakeri, H., Stitzel, N. O., Hillier, L., Kwok, P.-Y., & Gish, W. R. (1999). *A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery.* <http://genetics.nature.com>.

44. Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. In *Gene* (Vol. 234, Issue 2, pp. 177–186). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X).

45. Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer. In *Cancer Research* (Vol. 76, Issue 13, pp. 3666–3670). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>.

46. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34, 275–305 (2002).

47. Baldassarre, D., Amato, M., Frigerio, B., Columbo, G., Binkley, P.F., Pandey, S.R., Suhy, A.M., Hartmann, K., Kitzmiller, J.P. Biomarcatori Farmacogenomici Per La Predizione Di Efficacia e Sicurezza delle Statine (2015).

48. Lee, S., Kasif, S., Weng, Z., & Cantor, C. R. (2008). Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS ONE*, 3(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003906>.

**49.** Shastry, B. S. In: SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *Journal of Human Genetics* at <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0200-z> (2007).

**50.** <https://www.qiagen.com/us>.

**51.** Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teillum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. In *Methods* (Vol. 59, Issue 1, pp. S1–S6). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>.

**52.** He, Q., Ye, A., Ye, W., Liao, X., Qin, G., Xu, Y., Yin, Y., Luo, H., Yi, M., Xian, L., Zhang, S., Qin, X., Zhu, W., & Li, Y. (2021). Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1. *Cell Death and Disease*, 12(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03803-8>.

**53.** Bassand, K., Metzinger, L., Naïm, M., Mouhoubi, N., Haddad, O., Assoun, V., Zaïdi, N., Sainte-Catherine, O., Butt, A., Guyot, E., Oudar, O., Laguillier-Morizot, C., Sutton, A., Charnaux, N., Metzinger-Le Meuth, V., & Hlawaty, H. (2021). miR-126-

3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(13), 6032–6045. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16460>.

**54.** Hu, J., Cheng, Y., Li, Y., Jin, Z., Pan, Y., Liu, G., Fu, S., Zhang, Y., Feng, K., & Feng, Y. (2014). MicroRNA-128 plays a critical role in human non-small cell lung cancer tumorigenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis by directly targeting vascular endothelial growth factor-C. *European Journal of Cancer*, 50(13), 2336–2350. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.005>.

**55.** Jansson, M. D., Damas, N. D., Lees, M., Jacobsen, A., & Lund, A. H. (2014). miR-339-5p regulates the p53 tumor-suppressor pathway by targeting MDM2. *Oncogene*, 34(15), 1908–1918. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.130>.

**56.** Mentrasti, G., Ambrosini, E., Giuliani, L., Chiodi, N., Liguori, C., Gualtieri, M., Bianchi, F., Barbisan, F., Goteri, G., Rocchi, M. B. L., & Berardi, R. (2022). 1621P miRNA signature as early predictor of hyponatremia and survival in lung cancer: Preliminary results from the ISA retrospective study. *Annals of Oncology*, 33, S1282–S1283. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.1924>.

- 57.** Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teillum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. In *Methods* (Vol. 59, Issue 1, pp. S1–S6). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>.
- 58.** Prencipe, N., Benso, A., Varaldo, E., & Berton, A. M. (2023). Erratum to: Gestione ambulatoriale del paziente con iponatriemia ipotonica cronica. *L'Endocrinologo*, 24(S1), 84–84. <https://doi.org/10.1007/s40619-023-01314-6>.
- 59.** Martin-Grace, J., Tomkins, M., O Reilly, M. W., Thompson, C. J., & Sherlock, M. (2022). Approach to the Patient: Hyponatremia and the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis (SIAD). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 107(8), 2362–2376.
- 60.** Berardi, R., Caramanti, M., Castagnani, M., Guglielmi, S., Marcucci, F., Savini, A., Morgese, F., Rinaldi, S., Ferrini, C., Tiberi, M., Torniai, M., Rovinelli, F., Fiordoliva, I., Onofri, A., & Cascinu, S. (2015). Hyponatremia is a predictor of hospital length and cost of stay and outcome in cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 23(10), 3095–3101. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2683-z>.

**61.** Ambrosini, E., Mentrasti, G., Chiodi, N., Giuliani, L., Liguori, C., Gualtieri, M., Bianchi, F., Rocchi, M.B.L., Berardi, R. (2023). SNP as predictors of natremic status and survival in lung cancer: preliminary results of the ISA-2 prospective study.

**62.** Berardi, R., Goteri, G., Pagliaretta, S., Paolucci, V., Morgese, F., Conti, A., Ferai, M., Pompili, C., Duranti, C., Marcantognini, G., Savini, A., Caramenti, M., Rinaldi, S., Torniai, M., Santoni, M., Zizzi, A., Mazzanti, P., Onofri, A., Ricci, G., Scarpelli, M. (2020). The role of angiogenetic single-nucleotide polymorphism in thymic malignancies and thymic benign lesions. doi: 10.21037/jtd-19-3720. PMID: 33447413; PMCID: PMC7797874.

**63.** Dronova, T. A., Babyshkina, N. N., Zavyalova, M. v., Slonimskaya, E. M., & Cherdyntseva, N. v. (2021). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) Contributes to Tamoxifen Resistance in Estrogen-Positive Breast Cancer Patients. *Molecular Biology*, 55(1), 102–108. <https://doi.org/10.1134/S0026893321010052>.

**64.** Berardi, R., Torniai, M., Partelli, S., Rubini, C., Pagliaretta, S., Savini, A., Polenta, V., Santoni, M., Giampieri, R., Onorati, S., Barucca, F., Murrone, A., Bianchi, F., & Falconi, M. (2018). Impact of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) single nucleotide polymorphisms on outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *PLoS ONE*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197035>.

**65.** Sun, S., Li, X., Qu, B., Xie, K., Li, J., & Miao, J. (2022). Association of the VEGFR2 single nucleotide polymorphism rs2305948 with glioma risk. In *Medicine (United States)* (Vol. 101, Issue 1, p. E28454). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028454>.

**66.** Wang, W., Ma, X.-P., Shi, Z., Zhang, P., Ding, D.-L., Huang, H.-X., Saiyin, H. G., Chen, T.-Y., Lu, P.-X., Wang, N.-J., Yu, H., Sun, J., Zheng, L., Yu, L., Xu, J., & Jiang, D.-K. (2015). Epidermal growth factor receptor pathway polymorphisms and the prognosis of hepatocellular carcinoma. In *J Cancer Res* (Vol. 5, Issue 1). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.



67. Wang, L., Ge, H., Peng, L., & Wang, B. (2019). A meta-analysis of the relationship between VEGFR2 polymorphisms and atherosclerotic cardiovascular diseases. *Clinical Cardiology*, 42(10), 860–865. <https://doi.org/10.1002/clc.23233>.
68. Gao, Y., Ma, P., He, Y., Liu, Y., & Jiang, Y. (2016). Genetic Variations of Kinase Inserts Domain Receptor (KDR) Gene Are Associated with the Risk of Astrocytomas. *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2541–2549. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9239-6>.
69. Paradowska-Gorycka, A., Stypinska, B., Pawlik, A., Malinowski, D., Romanowska-Prochnicka, K., Manczak, M., & Olesinska, M. (2019). Kdr (Vegfr2) genetic variants and serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Biomolecules*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080355>.
70. Fondazione AIRC. Le metastasi ossee. (2024).
71. Zhang, L. J., Zhang, Y. Q., Han, X., Zhang, Z. T., & Zhang, Z. Q. (2016). Association of vegfr-2 gene polymorphisms with clopidogrel resistance in patients with coronary heart disease. *American Journal of Therapeutics*, 23(6), e1663–e1670. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000231>

72. Zhuo, Y. J., Shi, Y., & Wu, T. (2019). NRP-1 and kdr polymorphisms are associated with survival time in patients with advanced gastric cancer. *Oncology Letters*, 18(5), 4629–4638. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10842>.
73. Zhu, X., Wang, Y., Xue, W., Wang, R., Wang, L., Zhu, M. L., & Zheng, L. (2019). The VEGFR-2 protein and the VEGFR-2 rs1870377 A>T genetic polymorphism are prognostic factors for gastric cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 20(4), 497–504. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1537575>.
74. Koshy, L., Vijayalekshmi, S. v., Harikrishnan, S., Raman, K. v., Jissa, V. T., Jayakumaran Nair, A., Gangaprasad, A., Nair, G. M., & Sudhakaran, P. R. (2018). Lack of association of mirSNP 11174811 in AVPR1A gene with arterial blood pressure and hypertension in South Indian population. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40(6), 534–538. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1403624>.
75. Tu, J., Wang, S., Zhao, J., Zhu, J., Sheng, L., Sheng, Y., Chen, H., & Tian, J. (2014). rs833061 and rs699947 on Promoter Gene of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Associated Lung Cancer Susceptibility and Survival: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor*, 20, 2520–2526. <https://doi.org/10.12659/MSM.891394>.

76. Zhu, K., Lin, J., Chen, S., & Xu, Q. (2021). miR-9-5p Promotes Lung Adenocarcinoma Cell Proliferation, Migration and Invasion by Targeting ID4. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 20. <https://doi.org/10.1177/15330338211048592>.

77. Ma, Z., Chen, G., Chen, Y., Guo, Z., Chai, H., Tang, Y., Zheng, L., Wei, K., Pan, C., Ma, Z., Xia, Y., & Zhang, A. (2022). MiR-937-3p promotes metastasis and angiogenesis and is activated by MYC in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell International*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02453-w>.

78. Wang, X., Jiang, X., Li, J., Wang, J., Binang, H., Shi, S., Duan, W., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2020). Serum exosomal miR-1269a serves as a diagnostic marker and plays an oncogenic role in non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, 11(12), 3436–3447. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13644>.

79. Bijkerk, R., Trimpert, C., van Solingen, C., de Bruin, R. G., Florijn, B. W., Kooijman, S., van den Berg, R., van der Veer, E. P., Bredewold, E. O. W., Rensen, P. C. N., Rabelink, T. J., Humphreys, B. D., Deen, P. M. T., & van Zonneveld, A. J. (2018). MicroRNA-132 controls water homeostasis through regulating MECP2-

mediated vasopressin synthesis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 315(4), F1129–F1138. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00087.2018>.

**80.** Wang, X., Yin, H., Zhang, L., Zheng, D., Yang, Y., Zhang, J., Jiang, H., Ling, X., Xin, Y., Liang, H., Fang, C., Ma, J., & Zhu, J. (2019). The construction and analysis of the aberrant lncRNA-miRNA-mRNA network in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 11(5), 1772–1778. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.05.69>.

**81.** Wysocka, M. B., Pietraszek-Gremplewicz, K., & Nowak, D. (2018). The role of apelin in cardiovascular diseases, obesity and cancer. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00557>.

**82.** Ran, J., Li, Y., Liu, L., Zhu, Y., Ni, Y., Huang, H., Liu, Z., Miao, Z., & Zhang, L. (2021). Apelin enhances biological functions in lung cancer A549 cells by downregulating exosomal miR-15a-5p. *Carcinogenesis*, 42(2), 243–253. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa089>.

## 7. RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo elaborato è doveroso dedicare questo spazio a tutti coloro che, durante questo percorso, mi sono stati davvero vicino, mi hanno supportato e sopportato e che mi hanno aiutato nella realizzazione della mia tesi. Siete stati tanti e mi avete accompagnato in questi anni che sono stati molto difficili a livello sia emotivo che fisico.

Il mio più grande ringraziamento va alla Professoressa Rossana Berardi per l'opportunità che mi ha regalato facendomi da relatore e permettendomi di lavorare in un ambiente stimolante, gliene sarò grata a vita. La sua professionalità è stata un esempio meraviglioso che custodirò sempre.

In secondo luogo, vorrei ringraziare la Dottoressa Francesca Bianchi, che con la sua disponibilità, la sua dolcezza, la sua pazienza e al tempo stesso la sua serietà, mi ha sempre spronata a dare il mio meglio. Il suo supporto è stato fondamentale in questo anno, non solo a livello universitario, ma anche a livello umano. La ringrazio infinitamente.

Grazie alle Dottoresse Elisa Ambrosini e Natalia Chiodi, siete state fondamentali. Mi avete preso per mano dal primo giorno, mi avete insegnato e dato tanto. Vi sono debitrice per la pazienza che ci avete messo e per l'aiuto che mi avete donato senza mai chiedere nulla in cambio.

Un ulteriore grazie a tutto il resto del gruppo del Laboratorio e alla Clinica Oncologica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche per la loro professionalità e per avermi sempre regalato un sorriso.

Alla mia famiglia allargata, il mio punto fermo ma bizzarro. Siete tanti (divorziarsi è passato di moda, fate basta), bellissimi e diversissimi, vi adoro. Soprattutto vorrei ringraziare Nonna Alba per la sua immensa dolcezza e Nonno Nando per i suoi “che gli Dei ci siano favorevoli” prima di ogni esame.

A Isabella, mia sorella (non di sangue, ma di fatto), donna tanto incredibile quanto pazza. Tra un “mi vieni a prendere alla stazione di Pesaro?” ed un “laureati che si va alle Maldive”, la tua presenza è stata costante e stupenda. Io sono migliorata a dirti cosa provo per te, ora tu diventa puntuale, grazie!

A Giorgia, la coinquilina e compagna di studio perfetta. Sei stata il mio punto fermo, la mia “mini spalla su cui piangere” ed è stato bellissimo condividere anche questo percorso con te.

Per ultimo, ma non per importanza, un infinito GRAZIE a Papi e Mami.

Papi, grazie perché, se anche a distanza ti ho sempre sentito vicino e anche se a modo tuo mi hai sempre incitato a dare il massimo.

Mami, di solito ti dico tutto, anche troppo, ma oggi voglio dirti una cosa che non ti ho mai detto: io da “grande” voglio essere come te, ma senza l’allergia! I momenti che passiamo insieme sono meravigliosi e dobbiamo fare basta di mangiare le patatine fritte e la salsa di soia perché sennò “ci accendiamo come i cerini con l’istamina”.

Infine, voglio ringraziare me stessa per essere riuscita a portare a termine questo percorso molto tosto in anni che per me sono stati veramente difficili. Non so cosa mi riserverà il futuro ma spero di riuscire a realizzare i miei sogni; quindi, preparatevi che ci sarà da divertirsi!

*Un immenso GRAZIE a Tutti!*