



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA
E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata
Curriculum Tecnologie Biologiche**

**RICERCA DI BIOMARCATORI CORRELATI
ALL'IPONATRIEMIA IN PAZIENTI CON TUMORE
AL POLMONE: ANALISI DI MICRO-RNA E STUDIO
DI POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE**

**RESEARCH OF HYPONATREMIA-RELATED
BIOMARKERS IN LUNG CANCER PATIENTS:
ANALYSIS OF MICRO-RNAS AND STUDY OF
SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Ester Lucidi

Relatore Chiar.ma Prof.ssa:
Rossana Berardi

Sessione Straordinaria (Febbraio)

Anno Accademico 2021/22

Indice

| | |
|--|-----------|
| RIASSUNTO..... | 1 |
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 Iponatriemia | 3 |
| 1.1.1 Classificazione e patogenesi..... | 4 |
| 1.1.2 Diagnosi e trattamento | 7 |
| 1.1.3 <i>SIADH</i> | 9 |
| 1.1.3.1 <i>ADH</i> | 9 |
| 1.1.3.2 Patofisiologia della <i>SIADH</i> | 13 |
| 1.1.3.3 Classificazione della <i>SIADH</i> | 14 |
| 1.1.3.4 Cause della <i>SIADH</i> | 15 |
| 1.1.3.5 Diagnosi e trattamento della <i>SIADH</i> | 16 |
| 1.1.4 Iponatriemia nei pazienti oncologici ed importanza nel tumore al polmone | 19 |
| 1.1.5 Ruolo prognostico-predittivo dell'iponatriemia..... | 20 |
| 1.2 Biomarcatori..... | 22 |
| 1.2.1 <i>micro-RNA</i> | 22 |
| 1.2.1.1 Biogenesi..... | 22 |
| 1.2.1.2 Funzioni biologiche e applicazioni..... | 26 |
| 1.2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide..... | 27 |
| 1.2.2.1 Funzioni biologiche e applicazioni..... | 29 |
| 1.2.3 Biomarcatori correlati all'iponatriemia | 30 |
| 2. SCOPO | 32 |
| 3. MATERIALI E METODI | 34 |
| 3.1 Pazienti..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Materiali e metodi per l'analisi dei <i>miRNA</i> – Fase di <i>screening</i> | 36 |
| 3.2.1 Estrazione dell' <i>RNA</i> totale da campioni <i>FFPE</i> | 36 |
| 3.2.2 <i>miRNA sequencing</i> | 38 |
| 3.2.3 Analisi bioinformatiche..... | 39 |
| 3.3 Materiali e metodi per l'analisi dei <i>miRNA</i> – Fase di validazione | 41 |
| 3.3.1 Raccolta dei campioni plasmatici..... | 41 |
| 3.3.2 Estrazione dell' <i>RNA</i> totale da campioni plasmatici | 42 |
| 3.3.3 Sintesi del <i>cDNA</i> | 44 |
| 3.3.4 <i>Real-Time PCR</i> per la valutazione della qualità del <i>workflow</i> laboratoristico e del grado di emolisi dei campioni plasmatici..... | 46 |
| 3.3.5 <i>Real-Time PCR</i> per l'analisi del profilo di espressione della <i>signature</i> di <i>miRNA</i> in esame..... | 48 |
| 3.4 Materiali e metodi per l'analisi <i>SNP</i> | 50 |
| 3.4.1 Estrazione del <i>DNA</i> da campioni di sangue intero | 50 |
| 3.4.2 Valutazione spettrofotometrica della purezza del <i>DNA</i> estratto | 53 |
| 3.4.3 Quantificazione del <i>DNA</i> al <i>Qubit</i> | 54 |
| 3.4.4 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (<i>SNP</i>) mediante saggio <i>TaqMan</i> | 55 |
| 3.4.5 Ricerca frequenze genotipiche ed alleliche della popolazione generale..... | 57 |
| 4. RISULTATI | 59 |
| 4.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati | 59 |
| 4.2 Risultati dello studio dei <i>miRNA</i> – Fase di <i>screening</i> | 61 |
| 4.2.1 Controllo qualità e analisi informatica del <i>miRNA-sequencing</i> | 61 |
| 4.2.2 Analisi di espressione differenziale tra i campioni tumorali..... | 64 |
| 4.2.3 Correlazione dei <i>miRNA</i> con gli <i>outcome</i> clinici | 68 |
| 4.2.4 Analisi di espressione differenziale tra i campioni peritumorali..... | 70 |
| 4.2.5 Correlazione dei <i>miRNA</i> con gli <i>outcome</i> clinici | 74 |
| 4.3 Risultati per lo studio dei <i>miRNA</i> – Fase di validazione | 76 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1 Piastre <i>Custom</i> | 76 |
| 4.3.2 Controllo qualità del <i>workflow</i> laboratoristico..... | 79 |
| 4.3.3 Risultati dell'analisi del profilo di espressione del <i>set</i> di <i>miRNA</i> | 84 |
| 4.4 Risultati dell'analisi <i>SNP</i>..... | 87 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 96 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 108 |

RIASSUNTO

L'iponatriemia, definita da una concentrazione sierica del sodio ≤ 135 mEq/L, è il disordine elettrolitico più diffuso nella pratica clinica. Si tratta di una condizione riscontrata molto frequentemente nei pazienti oncologici, per i quali rappresenta un fattore prognostico negativo: è stata infatti associata a una minor sopravvivenza, a un'inferiore risposta alla terapia e a una maggior durata dell'ospedalizzazione, con conseguente aumento dei costi a carico del Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Si presenta con un'incidenza aumentata in pazienti affetti da tumore al polmone (20-40%), in particolare quello a piccole cellule (SCLC) (18.9%).

Il nostro studio si propone di ricercare dei biomarcatori, quali *micro-RNA* e polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), correlati con la condizione di iponatriemia nei pazienti con tumore al polmone, andandone successivamente ad investigare il ruolo prognostico e predittivo.

In una prima fase retrospettiva, è stata effettuata un'analisi di *miRNA sequencing* su campioni FFPE tumorali e peritumorali di 20 pazienti affetti da tumore al polmone, di cui 10 eunatriemici e 10 pazienti che hanno sviluppato iponatriemia. Da questa indagine, sono stati identificati 12 *miRNA*, relativamente ai campioni tumorali, e 7 *miRNA*, per i campioni peritumorali, differenzialmente espressi tra questi due gruppi di pazienti con diverso stato

di natriemia. Inoltre, si è investigato il ruolo prognostico e predittivo di tali *miRNA*, correlandoli con gli *outcome* clinici degli stessi pazienti.

Attualmente, questo *set* di *miRNA* è in fase di validazione su campioni plasmatici di pazienti con tumore al polmone che si stanno arruolando nella fase prospettica. Parallelamente, su campioni di sangue intero di questi ultimi, si sta conducendo uno studio di 16 *SNP*, auspicando di poter correlare tali risultati con la condizione di natriemia e gli *outcome* clinici dei pazienti.

In conclusione, il nostro lavoro si propone di fornire dati importanti alla comunità scientifica, che permetteranno di dare un contributo significativo per poter implementare le conoscenze molecolari relative a questo complesso disordine elettrolitico.

1. INTRODUZIONE

1.1 Iponatriemia

L'iponatriemia è il disordine elettrolitico più comune riscontrato nella pratica clinica¹, definito da una concentrazione sierica del sodio \leq a 135 mEq/L². Questa condizione colpisce il 15-30% dei pazienti ospedalizzati³ e fino al 40% dei pazienti nelle unità di terapia intensiva⁴.

Secondo un criterio di gravità si distinguono tre gradi di iponatriemia: di grado lieve (concentrazione di sodio nel siero pari a 130-135 mmol/L), di grado moderato (125-129 mmol/L) e severo (<125 mmol/L)⁵.

Sulla base del tempo di insorgenza può essere distinta in acuta, se il sodio sierico diminuisce nell'arco di 48 ore, e cronica, se il declino del sodio sierico avviene in più di 48 ore⁶.

Come è ormai ben noto, questo disordine è associato a una morbilità e una mortalità significative e dunque richiede sia una diagnosi che un intervento appropriati e tempestivi³.

La sintomatologia associata a tale disturbo è estremamente variabile. Le forme con bassa gravità e quelle che interessano i soggetti di età avanzata sono spesso asintomatiche, mentre quelle con gravità moderata-severa e

quelle acute danno luogo a nausea, vomito, mal di testa e sintomi neurologici come stato di confusione generale fino a convulsioni, coma e morte⁷.

L'iponatriemia va attenzionata anche se si manifesta del tutto asintomatica, poiché è stato dimostrato che, specie nei pazienti anziani, espone ad un aumentato rischio di cadute, osteoporosi e fratture³, impattando sulla morbilità e sui costi a carico del Servizio Sanitario Nazionale (SSN).

1.1.1 Classificazione e patogenesi

Sulla base dell'osmolarità, cioè della quantità di osmoliti attivi presenti nel siero, l'iponatriemia può essere distinta in ipotonica e non-ipotonica⁷ (**Figura 1**). Una varietà estremamente ampia di fattori può determinare l'insorgenza di questo disordine, a seconda della forma presa in considerazione.

| Iponatriemia | |
|--|---|
| Ipotonica | Non-ipotonica |
| <ul style="list-style-type: none">•Ipovolemica•Euvolemica•Ipervolemica | <ul style="list-style-type: none">•Pseudoiponatriemia•Ipertonica |

Figura 1. Tipi di iponatriemia. La tabella riporta la classificazione dell'iponatriemia in diverse tipologie sulla base dell'osmolarità sierica⁷.

L'iponatriemia ipotonica è associata a livelli di osmolarità del siero inferiori a 275 mOsm/kg⁸ e può essere classificata in ipovolemica, euvolemica e ipervolemica. La diagnosi viene effettuata stimando il volume extracellulare del paziente.

La forma ipovolemica è causata da una diminuzione dell'acqua e del sodio corporei, con un eccesso nella perdita di sodio³. La perdita di soluti che si verifica in questa forma di iponatriemia può essere legata a problematiche che si riscontrano sia a livello renale, quali nefropatie con perdita di sali o deficit di mineralcorticoidi, che a livello non renale, quali ustioni o sudorazione, ma anche diarrea e vomito, spesso associati a diversi tipi di infezioni^{7,9}. Anche la Sindrome da Perdita di Sali Cerebrale (*CSWS*) può portare a questo sottotipo di iponatriemia^{7,9}.

La forma euvolemica è associata a un aumento di acqua nell'organismo³. Risulta essere la più comune forma di iponatriemia nei pazienti ospedalizzati e frequentemente ha come causa la Sindrome da Inappropriata Secrezione dell'Ormone Antidiuretico (*SIADH*)³. Tuttavia, sono stati riscontrati altri fattori che determinano l'insorgenza di una tipologia analoga di iponatriemia, tra cui carenza di glucocorticoidi, disfunzioni ipotalamiche, Sindrome di *Seehan*, tumori e ipotiroidismo⁹.

Entrambe queste due forme di iponatriemia appena citate, talvolta, sono associate anche ad una dieta povera di sodio o ad un'attività fisica troppo prolungata⁷.

La forma ipervolemica è legata ad un incremento dell'acqua e del sodio corporei, ma con eccesso relativo di acqua³. Tale forma può manifestarsi in caso di arresto cardiaco, cirrosi, sindrome nefrosica o insufficienza renale⁹.

Si parla di iponatriemia non ipotonica quando l'osmolarità del siero risulta superiore a 275 mOsm/kg⁷ e ne esistono due tipologie: iponatriemia ipertonica e pseudoiponatriemia.

Nel primo caso si registra un aumento nella concentrazione di molecole osmoticamente attive quali glucosio o mannitolo⁷, che non possono penetrare di per sé nelle cellule e dunque determinano un richiamo di acqua dall'ambiente intracellulare a quello extracellulare.

Per pseudoiponatriemia s'intende, invece, una diminuzione apparente di sodio quando vi è un aumento di lipidi e proteine ematiche. In questa situazione, la frazione di acqua del plasma si riduce e quindi la natriemia, misurata sul totale del volume plasmatico, appare ridotta, nonostante l'osmolarità e la reale concentrazione di sodio plasmatico siano nella norma⁹.

1.1.2 Diagnosi e trattamento

La diagnosi di iponatriemia richiede sia una valutazione della clinica del paziente, sia un'analisi di alcuni parametri laboratoristici^{5,10,11}. In primo luogo, si deve determinare l'osmolarità del siero, al fine di escludere tutte quelle situazioni in cui si verifica una discordanza tra la presenza di iponatriemia e l'osmolarità registrata¹². Queste includono pseudoiponatriemia e forme ipertoniche, che non necessitano di trattamento¹².

Seguendo le linee guida Europee, una volta escluse le casistiche appena esposte, lo *step* successivo mira a una valutazione del tipo di sintomatologia: se si ha a che fare con sintomi acuti o severi è raccomandato prendere in considerazione un trattamento immediato¹³.

Se, invece, non si hanno pazienti con sintomi severi o acuti, i fattori che vengono esaminati per identificare le diverse forme di iponatriemia ipotonica sono *in primis* l'osmolarità delle urine (*cut-off* 100 mOsm/kg) e in seguito la concentrazione di sodio nelle urine (*cut-off* 30 mmol/L), che le linee guida prediligono rispetto alla volemia¹³. Altri *test* possono facilitare la diagnosi: una prova di espansione del volume con una soluzione salina isotonica, per esempio, può essere utilizzata per diagnosticare l'iponatriemia ipovolemica¹³.

In merito al trattamento, si richiede di differenziare l'iponatriemia acuta da quella cronica. La prima tipologia, come detto, viene generalmente sviluppata nell'arco di 24-48 ore e, se non corretta rapidamente, può portare a danni neurologici potenzialmente permanenti o morte⁵. Nel caso in cui questa sia sintomatica, la terapia consiste solitamente nell'utilizzo di soluzione salina ipertonica che, incrementando i livelli di sodio sierico, va a ridurre l'edema a livello cerebrale⁹. Sono disponibili diverse linee guida per il trattamento di questa forma nei pazienti adulti^{5,10,14}. Qualora il paziente sia invece asintomatico, l'opzione terapeutica da mettere in atto verrà definita sulla base dell'eziologia⁹.

L'iponatriemia acuta può essere risolta più rapidamente rispetto alla cronica; in ogni caso, se esistono dubbi sulle tempistiche d'insorgenza, si ricorre alle misure attuate per la forma cronica⁹.

L'iponatriemia cronica dovrebbe essere trattata con soluzione salina ipertonica al 3% fino a risoluzione completa dei sintomi, ma occorre tener conto del fatto che un incremento troppo rapido dei livelli di sodio sierici può portare a Sindrome da Demielinizzazione Osmotica (*ODS*)⁹. Per tale ragione, si raccomanda di diversificare la terapia sulla base del rischio di sviluppare l'*ODS*³.

Il trattamento dell'iponatriemia correlata alla *SIADH* verrà descritto nel paragrafo 1.1.3.5.

1.1.3 SIADH

La Sindrome da Inappropriata Secrezione dell'Ormone Antidiuretico (*SIADH*) fu descritta per la prima volta nel 1957 da Schwartz e Bartter ed è una condizione caratterizzata da iponatriemia ipotonica euvolemica e da iperosmolarità urinaria¹⁵, la quale insorge come conseguenza di un inappropriato rilascio di Ormone Antidiuretico (*ADH*), anche in assenza di stimoli. Dal momento che non in tutti i pazienti colpiti si manifesta un aumento di *ADH* circolante, oggi si preferisce parlare di Sindrome da Inappropriata Antidiuresi (*SIAD*)¹⁵. La sintomatologia è strettamente correlabile agli effetti dell'iponatriemia, nonché al grado di severità e al tempo di insorgenza di quest'ultima.

1.1.3.1 ADH

L'ormone antidiuretico (*ADH*) o Arginina Vasopressina (*AVP*) è un peptide ciclico costituito da 9 aminoacidi, caratterizzato dalla presenza di un ponte disolfuro tra i residui di Cisteina 1 e 6 (**Figura 2**). Esso viene fisiologicamente rilasciato in circolo dal lobo posteriore dell'ipofisi, in risposta ad un'aumentata osmolarità del siero o ad una diminuzione nel volume sanguigno (volemia)¹⁶.

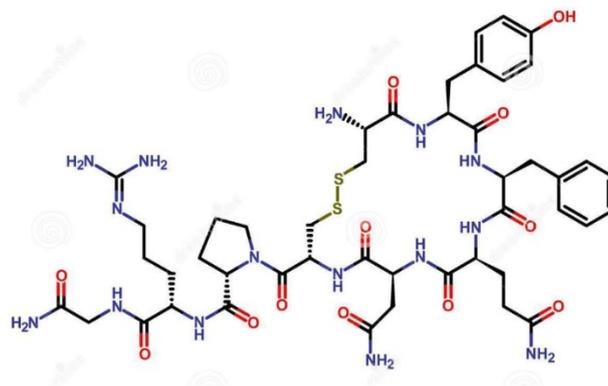


Figura 2. Struttura chimica della Vasopressina. Al centro, viene rappresentato il ponte disolfuro tra le Cisteine 1 e 6.

Sono noti tre diversi recettori in grado di legare la Vasopressina a livello della membrana cellulare: *V1a*, *V1b* e *V2*, appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G¹⁷. Il recettore *V1a* media la maggior parte degli effetti dell'*ADH* a livello centrale e periferico, tra cui la vasocostrizione, la glicogenolisi, la secrezione di Angiotensina II e l'adesione delle piastrine. *V1b*, al contrario, modula l'azione del fattore di rilascio delle corticotropine (*CRF*) sulla sintesi e sul rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (*ACTH*) in risposta allo stress¹⁸.

Il recettore *V2* (*V2R*) è localizzato a livello renale, sulla membrana basolaterale delle cellule dei dotti collettori; l'*AVP*, associandosi ad esso, regola i canali ionici dell'acquaporina 2 (*AQP2*) e determina un aumento del trasporto osmotico dell'acqua¹⁶.

Le Acquaporine sono proteine integrali di membrana, che regolano il passaggio dell'acqua attraverso le membrane biologiche: delle 13 note, otto

(*AQP 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11*) sono espresse nel rene¹⁹. Il tratto terminale del tubulo renale, con dotti e tubuli collettori, esprime tre acquaporine (*AQP2* nella membrana apicale, *AQP3* e *AQP4* nella membrana basolaterale)¹⁹.

Pur essendo stata dimostrata la regolazione dei canali basolaterali da parte della Vasopressina, la permeabilità all'acqua è regolata prevalentemente dagli effetti dell'*AVP* su *AQP2*¹⁹.

In particolare, il legame *AVP-V2R* determina l'attivazione di una proteina G, che stimola l'Adenilato Ciclastasi (*AC*), con conseguente aumento dell'*AMP* ciclico intracellulare (*cAMP*) e attivazione di una protein chinasi A (*PKA*)²⁰. Questa cascata di segnalazione ha come risultato la traslocazione dell'*AQP2* nella membrana apicale¹⁶, attraverso una serie di reazioni di fosforilazione, che iniziano quando la protein chinasi A agisce a livello della Serina 256 di *AQP2*.

Inoltre, una serie di ulteriori proteine è coinvolta negli effetti su *AQP2* dovuti all'aumento di *cAMP*, come proteine *SNARE*, *hsc70*, proteine di ancoraggio alla chinasi A (*AKAPs*) e piccole *GTPase* della famiglia *Rho*¹⁶.

Altri residui amminoacidici noti per essere bersaglio di fosforilazioni sono tre serine presenti al C-terminale di *AQP2*: Ser261, Ser269 e Ser264¹⁹. Secondo uno studio, le modifiche dovrebbero essere regolate dalla Vasopressina e non

passano attraverso l'azione dell'enzima *PKA*²¹. La fosforilazione a livello di Ser264 e Ser269 sembra regolare l'endocitosi di *AQP2*¹⁹.

Un altro processo indotto dalla Vasopressina è la mobilitazione del calcio intracellulare²² a livello dei dotti collettori. Il conseguente aumento di Ca^{2+} determina la fosforilazione della Chinasi della Catena Leggera della Miosina (*MLCK*) e l'attivazione delle Miosine non-muscolari II-A e II-B, repute essenziali per il movimento delle vescicole contenenti *AQP2* verso la membrana plasmatica apicale¹⁹.

I meccanismi fin ora descritti riguardano una regolazione “a breve termine” dell'escrezione di acqua da parte dell'*AVP*; tuttavia, esiste anche una forma di regolazione definita “a lungo termine”, che controlla la concentrazione dell'*AQP2* nelle cellule dei dotti collettori renali. In questo secondo caso, l'Ormone Antidiuretico promuove un aumento dei livelli di tale acquaporina, agendo sia direttamente a livello genico, che dell'*mRNA* corrispondente²³. Recenti studi condotti su topi suggeriscono che l'azione dell'*AVP* a livello del messaggero dell'acquaporina 2 sia esplicita attraverso la promozione del processo di trascrizione del gene che codifica per questa proteina (*Aqp2*), e non direttamente agendo sulla stabilità del messaggero, in quanto l'aumento dell'*AQP2-mRNA* si associa ad un *binding* più spiccato dell'*RNA* Polimerasi II verso il gene *Aqp2*²³.

Un riassunto dei meccanismi d'azione della Vasopressina a livello delle cellule del dotto collettore è proposto in **Figura 3**.

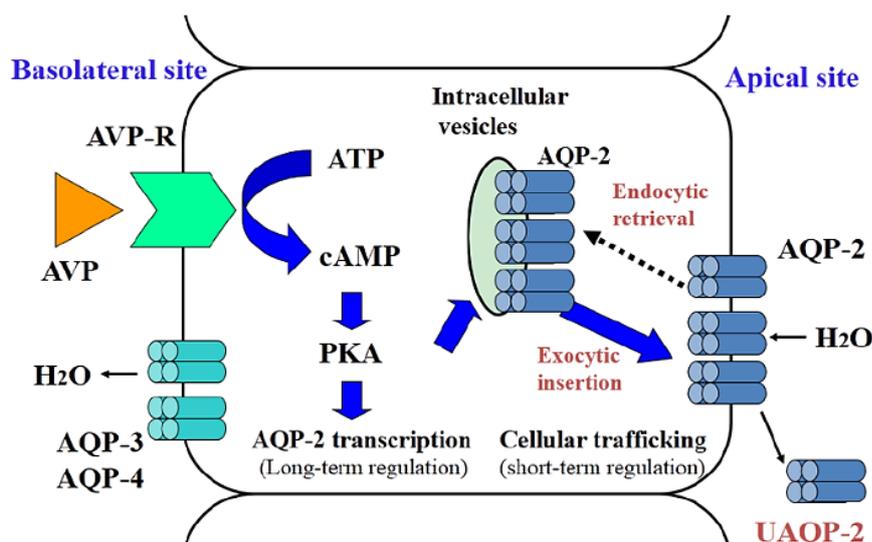


Figura 3. *Pathway* della Vasopressina nelle cellule del dotto collettore. L'AVP attraverso la via di segnalazione *cAMP/PKA* opera una regolazione a breve e a lungo termine del trasporto dell'acqua, rispettivamente regolando il traffico cellulare o la trascrizione del gene codificante *AQP2*²⁴.

1.1.3.2 Patofisiologia della SIADH

Alla base della Sindrome da Inappropriata Antidiuresi (*SIAD*) c'è un aumento assoluto di acqua nell'organismo, dovuto da un lato ad un'eccessiva assunzione di acqua, che va a sovrappassare la capacità del sistema renale di diluire l'urina, e dall'altro a una deregolazione dell'azione dell'ormone antidiuretico: entrambe queste condizioni sono necessarie per lo sviluppo di tale sindrome¹⁷. L'aumento di acqua determina la diluizione del sodio sierico,

causando iponatriemia ipotonica. Alcuni meccanismi possono essere messi in atto per stabilizzare o aumentare i livelli di sodio, come ad esempio un fenomeno noto come “*escape from antidiuresis*”, che consiste nello sviluppo di una parziale “resistenza” renale all’azione dell’*ADH* per diminuzione dei recettori *V2* e della proteina *AQP2*¹⁷.

1.1.3.3 Classificazione della SIADH

Esistono quattro diverse tipologie di *SIADH*, definite in base al *pattern* di rilascio anomalo di *AVP*: tipo A, tipo B, tipo C e tipo D²⁵.

La tipologia A rappresenta il *pattern* più comune di rilascio dell’*AVP* (40% dei casi) ed è stata osservata particolarmente nel cancro al polmone a piccole cellule (*SCLC*), in cui il tumore stesso può sintetizzare e secernere *AVP* nella sua forma attiva²⁵. Viene persa la correlazione fisiologica tra l’osmolarità e la concentrazione plasmatica di *AVP*²⁵, poiché si verificano fluttuazioni nel rilascio di *ADH* indipendentemente dall’aumento del sodio nel plasma²⁶.

Il tipo B interessa una bassa percentuale di pazienti con la *SIADH* nella pratica clinica ed è caratterizzato da una soglia osmotica per la secrezione di *AVP* inferiore a quella fisiologica²⁵. Di conseguenza, il sodio plasmatico rimane stabile a livelli più bassi del normale, tipicamente tra 125 e 135 mmol/L²⁵. Il rilascio di *AVP* è più lento e costante²⁶.

Nella tipologia C, che rappresenta una forma rara di *SIADH*, quando l'osmolarità del plasma è superiore alla soglia fisiologica viene mantenuta una correlazione lineare tra concentrazione plasmatica di *AVP* e osmolarità, ma a livelli inferiori la secrezione di *ADH* non viene soppressa, probabilmente a causa di una disfunzione dei neuroni inibitori ipotalamici²⁵.

Si parla, invece, di tipologia D (5-10% dei pazienti) quando non si ha evidenza di un'osmoregolazione anomala dell'*AVP*²⁶: il paziente sviluppa un'iponatriemia che soddisfa i criteri per la diagnosi di *SIADH*, ma l'*AVP* non è rilevabile nel plasma²⁵. In età pediatrica questo sembra associato a mutazioni nel recettore *V2*, ma negli adulti potrebbe dipendere anche da anomalie nel funzionamento dei canali delle *AQP2*²⁶.

1.1.3.4 Cause della SIADH

Molteplici e differenti cause possono determinare lo sviluppo della *SIADH*. Tra queste troviamo patologie che coinvolgono il sistema polmonare e disordini del sistema nervoso, ma anche farmaci, soprattutto anti-infiammatori non steroidei, molti chemioterapici, e oppioidi²⁷. La *SIADH* riconosce anche cause ereditarie (come mutazioni nel gene per il recettore *V2*) ed idiopatiche. Ulteriori eziologie sono rappresentate dalla Fibrosi Cistica, ma anche l'asma, la nausea, il dolore e lo stress possono influenzarne l'insorgenza¹⁵. Tale

sindrome è inoltre frequentemente associata, spesso in relazione a una produzione ectopica di *ADH*, a numerosi tumori, tra cui quelli che interessano il tratto respiratorio, gastrointestinale e genitourinario, ma anche a sarcomi, linfomi, timomi e al neuroblastoma¹⁵.

1.1.3.5 Diagnosi e trattamento della SIADH

Una corretta diagnosi è essenziale per distinguere la Sindrome da Inappropriata Antidiuresi da altre condizioni che portano all'instaurarsi dell'iponatriemia. L'identificazione della malattia avviene per esclusione ed i criteri diagnostici utilizzati sono gli stessi definiti da Schwartz e Barttet nel 1957¹⁵. I criteri essenziali sono riassunti nella **Figura 4**.

| Criteri essenziali |
|---|
| Osmolarità del siero <275 mOsm/kg |
| Osmolarità delle urine >100 mOsm/kg |
| Incremento della concentrazione di sodio nelle urine (>30 mmol/L) con normale assunzione di acqua e Sali con la dieta |
| Euvolemia clinica |
| Normale funzionalità renale, tiroidea, adrenale e ipofisaria |
| Nessun utilizzo recente di diuretici |

Figura 4. Criteri diagnostici essenziali per la *SIADH*^{14,16}.

Parlando delle possibilità di trattamento della *SIADH*, per molto tempo l'opzione preferenziale consisteva nell'individuare e rimuovere la causa principale¹⁵, qualora questo non fosse stato possibile, veniva presa in considerazione una restrizione idrica con raccomandata un'assunzione di 800-1200 ml per giorno (a seconda della gravità dell'iponatriemia), allo scopo di far risalire la concentrazione sierica del sodio²⁸. Tuttavia, questa prima strategia terapeutica si associava ad una scarsa *compliance* da parte dei pazienti affetti da *SIADH*, avendo questi ultimi un'anormale soglia della sete²⁸. In alternativa, si poteva dunque optare per una somministrazione orale di preparazioni a base di sodio o per continue infusioni di soluzione salina ipertonica (3%)¹⁵.

Altre opzioni terapeutiche, oggi non più in uso a causa dei loro effetti collaterali e della loro tossicità, prevedevano l'uso di Demeclociclina, un derivato della Tetraciclina¹⁷. Quest'ultimo è responsabile di indurre una forma di diabete insipido, incrementando i livelli di sodio sierico. Un effetto analogo si ottiene con il Litio, che in aggiunta può *downregolare* l'espressione di *AQP2*, riducendo la capacità renale di concentrare l'urina¹⁷.

Studi più recenti hanno dimostrato l'efficacia del trattamento dell'iponatriemia con l'urea²⁹, tuttavia è stata dimostrata non di rado l'eventualità che questo porti a ipercorrezione con insorgenza di ipernatriemia. L'incremento di sodio sierico determinato dall'assunzione di

urea, infatti, è influenzato anche dallo stato d'idratazione del paziente e dall'osmolarità urinaria³⁰. Tale terapia dovrebbe quindi essere messa in atto qualora la restrizione idrica non sia efficace o non sia possibile attuarla³¹.

Le nuove prospettive terapeutiche si concentrano sull'utilizzo dei vaptani, farmaci che si comportano come antagonisti dell'*AVP* per i recettori *V2*¹⁵. Bloccando l'azione di tali recettori, i vaptani determinano una diminuzione delle proteine *AQP2* a livello dei tubuli e dotti collettori: l'effetto finale è un'insensibilità all'*AVP* e un aumento nell'escrezione di acqua con le urine³². Tra questi farmaci, un esempio è rappresentato dal *Tolvaptan*, recentemente approvato in Europa per il trattamento della *SIADH*; il suo utilizzo come farmaco di prima scelta per questa sindrome negli anni non è stato incoraggiato dalle linee guida Europee¹⁵, in quanto non era stato paragonato ad altre tipologie di trattamento e sembrava non avere effetto sulla mortalità globale, nonché determinare una sovracorrezione dell'iponatriemia³³. In realtà, studi più recenti ne hanno dimostrato l'efficacia. In particolare, uno studio multicentrico osservazionale italiano ha evidenziato un doppio effetto positivo nell'utilizzo del *Tolvaptan*: un aumento della sopravvivenza globale (*OS*) e una diminuzione dei tempi di ricovero³⁴.

Inoltre, lo studio *ASSERT*, presentato al Congresso *ESMO* 2019, ha sopperito alla carenza di un confronto con altri farmaci, mostrando una sopravvivenza

media e globale maggiori per i pazienti trattati con *Tolvaptan* rispetto a quelli sottoposti ad altri trattamenti³⁵.

1.1.4 Iponatriemia nei pazienti oncologici ed importanza nel tumore al polmone

L'iponatriemia è un disordine elettrolitico riscontrato frequentemente nei pazienti oncologici: il 14% dei casi di iponatriemia nei pazienti ricoverati è infatti riconducibile a condizioni tumore-correlate³⁶. La sua incidenza e prevalenza, tuttavia, dipendono dalla tipologia di tumore, dal *setting* clinico e dai *cut-off* per i livelli di sodio sierici²⁷.

I pazienti oncologici presentano una serie di fattori che li predispongono allo sviluppo dell'iponatriemia: le terapie antitumorali e i loro effetti collaterali, la compresenza di altre patologie favorenti e il cancro stesso possono contribuire alla patogenesi di questo disordine³⁷.

Tra le diverse tipologie di cancro, il tumore al polmone è quello più frequentemente associato all'iponatriemia, con un'incidenza del 20-40%³⁸⁻⁴¹.

In particolare, nel tumore al polmone a piccole cellule (*small cell lung cancer*, *SCLC*) questo dato si attesta intorno al 18.9% ed è strettamente correlato con lo stadio della malattia al momento della diagnosi: si manifesta nel 24% dei

pazienti con malattia estesa e nell'11% di quelli con malattia ancora limitata⁴².

La *SIADH* risulta essere una causa molto comune di iponatriemia nei pazienti affetti da tumore⁴³, con un'elevata incidenza (11-15%) nei pazienti con cancro al polmone a piccole cellule (*SCLC*)^{38,44}. Questo disordine sembra correlato con un'aumentata secrezione di *AVP* da parte dell'ipofisi o con una sua produzione ectopica da parte delle cellule tumorali³⁷, ed è stato anche osservato nel 3% di pazienti affetti da tumori della testa e del collo, nonché in altri tumori solidi e neoplasie ematologiche^{38,43,45}.

1.1.5 Ruolo prognostico-predittivo dell'iponatriemia

Diversi studi hanno indagato il ruolo prognostico dell'iponatriemia nel cancro²⁷, specialmente nel tumore al polmone. Un'analisi condotta da Hansen et. al su una coorte di 453 pazienti con *SCLC*, il 44% dei quali presentava livelli di sodio plasmatici inferiori a 135 mEq/L, ha mostrato una sopravvivenza inferiore per i pazienti iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici (rispettivamente 7,2 mesi e 11 mesi)³⁹. In aggiunta, è stata anche riscontrata una peggior prognosi nei pazienti in cui non si era ottenuta una normalizzazione dei livelli di sodio plasmatici entro i primi due cicli di chemioterapia³⁹.

Petereit et al. hanno analizzato 2048 pazienti affetti da cancro al polmone (dei quali il 97% iponatriemici), osservando una sopravvivenza globale (*overall survival, OS*) media inferiore nei pazienti con iponatriemia se confrontata con quella dei pazienti eunatriemici (rispettivamente 10.08 e 12.2 mesi)⁴⁶. Anche in questo caso, un fallimento nell'incrementare i livelli di sodio plasmatici sopra 138 mmol/L correlava con una minor sopravvivenza⁴⁶. L'impatto dell'iponatriemia sulla sopravvivenza globale è stato indagato anche per altre tipologie tumorali, come carcinoma gastrointestinale⁴⁷ e mesotelioma pleurico⁴⁸, con risultati affini a quelli sopra esposti.

In un ristretto numero di studi l'iponatriemia è stata correlata anche con la risposta alla terapia antitumorale²⁷, come ad esempio in un'analisi condotta da Jeppesen et al. su pazienti affetti da carcinoma a cellule renali metastatico (*metastatic renal cell carcinoma, mRCC*)⁴⁹. A parità di trattamento (terapia basata su *IL-2*), i pazienti iponatriemici hanno mostrato un tasso di risposta e una durata della risposta stessa inferiori rispetto agli eunatriemici⁴⁹. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per approfondire il ruolo predittivo dell'iponatriemia.

La letteratura suggerisce inoltre l'impatto negativo dell'iponatriemia sulla durata dell'ospedalizzazione e sulla qualità della vita, sia nei pazienti oncologici che in quelli affetti da patologie di altro tipo⁵⁰.

Uno studio di Berardi et. al su 105 pazienti oncologici (dei quali il 28.6% affetto da adenocarcinoma del polmone, il 32.4% da carcinoma gastrointestinale e il 9.5% da sarcoma) ha mostrato, oltre che una differenza significativa nella sopravvivenza globale fra pazienti eunatriemici e iponatriemici, confermando il ruolo prognostico negativo della condizione in esame, anche una maggiore durata del ricovero per i pazienti iponatriemici, con conseguente aumento dei costi a carico del SSN dal 128 al 299%⁵⁰.

1.2 Biomarcatori

1.2.1 micro-RNA

I *micro-RNA* sono piccoli *RNA* non codificanti lunghi circa 22 nucleotidi che rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione genica⁵¹.

1.2.1.1 Biogenesi

Questi piccoli *RNA* possono avere origine da una via biosintetica canonica o da *pathway* non canonici⁵¹. Tali meccanismi sono riassunti nella **Figura 5**.

Nell'uomo, le sequenze che portano l'informazione per la maggior parte dei *miRNA* canonici solitamente si trovano all'interno di regioni introniche, di

trascritti codificanti o non codificanti, e in piccola parte anche esoniche; queste spesso sono molto vicine tra loro, costituendo unità policistroniche⁵². Ciascuna sequenza viene trascritta dall'*RNA* polimerasi II in un *pri-miRNA*, che corrisponde al trascritto primario del *miRNA* e possiede una struttura *stem-loop* con estensioni a singolo filamento alle estremità 5' e 3'⁵². Il trascritto primario dev'essere processato affinché il *miRNA* diventi maturo e attivo. Il primo *step* di maturazione viene effettuato da un complesso definito Microprocessore, costituito da una *RNase III* (*Drosha*) e una proteina che lega l'*RNA* a doppio filamento (*DiGeorge Syndrome Clinical Region 8*, *DGCR8*)⁵³. *DGCR8* media il legame del complesso al *pri-miRNA* riconoscendo un motivo GGAC N⁶-metiladenilato⁵⁴, mentre *Drosha* effettua un taglio alla base della struttura a forcina, rilasciando un precursore che presenta un'estremità 3' sporgente di due nucleotidi^{51,55}. Tale precursore (*pre-miRNA*) viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera di un complesso *XPO5-RanGTP*⁵⁶.

Nel citoplasma, il *pre-miRNA* subisce un taglio ad opera di un'ulteriore *RNase III*, chiamata *Dicer*⁵⁵. Come effetto, si ha la perdita del *loop* terminale della forcina e si ottiene un *miRNA duplex*⁵⁷ lungo circa 21-22 nucleotidi, il quale viene caricato su una proteina Argonauta (*AGO*) per formare un complesso che prende il nome di *mi-RISC* (*miRNA-induced silencing complex*)⁵⁸. Nei mammiferi è presente l'informazione per quattro proteine

Argonaute (1-4), di cui *Ago2* è la più espressa⁵⁷. Generalmente, solamente uno dei due filamenti del *duplex* rimane ancorato al complesso: tale *strand* può avere origine dall'estremità 5' del *pre-miRNA*, e in tal caso prende il nome di filamento "5p", o dall'estremità 3', acquisendo la denominazione di filamento "3p"⁵⁸. Sebbene entrambi i filamenti (5p e 3p) possano associarsi alle proteine *AGO*, per la maggior parte dei *miRNA* solo uno viene scelto preferenzialmente, e prende il nome di filamento "guida" (*guide strand*)⁵⁸. Il filamento che viene mantenuto, che rappresenta il *miRNA* maturo, viene selezionato in base alla stabilità termodinamica o alla presenza di un'Uracile in posizione 1 all'estremità 5': una minor stabilità termodinamica al 5' o la presenza dell'Uracile favoriscono l'associazione alla proteina *AGO*^{51,59}. L'altro filamento viene definito filamento passeggero (*passenger strand*, indicato anche come *miRNA**): la sua dissociazione dal filamento guida avviene con diversi meccanismi sulla base della loro complementarità⁵¹.

In realtà, è stato dimostrato da alcuni studi condotti su insetti e mammiferi che anche i filamenti *miR** sono dotati di funzione biologica^{60,61}, dunque, la nomenclatura che sfrutta il sistema 5p/3p è sempre più utilizzata⁵⁸.

Come detto, gli enzimi *Drosha* e *Dicer* riconoscono specifici moduli strutturali o motivi di sequenza, tuttavia possono operare un taglio alternativo che porta alla sintesi di forme definite "*isomiR*", le quali vengono prodotte a

partire dallo stesso *pre-miRNA*, ma differiscono tra loro per sequenza, lunghezza o entrambe⁶².

Inoltre, sono state identificate alcune vie biosintetiche alternative. Per esempio, è stato osservato che alcuni introni, mimando la struttura dei *pre-miRNA*, sono in grado di entrare nella via biosintetica canonica senza passare attraverso il taglio ad opera di *Drosha/DGCR8*⁶³. Un altro gruppo di piccoli *RNA* generati indipendentemente dall'azione di *Drosha* prende origine da alcuni *RNA* non codificanti come *small nucleolar RNA (snoRNA)* o *RNA transfer (tRNA)*^{64,65}. Un ulteriore esempio di via alternativa è rappresentato da alcuni *RNA* che, presentando un *cap* di 7-metilguanosina, possono essere trasportati direttamente nel citosol per azione dell'Esportina 1, anch'essi senza necessità dell'intervento di *Drosha*⁵¹.

Oltre a tali vie *Drosha*-indipendenti, è stata identificata anche una via biosintetica *Dicer*-indipendente, perseguita ad esempio dal miR-451a, che sfrutta l'attività catalitica della proteina *Ago2*⁶⁶. In tale *pathway*, *Ago2* si lega al *pre-miRNA* e taglia quello che sarà il filamento passeggero a 10 nucleotidi dall'estremità 5' di quello guida⁶⁶.

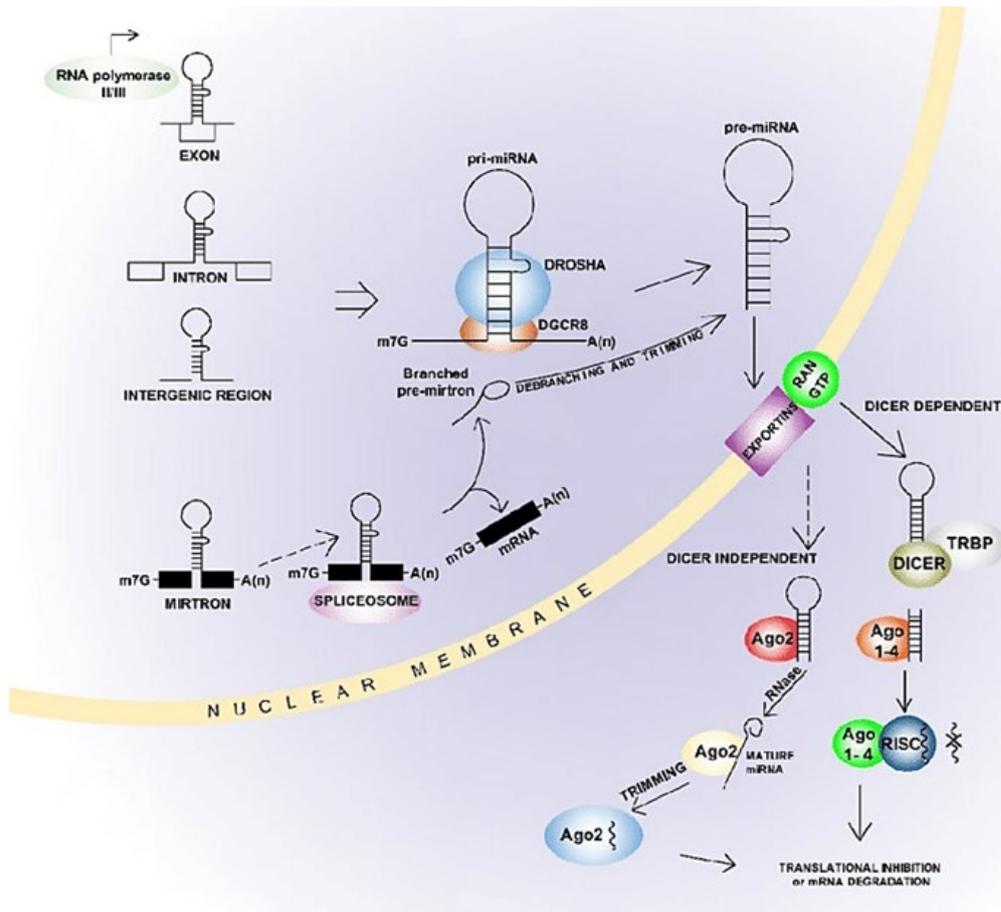


Figura 5. Biogenesi dei *miRNA*. In figura, sono rappresentate la via biosintetica canonica e le vie non canoniche, *Drosha* e *Dicer* indipendenti, da cui prendono origine i *miRNA*⁶⁷.

1.2.1.2 Funzioni biologiche e applicazioni

La formazione del *miRISC* risulta essenziale affinché i *miRNA* possano svolgere la loro funzione biologica: all'interno di questo complesso tali piccoli *RNA* vengono guidati verso specifiche regioni *target* localizzate a livello del 3'-*UTR* degli *RNA* messaggeri e qui esercitano un'attività di repressione post-trascrizionale attraverso la degradazione o bloccando direttamente il processo traduzionale⁵⁷. Il riconoscimento è mediato da una

specifica sequenza del *miRNA* denominata *seed sequence* (nucleotidi 2-8)⁶⁸. Risulta importante sottolineare che la deregolazione di singoli *miRNA* o di un loro *cluster* determina frequentemente un'alterazione nell'espressione di oncogeni o geni soppressori di tumore⁶⁹. Distinguiamo quindi *miRNA* oncosoppressori, che regolano negativamente l'espressione di oncogeni codificanti proteine, e *miRNA* oncogenici, che reprimono geni coinvolti nella soppressione dei tumori⁶⁹.

Studi recenti hanno dimostrato che i *miRNA* possono essere rilasciati in circolo dalle cellule, come conseguenza di un'attiva secrezione o di morte cellulare⁷⁰, per cui sono stati ritrovati in diversi fluidi biologici (come sangue, siero, plasma, urine e saliva)⁷¹. Questo ha aumentato l'interesse nei confronti di queste molecole e oggi ci sono evidenze della loro rilevanza clinica come biomarcatori in diversi tipi di cancro⁷⁰.

1.2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide

I polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP*) rappresentano i cambiamenti genetici più abbondanti nel genoma umano⁷²: il progetto 1000 Genomi ha identificato 88 milioni di varianti, tra cui 84.7 milioni di *SNP*⁷³. Con l'acronimo *SNP* si fa riferimento a una variazione di una singola base nella sequenza del *DNA*, in una specifica posizione, con generalmente due possibili

alternative nucleotidiche⁷⁴. Tuttavia, per poter parlare di *SNP*, l'allele meno presente deve mostrare una frequenza pari o superiore all'1%⁷⁴. Nell'ambito di tali polimorfismi non sono dunque incluse inserzioni o delezioni di singole basi, anche se la definizione appena esposta non è sempre applicata così rigidamente⁷⁵. In linea teorica questi polimorfismi possono essere bi, tri o tetra-allelici, tuttavia nell'uomo queste ultime due casistiche sono molto rare, quasi inesistenti, e dunque gli *SNP* sono considerati dei *marker* di-allelici⁷⁵.

Nell'uomo, la maggioranza dei polimorfismi a singolo nucleotide soddisfa l'equilibrio di *Hardy-Weinberg* (*HWE*)⁷⁶, 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 , $2pq$ e q , dove p e q indicano, nell'ordine, la frequenza dell'allele A e dell'allele B⁷⁷. Questa legge ha valore in presenza di specifiche condizioni, tra cui che la popolazione in esame sia di grandi dimensioni, che all'interno della popolazione stessa la riproduzione sessuale avvenga per accoppiamento casuale, che vi siano un tasso di mutazione e migrazione trascurabili, che le frequenze alleliche siano paragonabili tra i due sessi, e che si verifichi assenza di selezione naturale^{77,78}.

1.2.2.1 Funzioni biologiche e applicazioni

Gli *SNP* sono localizzati più frequentemente a livello delle regioni genomiche non codificanti, rispetto a quelle codificanti⁷⁹: nel primo caso, se presenti all'interno di siti di regolazione dei geni, possono modificarne la trascrizione. Quando presenti in regioni codificanti, possono alterare la struttura e di conseguenza la funzione di una proteina, contribuendo allo sviluppo di stati patologici o di differenti risposte a farmaci o tossine⁷². In generale, si possono distinguere *SNP* che portano a variazioni missenso e *SNP* che determinano variazioni silenti⁸⁰. Si parla di variazioni missenso o non sinonime quando la sostituzione di una singola base all'interno di una sequenza nucleotidica comporta una variazione della sequenza amminoacidica corrispondente, mentre di variazioni silenti o sinonime quando tale sostituzione non ha effetto sulla sequenza amminoacidica. In ogni caso, entrambe le tipologie di *SNP* possono influenzare l'attività dei promotori e modificare la stabilità dei *pre-mRNA* o la localizzazione subcellulare di alcune proteine⁸⁰. Nonostante la maggior parte di questi polimorfismi non risulti deleteria per l'organismo, si possono comunque rendere responsabili di suscettibilità a determinate malattie, accumulo di farmaci ed evoluzione del genoma⁸⁰. Di conseguenza, sono stati sfruttati come *marker* molecolari nello studio della genetica delle malattie e nella farmacogenomica⁷².

Un'applicazione interessante nel primo ambito è l'identificazione di *SNP* che causano cambiamenti nei processi biologici: un esempio di approccio potrebbe essere la genotipizzazione su larga scala di una popolazione di pazienti malati e una popolazione sana di controllo, per valutarne differenze genetiche e correlarle con caratteristiche fenotipiche prese in esame⁷².

1.2.3 Biomarcatori correlati all'iponatriemia

Attualmente, non sono disponibili studi che hanno identificato biomarcatori correlabili all'iponatriemia nel tumore al polmone. Tuttavia, alcune recenti ricerche possono fornire una base di partenza per poter indagare l'iponatriemia in oncologia.

Una ricerca condotta sui topi ha dimostrato il ruolo essenziale del miR-132 nella regolazione dell'omeostasi dell'acqua nell'organismo. Si è infatti verificato che un silenziamento di questo *miRNA* determina un incremento nell'espressione del repressore *MECP2* del gene che codifica per l'*AVP*⁸¹. L'impossibilità di produzione e di rilascio dell'*AVP* causa un effetto a cascata di diminuzione della proteina *AQP2* e quindi di aumento nell'osmolarità del plasma⁸¹. Il meccanismo d'azione proposto per il miR-132 è riassunto in **Figura 6**.

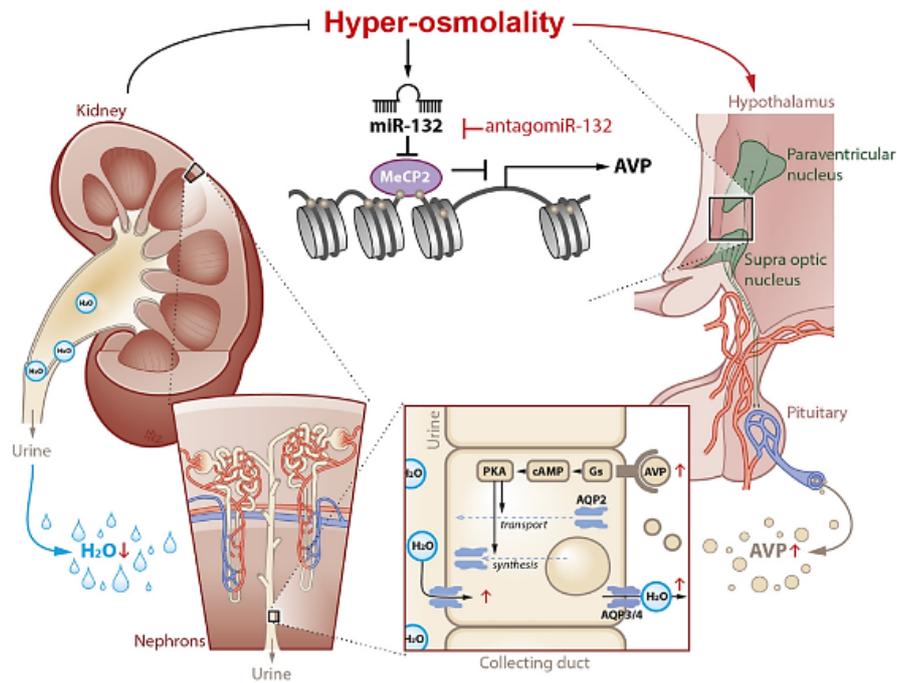


Figura 6. Mantenimento dell'omeostasi dell'acqua da parte del miR-132. In presenza di bassi livelli di sodio plasmatici, i livelli di miR-132 diminuiscono, mentre un'elevata osmolarità del plasma determina un aumento del miR-132. Questo *miRNA* agisce a livello ipotalamico reprimendo *MECP2* e favorendo la trascrizione del gene *Avp*⁸¹.

2. SCOPO

Lo scopo di questo studio è quello di ricercare dei biomarcatori correlati con la condizione di iponatriemia nei pazienti affetti da tumore al polmone.

Per raggiungere questo obiettivo verranno condotte due diverse tipologie di ricerche: l'analisi del profilo di espressione di *micro-RNA (miRNA)* e lo studio di polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP*).

La prima analisi consiste nell'identificare una *signature* di *miRNA* in grado di predire la condizione di iponatriemia e eunatriemia nei pazienti con tumore al polmone arruolati nella fase retrospettiva dello studio. Per individuare questo *set* di *target* verrà eseguito un *miRNA-sequencing* su campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*FFPE*), confrontando sia campioni di tessuto tumorale polmonare che di tessuto sano circondante la zona tumorale di 10 pazienti che hanno sviluppato iponatriemia e 10 pazienti eunatriemici. Tale *signature* verrà successivamente validata mediante *Real-Time PCR* e chimica del *SYBR Green* su campioni plasmatici di pazienti arruolati in prospettico.

Contemporaneamente a questa analisi, una seconda ricerca verrà condotta sui polimorfismi a singolo nucleotide su campioni di sangue intero dei pazienti arruolati nella fase prospettica. I polimorfismi candidati allo studio sono localizzati nei geni *AVP*, *AVPRIA*, *HIF- α* , *VEGF-A*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*.

La nostra ricerca, in quanto studio innovativo, apporterà importanti e stimolanti risultati nella comunità scientifica implementando le conoscenze molecolari di questo disturbo elettrolitico.

I risultati verranno inoltre correlati, con opportune analisi statistiche, agli *outcome* clinici dei pazienti, al fine di indagare un possibile ruolo prognostico e predittivo dei biomarcatori in esame, che potrebbe rivelarsi importante ai fini diagnostici e terapeutici specialmente considerando la non invasività delle ricerche condotte.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Nella fase di *screening* di questo studio sono stati analizzati campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*FFPE*), sia tumorali che relativi alla parte sana circostante il tumore, di 20 pazienti totali, 10 pazienti eunatriemici e 10 pazienti che hanno sviluppato iponatriemia.

I campioni tissutali sono stati forniti dalla *SOD* di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche e sono stati raccolti dal 2004 al 2019.

Nella fase prospettica, sono stati arruolati attualmente 99 pazienti consecutivi con diagnosi di neoplasia polmonare, con malattia localmente avanzata (stadio III), non suscettibile di chirurgia al momento della diagnosi, o metastatica (stadio IV) di qualunque istologia: non a piccole cellule (adenocarcinomi e carcinomi squamocellulari) e a piccole cellule (microcitomi). Di questi pazienti sono stati raccolti, dal 2020 al 2022, campioni di sangue intero, da cui si è ottenuta successivamente la porzione plasmatica. La raccolta dei prelievi è stata effettuata dal personale infermieristico della Clinica Oncologica (Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche) ed è stata condotta in tre tempi successivi per ciascun paziente:

al *baseline*, ovvero prima dell'inizio della terapia antitumorale (prelievo T0), in corso di trattamento, ovvero al terzo ciclo di terapia (prelievo T1) e prima della rivalutazione strumentale di malattia, ovvero prima del quinto ciclo di terapia (prelievo T2). I protocolli di trattamento oncologico effettuati includevano: chemioterapia, immunoterapia o una loro combinazione. 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 questa popolazione sono in fase di raccolta i dati clinico-laboratoristici (compreso lo stato di natriemia basale e in corso di trattamento), nonché i dati relativi alle caratteristiche istologiche, biomolecolari di malattia e all'*outcome* clinico.

Sia per i pazienti arruolati in fase retrospettiva che per quelli arruolati in prospettico lo stato di iponatriemia è stato definito qualora la concentrazione di sodio sierica fosse pari o inferiore a 135 mEq/L.

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

3.2 Materiali e metodi per l'analisi dei miRNA – Fase di screening

3.2.1 Estrazione dell'RNA totale da campioni FFPE

Il kit *miRNeasy FFPE* della *Qiagen* è stato utilizzato per purificare l'RNA totale, inclusi i *miRNA*, dai campioni *FFPE*.

Prima di iniziare la procedura, è opportuno preparare il materiale di partenza, 3-4 sezioni di tessuto con uno spessore fino a 10 µm, tagliando la paraffina in eccesso con l'aiuto di un bisturi e di una pinzetta sterili e posizionando il campione in una *ependorf* da 2 mL, che deve essere poi centrifugata brevemente.

Di seguito viene riportato il protocollo utilizzato per isolare l'RNA totale:

1. Aggiungere 320 µL di *Deparaffinization Solution*. Agitare mediante *vortex* per 10 secondi e centrifugare brevemente;
2. Incubare a 56°C per 3 minuti e successivamente lasciare raffreddare a temperatura ambiente;
3. Aggiungere 240 µL di *Buffer PKD* e agitare vigorosamente mediante *vortex*;
4. Centrifugare le provette a 11000xg per 1 minuto;
5. Aggiungere 10 µL di proteinasi K alla fase chiara più bassa e agitare gentilmente con la pipetta;

6. Incubare a 56°C per 15 minuti e poi a 80°C per 15 minuti;
7. Trasferire la fase più bassa e chiara in un nuovo tubo da 15 mL;
8. Incubare in ghiaccio per 3 minuti e poi centrifugare a 20000xg per 15 minuti;
9. Trasferire il surnatante in una nuova provetta da microcentrifuga facendo attenzione a non disturbare il *pellet*;
10. Aggiungere *DNase Booster Buffer* in quantità equivalente ad un decimo del volume totale del campione (approssimativamente 25 uL);
11. Aggiungere 10 uL di *DNase I*, miscelare invertendo il tubo e centrifugare brevemente;
12. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti;
13. Aggiungere 500 uL di *Buffer RBC* per aggiustare le condizioni di legame e miscelare il lisato accuratamente;
14. Aggiungere 1750 uL di Etanolo (100%) al campione e mescolare con la pipetta. Non centrifugare e procedere immediatamente allo *step* successivo;
15. Trasferire 700 uL di campione, inclusi eventuali precipitati, alla colonnina *RNeasy MinElute spin column* posizionata su un tubo di raccolta da 2 mL;
16. Chiudere il tappo e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;

17. Ripetere lo *step* 16 fino a che tutto il restante campione non ha attraversato la colonnina. Riutilizzare il tubo sottostante;
18. Aggiungere 500 uL di *Buffer RPE* alla colonnina. Chiudere il tappo e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
19. Aggiungere 500 uL di *Buffer RPE* alla colonnina. Chiudere il tappo e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 2 minuti. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
20. Posizionare la colonnina in un nuovo tubicino di raccolta da 2 mL;
21. Aprire il tappo della colonnina e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti. Scartare il liquido e il tubo di raccolta;
22. Posizionare la colonnina in un nuovo tubicino di raccolta da 1.5 mL;
23. Aggiungere 14-30 uL di acqua *RNase-free* direttamente al centro della membrana della colonnina;
24. Chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto alla massima velocità per eluire l'*RNA*;
25. Stoccare l'*RNA* nel congelatore $-80^{\circ}C$.

3.2.2 *miRNA sequencing*

Sui campioni di *RNA* totale estratto è stata eseguita, mediante un centro esterno, l'analisi di *miRNA sequencing*. Prima di procedere con il

sequenziamento, sono state valutate la purezza e la quantità dell'*RNA* tissutale mediante il *NanoDrop* ed il *Qubit BR RNA Kit (ThermoFisher)*, rispettivamente. Successivamente, è stata effettuata la preparazione della libreria *miRNA-seq* usando il *QIAseq miRNA Kit (Qiagen)*; 100 ng di *RNA* totale sono stati utilizzati per la costruzione della libreria con 16 cicli di *PCR*. La dimensione della libreria è stata valutata mediante l'analisi di elettroforesi capillare usando la *tape station Agilent 4200*. Le librerie *miRNA-seq* sono state analizzate con il sequenziatore *Illumina NextSeq500*, generando *1X75bp-reads* con una profondità di sequenziamento di 7.8 milioni di frammenti in media per campione.

3.2.3 Analisi bioinformatiche

La qualità dei dati di sequenziamento in formato *FASTQ* è stata valutata usando il software *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Gli adattatori di sequenziamento sono stati rimossi e le *reads* con una lunghezza <18bp e >27bp sono state escluse dall'analisi usando il programma *Cutadapt* (v1.18). Successivamente, le *reads* filtrate sono state allineate contro il database *miRBase* versione 22 usando l'allineatore *SHRiMP2* (v2.2.3). Le *reads* mappanti sono state assegnate al *miRNA* maturo sulla base della loro

posizione di mappatura sui *miRNA*-forcina. Per ciascun *miRNA*, si sono effettuate le conte dei frammenti mappanti, deduplicando per *Unique Molecular identifiers (UMI)*. Successivamente, le conte di ciascun *miRNA* maturo sono state normalizzate come *CPM (Count per Millions)*, dividendole per il totale delle *reads* mappate per campione e moltiplicando per un milione.

L'analisi differenziale dell'espressione di *miRNA* tra i gruppi di studio è stata eseguita con *DESeq2* (v1.30.1), considerando come statisticamente significativi i valori di $p\text{-value} < 0.05$ e accettando un $Log_2\text{FoldChange} > |0.58|$ per i campioni tumorali ed un $Log_2\text{FoldChange} > |1.2|$ per i campioni peritumorali.

Inoltre, i *miRNA* che sono risultati statisticamente significativi sono stati correlati con gli *outcome* clinici, quali sopravvivenza libera da recidiva (*RFS, relapse-free survival*), sopravvivenza libera da progressione (*PFS, progression-free survival*) e sopravvivenza globale (*OS, overall survival*), usando modelli di regressione multivariata *Cox*.

3.3 Materiali e metodi per l'analisi dei miRNA – Fase di validazione

3.3.1 Raccolta dei campioni plasmatici

Per ciascun paziente sono state raccolte tre provette di sangue intero con *EDTA* (tappo viola), le quali sono state processate, subito dopo l'esecuzione del prelievo, per ottenere campioni plasmatici, seguendo il protocollo indicato:

1. Invertire delicatamente le provette di sangue intero 8-10 volte;
2. Centrifugare le provette a 1100xg per 20 minuti a temperatura ambiente;
3. Prelevare il plasma con una pipetta *Pasteur* monouso *RNase-free* da 3 mL, restando a una distanza di circa 1 cm dal *buffy coat* e dai globuli rossi;
4. Trasferire il plasma in una provetta da 5mL o una *Falcon* da 15 mL e miscelare con la *Pasteur*;
5. Aliquotare 1 mL di plasma in provette *RNase-free* da 2 mL;
6. Centrifugare il plasma ottenuto a 10000xg per 7 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C per ottenere la precipitazione dei detriti cellulari;
7. Trasferire il plasma in nuove provette da 2 mL *RNase-free*, opportunamente siglate, avendo cura di non disturbare il *pellet*;

8. Stoccare i campioni nel congelatore a -80°C.

3.3.2 Estrazione dell'RNA totale da campioni plasmatici

Il *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* della *Qiagen* è stato utilizzato per purificare l'RNA totale libero da cellule, principalmente *miRNA* ed altri piccoli RNA, da campioni plasmatici. Per il controllo della qualità dell'estrazione è raccomandato l'utilizzo di un RNA sintetico (*Spike-in*), per cui durante questo processo è stata aggiunta una *mix* di *Unisp2*, *Unisp4* ed *Unisp5*, contenuta nell'*RNA Spike-in Kit* della *Qiagen*.

Di seguito viene riportato il protocollo utilizzato per isolare l'RNA totale.

1. Scongela i campioni di plasma a temperatura ambiente per circa 30 minuti e miscelarli con il *vortex*;
2. Trasferire 200 uL di plasma in una provetta da 2 mL;
3. Aggiungere 60 uL di *Buffer RPL*. Agitare mediante *vortex* per >5 secondi ed incubare a temperatura ambiente per 3 minuti;
4. Aggiungere 1 uL di *Spike-in mix*;
5. Aggiungere 20 uL di *Buffer RPP*. Agitare vigorosamente mediante *vortex* per >20 secondi ed incubare a temperatura ambiente per 3 minuti;

6. Centrifugare le provette a 12000xg per 3 minuti a temperatura ambiente per separare il precipitato. Il surnatante dovrebbe apparire limpido ed incolore;
7. Trasferire il surnatante (circa 230 uL) in un nuovo tubo da microcentrifuga;
8. Aggiungere 1 volume di isopropanolo e miscelare bene mediante *vortex*;
9. Trasferire l'intero campione nella colonnina *RNeasy UCP MinElute spin column* e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
10. Aggiungere 700 uL di *Buffer RWT* alla colonnina e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
11. Aggiungere 500 uL di *Buffer RPE* alla colonnina e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 15 secondi. Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
12. Aggiungere 500 uL di Etanolo 80% alla colonnina e centrifugare a $\geq 8000xg$ per 2 minuti per lavare la membrana;
13. Rimuovere la colonnina dal tubo sottostante e posizionarla in un nuovo tubo da 2 mL;

14. Aprire il tappo e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti.
Scartare il liquido e riutilizzare il tubo sottostante;
15. Posizionare la colonnina in una nuova provetta da 1.5 mL;
16. Aggiungere 20 uL di acqua *Rnase-free* direttamente al centro della membrana della colonnina;
17. Incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
18. Centrifugare per 1 minuto alla massima velocità per eluire l'*RNA*;
19. Per un maggior recupero dell'*RNA*, riapplicare l'eluato in colonnina, incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare nuovamente per 1 minuto alla massima velocità;
20. Conservare l'*RNA* eluito a -80°C.

3.3.3 Sintesi del cDNA

Per poter effettuare l'amplificazione via *PCR*, l'*RNA* deve essere sottoposto a retrotrascrizione. Per la reazione di conversione dell'*RNA* in *cDNA* è stato utilizzato il *miRCURY LNA RT Kit (Qiagen)*, che permette di condurre una poliadenilazione dei *miRNA*, poiché questi a differenza degli *RNA* messaggeri non sono poliadenilati, ed una retrotrascrizione universale utilizzando dei *primer oligo-dT*.

Per monitorare l'efficienza della retrotrascrizione è stato aggiunto alla reazione un *RNA Spike-in*, l'*Unisp6*, fornito dal *kit* stesso.

La procedura della reazione, riportata di seguito, deve essere effettuata in ghiaccio.

1. Preparare una *mix* di reazione, con volume finale di 6.8 uL, tenendo conto del numero totale di campioni che devono essere retrotrascritti, della necessità di un controllo negativo di retrotrascrizione e di un 10% di eccesso, considerando che per un campione le quantità di reagenti richieste sono:

| Reagente | Quantità per 1 reazione |
|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>5x miRCURY SYBR Green RT PCR</i> | 2 uL |
| <i>H2O RNase-free</i> | 3.3 uL |
| <i>10x miRCURY RT Enzyme Mix</i> | 1 uL |
| <i>Unisp6 RNA Spike-In</i> | 0.5 uL |
| Totale | 6.8 uL |

2. Miscelare e centrifugare brevemente la *mix* di reazione;
3. Distribuire 6.8 uL di *mix* in ogni tubo per *PCR* da 200 uL;
4. Aggiungere 3.2 uL di campione di *RNA* ad ogni tubo;
5. Miscelare le reazioni e centrifugare brevemente;
6. Posizionare i tubicini di reazione nel termociclatore (*SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems*) ed avviare il seguente profilo termico:

| <i>Step</i> | <i>Tempo</i> | <i>Temperatura</i> |
|------------------------------|----------------|--------------------|
| Retrotrascrizione | 60 minuti | 42°C |
| Inattivazione della reazione | 5 minuti | 95°C |
| Stoccaggio | <i>Forever</i> | 4°C |

Al termine:

7. Centrifugare brevemente le reazioni;
8. Trasferire il *cDNA* ottenuto in provette con basso legame con gli acidi nucleici e stoccare nel congelatore a -20°C.

3.3.4 Real-Time PCR per la valutazione della qualità del workflow laboratoristico e del grado di emolisi dei campioni plasmatici

Al fine di valutare l'affidabilità dell'estrazione e della retrotrascrizione dei campioni in esame e stimare il grado di emolisi dei campioni plasmatici di partenza sono state effettuate corse di *Real-Time PCR (qPCR)*. L'analisi è stata condotta mediante l'utilizzo del *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen)* ed i *miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen)*.

Nello specifico, sono stati testati i *targets Unisp2* e *Unisp6* per esaminare la qualità rispettivamente dell'estrazione e della sintesi del *cDNA*, mentre il grado di emolisi dei campioni plasmatici è stato valutato mediante il *miR-ratio*, ovvero il delta-Ct fra il miR-23a-3p, un *miRNA* ritrovato relativamente

stabile nei campioni plasmatici, ed il miR-451a, noto per essere arricchito negli eritrociti.

Di seguito viene riportata la procedura per la corsa *qPCR* che è stata eseguita a temperatura ambiente:

1. Immediatamente prima dell'utilizzo, preparare una diluizione del *cDNA* 1:30 in acqua *RNAse-free*;
2. Preparare la *mix* di reazione per il numero totale di campioni, includendo controlli negativi, il controllo negativo di retrotrascrizione ed un 10% di eccesso:

| Reagente | Quantità per 1 reazione |
|---|-------------------------|
| <i>2X miRCURY SYBR Green Master Mix + ROX Reference Dye</i> | 5 uL |
| <i>Primers</i> | 1 uL |
| <i>H2O RNAse-free</i> | 1 uL |
| Totale | 7 uL |

3. Miscelare la reazione, *vortexare* e centrifugare brevemente;
4. Dispensare 7 uL di *mix* in ciascun pozzetto della piastra per *qPCR* (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher*);
5. Aggiungere 3 uL del *cDNA* diluito 1:30 in ogni pozzetto;
6. Pipettare in ogni pozzetto per miscelare le reazioni;
7. Sigillare la piastra con il *film* ottico (*MicroAmp Optical Adhesive Film, Thermo Fisher*) e centrifugare brevemente a temperatura ambiente;

8. Caricare la piastra nello strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher)* ed impostare il seguente profilo termico:

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

9. Utilizzare il *ThermoFisher Cloud* per un'analisi preliminare dei dati.

3.3.5 Real-Time PCR per l'analisi del profilo di espressione della signature di miRNA in esame

L'analisi del profilo di espressione del nostro *set* di *miRNA* è stata effettuata mediante *qPCR* utilizzando il *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit* e le piastre *miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels* della *Qiagen*. Queste piastre vengono realizzate con *primer* pre-aliquotati all'interno di ciascun pozzetto e sono state progettate tramite il *link*:

[miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels - GeneGlobe \(qiagen.com\).](https://www.qiagen.com/it/products/real-time-pcr/real-time-pcr-panels/mi-rcury-lna-mi-rna-custom-pcr-panels)

Il protocollo eseguito, riportato di seguito, è stato effettuato a temperatura ambiente:

1. Immediatamente prima dell'utilizzo, preparare una diluizione 1:40 del *cDNA* con acqua *RNase-free*;
2. Preparare la *mix* di reazione secondo la seguente tabella per ciascuno dei campioni in esame:

| Reagente | Volume per <i>target</i> (uL) |
|---|-------------------------------|
| <i>2x miRCURY SYBR Green Master Mix + ROX Reference Dye</i> | 5 uL |
| cDNA diluito 1:40 | 4 uL |
| H2O <i>RNase-free</i> | 1 uL |
| Volume totale di reazione | 10 uL |

3. Miscelare la reazione mediante *vortex* e centrifugare brevemente;
4. Dispensare 10 uL di reazione in ogni pozzetto della piastra;
5. Chiudere la piastra con le *strips* ottiche (*Optical Thin-Wall 8-Cap Strips, Qiagen*);
6. Agitare mediante *vortex* la piastra e centrifugare brevemente a temperatura ambiente;
7. Attendere 5 minuti per far sì che i *primers* si dissolvano nella *mix* di reazione;
8. Inserire la piastra nello strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher)* ed avviare il programma di amplificazione come da seguente tabella:

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

9. Utilizzare il *ThermoFisher Cloud* per un'iniziale analisi dei dati.

3.4 Materiali e metodi per l'analisi SNP

3.4.1 Estrazione del DNA da campioni di sangue intero

Il *DNA* è stato estratto dai campioni di sangue intero di ciascun paziente arruolato in prospettico, prelevati al tempo T0 e conservati a una temperatura di -20°C. L'estrazione è stata effettuata in maniera automatica utilizzando lo strumento *QIAcube* (*Qiagen*) ed il *Qiapamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*). Lo strumento è in grado di eseguire l'estrazione di *DNA* fino a 12 campioni di sangue o altri fluidi corporei contemporaneamente ed in autonomia, tuttavia la preparazione del materiale è affidata all'operatore ed è stata effettuata seguendo i successivi passaggi:

1. Scongellare le provette di sangue intero a temperatura ambiente;
2. Una volta scongelate, trasferire per ogni campione 200 uL di sangue in un tubicino;

3. Preparare gli adattatori (**Figura 7**) inserendo una colonnina, priva del tubo sottostante, nella posizione 1 ed una provetta con basso legame agli acidi nucleici per l'eluizione, che va siglata opportunamente sul tappo e sulla parete, nella posizione 3. La posizione 2 deve rimanere vuota.

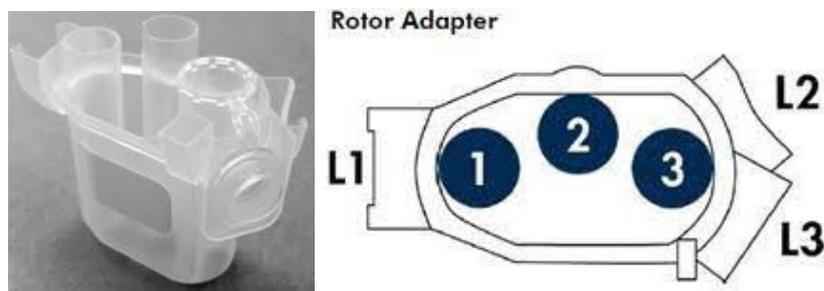


Figura 7. Immagini dell'adattatore compatibile con il *Qiacube*. A sinistra, l'adattatore che verrà inserito nella centrifuga del *Qiacube*. A destra, lo stesso adattatore schematicizzato con indicate le diverse posizioni.

All'interno dello strumento:

4. Controllare che i reagenti e i puntali siano sufficienti;
5. Mettere i gommini nelle postazioni dello *shaker* seguendo la scheda tecnica;
6. Aggiungere la proteinasi K in una *ependorf* da 1.5 mL che verrà posizionata nello strumento. La quantità di proteinasi K necessaria si può consultare nella scheda tecnica;

7. Inserire i tubicini nello *shaker* e, nelle posizioni equivalenti, gli adattatori nella centrifuga, seguendo le indicazioni riportate nella scheda tecnica;
8. Chiudere lo strumento ed avviare il protocollo opportuno.

Di seguito viene riportato il protocollo eseguito dal *Qiacube* per l'estrazione del *DNA*:

1. Aggiunta di 20 uL di proteinasi K ai 200 uL di campione presenti in ciascun tubicino;
2. Aggiunta di 200 uL di *Buffer AL* e agitazione per 15 secondi;
3. Incubazione a 56°C per 10 minuti;
4. Aggiunta di 200 uL di Etanolo (96-100%) a ciascun campione e agitazione per 15 secondi;
5. Applicazione della miscela ottenuta nello *step* 4 alla colonnina *QIAamp Mini spin column* e centrifuga a 6000xg per 1 minuto;
6. Aggiunta di 500 uL di *Buffer AW1* alla colonnina e centrifuga a 6000xg per 1 minuto;
7. Aggiunta di 500 uL di *Buffer AW2* alla colonnina e centrifuga alla massima velocità per 3 minuti;
8. Centrifuga alla massima velocità per 1 minuto;

9. Posizionata la colonnina nella provetta di eluizione, aggiunta di 100 uL di *Buffer AE*;
10. Incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e successiva centrifuga a 6000xg per 1 minuto;
11. Stoccare il *DNA* ottenuto a -20°C.

3.4.2 Valutazione spettrofotometrica della purezza del *DNA* estratto

La purezza del *DNA* estratto è stata valutata mediante il rapporto fra l'assorbanza misurata a 260 nm e quella misurata a 280 nm, lunghezze d'onda corrispondenti al picco di assorbimento rispettivamente degli acidi nucleici e delle proteine. Tale valutazione è stata effettuata utilizzando lo strumento *Nanodrop 2000C (Thermo Fisher)* secondo il protocollo indicato:

1. Effettuare un lavaggio del piedistallo dello strumento con circa 5 uL di acqua;
2. Procedere con la lettura del bianco posizionando 2 uL di *Buffer AE* sul piedistallo;
3. Pulire il piedistallo con la carta assorbente;
4. Posizionare 2 uL di campione sul piedistallo e procedere con la lettura;
5. Pulire il piedistallo;
6. Ripetere la procedura per tutti i campioni;

7. Al termine, effettuare nuovamente un lavaggio del piedistallo con circa 5 uL di acqua.

3.4.3 Quantificazione del DNA al Qubit

Il *DNA* estratto è stato quantificato mediante il *Qubit*, un fluorimetro da banco, utilizzando il *Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit*.

Procedura:

1. Preparare e siglare i *Qubit assay tubes* da 0.5 mL nel numero richiesto per i campioni e gli *standard*;
2. Aggiungere la *Qubit 1X dsDNA working solution* a ciascuno dei tubicini, in modo che il volume finale in ogni provetta, dopo aver aggiunto anche il campione, sia di 200 uL. Nello specifico:
 - a. *STANDARD*: dispensare 190 uL di *working solution* e 10 uL di ciascuno *standard* nella provetta opportuna. *Vortexare* per 3-5 secondi e centrifugare brevemente;
 - b. *CAMPIONI*: dispensare 198 uL di *working solution* e 2 uL di *DNA* in ogni tubicino. *Vortexare* per 3-5 secondi e centrifugare brevemente;
3. Incubare i tubi a temperatura ambiente per 2 minuti.

Nello strumento:

4. Sulla pagina “*Home*”, selezionare “*dsDNA*” e successivamente “*IX dsDNA High Sensitivity*”;
5. Inserire lo *Standard #1* e selezionare “*Read standard*”. Quando la lettura è completa, rimuoverlo. Ripetere le operazioni anche per lo *Standard #2*;
6. Premere “*Run samples*”;
7. Sullo schermo, selezionare il volume di campione e l’unità di misura (ng/uL);
8. Inserire il campione e selezionare “*Read tube*”. Lo strumento fornisce il risultato sullo schermo come concentrazione del campione originale;
9. Rimuovere la provetta e ripetere l’operazione anche per gli altri campioni.

3.4.4 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) mediante saggio TaqMan

La determinazione del genotipo per i diversi *SNP* è stata condotta sui campioni di *DNA* estratti da sangue intero, utilizzando la *TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher)* ed i *TaqMan SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher)*.

Per quest'analisi i campioni di *DNA* sono stati diluiti in acqua *nuclease-free* in modo da ottenere una concentrazione finale di 5 ng/uL, con l'obiettivo di testare 10 ng di *DNA* totale.

Procedura:

- 1) Miscelare la *TaqMan Genotyping Master Mix* agitando la bottiglia;
- 2) Agitare mediante *vortex* e centrifugare brevemente il saggio;
- 3) Preparare una *mix* di reazione per il numero totale di campioni testati per ogni saggio, tenendo conto di un 10% di eccesso e di almeno due controlli negativi (*NTC*), come da tabella:

| Reagente | Quantità per una reazione |
|---------------------------------------|---------------------------|
| <i>TaqMan Genotyping Master Mix</i> | 5 uL |
| Saggio 20X | 0.5 uL |
| H ₂ O <i>nuclease-free</i> | 2.5 uL |
| Volume totale per pozzetto | 8 uL |

- 4) Miscelare brevemente mediante *vortex* e centrifugare la *mix* di reazione;
- 5) Dispensare 8 uL di *mix* per ogni pozzetto della piastra (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher*);
- 6) *Vortexare* e centrifugare brevemente le diluizioni di *DNA* 5 ng/uL;
- 7) Aggiungere 2 uL di *DNA* 5 ng/uL (10 ng totali) ad ogni pozzetto della piastra per ottenere un volume finale di 10 uL;

- 8) Sigillare la piastra con il *film* ottico (*MicroAmp Optical Adhesive Film*, *Thermo Fisher*) e centrifugare brevemente per portare la reazione sul fondo del pozzetto ed eliminare eventuali bolle;
- 9) Caricare la piastra nello strumento *QuantStudio 3 Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher*) ed impostare il protocollo secondo il seguente profilo termico:

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

- 10) Avviare la corsa in modalità *Standard*;
- 11) Analizzare i risultati mediante il *TaqMan Genotyper Software*.

3.4.5 Ricerca frequenze genotipiche ed alleliche della popolazione generale

Per ciascun polimorfismo in esame è stata consultata la banca dati *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>) al fine di ottenere i dati relativi al tipo di variante e alla sua localizzazione cromosomica. In aggiunta, dopo aver calcolato le frequenze alleliche e genotipiche di ogni *SNP* della nostra coorte

di studio, queste sono state confrontate con quelle presenti all'interno dello stesso *database*. In particolare, tali frequenze sono state ottenute dal progetto "1000 Genomi" per la popolazione Europea (*CEU*) e per la popolazione Toscana (*TSI*). I dati del progetto "1000 Genomi" per l'rs307821 non erano presenti all'interno di *Ensembl*, per cui le frequenze alleliche relative alla popolazione Europea sono state ricavate dalla banca dati *dbSNP* sul sito *RefSeq* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) e da queste si sono ottenute le corrispondenti frequenze genotipiche applicando la legge di *Hardy-Weinberg*.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati

Nella fase di *screening* dei *miRNA*, sono stati analizzati campioni *FFPE* di tessuto tumorale e peritumorale (istologicamente negativo per la ricerca di cellule neoplastiche) di 20 pazienti, 10 eunatriemici e 10 iponatriemici. Nella

Tabella 1 vengono riportate le caratteristiche cliniche relative ai pazienti.

| Caratteristiche | Pazienti arruolati | Pazienti eunatriemici | Pazienti iponatriemici |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| Numero pazienti | 20 | 10 (50.0%) | 10 (50.0%) |
| Sesso | | | |
| Maschi | 16 (80.0%) | 8 (80.0%) | 8 (80.0%) |
| Femmine | 4 (20.0%) | 2 (20.0%) | 2 (20.0%) |
| Età mediana (range min-max) | | | |
| | 81 (66-86) | 80 (69-86) | 81 (66-86) |
| Istologia tumorale | | | |
| Adenocarcinomi | 11 (55.0%) | 5 (50.0%) | 6 (60.0%) |
| Carcinomi squamocellulari | 8 (40.0%) | 4 (40.0%) | 4 (40.0%) |
| Adenosquamoso (Mista) | 1 (5.0%) | 1 (10.0%) | 0 (0.0%) |
| Stadio | | | |
| I | 1 (5.0%) | 1 (10.0%) | 0 (0.0%) |
| IIB | 1 (5.0%) | 0 (0.0%) | 1 (10.0%) |
| IIIA | 5 (25.0%) | 3 (30.0%) | 2 (20.0%) |
| IIIB | 4 (20.0%) | 3 (30.0%) | 1 (10.0%) |
| IV | 9 (45.0%) | 3 (30.0%) | 6 (60.0%) |
| Fumo | | | |
| Fumatore | 6 (30.0%) | 3 (30.0%) | 3 (30.0%) |
| Ex fumatore | 9 (45.0%) | 5 (50.0%) | 4 (40.0%) |
| Non fumatore | 4 (20.0%) | 2 (20.0%) | 2 (20.0%) |
| ND | 1 (5.0%) | 0 (0.0%) | 1 (10.0%) |

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nella fase retrospettiva. Nella tabella sono riportati il numero, il sesso, l'età, l'istologia tumorale, lo stadio ed il rapporto con il fumo dei pazienti arruolati nella fase di *screening* per lo studio dei *miRNA*. ND: non disponibile.

Invece, riguardo la fase prospettica, sono stati arruolati 99 pazienti totali con tumore al polmone, di cui abbiamo preso in esame sia campioni plasmatici che di sangue intero. Nella **Tabella 2** sono riportate le caratteristiche cliniche relative a questi pazienti. Da notare che, per le analisi *SNP* si hanno disponibili 98 campioni totali su cui effettuare le analisi, mentre per lo studio dei *miRNA*, i campioni attualmente analizzati e che hanno passato il controllo qualità dell'emolisi sono 68.

| Caratteristiche | Pazienti arruolati | Pazienti analizzati - <i>SNP</i> | Pazienti analizzati - <i>miRNA</i> |
|---|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Numero pazienti | | | |
| | 99 | 98 (99.0%) | 68 (68.7%) |
| Sesso | | | |
| Maschi | 71 (71.7%) | 70 (71.4%) | 49 (72.1%) |
| Femmine | 28 (28.3%) | 28 (28.6%) | 19 (27.9%) |
| Età mediana (range min-max) | | | |
| | 72 (40-88) | 72 (40-87) | 72 (52-87) |
| Istologia tumorale | | | |
| Adenocarcinomi | 72 (72.7%) | 71 (72.4%) | 48 (70.6%) |
| Carcinomi squamocellulari | 18 (18.2%) | 18 (18.4%) | 15 (22.0%) |
| Microcitomi | 8 (8.1%) | 8 (8.2%) | 5 (7.4%) |
| Adenosquamoso (Mista) | 1 (1.0%) | 1 (1.0%) | 0 (0.0%) |
| Stadio | | | |
| IIIA | 7 (7.1%) | 7 (7.1%) | 5 (7.4%) |
| IIIB | 14 (14.1%) | 14 (14.3%) | 12 (17.6%) |
| IV | 69 (69.7%) | 68 (69.4%) | 45 (66.2%) |
| malattia limitata (SCLC) | 5 (5.1%) | 5 (5.1%) | 4 (5.9%) |
| malattia estesa (SCLC) | 4 (4.0%) | 4 (4.1%) | 2 (2.9%) |
| Iponatriemia al <i>baseline</i> | | | |
| Iponatriemici | 15 (15.2%) | 15 (15.3%) | 13 (19.1%) |
| Eunatriemici | 84 (84.8%) | 83 (84.7%) | 55 (80.9%) |
| Iponatriemia in corso di terapia | | | |
| Iponatriemici | 35 (35.4%) | 34 (34.7%) | 26 (38.2%) |
| Eunatriemici | 64 (64.6%) | 64 (65.3%) | 42 (61.8%) |
| Ricovero | | | |
| Si | 7 (7.1%) | 7 (7.1%) | 6 (8.8%) |
| No | 92 (92.9%) | 91 (92.9%) | 62 (91.2%) |
| Metastasi ossee | | | |
| Si | 29 (29.3%) | 29 (29.6%) | 17 (25.0%) |
| No | 70 (70.7%) | 69 (70.4%) | 51 (75.0%) |

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nella fase prospettica. Nella tabella sono riportati il numero, il sesso, l'età media, l'istologia tumorale, lo stadio, l'iponatriemia al *baseline* ed in corso di terapia, il ricovero e la ricorrenza delle metastasi ossee per i pazienti arruolati in fase prospettica.

4.2 Risultati dello studio dei miRNA – Fase di screening

4.2.1 Controllo qualità e analisi informatica del miRNA-sequencing

Tutti i 40 campioni totali di *RNA* sono risultati essere idonei per la preparazione della libreria *miRNA-seq*.

Nella **Tabella 3** viene riportato il controllo di qualità dell'*RNA* per ogni campione.

Dopo la conclusione della procedura laboratoristica e l'analisi bioinformatica del *miRNA-sequencing*, è emerso che sono state sequenziate in media 8.873.924 *reads* per ogni campione. Dopo il *trimming* delle *reads*, in media il 47.32% delle *reads* è stato mappato sul *miRNA hairpin*.

I dati statistici del sequenziamento e del mappaggio sono riassunti nella **Tabella 4**.

| Campione | Qubit BR RNA (ng/uL) | Picco della libreria nella tape station |
|----------|-------------------------|---|
| 3-P | 111 | 198 |
| 3-T | 548 | 200 |
| 4-P | 30.6 | 186 |
| 4-T | 590 | 192 |
| 5-P | 54 | 201 |
| 5-T | 272 | 191 |
| 7-P | 58.6 | 188 |
| 7-T | 872 | 180 |
| 8-P | 49.2 | 174 |
| 8-T | 736 | 190 |
| 10-P | 33.8 | 190 |
| 10-T | 138 | 198 |
| 11-P | 31 | 194 |
| 11-T | 430 | 190 |
| 12-P | 23.2 | 185 |
| 12-T | 116 | 183 |
| 13-P | 55 | 186 |
| 13-T | 362 | 183 |
| 14-P | 58.4 | 192 |
| 14-T | 686 | 186 |
| 15-P | 72 | 193 |
| 15-T | 756 | 185 |
| 16-P | 19 | 194 |
| 16-T | 132 | 189 |
| 17-P | 294 | 190 |
| 17-T | 378 | 193 |
| 18-P | 85 | 197 |
| 18-T | 596 | 184 |
| 19-P | 370 | 194 |
| 19-T | 1020 | 190 |
| 20-P | 43.8 | 189 |
| 20-T | 154 | 189 |
| 21-P | 32 | 186 |
| 21-T | 43.6 | 187 |
| 22-P | 92.8 | 182 |
| 22-T | 200 | 183 |
| 23-P | 199 | 187 |
| 23-T | 36 | 191 |
| 24-P | 20.2 | 185 |
| 24-T | 38.2 | 204 |

Tabella 3. Controllo di qualità dell'RNA per ogni campione. Nella tabella sono riportati i dati relativi al controllo qualità dell'RNA per ogni campione. Il numero attribuito a ciascun campione viene accompagnato dalla lettera P (peritumorale) o T (tumorale).

| Campioni | Numero dei frammenti sequenziati | Numero delle reads filtrate | % delle reads filtrate | Numero delle reads mappate | % delle reads mappate | Numero delle reads deduplicate | % delle reads deduplicate | Numero di miRNA coperti da 1 read | Numero di miRNA coperti da 5 reads |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 10-P | 10109776 | 3843005 | 38.01 | 1522398 | 39.61 | 1400703 | 7.99 | 1390 | 614 |
| 10-T | 8658203 | 3460531 | 39.97 | 1320235 | 38.15 | 1318104 | 0.16 | 1302 | 585 |
| 11-P | 7855031 | 3304821 | 42.07 | 1185173 | 35.86 | 1079688 | 8.9 | 1293 | 536 |
| 11-T | 9530698 | 3668124 | 38.49 | 880347 | 24 | 829542 | 5.77 | 1411 | 572 |
| 12-P | 9191465 | 3756320 | 40.87 | 1856930 | 49.43 | 1697839 | 8.57 | 1423 | 623 |
| 12-T | 8672719 | 4138019 | 47.71 | 2230995 | 53.91 | 2029304 | 9.04 | 1281 | 618 |
| 13-P | 8897169 | 3006674 | 33.79 | 907421 | 30.18 | 659211 | 27.35 | 1249 | 552 |
| 13-T | 9098297 | 3508717 | 38.56 | 1489819 | 42.46 | 1340498 | 10.02 | 1324 | 614 |
| 14-P | 8572962 | 3383717 | 39.47 | 1489864 | 44.03 | 1333136 | 10.52 | 1320 | 546 |
| 14-T | 8777206 | 3790819 | 43.19 | 1698426 | 44.8 | 1611707 | 5.11 | 1333 | 615 |
| 15-P | 7226951 | 2804599 | 38.81 | 1434906 | 51.16 | 1326942 | 7.52 | 1312 | 551 |
| 15-T | 7938591 | 2301471 | 28.99 | 960700 | 41.74 | 897672 | 6.56 | 1097 | 507 |
| 16-P | 9028962 | 3956590 | 43.82 | 1839520 | 46.49 | 1660423 | 9.74 | 1427 | 594 |
| 16-T | 8219892 | 3354132 | 40.81 | 1247120 | 37.18 | 1175325 | 5.76 | 1262 | 603 |
| 17-P | 7768688 | 3639166 | 46.84 | 2182528 | 59.97 | 2083333 | 4.54 | 1265 | 611 |
| 17-T | 7868080 | 3795074 | 48.23 | 1947878 | 51.33 | 1839295 | 5.57 | 1250 | 579 |
| 18-P | 9144606 | 4598295 | 50.28 | 2477534 | 53.88 | 2254139 | 9.02 | 1458 | 662 |
| 18-T | 9096462 | 3375750 | 37.11 | 1620481 | 48 | 1514816 | 6.52 | 1366 | 646 |
| 19-P | 9012434 | 4254178 | 47.2 | 2361708 | 55.52 | 2095776 | 11.26 | 1364 | 637 |
| 19-T | 10003588 | 3922470 | 39.21 | 2021320 | 51.53 | 1956995 | 3.18 | 1472 | 667 |
| 20-P | 9365685 | 3783401 | 40.4 | 1994851 | 52.73 | 1872083 | 6.15 | 1549 | 653 |
| 20-T | 9110383 | 3995861 | 43.86 | 2039760 | 51.05 | 1995223 | 2.18 | 1376 | 640 |
| 21-P | 6786642 | 2667509 | 39.31 | 1644046 | 61.63 | 1544435 | 6.06 | 1267 | 599 |
| 21-T | 7771472 | 3296788 | 42.42 | 1832990 | 55.6 | 1635433 | 10.78 | 1340 | 621 |
| 22-P | 9257566 | 4047679 | 43.72 | 2898517 | 71.61 | 2678731 | 7.58 | 1296 | 592 |
| 22-T | 9200177 | 3843258 | 41.77 | 2155268 | 56.08 | 1911923 | 11.29 | 1367 | 621 |
| 23-P | 9598771 | 4400577 | 45.85 | 2596575 | 59.01 | 2296537 | 11.56 | 1286 | 636 |
| 23-T | 9114009 | 3885480 | 42.63 | 2132762 | 54.89 | 1994942 | 6.46 | 1327 | 642 |
| 24-P | 9718721 | 3942752 | 40.57 | 2956372 | 74.98 | 2789386 | 5.65 | 1353 | 641 |
| 24-T | 10817333 | 4342195 | 40.14 | 3024195 | 69.65 | 2839751 | 6.1 | 1750 | 823 |
| 3-P | 10559281 | 3527203 | 33.4 | 1022398 | 28.99 | 986727 | 3.49 | 1652 | 642 |
| 3-T | 10590483 | 3641089 | 34.38 | 710528 | 19.51 | 686697 | 3.35 | 1459 | 591 |
| 4-P | 8293831 | 2375285 | 28.64 | 779111 | 32.8 | 709750 | 8.9 | 1415 | 529 |
| 4-T | 7108697 | 2138120 | 30.08 | 535857 | 25.06 | 495827 | 7.47 | 1250 | 526 |
| 5-P | 9891305 | 4923693 | 49.78 | 3401991 | 69.09 | 3200785 | 5.91 | 1390 | 646 |
| 5-T | 8881576 | 3844778 | 43.29 | 1959587 | 50.97 | 1859829 | 5.09 | 1411 | 644 |
| 7-P | 7853841 | 2918360 | 37.16 | 1176506 | 40.31 | 1074750 | 8.65 | 1265 | 555 |
| 7-T | 7809978 | 3082186 | 39.46 | 1211446 | 39.3 | 1171743 | 3,28 | 1180 | 539 |
| 8-P | 9115230 | 3496571 | 38.36 | 1356677 | 38.8 | 1212777 | 10.61 | 1417 | 602 |
| 8-T | 9440201 | 4030790 | 42.7 | 1666312 | 41.34 | 1599011 | 4.04 | 1252 | 563 |
| MEDIA | 8873924.05 | 3601151.18 | 40.53 | 1744276.30 | 47.32 | 1616519.7 | 7.44 | 1355.03 | 605.93 |

Tabella 4. Dati statistici del sequenziamento e del mappaggio. Nella tabella vengono riportati per ogni campione il numero delle *reads* sequenziate, le *reads* filtrate, le *reads* mappate, le *reads* mappate deduplicate ed il numero dei *miRNA* coperti da almeno 1 e 5 *reads*.

4.2.2 Analisi di espressione differenziale tra i campioni tumorali

Con i dati ottenuti dal *miRNA-sequencing* è stato effettuato un primo confronto volto a valutare l'espressione differenziale dei *miRNA* tra campioni tumorali di pazienti iponatriemici ed eunatriemici, questi ultimi presi come gruppo di riferimento. Due *miRNA*, il miR-147b-3p e il miR-147b-5p, sono emersi particolarmente significativi, con un *pvalue* aggiustato inferiore a 0.1. Considerando dei criteri di analisi meno stringenti, ovvero un *pvalue* inferiore a 0.05 e un *Log2FoldChange (LFC)* $>|0.58|$, sono stati identificati 12 *miRNA* statisticamente significativi, di cui otto *downregolati* e quattro *upregolati* nei pazienti iponatriemici rispetto agli eunatriemici. I *miRNA* identificati sono mostrati nella **Tabella 5** e nel **Grafico 1**.

Inoltre, mediante l'*MA Plot* (**Grafico 2**), è possibile visualizzare ed identificare i cambiamenti dell'espressione dei *miRNA* tra i due gruppi di riferimento, mettendo in relazione il *Log2FoldChange* ed il logaritmo della media delle conte normalizzate delle due condizioni.

| <i>miRNA</i> | <i>p</i> adj | <i>P</i> value | <i>log2FoldChange (LFC)</i> |
|--------------|--------------|----------------|-----------------------------|
| miR-147b-3p | 4.46E-05 | 1.72E-08 | -2.609 |
| miR-147b-5p | 0.00701 | 5.41E-08 | -2.193 |
| miR-9-3p | 0.121565 | 0.000211 | 2.624 |
| miR-539-3p | 0.121565 | 0.000235 | -1.740 |
| miR-9-5p | 0.488621 | 0.000678 | 1.923 |
| miR-937-3p | 0.292661 | 0.000678 | -1.422 |
| miR-625-3p | 0.417882 | 0.001129 | -1.143 |
| miR-190a-5p | 0.545399 | 0.002023 | 0.614 |
| miR-146a-5p | 0.545399 | 0.002289 | -0.899 |
| miR-32-3p | 0.652256 | 0.005611 | 0.734 |
| miR-432-5p | 0.999745 | 0.034349 | -1.482 |
| miR-122-5p | 0.999745 | 0.037798 | -4.212 |

Tabella 5. *miRNA* ritrovati differenzialmente espressi tra campioni tumorali iponatriemici ed eunatriemici applicando un *pvalue*<0.05 e un *LFC*>|0.58|. La tabella riporta i 12 *miRNA* ritrovati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa dal confronto tra campioni tumorali iponatriemici ed eunatriemici, con indicati *pvalue* aggiustato, *pvalue* e *LFC*. I *miRNA* riportati nelle caselle arancioni sono quelli *downregolati*, mentre quelli riportati nelle caselle verdi sono quelli *upregolati* rispetto al gruppo di riferimento.

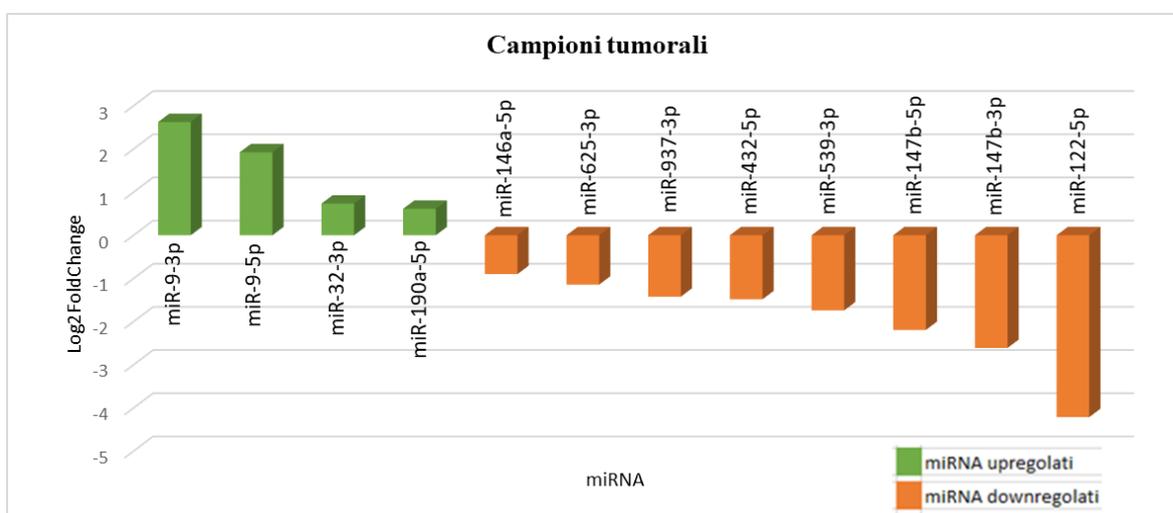


Grafico 1. *miRNA* ritrovati differenzialmente espressi tra campioni tumorali iponatriemici ed eunatriemici (*pvalue*<0.05; *LFC*>|0.58|). Il grafico mette in evidenza l'espressione differenziale dei 12 *miRNA* significativi tra i campioni tumorali dei due gruppi: nell'ordinata viene riportato il valore del *Log2FoldChange*, mentre nell'asse delle ascisse sono riportati i *miRNA* identificati. Le colonne arancioni rappresentano i *miRNA downregolati*, mentre quelle verdi i *miRNA upregolati*.

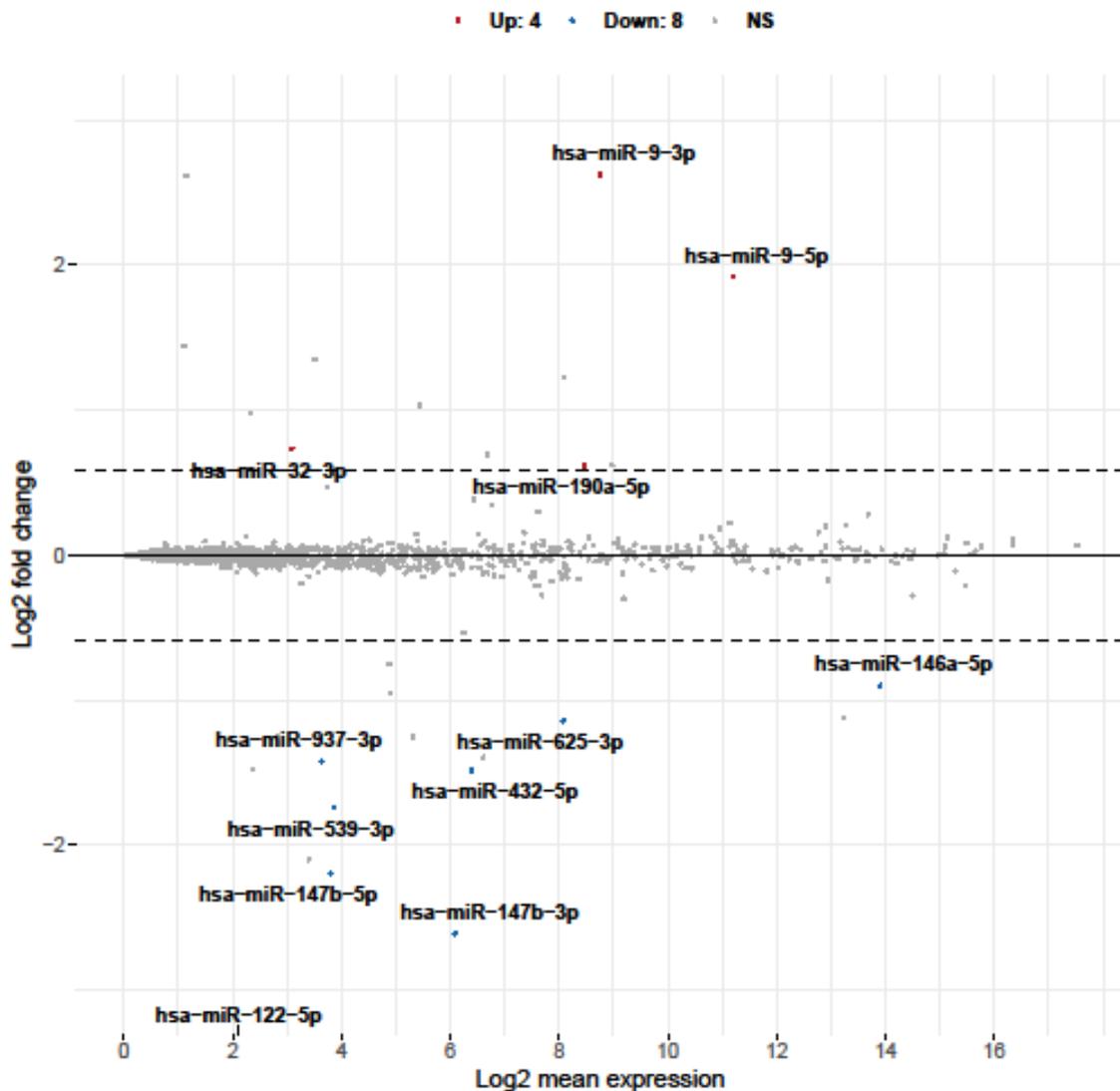


Grafico 2. Visualizzazione con *MA Plot* dei 12 *miRNA* differenzialmente espressi tra campioni tumorali iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici ($pvalue < 0.05$; $LFC > |0.58|$). Il grafico mette in relazione il $Log_2 Fold Change$ e il logaritmo della media delle conte normalizzate delle due condizioni. I *miRNA* vengono rappresentati come puntini e quelli che passano la soglia da noi impostata vengono colorati in rosso, per quelli *upregolati*, in azzurro per quelli *downregolati*, ed in grigio rimangono quelli non significativi. Nella parte superiore del grafico si vedono i *miRNA upregolati* ($LFC > 0$) e nella parte inferiore quelli *downregolati* ($LFC < 0$), mentre nella parte destra troviamo *miRNA* molto espressi e nella parte sinistra *miRNA* poco espressi.

Infine, il quadro del profilo di espressione dei 12 *miRNA* ritrovati può essere visualizzato con una *HeatMap*, per apprezzare meglio la similarità nel profilo

di espressione stesso sia tra i diversi *miRNA* che tra i diversi campioni
(Grafico 3).

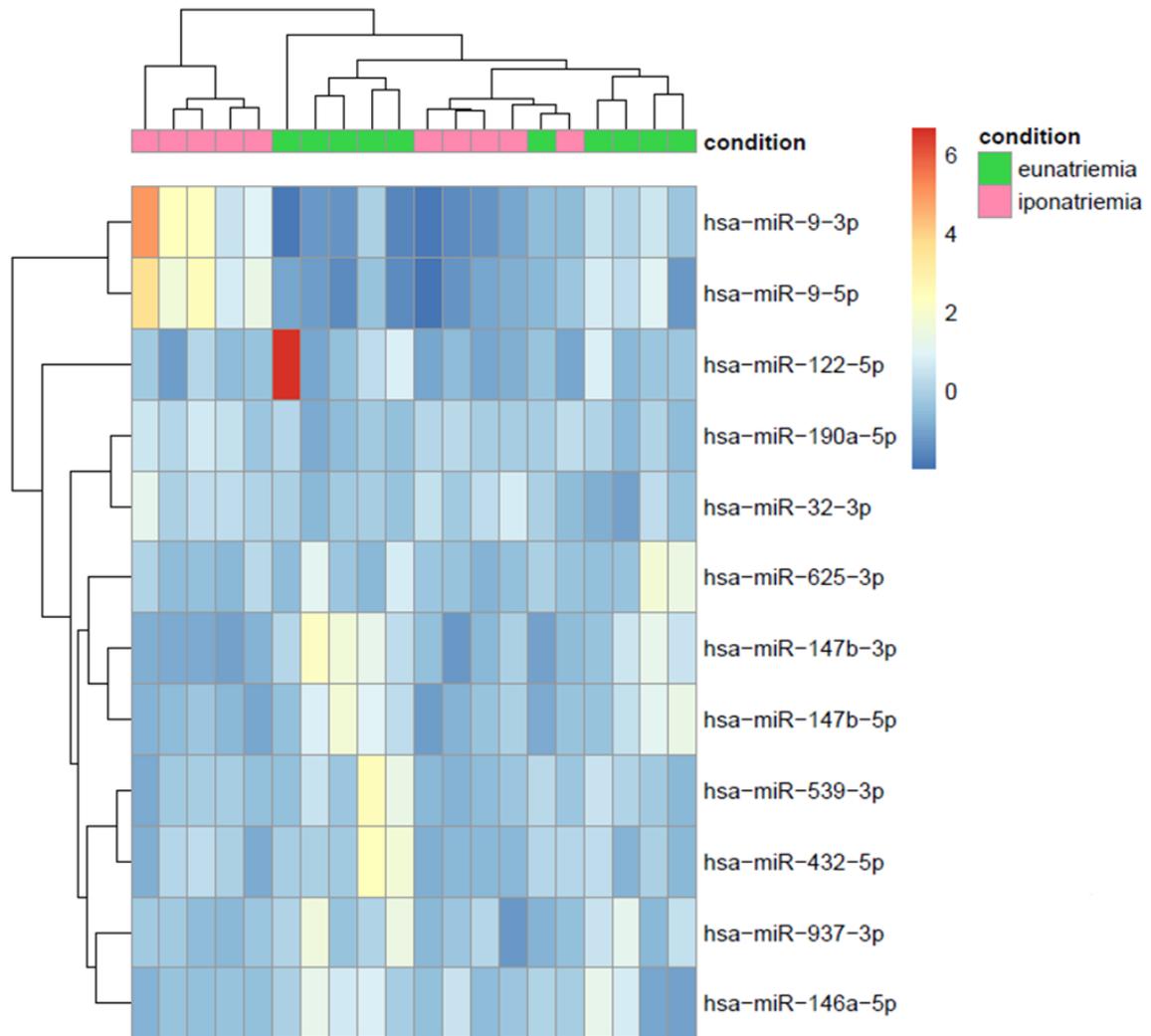


Grafico 3. HeatMap per i 12 *miRNA* differenzialmente espressi tra campioni tumorali iponatriemici ed eunatriemici ($pvalue < 0.05$; $LFC > |0.58|$). La HeatMap permette di visualizzare simultaneamente il livello di espressione (rappresentato con una scala cromatica) dei 12 *miRNA* nei diversi campioni tumorali. Gli alberi a sinistra mettono in evidenza *cluster* di *miRNA* regolati in modo simile, mentre quelli in alto *cluster* di campioni con profili di espressione simili.

Una volta ottenuti i risultati precedentemente illustrati, è stata effettuata un'analisi multivariata tra i due gruppi di interesse, considerando significativi i *miRNA* con $p\text{-value}<0.05$ (**Grafico 4**). Da questa, è emerso che alcuni *miRNA* sono significativamente *down-regolati* nei pazienti iponatriemici rispetto agli eunatriemici, in particolare: il miR-147b-3p (espressione media 10.8 vs 92.6, $p\text{-value}=0.025$), miR-147b-5p (2.6 vs 15.9, $p\text{-value}=0.002$), miR-937-3p (3.4 vs 14.6, $p\text{-value}=0.039$), miR-146a-5p (6106.6 vs 16601.4, $p\text{-value}=0.035$). In maniera simile, il miR-539-3p (3.4 vs 14.9, $p\text{-value}=0.083$) ed il miR-625-3p (97.8 vs 308.9, $p\text{-value}=0.061$) mostrano un *trend* di significatività per la *downregolazione*. Un comportamento opposto è stato osservato per il miR-190a-5p (304.2 vs 179.5, $p\text{-value}=0.006$) e miR-32-3p (7 vs 3, $p\text{-value}=0.017$) che sono risultati *up-regolati* negli iponatriemici rispetto al gruppo di riferimento.

4.2.3 Correlazione dei miRNA con gli outcome clinici

È stata effettuata una correlazione tra i *miRNA* tumorali riscontrati e gli *outcome* clinici dei pazienti ed è emerso che l'*upregolazione* del miR-937-3p ($p\text{-value}=0.042$), miR-190a-5p ($p\text{-value}=0.001$) e miR-9-3p ($p\text{-value}=0.035$) è associata ad una peggiore *OS*, mentre l'*upregolazione* del miR-32-3p è correlata ad una migliore *OS* ($p\text{-value}=0.010$) e *RFS* ($p\text{-value}=0.064$).

I risultati ottenuti sono stati recentemente presentati come *poster presentation*⁸² al Congresso 2022 dell'*European Society for Medical Oncology (ESMO)*.

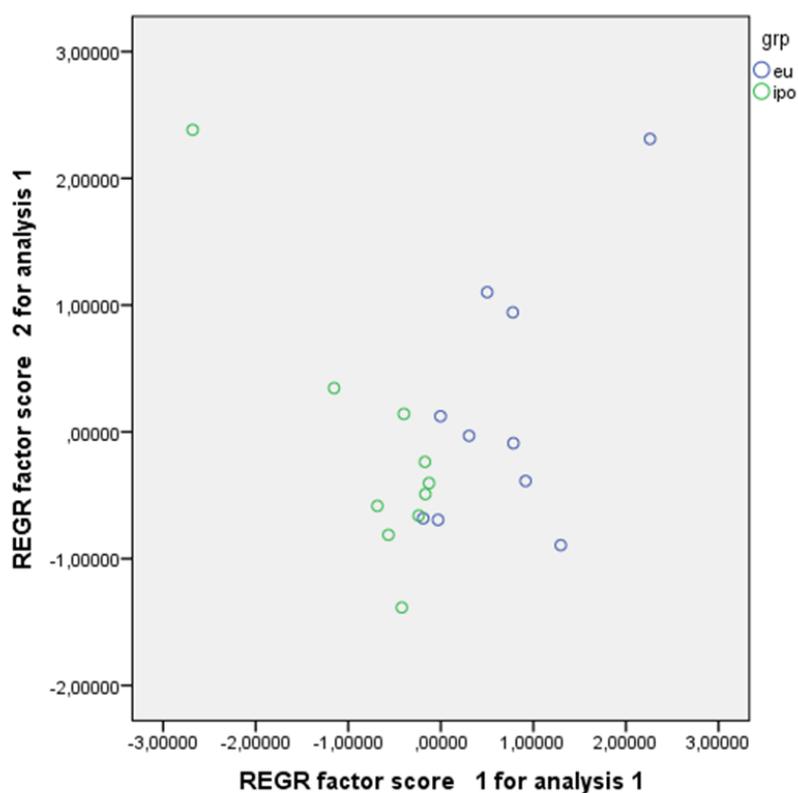


Grafico 4. L'analisi delle componenti principali (ACP) usando *miRs data*. Un' ipotetica linea verticale separa chiaramente i soggetti eunatriemici (a destra) da quelli iponatriemici (a sinistra). Le prime due componenti principali qui rappresentate spiegano circa il 50% del totale della varianza.

4.2.4 Analisi di espressione differenziale tra i campioni peritumorali

Sono stati confrontati anche i campioni della parte sana che circonda il tumore di pazienti iponatriemici ed eunatriemici in termini di espressione differenziale dei *miRNA*. 7 *miRNA* sono emersi come statisticamente significativi con un *pvalue* inferiore a 0.05 e un $\text{Log2FoldChange} > |1.2|$. Di questi, sei sono *upregolati* nei pazienti iponatriemici rispetto agli eunatriemici, mentre uno risulta essere *downregolato*. Tali *miRNA* sono mostrati nella **Tabella 6** e nel **Grafico 5**.

Anche per i 7 *miRNA* differenzialmente espressi tra i campioni peritumorali dei due gruppi sono stati realizzati un *MA Plot*, **Grafico 6**, e una *HeatMap*, **Grafico 7**.

| <i>miRNA</i> | <i>padj</i> | <i>pvalue</i> | <i>log2FoldChange (LFC)</i> |
|--------------|-------------|---------------|-----------------------------|
| miR-4695-3p | 0.000116 | 8.69E-07 | 1.958 |
| miR-1275 | 0.011428 | 0.000192 | 1.550 |
| miR-1260b | 2.65E-05 | 1.49E-07 | 1.477 |
| miR-1260a | 2.65E-05 | 1.37E-07 | 1.418 |
| miR-5100 | 3.64E-06 | 6.81E-09 | 1.365 |
| miR-4454 | 0.001294 | 1.69E-05 | 1.255 |
| miR-6073 | 0.000659 | 6.16E-06 | -1.827 |

Tabella 6. *miRNA* ritrovati differenzialmente espressi tra campioni peritumorali iponatriemici ed eunatriemici applicando un $pvalue < 0.05$ e un $LFC > |1.2|$. La tabella riporta i 7 *miRNA* ritrovati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa dal confronto tra campioni peritumorali iponatriemici ed eunatriemici, con indicati *pvalue* aggiustato, *pvalue* e *LFC*. I *miRNA* riportati nelle caselle arancioni sono quelli *downregolati*, mentre quelli riportati nelle caselle verdi sono quelli *upregolati* rispetto al gruppo di riferimento.

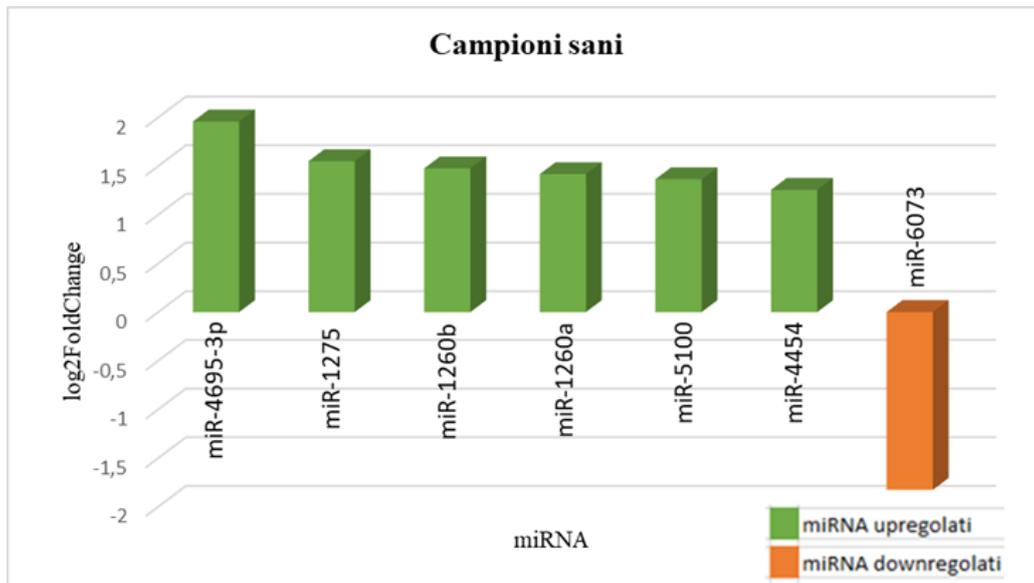


Grafico 5. *miRNA* differenzialmente espressi tra campioni peritumorali iponatriemici ed eunatriemici ($pvalue < 0.05$; $LFC > |1.2|$). Il grafico mette in evidenza l'espressione differenziale dei 7 *miRNA* significativi tra i campioni peritumorali dei due gruppi: nell'ordinata viene riportato il valore del $Log_2FoldChange$, mentre nell'asse delle ascisse sono riportati i *miRNA* identificati. Le colonne arancioni rappresentano i *miRNA* downregolati, mentre quelle verdi i *miRNA* upregolati.

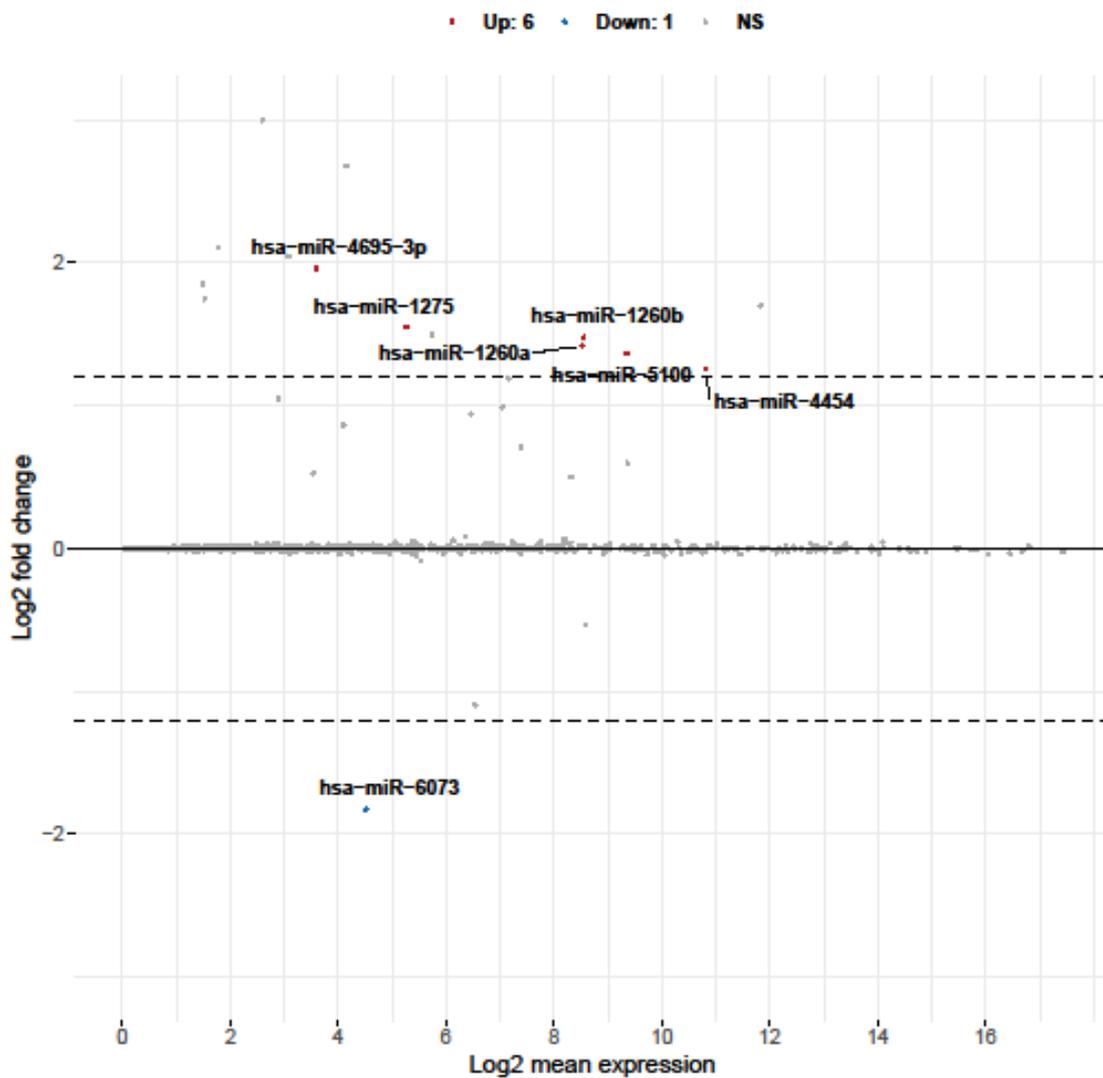


Grafico 6. Visualizzazione con *MA Plot* dei 7 *miRNA* differenzialmente espressi tra campioni peritumorali iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici ($pvalue < 0.05$; $LFC > |1.2|$). Il grafico mette in relazione il *Log2FoldChange* e il logaritmo della media delle conte normalizzate delle due condizioni. I *miRNA* vengono rappresentati come puntini e quelli che passano la soglia da noi impostata vengono colorati in rosso, per quelli *upregolati*, in azzurro per quelli *downregolati*, ed in grigio rimangono quelli non significativi. Nella parte superiore del grafico si vedono i *miRNA upregolati* ($LFC > 0$) e nella parte inferiore quelli *downregolati* ($LFC < 0$), mentre nella parte destra troviamo *miRNA* molto espressi e nella parte sinistra *miRNA* poco espressi.

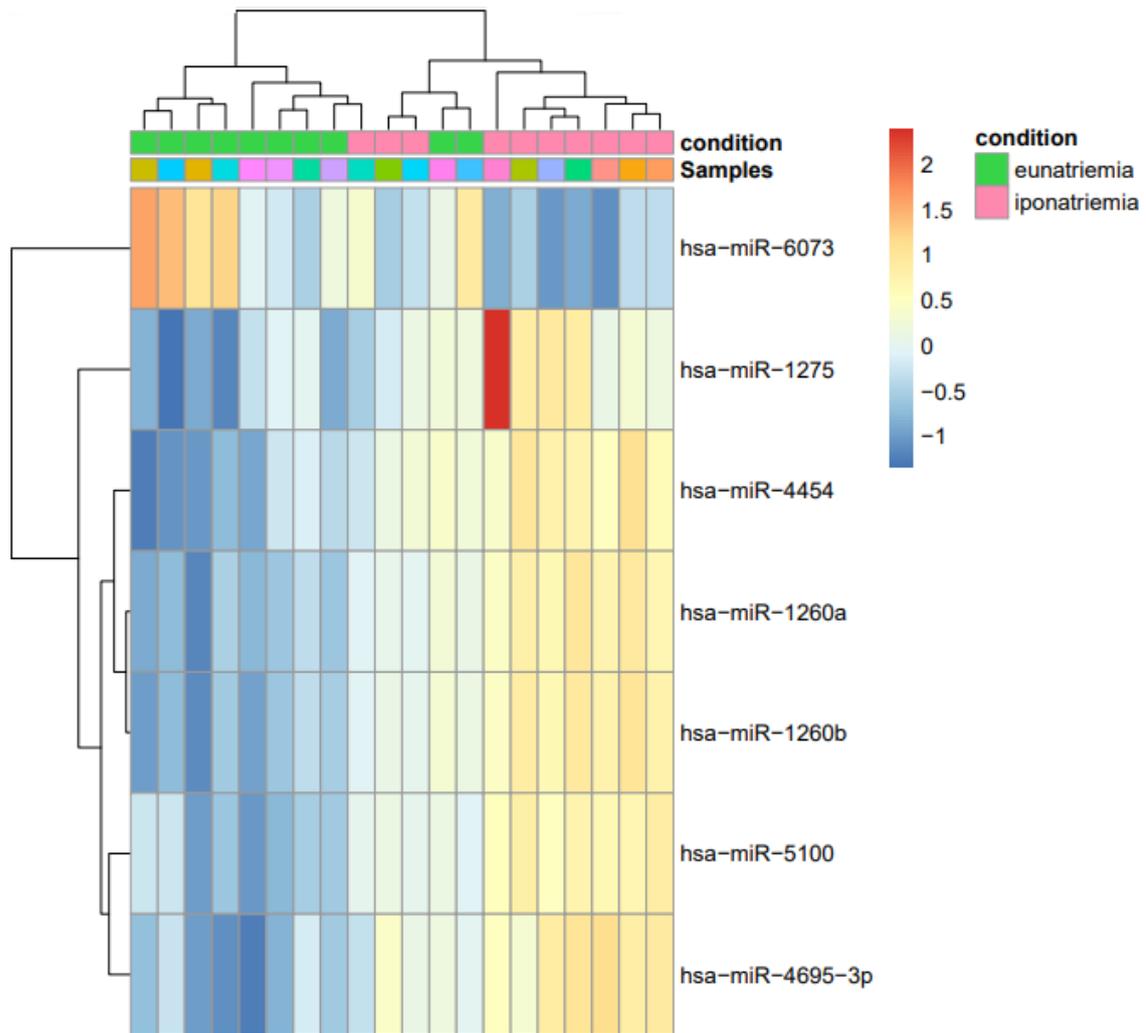


Grafico 7. *HeatMap* per i 7 *miRNA* differenzialmente espressi tra campioni peritumorali iponatriemici ed eunatriemici ($pvalue < 0.05$; $LFC > |1.2|$). La *HeatMap* permette di visualizzare simultaneamente il livello di espressione (rappresentato con una scala cromatica) dei 7 *miRNA* nei diversi campioni. Gli alberi a sinistra mettono in evidenza *cluster* di *miRNA* regolati in modo simile, mentre quelli in alto *cluster* di campioni con profili di espressione simili.

Una volta ottenuti i risultati precedentemente illustrati, anche per i campioni peritumorali è stata effettuata un'analisi multivariata tra i due gruppi di interesse, considerando significativi i *miRNA* con $p-value < 0.05$ (**Grafico 8**).

Da questa, è emerso che tutti i *miRNA* sono significativamente *upregolati* nei

pazienti iponatriemici rispetto agli eunatriemici, in particolare: il miR-1260a (espressione media 375.3 vs 116.2, p -value= 0.00007), miR-1260b (385.8 vs 114.4, p -value= 0.00006), miR-4454 (1794.8 vs 602.1, p -value= 0.0002), miR-4695-3p (12.5 vs 2.4, p -value= 0.0001), miR-5100 (650.7 vs 217.2, p -value= 9.98E-06), eccetto miR-6073 (5.34 vs 23.6, p -value=0.006) che risulta *downregolato*. Inoltre, il miR-1275 (42.7 vs 9.7, p -value=0.081) mostra un *trend* di significatività per la *upregolazione*.

4.2.5 Correlazione dei miRNA con gli outcome clinici

È stata effettuata una correlazione tra i *miRNA* peritumorali e gli *outcome* clinici dei pazienti, considerando come significativi i risultati con un p -value<0.05 e con un *trend* di significatività quelli con un $0.05 < p$ -value<0.10. Da queste analisi è emerso che all'aumentare del miR-1260a aumenta la *PFS1* (sopravvivenza libera da progressione alla prima linea di trattamento) (p -value=0.084) e diminuisce la *PFS2* (sopravvivenza libera da progressione alla seconda linea di trattamento) (p -value=0.082), mentre all'aumentare del miR-1260b è correlata una aumentata *PFS2* (p -value=0.077). L'*upregolazione* del miR-5100 è associata ad una diminuita *RFS* (p -value=0.013), *PFS1* (p -value=0.049), *PFS2* (p -value=0.093) ed *OS* (p -value=0.038). Inoltre, all'aumentare del miR-6073 e miR-4695-3p aumenta la *RFS* (p -value=0.037 e

$p\text{-value}=0.087$, rispettivamente), e l'upregolazione del miR-1275 e miR-4454 è correlata ad una diminuita *PFSI* ($p\text{-value}=0.036$ e $p\text{-value}=0.070$, rispettivamente).

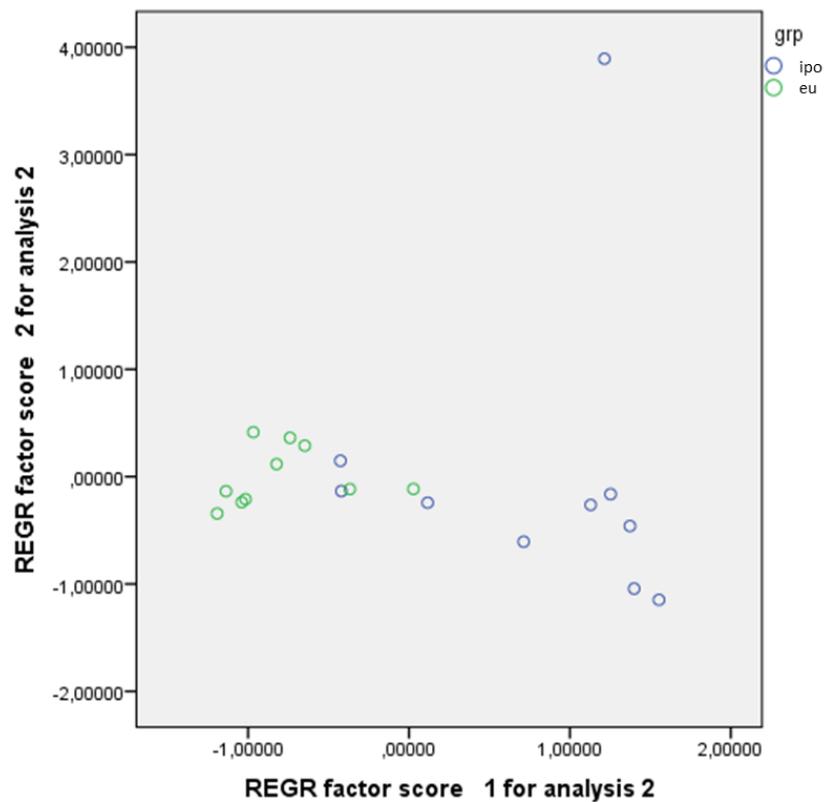


Grafico 8. L'analisi delle componenti principali (ACP) usando *miRs* data. Un' ipotetica linea verticale separa chiaramente i soggetti eunatriemici (a destra) da quelli iponatriemici (a sinistra). Le prime due componenti principali qui rappresentate spiegano circa il 50% del totale della varianza.

4.3 Risultati per lo studio dei miRNA – Fase di validazione

4.3.1 Piastre Custom

Inizialmente, sono state progettate delle piastre *Custom* per poter analizzare simultaneamente l'espressione della *signature* di 19 *miRNA* identificata nella fase di *screening* del nostro studio.

Oltre a questo *set* di *miRNA* (pozzetti A1-D2 e E3-C4 procedendo in verticale), sono stati inseriti anche 4 *miRNA* noti in letteratura per il loro ruolo nello sviluppo tumorale e nell'angiogenesi (miR-21-5p⁸³, miR-126-3p⁸⁴, miR-128-3p^{85,86} e 339-5p⁸⁷), 4 possibili normalizzatori (miR-16-5p, miR-191-5p, miR-103a-3p, miR-30e-5p), 5 *Spike-in*, utili sia, come accennato precedentemente, a monitorare l'efficienza del *workflow* laboratoristico, sia come potenziali normalizzatori per le variabili tecniche, ed 1 *interplate calibrator* (*IPC*). Questo pannello, rappresentato nella **Figura 8**, permette di analizzare tre campioni contemporaneamente utilizzando delle piastre da 96 pozzetti contenenti dei *primer* a *LNA*, relativi a ciascun *miRNA*, pre-aliquotati dalla ditta *Qiagen*.

| | 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 | 5100 | hsa-miR-147b-5p | hsa-miR-146a-5p | hsa-miR-191-5p | 5100 | hsa-miR-147b-5p | hsa-miR-146a-5p | hsa-miR-191-5p | 5100 |
| C | hsa-miR-539-3p | hsa-miR-190a-5p | hsa-miR-103a-3p | 6073 | hsa-miR-539-3p | hsa-miR-190a-5p | hsa-miR-103-3p | 6073 | hsa-miR-539-3p | hsa-miR-190a-5p | hsa-miR-103a-3p | 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 (IPC) | hsa-miR-122-5p | hsa-miR-339-5p | hsa-miR-4454 | Unisp3 (IPC) | hsa-miR-122-5p | hsa-miR-339-5p | hsa-miR-4454 | Unisp3 (IPC) |

Figura 8. Piastra Custom. In figura è rappresentata schematicamente la piastra progettata per la nostra fase di validazione. Ogni colore evidenzia i *target* testati per un campione.

Il pozzetto contenete l'*IPC* consiste in un *DNA* template pre-aliquotato e una coppia di *primer* per l'amplificazione dello stampo ed è essenziale per confrontare le diverse piastre analizzate, poiché fornisce un risultato che è indipendente dalla qualità del *cDNA* e dunque dovrebbe essere poco variabile se non vi è la presenza di eventuali inibitori di *PCR*.

Tutti i *target* testati sono riportati nella seguente **Tabella 7** con la loro sequenza matura, ricavata da *miRBase* (www.mirbase.org):

| <i>miRNA</i> | Posizione | Sequenza matura |
|-----------------|-----------|-------------------------|
| hsa-miR-147b-3p | A1 | GUGUGCGGAAAUGCUUCUGCU |
| hsa-miR-147b-5p | B1 | UGGAAACAUUUCUGCACAAACU |
| hsa-miR-539-3p | C1 | AUCAUACAAGGACAAUUUCUUU |
| hsa-miR-625-3p | D1 | GACUAUAGAACUUUCCCCUCA |
| hsa-miR-9-3p | E1 | AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU |
| hsa-miR-9-5p | F1 | UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA |
| hsa-miR-937-3p | G1 | AUCCGCGCUCUGACUCUCUGCC |
| hsa-miR-122-5p | H1 | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG |
| hsa-miR-432-5p | A2 | UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG |
| hsa-miR-146a-5p | B2 | UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU |
| hsa-miR-190a-5p | C2 | UGAUUUGUUUGAUUAUUAUAGGU |
| hsa-miR-32-3p | D2 | CAUUUAGUGUGUGUGAUUUU |
| hsa-miR-21-5p | E2 | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA |
| hsa-miR126-3p | F2 | UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG |
| hsa-miR-128-3p | G2 | UCACAGUGAACCGGUCUCUUU |
| hsa-miR-339-5p | H2 | UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG |
| hsa-miR-16-5p | A3 | UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG |
| hsa-miR-191-5p | B3 | CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG |
| hsa-miR-103a-3p | C3 | AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA |
| hsa-miR-30e-5p | D3 | UGUAAACAUCUUGACUGGAAG |
| hsa-miR-1260a | E3 | AUCCCACCUCUGCCACCA |
| hsa-miR-1260b | F3 | AUCCCACCACUGCCACCAU |
| hsa-miR-1275 | G3 | GUGGGGGAGAGGCUGUC |
| hsa-miR-4454 | H3 | GGAUCCGAGUCACGGCACCA |
| hsa-miR-4695-3p | A4 | UGAUCUCACCGCUGCCUCCUUC |
| hsa-miR-5100 | B4 | UUCAGAUCCAGCGGUGCCUCU |
| hsa-miR-6073 | C4 | GGUAGUGAGUUAUCAGCUAC |
| <i>Unisp2</i> | D4 | |
| <i>Unisp4</i> | E4 | |
| <i>Unisp5</i> | F4 | |
| <i>Unisp6</i> | G4 | |
| <i>IPC</i> | H4 | |

Tabella 7. Target analizzati per ciascun campione. Per ciascun *target* preso in esame, la tabella riporta la posizione nella *Custom* e per i *miRNA* viene riportata anche la sequenza matura ricavata dalla banca dati *miRBase*.

4.3.2 Controllo qualità del workflow laboratoristico

Per effettuare un controllo della qualità della procedura di estrazione e della reazione di retrotrascrizione e per calcolare il *miR-ratio* relativo ai campioni in esame è stata effettuata una *PCR* quantitativa (*qPCR*) analizzando i *target Unisp2, Unisp6, miR-23a-3p e miR-451a*.

La *PCR* quantitativa o *Real-Time PCR* è una tecnica che consente di amplificare il *DNA* e simultaneamente rilevarne l'amplificazione con diversi metodi. Nel nostro caso si è utilizzato il *SYBR Green*, un colorante fluorescente che s'intercala al *DNA* quando è presente come doppio filamento. Al termine della reazione, lo strumento *Real-Time* restituisce un grafico che mette in relazione l'intensità di fluorescenza in termini di ΔRn (asse Y) e il numero di cicli di amplificazione (asse X). L'*Rn* viene calcolato normalizzando l'intensità di fluorescenza del *SYBR Green* con la fluorescenza emessa dal colorante passivo *ROX*, il cui segnale dovrebbe restare costante nel tempo. Le curve di amplificazione ottenute devono poter essere confrontate tra loro e a tale scopo è stata definita una linea di soglia (*threshold*) che, intercettando le curve, permette di determinare il numero di cicli (*Ct*) necessari affinché la fluorescenza emessa incontri la soglia. Per i *target Unisp2 e Unisp6* la soglia è stata fissata a 0.200, mentre per i *target miR-23a-3p e miR-451a* è stata impostata automaticamente con il *software* di analisi, per ottenere risultati più accurati.

L'*Unisp2* è un oligonucleotide sintetico presente all'interno dello *Spike-in mix*, aggiunto in quantità fissa durante l'estrazione, ed è stato utilizzato per monitorare la qualità della procedura di estrazione dell'*RNA* totale, in quanto i valori di *Ct* registrati per tale *target* dovrebbero variare entro un *range* fisso, nel nostro caso tra 18 e 21. Per i campioni in esame è stato verificato che i valori di *Ct* relativi all'*Unisp2* ricadessero in tale intervallo; un esempio è riportato in **Figura 9**.

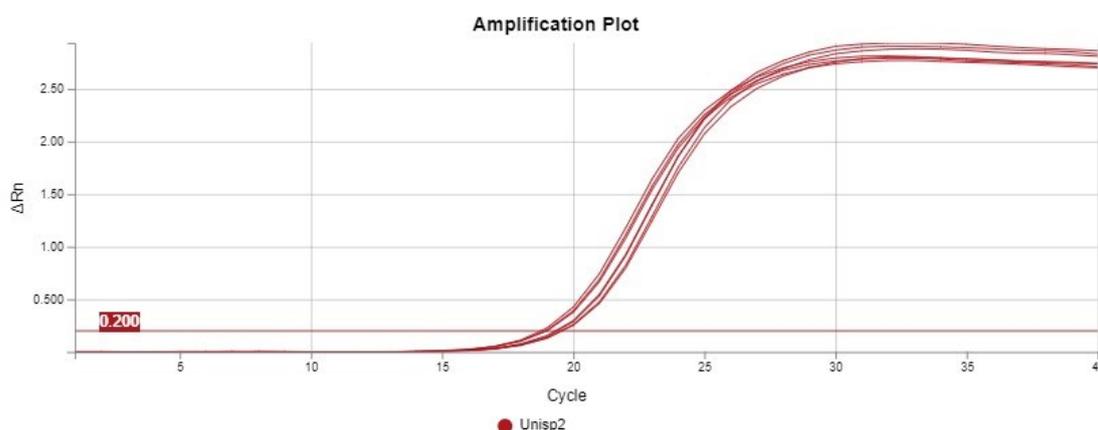


Figura 9. Curve di amplificazione per il *target Unisp2*. In rosso sono rappresentate le curve di amplificazione di alcuni campioni relative al *target Unisp2*, che incontrano la linea di *threshold* (0.200) nel *range* 18-20 *Ct*.

Alcuni campioni hanno mostrato dei valori superiori a 21, pertanto si è deciso di ripeterne l'estrazione, per escludere eventuali errori durante la procedura.

Per verificare l'efficienza della sintesi del *cDNA* è stato utilizzato l'oligonucleotide sintetico *Unisp6*, aggiunto in quantità *standard* alla reazione di *RT*. Tale *target* dovrebbe mostrare dei valori di *Ct* compresi tra 18.5 e 20.5 per tutti i campioni e per il controllo negativo di retrotrascrizione, per cui se i risultati ottenuti sono più alti della soglia di 20.5 è opportuno ripetere la reazione perché si ipotizza non sia andata a buon fine. Per i campioni testati ci si è assicurati che i *Ct* relativi all'*Unisp6* ricadessero nel *range* indicato; un esempio è mostrato in **Figura 10**.

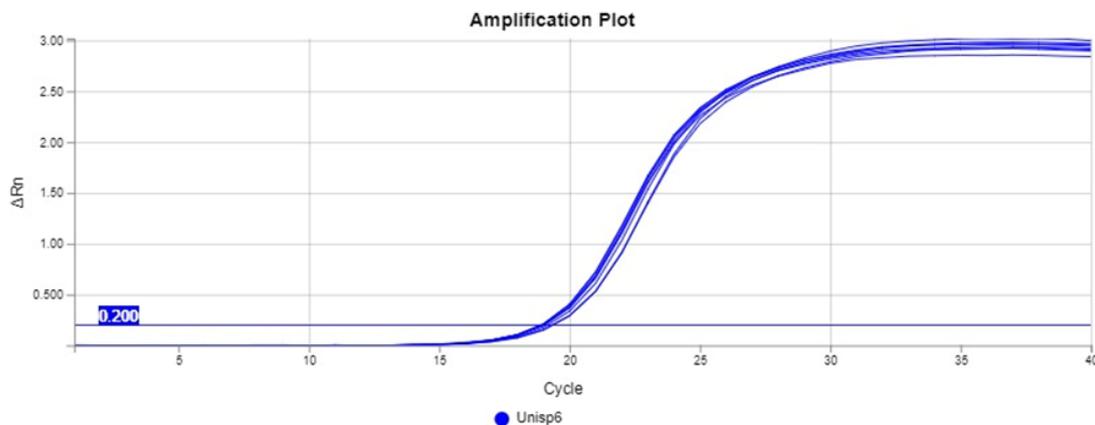


Figura 10. Curve di amplificazione per il *target Unisp6*. In blu osserviamo le curve di amplificazione di alcuni campioni per il *target Unisp6*, che incontrano la linea di *threshold* (0.200) nel range 18.5-20.5 *Ct*.

L'ulteriore analisi di controllo della qualità riguarda il grado di emolisi dei campioni plasmatici. L'emolisi, ovvero la rottura degli eritrociti, è un fenomeno che può interessare i campioni di sangue dal momento della

raccolta fino al momento in cui il plasma viene separato dalle restanti componenti, e che influenza notevolmente la qualità delle analisi a valle, poiché il rilascio dei *miRNA* contenuti all'interno degli eritrociti può alterare il profilo dei *miRNA* circolanti. Per tali motivazioni, è opportuno cercare di valutare il grado di emolisi dei campioni oggetto di studio e un metodo efficiente prevede di prendere in considerazione un *miRNA* noto per essere arricchito negli eritrociti, il miR-451a, in relazione a un *miRNA* ritrovato relativamente stabile nei campioni plasmatici e non influenzato dall'emolisi, il miR-23a-3p. Studi precedenti hanno osservato che un delta *Ct* (miR-23a-3p - miR-451a), detto anche "*miR-ratio*", superiore a 7-8 indica un elevato rischio di emolisi⁸⁸. Sono dunque stati testati tutti i campioni per il miR-23a-3p e il miR-451a (un esempio è riportato in **Figura 11**) e quelli che hanno mostrato un delta *Ct* tra questi *target* superiore a 7 sono stati esclusi dall'analisi.

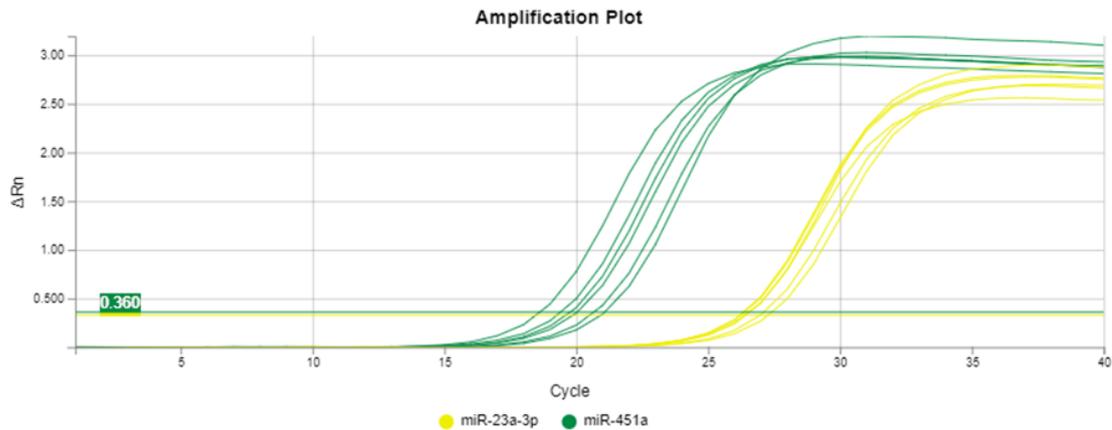


Figura 11. Curve di amplificazione per miR-23a-3p e miR-451a. Per alcuni campioni presi come esempio, sono rappresentate le curve di amplificazione relative al *target* miR-23a-3p (in giallo) e al miR-451a (in verde). La linea di *threshold* (0.360) è stata settata in maniera automatica.

Come verifica aggiuntiva, è stata condotta anche una valutazione della colorazione dei campioni plasmatici a livello visivo ed è stato osservato che la maggior parte dei campioni esclusi mostrava effettivamente un colore scuro, tendente all'arancio o al rosso.

Infine, il controllo negativo di retrotrascrizione è stato sottoposto, come ulteriore valutazione della qualità, ad analisi per i *target Unisp6*, miR-451a e miR-23a-3p ed è stato verificato che i *Ct* relativi all'*Unisp6* ricadessero nei *range* riportati sopra e che per gli altri *target* non ci fosse segnale di fluorescenza, come atteso, in quanto il controllo contiene acqua *nuclease-free*.

Anche l'acqua *nuclease-free* utilizzata per la reazione di amplificazione è stata testata come *NTC (No Template Control)* per i *target* miR-451a e miR-

23a-3p, al fine di escludere ogni possibile contaminazione, e non si è rilevata fluorescenza.

4.3.3 Risultati dell'analisi del profilo di espressione del set di miRNA

L'espressione del *set* di *miRNA* preso in esame è stata valutata mediante *PCR* quantitativa (*qPCR*), testando ciascun campione per tutti i *target* d'interesse.

Attualmente la fase di validazione è in corso su campioni al *baseline*.

Un esempio delle fluorescenze ottenute dall'analisi di una piastra *Custom* è riportato nella **Figura 12**.

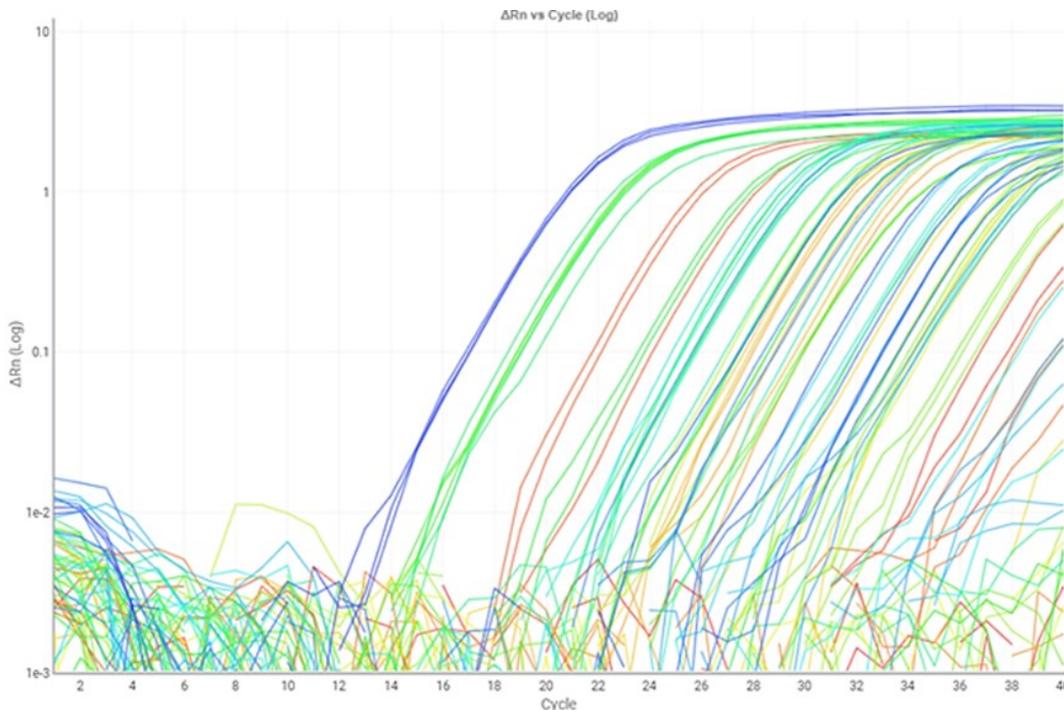


Figura 12. Curve di amplificazione per tutti i *target*. In figura sono riportate le curve di amplificazione relative a tutti i *miRNA* in esame per tre dei campioni analizzati.

Dopo aver effettuato le corse per i campioni analizzati fino ad ora, con un'analisi multipiastra la linea di *threshold* è stata settata automaticamente per ciascun *target* utilizzando il *software* di analisi. Le soglie ottenute sono riportate nella **Tabella 8**.

| <i>miRNA</i> | <i>Threshold</i> |
|---------------|------------------|
| miR-103a-3p | 0.132 |
| miR-122-5p | 0.168 |
| miR-126-3p | 0.15 |
| miR-1260a | 0.137 |
| miR-1260b | 0.162 |
| miR-1275 | 0.04 |
| miR-128-3p | 0.115 |
| miR-146a-5p | 0.132 |
| miR-147b-3p | 0.105 |
| miR-147b-5p | 0.194 |
| miR-16-5p | 0.137 |
| miR-190a-5p | 0.105 |
| miR-191-5p | 0.166 |
| miR-21-5p | 0.138 |
| miR-30a-5p | 0.099 |
| miR-32-3p | 0.111 |
| miR-339-5p | 0.074 |
| miR-432-5p | 0.086 |
| miR-4454 | 0.113 |
| miR-4695-3p | 0.049 |
| miR-5100 | 0.07 |
| miR-539-3p | 0.109 |
| miR-6073 | 0.087 |
| miR-6253p | 0.087 |
| miR-9-3p | 0.106 |
| miR-9-5p | 0.077 |
| miR-937-3p | 0.04 |
| <i>IPC</i> | 0.178 |
| <i>Unisp2</i> | 0.146 |
| <i>Unisp4</i> | 0.155 |
| <i>Unisp5</i> | 0.106 |
| <i>Unisp6</i> | 0.11 |

Tabella 8. *Threshold* ottenute per ogni *target*.

A questo punto è stata calcolata, per ogni piastra, la deviazione *standard* tra i valori di *Ct* relativi ai replicati dell'*interplate calibrator (IPC)* ed è stato verificato che risultasse pari o inferiore a 0.500, come raccomandato nell'*handbook* del *kit* di amplificazione della *Qiagen*.

In seguito, le piastre in esame sono state calibrate: per ognuna, a tutti i valori di *Ct* ottenuti è stato sottratto il “*calibration factor*”, che viene calcolato come differenza fra la media dei *Ct* ottenuti per gli *IPC* di ogni piastra e la media dei *Ct* ottenuti per gli *IPC* di tutte le piastre ($IPC_{plate} - IPC_{overall} = calibration\ factor$).

Inoltre, sono stati presi in considerazione i *target Unisp2, Unisp4 e Unisp5*. Questi oligonucleotidi sintetici sono, come detto, contenuti all'interno dell'*RNA Spike-in mix* utilizzato nella procedura di estrazione: l'*Unisp2* è presente in concentrazione 100 volte maggiore rispetto all'*Unisp4*, che a sua volta ha una concentrazione 100 volte superiore a quella dell'*Unisp5*. Pertanto, l'*Unisp2* dovrebbe essere amplificato allo stesso livello di *miRNA* presenti abbondantemente nel campione, mentre l'*Unisp5* dovrebbe corrispondere a *miRNA* poco espressi nel campione. Di conseguenza, come riportato nell'*handbook* del *kit* stesso, la differenza tra i valori di *Ct* ottenuti per l'*Unisp4* e quelli ottenuti per l'*Unisp2* dovrebbe essere di circa 6-7 e anche quella fra i *Ct* relativi all'*Unisp5* e all'*Unisp2* dovrebbe essere approssimativamente di 6-7. Nella nostra analisi, è stato calcolato il delta *Ct*

fra *Unisp4* e *Unisp2* ed è risultato ricadere in un *range* di 5.9-7.2, quindi non sono state riscontrate problematiche.

In merito agli altri *target*, i *miRNA* che hanno mostrato una fluorescenza tardiva, per cui sono stati ottenuti *Ct* pari o superiori al valore di 35, sono stati esclusi dall'analisi per cui anche l'*Unisp5*, rientrando in questa casistica, non è stato preso in considerazione.

4.4 Risultati dell'analisi SNP

L'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide è stata effettuata a partire da campioni di sangue intero di 98 pazienti arruolati in fase prospettica.

Mediante analisi spettrofotometrica è stato verificato che il *DNA* estratto da tali campioni avesse una purezza nel *range* 1.8-2 (considerata ottimale per il *DNA*). Una volta effettuato questo controllo, per tutti i campioni di *DNA* è stata condotta un'analisi *end-point* di 16 *SNP*.

I polimorfismi in esame coinvolgono i geni *AVP* e *AVPRIA*^{89,90} e i geni *HIF-1 α* , *VEGF-A*, *VEGFR-2* e *VEGFR-3*, in quanto si vuole investigare il possibile ruolo dell'angiogenesi nell'iponatremia^{91,92}. Gli *SNP* selezionati sono riportati nella **Tabella 9**, insieme ad alcune caratteristiche ricavate dalla loro ricerca all'interno del *database Ensembl*:

| SNP | GENE | LOCALIZZAZIONE | TIPO VARIANTE |
|------------|----------------|-----------------------|---------------|
| rs2282018 | AVP | Cromosoma 20:3084303 | Intronica |
| rs7308855 | AVPR1A | Cromosoma 12:63154276 | Intergenica |
| rs11174811 | AVPR1A | Cromosoma 12:63146696 | 3'-UTR |
| rs2057482 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61747130 | 3'-UTR |
| rs1951795 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61704708 | Intronica |
| rs2301113 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61739830 | Intronica |
| rs10873142 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61736744 | Intronica |
| rs11158358 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61732236 | Intronica |
| rs12434438 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61730580 | Intronica |
| rs11549465 | HIF-1 α | Cromosoma 14:61740839 | Missenso |
| rs2010963 | VEGF-A | Cromosoma 6:43770613 | 5'-UTR |
| rs699947 | VEGF-A | Cromosoma 6:43768652 | Intergenica |
| rs2305948 | VEGFR-2 | Cromosoma 4:55113391 | Missenso |
| rs1870377 | VEGFR-2 | Cromosoma 4:55106807 | Missenso |
| rs307826 | VEGFR-3 | Cromosoma 5:180624003 | Missenso |
| rs307821 | VEGFR-3 | Cromosoma 5:180603314 | Missenso |

Tabella 9. I 16 SNP analizzati. Nella tabella troviamo gli *SNP* analizzati: per ognuno sono indicati il gene di appartenenza, la localizzazione cromosomica e la tipologia di variante.

L'analisi dei polimorfismi è stata effettuata utilizzando saggi *Taqman*. Ciacun saggio *TaqMan* contiene i *primer* necessari per l'amplificazione della sequenza d'interesse (ovvero quella che circonda il sito dello *SNP*) e due tipologie di sonda. Ogni sonda è coniugata ad un *quencher* non fluorescente e ad uno specifico *reporter* fluorescente (*VIC* o *FAM*), ed è in grado di riconoscere una delle due varianti alleliche dello *SNP* in esame (Allele 1 e Allele 2).

Durante la reazione di amplificazione, in fase di *annealing*, la sonda si appaia alla sequenza d'interesse e il *quencher*, vista la sua vicinanza al *reporter*, ne spegne la fluorescenza. Man mano che la polimerasi avanza sul *DNA*, la sua attività 5'-3' esonucleasica determina il clivaggio della sonda e di conseguenza l'allontanamento del *quencher* dal *reporter*, che a questo punto emetterà la fluorescenza specifica, come mostrato in **Figura 13**.

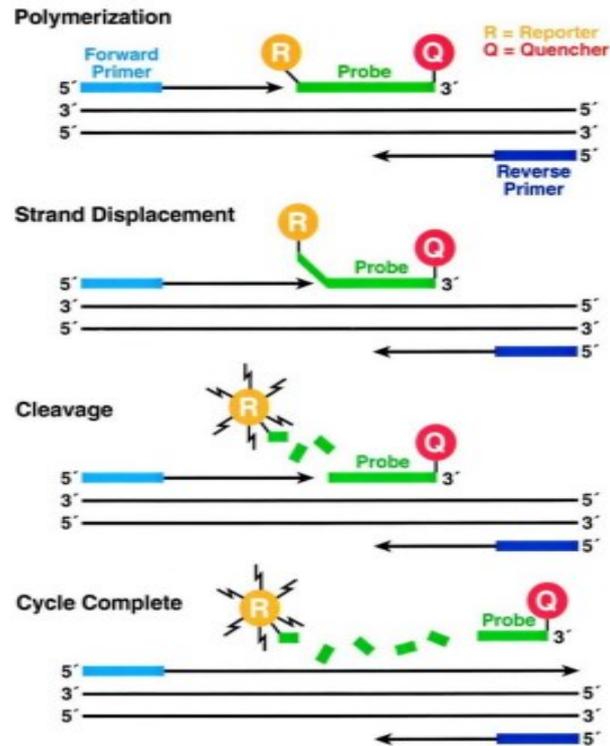


Figura 13. Rilevazione con sonde *TaqMan*. In fase di allungamento, la polimerasi raggiunge la sonda e ne determina il clivaggio: il *reporter* si allontana dal *quencher* ed emette la fluorescenza specifica.

Come raccomandato dalla *TaqMan SNP Genotyping Assay User Guide*, sono state condotte una fase di *pre-read* e una fase di *post-read*, della durata di 1 minuto ciascuna, che rispettivamente precedono e seguono l'amplificazione vera e propria. Durante il *pre-read* viene misurata la fluorescenza di base per ogni pozzetto della piastra di analisi, la quale verrà sottratta alla fluorescenza registrata in fase di *post-read*. In quest'ultima fase, per ogni pozzetto il segnale del *reporter* viene normalizzato con quello misurato per *ROX*, utilizzato come riferimento.

Al termine della corsa, viene restituito un *Allelic Discrimination Plot*, ovvero un grafico in cui sull'asse X è riportata la fluorescenza emessa dal colorante *VIC*, corrispondente all'Allele 1, mentre sull'asse Y la fluorescenza relativa al colorante *FAM*, corrispondente all'Allele 2. Nel *Plot*, ogni campione è rappresentato come un punto e, se sono presenti tutte e tre le combinazioni genotipiche nella nostra popolazione, vengono osservati tre *cluster* di punti: uno corrispondente ai campioni omozigoti per l'Allele 1 (che hanno elevata fluorescenza per *VIC*, ma bassa per *FAM*), uno che rappresenta i campioni omozigoti per l'Allele 2 (elevata fluorescenza per *FAM* e bassa per *VIC*) e uno relativo ai campioni eterozigoti (livelli di fluorescenza paragonabili).

I campioni con risultato indeterminato vengono rappresentati con una X: nelle nostre analisi non sono stati ottenuti tali risultati.

Per ogni piastra di analisi sono state testate come controlli negativi (*NTC*) l'acqua utilizzata per la reazione di amplificazione e quella utilizzata per le diluizioni del *DNA*, ottenendo in tutti i casi una fluorescenza prossima allo zero, dimostrando l'assenza di contaminazione.

Un esempio di risultato, relativo all'analisi dell'rs2282018 per tutti i campioni in esame è riportato nella **Figura 14**.

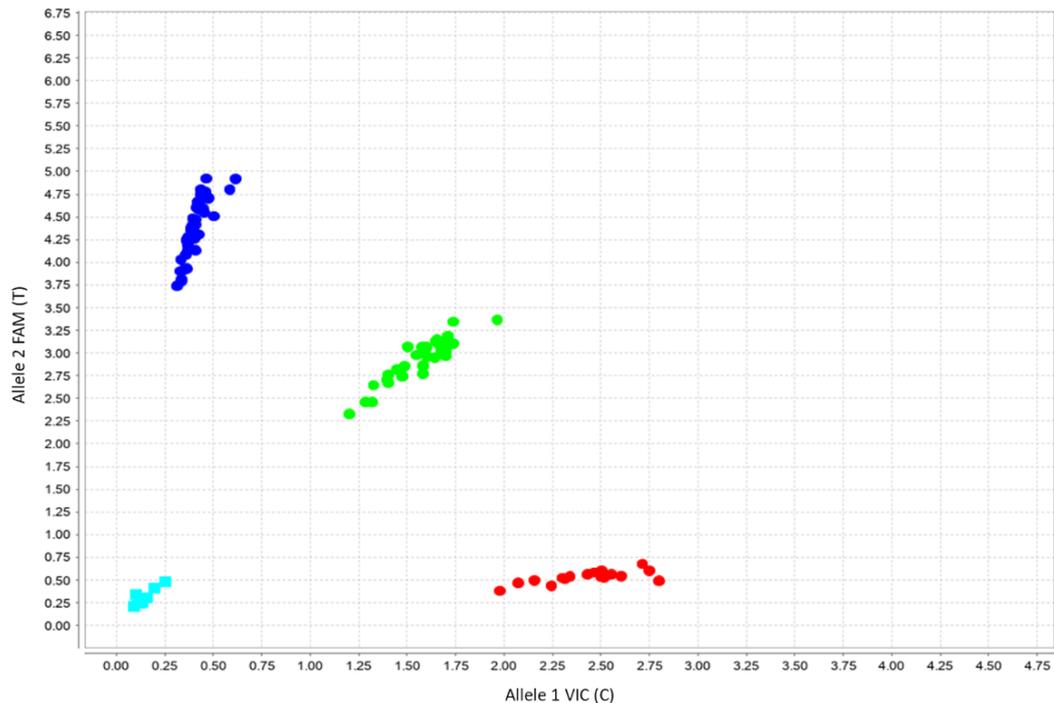


Figura 14. Plot di discriminazione allelica rs2282018. In figura, il risultato dell'analisi dell'rs2282018 per tutti i 98 campioni. L'allele C è rilevato dalla sonda con *reporter VIC*, l'allele T dalla sonda con *reporter FAM*. In blu si osserva il *cluster* degli omozigoti per l'allele T, in verde il *cluster* degli eterozigoti e in rosso il *cluster* degli omozigoti per l'allele C. In azzurro sono rappresentati gli *NTC*.

Pur trattandosi di un'analisi puramente qualitativa, questa è stata comunque condotta in *Real-Time* per valutare l'accuratezza delle chiamate genotipiche, osservando l'andamento delle fluorescenze nel corso dell'amplificazione mediante *Multicomponent Plot*.

I risultati possono essere visualizzati anche come chiamate genotipiche. Da questi risultati, per ogni polimorfismo, sono state calcolate le conte e le frequenze genotipiche relative alla nostra coorte di studio, che sono state poi confrontate con quelle presenti all'interno del *database Ensembl* per le

popolazioni *CEU* e *TSI*. I dati e i confronti di cui sopra sono riportati nella

Tabella 10.

Sono state ricavate per la nostra popolazione anche le conte e le frequenze alleliche ed è stato effettuato lo stesso confronto con i dati presenti all'interno di *Ensembl*. I risultati sono riportati nella **Tabella 11.**

| | | Coorte Di Studio | Coorte Di Studio | Popolazione Generale CEU | Popolazione Generale CEU | Popolazione Generale TSI | Popolazione Generale TSI |
|------------|----------|------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SNP | Genotipi | Conta Genotipica | Freq. Genotipica % | Conta Genotipica | Freq. Genotipica % | Conta Genotipica | Freq. Genotipica % |
| rs2282018 | T/T | 43 | 43.9 | 33 | 33.3 | 38 | 35.5 |
| | C/C | 18 | 18.3 | 17 | 17.2 | 24 | 22.4 |
| | C/T | 37 | 38.8 | 49 | 49.5 | 45 | 42.1 |
| rs7308855 | T/T | 0 | 0 | 1 | 1.0 | 0 | 0 |
| | C/C | 82 | 83.7 | 83 | 83.8 | 94 | 87.9 |
| | C/T | 16 | 16.3 | 15 | 15.2 | 13 | 12.1 |
| rs11174811 | A/A | 0 | 0 | 2 | 2.0 | 0 | 0 |
| | C/C | 74 | 75.5 | 78 | 78.8 | 82 | 76.6 |
| | C/A | 24 | 24.5 | 19 | 19.2 | 25 | 23.4 |
| rs2057482 | T/T | 4 | 4.1 | 1 | 1.0 | 7 | 6.5 |
| | C/C | 60 | 61.2 | 80 | 80.8 | 65 | 60.8 |
| | C/T | 34 | 34.7 | 18 | 18.2 | 35 | 32.7 |
| rs1951795 | A/A | 4 | 4.1 | 2 | 2.0 | 12 | 11.2 |
| | C/C | 53 | 54.1 | 74 | 74.8 | 48 | 44.9 |
| | C/A | 41 | 41.8 | 23 | 23.2 | 47 | 43.9 |
| rs2301113 | A/A | 50 | 51.0 | 65 | 65.7 | 45 | 42.1 |
| | C/C | 8 | 8.2 | 2 | 2.0 | 12 | 11.2 |
| | C/A | 40 | 40.8 | 32 | 32.3 | 50 | 46.7 |
| rs10873142 | T/T | 53 | 54.1 | 74 | 74.8 | 48 | 44.9 |
| | C/C | 4 | 4.1 | 2 | 2.0 | 12 | 11.2 |
| | C/T | 41 | 41.8 | 23 | 23.2 | 47 | 43.9 |
| rs11158358 | C/G | 40 | 40.8 | 22 | 22.2 | 46 | 43 |
| | C/C | 53 | 54.1 | 76 | 76.8 | 54 | 50.5 |
| | G/G | 5 | 5.1 | 1 | 1.0 | 7 | 6.5 |
| rs12434438 | A/G | 45 | 45.9 | 26 | 26.3 | 52 | 48.6 |
| | G/G | 7 | 7.1 | 3 | 3.0 | 15 | 14.0 |
| | A/A | 46 | 47.0 | 70 | 70.7 | 40 | 37.4 |
| rs11549465 | T/T | 2 | 2.0 | 0 | 0 | 5 | 4.7 |
| | C/C | 72 | 73.5 | 86 | 86.9 | 72 | 67.3 |
| | C/T | 24 | 24.5 | 13 | 13.1 | 30 | 28.0 |
| rs2010963 | C/G | 47 | 48.0 | 45 | 45.5 | 45 | 42.1 |
| | C/C | 15 | 15.3 | 10 | 10.1 | 15 | 14.0 |
| | G/G | 36 | 36.7 | 44 | 44.4 | 47 | 43.9 |
| rs699947 | A/A | 16 | 16.3 | 20 | 20.2 | 30 | 28.0 |
| | C/C | 26 | 26.5 | 29 | 29.3 | 28 | 26.2 |
| | C/A | 56 | 57.2 | 50 | 50.5 | 49 | 45.8 |
| rs2305948 | T/T | 2 | 2.0 | 0 | 0 | 1 | 1.0 |
| | C/C | 82 | 83.7 | 81 | 81.8 | 87 | 81.3 |
| | C/T | 14 | 14.3 | 18 | 18.2 | 19 | 17.7 |
| rs1870377 | T/T | 58 | 59.2 | 56 | 56.6 | 71 | 66.3 |
| | A/T | 35 | 35.7 | 36 | 36.4 | 34 | 31.8 |
| | A/A | 5 | 5.1 | 7 | 7.0 | 2 | 1.9 |
| rs307826 | T/T | 74 | 75.5 | 81 | 81.8 | 82 | 76.6 |
| | C/C | 3 | 3.1 | 1 | 1.0 | 0 | 0 |
| | C/T | 21 | 21.4 | 17 | 17.2 | 25 | 23.4 |
| rs307821 | A/A | 0 | 0 | 235 | 0.6 | | |
| | C/C | 79 | 80.6 | 33024 | 84.5 | | |
| | * | C/A | 19 | 19.4 | 5823 | 14.9 | |

Tabella 10. Frequenze genotipiche a confronto. Nella tabella sono riportate, per ogni SNP in esame, le conte genotipiche e le corrispondenti frequenze genotipiche in percentuale, sia in riferimento alla coorte di studio che alle popolazioni CEU e TSI, i cui dati sono stati ricavati dalla banca dati *Ensembl*. *Per lo SNP rs307821, le frequenze relative alla popolazione generale non sono riferite alla CEU ma alla popolazione Europea e sono state ricavate dalle frequenze alleliche presenti su *Refseq*.

| | | Coorte Di Studio | Coorte Di Studio | Popolazione Generale CEU | Popolazione Generale CEU | Popolazione Generale TSI | Popolazione Generale TSI |
|------------|--------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SNP | Alleli | Conta Allelica | Freq. Allelica % | Conta Allelica | Freq. Allelica % | Conta Allelica | Freq. Allelica % |
| rs2282018 | T | 123 | 62.7 | 115 | 58.1 | 121 | 56.5 |
| | C | 73 | 37.3 | 83 | 41.9 | 93 | 43.5 |
| rs7308855 | T | 16 | 8.2 | 17 | 8.6 | 13 | 6.1 |
| | C | 180 | 91.8 | 181 | 91.4 | 201 | 93.9 |
| rs11174811 | A | 24 | 12.2 | 23 | 11.6 | 25 | 11.7 |
| | C | 172 | 87.8 | 175 | 88.4 | 189 | 88.3 |
| rs2057482 | T | 42 | 21.4 | 20 | 10.1 | 49 | 22.9 |
| | C | 154 | 78.6 | 178 | 89.9 | 165 | 77.1 |
| rs1951795 | A | 49 | 25.0 | 27 | 13.6 | 71 | 33.2 |
| | C | 147 | 75.0 | 171 | 86.4 | 143 | 66.8 |
| rs2301113 | A | 140 | 71.4 | 162 | 81.8 | 140 | 65.4 |
| | C | 56 | 28.6 | 36 | 18.2 | 74 | 34.6 |
| rs10873142 | T | 147 | 75.0 | 171 | 86.4 | 143 | 66.8 |
| | C | 49 | 25.0 | 27 | 13.6 | 71 | 33.2 |
| rs11158358 | C | 146 | 74.5 | 174 | 87.9 | 154 | 72.0 |
| | G | 50 | 25.5 | 24 | 12.1 | 60 | 28.0 |
| rs12434438 | A | 137 | 69.9 | 166 | 83.8 | 132 | 61.7 |
| | G | 59 | 30.1 | 32 | 16.2 | 82 | 38.3 |
| rs11549465 | T | 28 | 14.3 | 13 | 6.6 | 40 | 18.7 |
| | C | 168 | 85.7 | 185 | 93.4 | 174 | 81.3 |
| rs2010963 | C | 77 | 39.3 | 65 | 32.8 | 75 | 35.0 |
| | G | 119 | 60.7 | 133 | 67.2 | 139 | 65.0 |
| rs699947 | A | 88 | 44.9 | 90 | 45.5 | 109 | 50.9 |
| | C | 108 | 55.1 | 108 | 54.5 | 105 | 49.1 |
| rs2305948 | T | 18 | 9.2 | 18 | 9.1 | 21 | 9.8 |
| | C | 178 | 90.8 | 180 | 90.9 | 193 | 90.2 |
| rs1870377 | T | 151 | 77.0 | 148 | 74.7 | 176 | 82.2 |
| | A | 45 | 23.0 | 50 | 25.3 | 38 | 17.8 |
| rs307826 | T | 169 | 86.2 | 179 | 90.4 | 189 | 88.3 |
| | C | 27 | 13.8 | 19 | 9.6 | 25 | 11.7 |
| rs307821* | C | 177 | 90.3 | 71871 | 91.9 | | |
| | A | 19 | 9.7 | 6293 | 8.1 | | |

Tabella 11. Frequenze alleliche a confronto. Nella tabella sono riportate, per ogni *SNP* in esame, le conte alleliche e le corrispondenti frequenze alleliche in percentuale, sia in riferimento alla coorte di studio che alle popolazioni *CEU* e *TSI*, i cui dati sono stati ricavati dalla banca dati *Ensembl*. *Per lo *SNP* rs307821, le frequenze relative alla popolazione generale non sono riferite alla *CEU* ma alla popolazione Europea e sono state ricavate da *Refseq*.

5. DISCUSSIONE

Con il termine iponatriemia si fa riferimento a una condizione clinica caratterizzata da livelli di sodio sierici ≤ 135 mEq/L². Questa rappresenta il disordine elettrolitico riscontrato più frequentemente nella pratica clinica⁹³ in ambito oncologico e può manifestarsi con un'epidemiologia ed una sintomatologia estremamente variabili. La sua associazione con un'elevata morbilità e mortalità la rendono un disturbo che va particolarmente attenzionato³.

Tra le cause che possono determinare l'insorgenza dell'iponatriemia troviamo la Sindrome da Inappropriata Antidiuresi (*SIAD*), un disordine caratterizzato da iponatriemia ipotonica euvolemica e da iperosmolarità urinaria, che di frequente si associa a un rilascio di ormone antidiuretico (*ADH*) anche in assenza di stimoli¹⁵.

L'eziologia dell'iponatriemia nei pazienti oncologici è multifattoriale, tra cui gli effetti collaterali di alcune terapie antitumorali²⁷. Si riscontra con una maggiore frequenza (20-40%) in pazienti affetti da tumore al polmone³⁸⁻⁴¹, in particolare quello a piccole cellule (*SCLC*) (18.9%)⁴².

Nei pazienti oncologici la *SIADH*, associata a un'aumentata secrezione di *AVP* da parte dell'ipofisi o a una sua produzione ectopica da parte delle

cellule tumorali³⁷, è una causa molto comune di iponatriemia⁴³, con un'augmentata incidenza in quelli con *SCLC*^{38,44}.

Le implicazioni cliniche dell'iponatriemia per i pazienti con tumore sono numerose. Alcuni studi hanno analizzato l'impatto dell'iponatriemia sull'*overall survival (OS)* di pazienti affetti da tumore al polmone, osservando che i pazienti iponatriemici mostrano una sopravvivenza inferiore rispetto agli eunatriemici, specie se non si riesce a normalizzare i livelli di sodio plasmatici^{39,46}. Sembra inoltre che l'iponatriemia possa peggiorare la risposta alla terapia antitumorale⁴⁹ e prolungare le tempistiche di ospedalizzazione, con conseguente aumento dei costi⁵⁰.

L'obiettivo del nostro studio, finanziato dal progetto *PRIN* (Progetti di ricerca di Rilevante Interesse Nazionale), è stato quello di ricercare biomarcatori, quali *micro-RNA* e polimorfismi a singolo nucleotide (*SNP*), che possano essere correlati all'iponatriemia nei pazienti con tumore al polmone, andando ad indagare successivamente anche il loro ruolo prognostico e predittivo.

A tal proposito, la prima fase della nostra ricerca ha previsto un'iniziale analisi di *screening* in cui è stato condotto un *miRNA-sequencing* su campioni *FFPE* tumorali e peritumorali di pazienti eunatriemici e pazienti che hanno sviluppato iponatriemia, affetti da tumore al polmone. Con i risultati ottenuti

sono stati effettuati dei confronti, per entrambe le tipologie di campioni, al fine di identificare una *signature* di *miRNA* relativa all'iponatriemia.

Per quanto riguarda l'analisi univariata dei campioni tumorali, applicando un $p\text{-value}<0.05$ e un $LFC>|0.58|$, sono emersi 12 *miRNA* statisticamente significativi. Tra questi, il miR-147b-3p, miR-147b-5p, miR-539-3p, miR-625-3p, miR-937-3p, miR-122-5p, miR-432-5p e miR-146a-5p risultano *downregolati* nei pazienti iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici, mentre il miR-9-3p, miR-9-5p, miR-190a-5p, miR-32-3p sono *upregolati*.

Sottoponendo questi *miRNA* all'analisi multivariata, è emerso che il miR-147b-3p, miR-147b-5p, miR-937-3p e miR-146a-5p sono significativamente *downregolati* nei pazienti iponatriemici confrontati con il gruppo di riferimento ($p\text{-value}<0.05$) e, similmente, il miR-539-3p e miR-625-3p mostrano un *trend* di significatività ($0.05<p\text{-value}<0.10$) per la *downregolazione*. Al contrario, il miR-190a-5p e miR-32-3p ($p\text{-value}<0.05$) risultano significativamente *upregolati* negli iponatriemici rispetto agli eunatriemici.

Inoltre, i 12 *miRNA* osservati sono stati correlati con gli *outcome* clinici dei pazienti ed è emerso che l'*upregolazione* del miR-937-3p, miR-190a-5p e miR-9-3p è associata ad una peggiore OS ($p\text{-value}<0.05$), mentre l'*upregolazione* del miR-32-3p è correlata ad una migliore OS ($p\text{-value}=0.010$) e RFS ($p\text{-value}=0.064$).

In merito a tali associazioni, è opportuno focalizzare l'attenzione su due *miRNA*, il miR-190a-5p e miR-9-3p, in quanto una loro *upregolazione* è stata correlata sia con lo stato iponatriemico che con una peggiore *OS* dei pazienti arruolati. Questo dato è interessante in quanto può essere considerato una correlazione coerente con quanto riportato in letteratura riguardo il ruolo prognostico negativo dell'iponatriemia sulla sopravvivenza globale dei pazienti oncologici^{46-48,50}.

Tra tutti i *miRNA* tumorali, il miR-147b-3p, il miR-937-3p e il miR-9-5p sono interessanti da investigare perché noti dalla letteratura in quanto ritrovati nell'adenocarcinoma polmonare con varie funzioni. In particolare, il miR-147b-3p e il miR-9-5p sono stati identificati per il loro ruolo, quando *up-regolati*, nella proliferazione, invasione, migrazione cellulare e formazione di colonie^{94,95}. Anche una sovraespressione del miR-937-3p sembra favorire la progressione del tumore in questione promuovendo l'angiogenesi, l'invasione e la formazione di metastasi⁹⁶. Il miR-9-5p è stato riscontrato anche nel tumore al polmone non a piccole cellule, dove è stato trovato altamente espresso nel tessuto tumorale e si è dimostrata la sua capacità di favorire la crescita cellulare e la formazione di metastasi attraverso la *downregolazione* dell'espressione dell'oncosoppressore *TGFRB2*⁹⁷.

Un altro *miRNA* tumorale particolarmente rilevante è rappresentato dal miR-146a-5p. Dalla letteratura emerge che tale *miRNA* sembra poter regolare

simultaneamente e in maniera opposta l'espressione da parte delle cellule tumorali di due mediatori chiave della risposta infiammatoria nel cancro: *iNOS*, che promuove la morte cellulare e *EMMPRIN*, che favorisce la sopravvivenza cellulare e l'angiogenesi⁹⁸. In particolare, una sua *upregolazione* sembra aumentare l'espressione di *EMMPRIN* nelle cellule tumorali, inducendo l'angiogenesi attraverso la regolazione di *VEGF* e *MMP-9*. In aggiunta, studi recenti hanno proposto un ruolo di questo *miRNA* come oncosoppressore nel tumore al polmone non a piccole cellule (*NSCLC*)^{99,100}.

In seguito, anche per i campioni peritumorali è stato effettuato un confronto analogo al precedente e sono stati riscontrati all'analisi univariata 7 *miRNA* significativi: il miR-1260a, miR-1260b, miR-1275, miR-4454, miR-4695-3p, miR-5100, che risultano *upregolati*, e il miR-6073, che risulta *downregolato*.

Sottoponendo questi *miRNA* all'analisi multivariata, sono risultati tutti significativamente *upregolati* nei pazienti iponatriemici rispetto agli eunatriemici ($p\text{-value}<0.05$), ad eccezione del miR-1275, che mostra un *trend* di significatività per l'*upregolazione* ($0.05<p\text{-value}<0.10$), e del miR-6073, che viene *downregolato* negli iponatriemici confrontati con il gruppo di riferimento.

Successivamente, come per i campioni tumorali, è stata effettuata una correlazione con gli *outcome* clinici dei pazienti considerando come significativi i risultati con un $p\text{-value}<0.05$ e con un *trend* di significatività quelli con un $0.05<p\text{-value}<0.10$. È stato riscontrato che all'aumentare del miR-1260a aumenta la *PFS1* ($p\text{-value}=0.084$) e diminuisce la *PFS2* ($p\text{-value}=0.082$), mentre all'aumentare del miR-1260b è correlata una aumentata *PFS2* ($p\text{-value}=0.077$). L'*upregolazione* del miR-5100 è associata ad una diminuita *RFS* ($p\text{-value}=0.013$), *PFS1* ($p\text{-value}=0.049$), *PFS2* ($p\text{-value}=0.093$) ed *OS* ($p\text{-value}=0.038$). Infine, all'aumentare del miR-6073 e miR-4695-3p è stata associata una maggiore *RFS* ($p\text{-value}=0.037$ e $p\text{-value}=0.087$, rispettivamente), mentre l'*upregolazione* del miR-1275 e miR-4454 è correlata ad una diminuita *PFS1* ($p\text{-value}=0.036$ e $p\text{-value}=0.070$, rispettivamente).

A questo proposito, è interessante notare che l'*upregolazione* del miR-5100 è stata associata sia allo stato iponatriemico che ad una peggiore *OS* dei pazienti in esame. Questa correlazione, osservata in precedenza anche per i *miRNA* tumorali miR-190a-5p e miR-9-3p, è in linea con quanto studiato in letteratura sull'impatto negativo dell'iponatriemia sulla sopravvivenza globale dei pazienti affetti da tumore^{46-48,50}. In aggiunta, l'*upregolazione* del miR-1275, miR-4454 e miR-5100 è emersa come correlata all'iponatriemia ed anche ad una diminuita *PFS1* dei pazienti arruolati. Anche questo potrebbe essere un

dato interessante, tuttavia in studi precedenti non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative tra l'iponatriemia e la sopravvivenza libera da progressione^{101,102}.

Alcuni dei sette *miRNA* peritumorali sono stati presi in esame in letteratura per il loro ruolo nel cancro al polmone e per questo sono di particolare interesse per la nostra analisi. Una sovraespressione del miR-1260b, ad esempio, è stata correlata con un'aumentata migrazione e invasione cellulare nel tumore al polmone non a piccole cellule (*NSCLC*)¹⁰³. In più, il miR-1275 è stato studiato nell'adenocarcinoma polmonare, dove, se *upregolato* da *HIF-1 α* , risulta implicato nella progressione tumorale e si rende responsabile di una peggior prognosi e della formazione di metastasi¹⁰⁴.

A conclusione della fase di *screening*, visti i risultati ottenuti, possiamo sottolineare l'importanza di aver ricercato questi biomarcatori confrontando sia i campioni tumorali che quelli peritumorali. È importante notare che tra i *miRNA* tumorali e quelli peritumorali non è stata trovata alcuna sovrapposizione. I *miRNA* riscontrati nel confronto tumorale potrebbero essere importanti nella regolazione di *pathway* molecolari del tessuto tumorale polmonare legati all'*AVP* o ad altri *target* e con un possibile ruolo nello sviluppo dell'iponatriemia. Inoltre, aver ritrovato delle differenze di

espressione in alcuni *miRNA* anche nel tessuto peritumorale polmonare potrebbe essere legato ad una conseguenza dello sviluppo della condizione di iponatriemia impattante a livello sistemico e, pertanto, possono risultare biomarcatori molto interessanti da indagare nella nostra fase di validazione su campioni plasmatici.

Attualmente è in corso la fase di validazione della *signature* di *miRNA* finora descritti mediante *Real-Time PCR* e chimica *SYBR Green*, su campioni plasmatici, raccolti a prestabiliti *time points*, di pazienti oncologici affetti da tumore polmonare localmente avanzato o metastatico in corso di trattamento attivo. Una volta ottenuti i risultati, verranno effettuate anche in questo caso le correlazioni con gli *outcome* clinici (*RFS*, *PFS*, *OS*) e con lo stato di natriemia dei pazienti.

La fase retrospettiva e quella prospettica dello studio sono state svolte su due tipologie di campioni differenti. Infatti, nei campioni *FFPE* peritumorali e tumorali, i *miRNA* ritrovati sono quelli espressi rispettivamente da cellule sane e cellule cancerose, mentre nei campioni plasmatici ritroveremo tutti i *miRNA* circolanti, di cui una parte può essere rilasciata dal tumore^{105,106}. Di conseguenza, è possibile condurre la fase di validazione da tessuto a plasma,

come già effettuato in altri studi^{107,108}, il che può risultare molto vantaggioso considerando la facile accessibilità dei prelievi e la difficoltà che spesso si incontra nel reperire campioni tissutali.

Tuttavia, lavorare con campioni plasmatici richiede molta attenzione al rischio di emolisi. L'emolisi rappresenta, infatti, una problematica non trascurabile in questo tipo di analisi, in quanto i *miRNA* rilasciati dagli eritrociti possono alterare il profilo di espressione dei *miRNA* circolanti oggetto di studio⁷⁰. Di conseguenza, sui nostri campioni plasmatici sono stati condotti controlli di qualità, allo scopo di valutare questa variabile, calcolando il *miR-ratio* come delta-*Ct* fra il miR-23a-3p e il miR-451a⁸⁸.

Da considerare che, oltre al sopra citato *miR-ratio*, esistono attualmente vari parametri che consentono di valutare il grado di emolisi dei campioni plasmatici, quali la misurazione dell'assorbanza dell'emoglobina a 414 nm¹⁰⁹ o la normalizzazione di tale assorbanza con quella misurata a 375 nm, per escludere interferenze lipidiche¹¹⁰.

Alcuni *miRNA* già analizzati in fase prospettica mostrano fluorescenza tardiva, il che potrebbe essere legato anche a una loro bassa espressione, non rilevabile con la tecnica da noi in uso. Per risolvere questo tipo di problematica un'idea potrebbe essere traslare la fase di validazione in *digital*

PCR, una metodica innovativa di *PCR* molto sensibile che, attraverso delle microreazioni, consente di rilevare anche *RNA* presente in poche copie¹¹¹.

Come obiettivo futuro, potrebbe essere presa in considerazione l'idea di effettuare un *miRNA-sequencing* anche su campioni plasmatici di pazienti iponatriemici ed eunatriemici affetti da tumore al polmone, per identificare *miRNA* differenzialmente espressi tra i due gruppi ed investigare se sono presenti *target overlapping* o meno con quelli riscontrati dall'analisi di sequenziamento su tessuto.

Parallelamente alla fase di *screening* e a quella di validazione appena discusse, è stata effettuata l'analisi di 16 *SNP*, relativi ai geni *AVP*, *AVPRIA*, *HIF- α* , *VEGF*, *VEGFR-A*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3* su campioni di sangue intero di 98 pazienti arruolati in prospettico. Per tali pazienti sono state condotte tutte le analisi e non sono stati ottenuti campioni indeterminati. I risultati hanno permesso di ricavare frequenze genotipiche e alleliche della nostra popolazione ai diversi *SNP*, che verranno quindi confrontate con gli *outcome* clinici dei pazienti.

Per concludere, le correlazioni con gli *outcome* clinici e con lo stato di natriemia per tutti i risultati ottenuti in fase prospettica permetteranno di

indagare un possibile ruolo prognostico e predittivo dei biomarcatori in esame per la condizione iponatriemica, che potrebbe rivelarsi importante ai fini diagnostici e terapeutici specialmente considerando la non invasività delle ricerche condotte. Trattandosi di uno studio innovativo, questi dati daranno un importante contributo alla comunità scientifica, arricchendo le conoscenze molecolari relative a questo disturbo elettrolitico.

Inoltre, come obiettivo futuro, per poter implementare le ricerche sulla condizione iponatriemica in ambito oncologico, si potrebbe prendere in considerazione l'analisi di possibili *target* correlati ai *miRNA* ritrovati nel nostro studio, mediante ad esempio dei *test ELISA*, oppure la valutazione di altri biomarcatori, come l'apelina, piccolo peptide endogeno identificato come ligando del recettore accoppiato a proteine G *APJ*¹¹². Nell'uomo questa proteina è codificata dal gene *APLN*, il quale viene tradotto in una pre-proteina di 77 aminoacidi che può dare origine ai frammenti apelina 13, apelina 17 o apelina 36¹¹³. Nello specifico, l'apelina 13 sembra poter promuovere la proliferazione, l'angiogenesi e la formazione di metastasi in alcuni tumori maligni quali il cancro ovarico, il tumore alla prostata e l'adenocarcinoma polmonare¹¹³. Alcuni studi ne hanno confermato il ruolo in quest'ultima tipologia tumorale¹¹⁴.

Negli ultimi anni alcune ricerche preliminari hanno studiato un'eventuale correlazione tra l'azione esplicata da alcuni *miRNA* e l'effetto dell'apelina su linee cellulari tumorali polmonari. Uno studio di Ran et al. ha identificato il miR-15-5p come possibile *target* dell'apelina, che agirebbe, secondo quanto proposto, inibendone l'azione¹¹³. Zhou et al. hanno osservato che il miR-195 è in grado di promuovere la proliferazione, invasione e migrazione delle cellule tumorali polmonari agendo direttamente sull'*mRNA* dell'apelina¹¹⁵.

Tenendo conto di queste evidenze e del fatto che l'apelina è stata ritrovata maggiormente espressa in pazienti iponatriemici rispetto a quelli eunatriemici⁹², si potrebbero studiare questi *miRNA* nell'ambito di questo disturbo elettrolitico e del tumore al polmone.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Biswas, M. & Davies, J. S. Hyponatraemia in clinical practice. *Postgraduate Medical Journal* at <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.056515> (2007).
2. Yoshioka, K. *et al.* Recovery from hyponatremia in acute phase is associated with better in-hospital mortality rate in acute heart failure syndrome. *J. Cardiol.* (2016) doi:10.1016/j.jjcc.2015.12.004.
3. Dineen, R., Thompson, C. J. & Sherlock, M. Hyponatraemia - Presentations and management. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London* **17**, 263–269 (2017).
4. Upadhyay, A., Jaber, B. L. & Madias, N. E. Incidence and Prevalence of Hyponatremia. *Am. J. Med.* (2006) doi:10.1016/j.amjmed.2006.05.005.
5. Spasovski, G. *et al.* Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of hyponatraemia. *Intensive Care Med.* (2014) doi:10.1007/s00134-014-3210-2.
6. Sjöblom, E., Höjer, J., Ludwigs, U. & Pirskanen, R. Fatal hyponatraemic brain oedema due to common gastroenteritis with accidental water intoxication. *Intensive Care Med.* (1997) doi:10.1007/s001340050340.

7. Krajewska, M., Kruczkowska, A., Kusztal, M. A. & Królicka, A. L. Hyponatremia in infectious diseases—a literature review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–16 (2020).
8. Rondon-Berrios, H., Agaba, E. I. & Tzamaloukas, A. H. Hyponatremia: pathophysiology, classification, manifestations and management. *Int. Urol. Nephrol.* **46**, 2153–2165 (2014).
9. Buffington, M. A. & Abreo, K. Hyponatremia: A Review. *Journal of Intensive Care Medicine* at <https://doi.org/10.1177/0885066614566794> (2016).
10. Verbalis, J. G. *et al.* Diagnosis, evaluation, and treatment of hyponatremia: Expert panel recommendations. *American Journal of Medicine* at <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.07.006> (2013).
11. Grant, P. *et al.* The diagnosis and management of inpatient hyponatraemia and SIADH. *Eur. J. Clin. Invest.* (2015) doi:10.1111/eci.12465.
12. Berardi, R. *et al.* Practical issues for the management of hyponatremia in oncology. *Endocrine* (2018) doi:10.1007/s12020-018-1547-y.
13. Hoorn, E. J. & Zietse, R. Diagnosis and treatment of hyponatremia: Compilation of the guidelines. *Journal of the American Society of Nephrology* at <https://doi.org/10.1681/ASN.2016101139> (2017).

14. Ball, S., Barth, J., Levy, M. & __. SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY ENDOCRINE EMERGENCY GUIDANCE: Emergency management of severe symptomatic hyponatraemia in adult patients. *Endocr. Connect.* (2016) doi:10.1530/ec-16-0058.
15. Mentrasti, G. *et al.* Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (Siadh): Optimal management. *Therapeutics and Clinical Risk Management* at <https://doi.org/10.2147/TCRM.S206066> (2020).
16. Ranieri, M., Di Mise, A., Tamma, G. & Valenti, G. Vasopressin–aquaporin-2 pathway: Recent advances in understanding water balance disorders [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* **8**, 1–11 (2019).
17. Esposito, P., Piotti, G., Bianzina, S., Malul, Y. & Dal Canton, A. The syndrome of inappropriate antidiuresis: Pathophysiology, clinical management and new therapeutic options. *Nephron - Clin. Pract.* **119**, (2011).
18. Japundžić-Žigon, N., Lozić, M., Šarenac, O. & Murphy, D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Curr. Neuropharmacol.* (2019) doi:10.2174/1570159x17666190717150501.
19. Wilson, J. L. L., Miranda, C. A. & Knepper, M. A. Vasopressin and the

- regulation of aquaporin-2. *Clinical and Experimental Nephrology* at <https://doi.org/10.1007/s10157-013-0789-5> (2013).
20. Kwon, T. H., Frøkiær, J. & Nielsen, S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis. *Kidney Research and Clinical Practice* at <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2013.07.005> (2013).
 21. Hoffert, J. D. *et al.* Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J. Biol. Chem.* (2008) doi:10.1074/jbc.M803074200.
 22. Balasubramanian, L., Sham, J. S. K. & Yip, K. P. Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **456**, 747–754 (2008).
 23. Sandoval, P. C. *et al.* Systems-level analysis reveals selective regulation of Aqp2 gene expression by vasopressin. *Sci. Rep.* (2016) doi:10.1038/srep34863.
 24. Ishikawa, S. e. Hyponatremia associated with heart failure: Pathological role of vasopressin-dependent impaired water excretion. *Journal of Clinical Medicine* at <https://doi.org/10.3390/jcm4050933> (2015).
 25. Cuesta, M. & Thompson, C. J. The syndrome of inappropriate antidiuresis (SIAD). *Best Practice and Research: Clinical*

Endocrinology and Metabolism at

<https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.02.009> (2016).

26. Robertson, G. L. Regulation of Arginine Vasopressin in the Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *Am. J. Med.* (2006)
doi:10.1016/j.amjmed.2006.05.006.
27. Berardi, R. *et al.* Hyponatremia in cancer patients: Time for a new approach. *Critical Reviews in Oncology/Hematology at*
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.010> (2016).
28. Sherlock, M. & Thompson, C. J. The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone: Current and future management options. *Eur. J. Endocrinol.* (2010) doi:10.1530/EJE-09-1057.
29. Decaux, G. Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am. J. Med.* (2001)
doi:10.1016/S0002-9343(01)00678-7.
30. AIOM. DISORDINI ELETTROLITICI : Raccomandazioni per l' iter diagnostico- terapeutico nel paziente oncologico. (2018).
31. Decaux, G., Unger, J., Brimiouille, S. & Mockel, J. Hyponatremia in the Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone: Rapid Correction With Urea, Sodium Chloride, and Water Restriction

- Therapy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* (1982)
doi:10.1001/jama.1982.03320290017021.
32. Costello-Boerrigter, L. C., Boerrigter, G. & Burnett, J. C. Pharmacology of vasopressin antagonists. *Heart Fail. Rev.* (2009) doi:10.1007/s10741-008-9108-8.
33. Petereit, C., Zaba, O., Teber, I., Lüders, H. & Grohé, C. A rapid and efficient way to manage hyponatremia in patients with SIADH and small cell lung cancer: Treatment with tolvaptan. *BMC Pulm. Med.* (2013) doi:10.1186/1471-2466-13-55.
34. Berardi, R. *et al.* Syndrome of inappropriate anti-diuretic hormone secretion in cancer patients: results of the first multicenter Italian study. *Ther. Adv. Med. Oncol.* (2019) doi:10.1177/1758835919877725.
35. Berardi, R. *et al.* ASSERT: A prospective, observational study measuring sodium improvement and outcomes in patients treated for moderate to severe hyponatremia secondary to syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH) in Italy (lung cancer cohort). *Ann. Oncol.* (2019) doi:10.1093/annonc/mdz265.073.
36. Gill, G. *et al.* Characteristics and mortality of severe hyponatraemia - A hospital-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* (2006)
doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02583.x.

37. Fiordoliva, I. *et al.* Managing hyponatremia in lung cancer: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* at <https://doi.org/10.1177/1758834017736210> (2017).
38. SØRENSEN, J. B., ANDERSEN, M. K. & HANSEN, H. H. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) in malignant disease. *Journal of Internal Medicine* at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1995.tb00907.x> (1995).
39. 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).
40. Gross, A. J. *et al.* Atrial Natriuretic Factor and Arginine Vasopressin Production in Tumor Cell Lines from Patients with Lung Cancer and Their Relationship to Serum Sodium. *Cancer Res.* (1993).
41. Sengupta, A. *et al.* The incidence of hyponatraemia and its effect on the ECOG performance status among lung cancer patients. *J. Clin. Diagnostic Res.* (2013) doi:10.7860/JCDR/2013/5900.3225.
42. Hermes, A., Waschki, B. & Reck, M. Hyponatremia as prognostic factor in small cell lung cancer - A retrospective single institution analysis. *Respir. Med.* (2012) doi:10.1016/j.rmed.2012.02.010.

43. Raftopoulos, H. Diagnosis and management of hyponatremia in cancer patients. *Supportive Care in Cancer* at <https://doi.org/10.1007/s00520-007-0309-9> (2007).
44. List, A. F. *et al.* The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) in small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* (1986) doi:10.1200/JCO.1986.4.8.1191.
45. Talmi, Y. P., Hoffman, H. T. & McCabe, B. F. Syndrome of inappropriate secretion of arginine vasopressin in patients with cancer of the head and neck. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* (1992) doi:10.1177/000348949210101111.
46. Petereit, C., Zaba, O., Teber, I. & Grohe, C. [Is Hyponatremia a Prognostic Marker of Survival for Lung Cancer?]. *Pneumologie* (2011).
47. Kim, H. S. *et al.* Clinical outcome of gastric cancer patients with bone marrow metastases. *Oncology* (2008) doi:10.1159/000127386.
48. Berardi, R. *et al.* Hyponatraemia is a predictor of clinical outcome for malignant pleural mesothelioma. *Support. Care Cancer* (2015) doi:10.1007/s00520-014-2398-6.
49. Jeppesen, A. N., Jensen, H. K., Donskov, F., Marcussen, N. & Von Der Maase, H. Hyponatremia as a prognostic and predictive factor in metastatic renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* (2010)

doi:10.1038/sj.bjc.6605563.

50. Berardi, R. *et al.* Hyponatremia is a predictor of hospital length and cost of stay and outcome in cancer patients. *Support. Care Cancer* (2015) doi:10.1007/s00520-015-2683-z.
51. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology* at <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402> (2018).
52. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* at <https://doi.org/10.1038/nrm3838> (2014).
53. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–240 (2004).
54. Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. & Tavazoie, S. F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature14281.
55. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* (2004) doi:10.1101/gad.1262504.
56. Okada, C. *et al.* A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* (80-.). (2009) doi:10.1126/science.1178705.

57. He, B. *et al.* Mirna-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 2628–2647 (2020).
58. Medley, J. C., Panzade, G. & Zinovyeva, A. Y. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* at <https://doi.org/10.1002/wrna.1627> (2021).
59. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* (2003) doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8.
60. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2007.06.028.
61. Yang, S. *et al.* Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* (2011) doi:10.1261/rna.2537911.
62. Glogovitis, I., Yahubyan, G., Würdinger, T., Koppers-Lalic, D. & Baev, V. Isomirs—hidden soldiers in the mirna regulatory army, and how to find them? *Biomolecules* at <https://doi.org/10.3390/biom11010041> (2021).
63. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* (2007) doi:10.1038/nature05983.
64. Ender, C. *et al.* A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions.

- Mol. Cell* (2008) doi:10.1016/j.molcel.2008.10.017.
65. Haussecker, D. *et al.* Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* (2010) doi:10.1261/rna.2000810.
66. Cifuentes, D. *et al.* A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity. *Science* (80-.). (2010) doi:10.1126/science.1190809.
67. Dvorská, D., Braný, D., Ňachajová, M., Halašová, E. & Danková, Z. Breast cancer and the other non-coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms22063280> (2021).
68. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002> (2009).
69. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* at <https://doi.org/10.1038/nature10888> (2012).
70. Tiberio, P., Callari, M., Angeloni, V., Daidone, M. G. & Appierto, V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
71. Cortez, M. A. & Calin, G. A. MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy* at <https://doi.org/10.1517/14712590902932889> (2009).

72. Kim, S. & Misra, A. SNP genotyping: Technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* at <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037> (2007).
73. 1000 Genomes Project Consortium *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* (2015).
74. 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).
75. Brookes, A. J. The essence of SNPs. *Gene* at [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X) (1999).
76. Lee, S., Kasif, S., Weng, Z. & Cantor, C. R. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS One* (2008) doi:10.1371/journal.pone.0003906.
77. Graffelman, J., Jain, D. & Weir, B. A genome-wide study of Hardy–Weinberg equilibrium with next generation sequence data. *Hum. Genet.* (2017) doi:10.1007/s00439-017-1786-7.
78. Nussbaum, R. L. Genetic Variation in Populations. in *Thompson&Thompson Genetics in medicine, 2016.*
79. Li, W. H. & Sadler, L. A. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* (1991) doi:10.1093/genetics/129.2.513.

80. Shastry, B. S. 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).
81. Bijkerk, R. *et al.* MicroRNA-132 controls water homeostasis through regulating MECP2-mediated vasopressin synthesis. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* (2018) doi:10.1152/ajprenal.00087.2018.
82. G. Mentrasti, E. Ambrosini, L. Giuliani, N. Chiodi, C. Liguori, M. Gualtieri, F. Bianchi, F. Barbisan, G. Goteri, M.B.L. Rocchi, R. B. miRNA signature as early predictor of hyponatremia and survival in lung cancer: Preliminary results from the ISA retrospective study. *Ann. Oncol.* 33 S713-S742. [10.1016/j.annonc/annonc1075](https://doi.org/10.1016/j.annonc/annonc1075) (2022).
83. He, Q. *et al.* Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1. *Cell Death Dis.* (2021) doi:10.1038/s41419-021-03803-8.
84. Bassand, K. *et al.* miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* (2021) doi:10.1111/jcmm.16460.
85. Hu, J. *et al.* MicroRNA-128 plays a critical role in human non-small cell lung cancer tumourigenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis by directly targeting vascular endothelial growth factor-C. *Eur. J. Cancer* (2014) doi:10.1016/j.ejca.2014.06.005.

86. Pan, J. *et al.* A two-miRNA signature (miR-33a-5p and miR-128-3p) in whole blood as potential biomarker for early diagnosis of lung cancer. *Sci. Rep.* (2018) doi:10.1038/s41598-018-35139-3.
87. Jansson, M. D., Damas, N. D., Lees, M., Jacobsen, A. & Lund, A. H. miR-339-5p regulates the p53 tumor-suppressor pathway by targeting MDM2. *Oncogene* (2014) doi:10.1038/onc.2014.130.
88. Blondal, T. *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* **59**, S1–S6 (2013).
89. Kerbert, A. J. C. *et al.* Short article: Impact of genetic variation in the vasopressin 1a receptor on the development of organ failure in patients admitted for acute decompensation of liver cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* (2017) doi:10.1097/MEG.0000000000000834.
90. Randesi, M. *et al.* Association of Variants of Arginine Vasopressin and Arginine Vasopressin Receptor 1A With Severe Acetaminophen Liver Injury. *CMGH* (2017) doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.008.
91. Berta, J. *et al.* Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis. *J. Thorac. Oncol.* (2010) doi:10.1097/JTO.0b013e3181e2c1ff.
92. Lacquaniti, A. *et al.* Apelin beyond kidney failure and hyponatremia: a useful biomarker for cancer disease progression evaluation. *Clin. Exp.*

- Med.* (2015) doi:10.1007/s10238-014-0272-y.
93. Oh, J. Y. & Shin, J. Il. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion and cerebral/renal salt wasting syndrome: Similarities and differences. *Frontiers in Pediatrics* at <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00146> (2015).
94. Feng, Y. Y. *et al.* MicroRNA-147b promotes lung adenocarcinoma cell aggressiveness through negatively regulating microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4) and affects prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Gene* (2020) doi:10.1016/j.gene.2019.144316.
95. Zhu, K., Lin, J., Chen, S. & Xu, Q. miR-9-5p Promotes Lung Adenocarcinoma Cell Proliferation, Migration and Invasion by Targeting ID4. *Technol. Cancer Res. Treat.* (2021) doi:10.1177/15330338211048592.
96. Ma, Z. *et al.* MiR-937-3p promotes metastasis and angiogenesis and is activated by MYC in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* (2022) doi:10.1186/s12935-022-02453-w.
97. Li, G., Wu, F., Yang, H., Deng, X. & Yuan, Y. MiR-9-5p promotes cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer through the repression of TGFBR2. *Biomed. Pharmacother.* (2017) doi:10.1016/j.biopha.2017.11.105.

98. Simanovich, E., Brod, V., Rahat, M. M. & Rahat, M. A. Function of miR-146a-5p in tumor cells as a regulatory switch between cell death and angiogenesis: Macrophage therapy revisited. *Front. Immunol.* (2018) doi:10.3389/fimmu.2017.01931.
99. Li, Y. L. *et al.* MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.11040.
100. Iacona, J. R., Monteleone, N. J., Lemenze, A. D., Cornett, A. L. & Lutz, C. S. Transcriptomic studies provide insights into the tumor suppressive role of miR-146a-5p in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *RNA Biol.* (2019) doi:10.1080/15476286.2019.1657351.
101. Castillo, J. J. *et al.* The occurrence of hyponatremia and its importance as a prognostic factor in a cross-section of cancer patients. *BMC Cancer* (2016) doi:10.1186/s12885-016-2610-9.
102. Berardi, R. *et al.* Hyponatremia normalization as an independent prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line therapy. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.13372.
103. Xu, L. *et al.* MiR-1260b promotes the migration and invasion in non-small cell lung cancer via targeting PTPRK. *Pathol. Res. Pract.* (2018)

doi:10.1016/j.prp.2018.02.002.

104. Jiang, N. *et al.* HIF-1 α -regulated miR-1275 maintains stem cell-like phenotypes and promotes the progression of LUAD by simultaneously activating Wnt/ β -catenin and Notch signaling. *Theranostics* (2020) doi:10.7150/thno.41120.
105. Martínez-Rivera, V., Negrete-García, M. C., Ávila-Moreno, F. & Ortiz-Quintero, B. Secreted and tissue miRNAs as diagnosis biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *International Journal of Molecular Sciences* at <https://doi.org/10.3390/ijms19020595> (2018).
106. Cojocneanu, R. *et al.* Plasma and tissue specific miRNA expression pattern and functional analysis associated to colorectal cancer patients. *Cancers (Basel)*. (2020) doi:10.3390/cancers12040843.
107. Kanaan, Z. *et al.* Plasma MiR-21: A potential diagnostic marker of colorectal cancer. in *Annals of Surgery* (2012). doi:10.1097/SLA.0b013e318265bd6f.
108. Pedersen, N. J. *et al.* MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma. *Oral Oncol.* (2018) doi:10.1016/j.oraloncology.2018.05.020.
109. Kirschner, M. B. *et al.* Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* (2011)

doi:10.1371/journal.pone.0024145.

110. Fortunato, O. *et al.* Assessment of circulating micornas in plasma of lung cancer patients. *Molecules* (2014)
doi:10.3390/molecules19033038.
111. Laprovitera, N., Grzes, M., Porcellini, E. & Ferracin, M. Cancer site-specific multiple microRNA quantification by droplet digital PCR. *Front. Oncol.* (2018) doi:10.3389/fonc.2018.00447.
112. Wysocka, M. B., Pietraszek-Gremplewicz, K. & Nowak, D. The role of apelin in cardiovascular diseases, obesity and cancer. *Frontiers in Physiology* at <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00557> (2018).
113. Ran, J. *et al.* Apelin enhances biological functions in lung cancer A549 cells by downregulating exosomal miR-15a-5p. *Carcinogenesis* (2021)
doi:10.1093/carcin/bgaa089.
114. Yang, L. *et al.* ERK1/2 mediates lung adenocarcinoma cell proliferation and autophagy induced by apelin-13. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. (2014) doi:10.1093/abbs/gmt140.
115. Zhou, Y. *et al.* MicroRNA-195 suppresses the progression of lung adenocarcinoma by directly targeting apelin. *Thorac. Cancer* (2019)
doi:10.1111/1759-7714.13087.