



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA
SPERIMENTALE XXXVI CICLO**

**PIVKA-II COME NUOVO BIOMARCATORE
DIAGNOSTICO NELL'ADENOCARCINOMA
PANCREATICO: ESPRESSIONE SIERICA, TISSUTALE
E IN VITRO**

DOTTORANDO

Dr.ssa Sara Tartaglione

DOCENTE GUIDA

Prof.ssa Emanuela Anastasi

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Ad Achille Paolo

INDICE

ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1 CARCINOMA PANCREATICO	7
1.1.1 Epidemiologia.....	7
1.1.2 Eziologia e fattori di rischio.....	8
1.1.3 Classificazione istologica, grading e stadiazione.....	9
1.2 ADENOCARCINOMA PANCREATICO (PDAC).....	11
1.2.1 Oncogenesi del PDAC.....	12
1.2.2 Gestione Clinica: diagnosi e trattamento	14
1.3 BIOMARCATORI CIRCOLANTI NEL CARCINOMA PANCREATICO	16
1.4 PIVKA-II.....	18
1.4.1 Carezza di vitamina K in oncologia e nel carcinoma pancreatico.....	21
1.4.2 PIVKA-II biomarcatore nell'epatocarcinoma e nelle neoplasie gastrointestinali	26
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	27
3. MATERIALI E METODI	28
3.1 Popolazione in studio: arruolamento e caratteristiche	28
3.2 Prelievo, raccolta e conservazione dei campioni ematici	29
3.3 Determinazione di PIVKA-II.....	29
3.4 Raccolta e trattamento dei campioni tissutali	31
3.5 Immunofluorescenza indiretta	32
3.6 Colture cellulari	34
3.6.1 Trattamenti Cellulari	34
3.6.2 Lisi Cellulare	34
3.7 Immunofluorescenza Indiretta (cellule).....	35
3.8 SDS-PAGE e Western Blot	35
3.9 Metodi statistici	36
4. RISULTATI	37
4.1 I LIVELLI SIERICI DI PIVKA-II SONO AUMENTATI IN PAZIENTI CON PDAC ALLA DIAGNOSI	37

4.2	DECREMENTO DEI LIVELLI SIERICI DI PIVKA-II DOPO INTERVENTO TERAPEUTICO.....	37
4.3	ESPRESSIONE TISSUTALE DI PIVKA-II IN SEZIONI DI CARCINOMA PANCREATICO	39
4.4	PIVKA-II È ESPRESSO IN LINEE CELLULARI PDAC	41
4.5	LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE DI PIVKA-II IN CELLULE PANC-1.....	42
4.6	RILASCIO DI PIVKA-II DA PARTE DI CELLULE PANC-1 ESPOSTE A GLUCOSIO ED È SIMULTANEO ALLA ATTIVAZIONE DELLA TRANSIZIONE EPITELIO MESENCHIMA	43
5.	DISCUSSIONE	46
6.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	51
7.	ATTIVITA' SCIENTIFICA CORRELATA ALLO STUDIO	53
	BIBLIOGRAFIA	54

ABSTRACT

Il carcinoma pancreatico è la settima causa principale di decessi cancro correlati a livello globale, con un tasso medio di sopravvivenza a 5 anni di solo il 4%. Con il termine comune di "carcinoma pancreatico" ci si riferisce prettamente all'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC), l'85% di tutte le neoplasie che colpiscono quest'organo. Una delle principali cause di prognosi infausta è il difficile approccio diagnostico: nella maggioranza dei casi i pazienti non manifestando una sintomatologia specifica, giungono all'osservazione clinica quando le possibilità di guarigione sono ormai compromesse. Attualmente la diagnosi di PDAC è basata principalmente su tecniche di imaging e sul dosaggio di marcatori sierici specifici ma a causa dell'insufficiente sensibilità o specificità individuale di questi ultimi, nella comunità scientifica c'è uno sforzo costante per identificarne altri. Di recente la "protrombina indotta dall'assenza di vitamina K-II" (PIVKA-II) ha suscitato interesse come nuovo potenziale biomarcatore circolante nel PDAC. PIVKA-II è una forma di protrombina anomala (contenente alcuni residui di acido glutammico) rilasciata dal fegato in caso di insufficienza di vitamina K o come conseguenza di un difetto acquisito nella carbosilazione post-traduzionale del precursore della protrombina nelle cellule tumorali. In principio tale proteina è stata utilizzata soprattutto nell'ambito dell'emostasi ma attualmente rappresenta un valido biomarcatore diagnostico e prognostico dell'epatocarcinoma (HCC). Recentemente è stato documentato inoltre un aumento dei livelli di PIVKA-II non solo nell' HCC ma anche in altre neoplasie gastrointestinali, incluso il PDAC. In uno studio preliminare abbiamo riportato per la prima volta in letteratura che i livelli sierici di PIVKA-II sono significativamente più elevati nel PDAC rispetto alle malattie pancreatiche benigne e che il biomarcatore preso in esame mostra prestazioni diagnostiche piuttosto buone rispetto a CA 19.9, CEA e CA242. Alla luce di tali promettenti risultati, nel presente lavoro di ricerca abbiamo confermato i dati precedenti su un campione di dimensioni maggiori, dosando i livelli di PIVKA-II tramite tecnologia CLEIA. Inoltre, abbiamo riscontrato un decremento dei livelli circolanti di PIVKA-II in pazienti con PDAC sottoposti a resezione chirurgica. Quindi, la produzione diretta di PIVKA-II nel tessuto di PDAC, è stata dimostrata mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta utilizzando un frammento biotico di un paziente della nostra casistica. Data la attuale scarsità di conoscenze del PIVKA-II nel PDAC, nel nostro progetto abbiamo voluto inoltre studiarne il ruolo e significato avvalendoci di un modello sperimentale in vitro. Per la prima volta abbiamo dimostrato, tramite immunofluorescenza indiretta, che PIVKA-II è espresso in diverse linee cellulari di PDAC, in particolare nelle Panc-1. Quindi, partendo dall'ipotesi di molteplici linee di evidenza che hanno individuato nell'elevata iperglicemia una caratteristica comune ad un'ampia parte di pazienti affetti da PDAC, abbiamo riscontrato (attraverso uno studio cinetico) come il glucosio induca il rilascio di PIVKA-II dalle Panc-1 in maniera dose-dipendente. Infine, in questo studio emerge anche un dato fondamentale per classificare un biomarcatore come precoce: come dimostrato tramite Western Blot, il rilascio del PIVKA nel sovrnatante delle cellule Panc-1 promosso dal glucosio è un evento che si verifica contemporaneamente all'attivazione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT), meccanismo biologico finemente regolato che svolge un ruolo importante nella progressione neoplastica. Il PDAC rappresenta ancora una grossa sfida sia per gli studi di ricerca che per la gestione clinica, ed il riconoscimento di un biomarcatore valido, adatto alla valutazione di routine clinica, a basso costo e con alta riproducibilità, che faciliti l'identificazione precoce del PDAC potrebbe incidere notevolmente sul management e la prognosi di tale neoplasia.

1. INTRODUZIONE

1.1 CARCINOMA PANCREATICO

1.1.1 Epidemiologia

Il carcinoma pancreatico è una delle patologie neoplastiche a prognosi più infausta, rappresenta la settima causa di morte per cancro nel mondo. Secondo le stime GLOBOCAN 2020, questa neoplasia presenta un numero di decessi ($n = 466.000$) comparabile al numero dei nuovi casi ($n = 496.000$) e, nonostante i miglioramenti nella diagnostica e nella clinica, il tasso di mortalità non è significativamente migliorato nel corso degli anni (1,2). Il tasso di incidenza corrisponde, all'incirca, al tasso di mortalità: ad un anno dalla diagnosi sopravvive circa il 20% dei pazienti e dopo cinque anni il tasso di sopravvivenza globale è $< 5\%$ (3,4). L'escissione chirurgica è l'unico potenziale trattamento curativo con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 20%: tuttavia a causa della mancanza di sintomi specifici e di strumenti di diagnosi precoce adeguati, nell'80% dei casi il tumore viene diagnosticato in uno stadio avanzato o metastatico, rendendo difficile anche l'approccio chirurgico (5). Inoltre, il rischio di recidiva sistemica può coinvolgere ~80% dei pazienti resecati con una sopravvivenza a 5 anni del 12–27% (6). Nel mondo, l'incidenza dei vari tipi di carcinoma pancreatico è generalmente più alta nei paesi sviluppati e fra gli individui di sesso maschile anche se l'andamento è in crescita per entrambi i sessi. La fascia di età di insorgenza è generalmente compresa tra la sesta e la settima decade di vita (2). In Italia sono circa 21.200 le persone con diagnosi di tumore del pancreas; il numero relativamente ristretto di persone affette da questa patologia (pari a meno dell'1% di tutti i pazienti oncologici) è dovuto alla sua alta letalità. Nel 2023, sono state stimate in Italia circa 14.800 nuove diagnosi (maschi = 6.800; femmine = 8.000) di carcinoma del pancreas, secondo le ultime stime AIRTUM (Associazione Italiana dei Registri Tumori) (Figura 1) (7).

Tipo/sede	Uomini	Donne	Totale
Tutti i tumori*	208	187	395
Mammella		55.9	55.9
Colon-Retto-Ano	26.8	23.7	50.5
Polmone	29.8	14.0	43.8
Prostata	41.1		41.1
Vescica	23.7	6.0	29.7
Stomaco	9.0	6.0	15.0
Pancreas	6.8	8.0	14.8
Linfomi non Hodgkin	8.1	6.3	14.4
Melanoma	7.0	5.7	12.7
Rene	7.9	4.8	12.7
Tiroide	3.5	8.7	12.2
Fegato	8.2	4.0	12.2
Endometrio		10.2	10.2
Leucemie, tutte	5.3	4.3	9.6

Figura 1: Numero stimato di nuovi casi di tumore maligno in Italia nel 2023 (x 1000), per tipo di tumore e sesso (7).

1.1.2 Eziologia e fattori di rischio

Le cause del carcinoma pancreatico sono poco conosciute, ma è noto che nella tumorigenesi sono coinvolte sia predisposizioni genetiche che fattori di rischio ambientali. Nel 5-10% dei pazienti affetti da carcinoma pancreatico è presente una familiarità con la patologia legata ad alterazioni della linea germinale (8) legate a sindromi predisponenti a diversi tipi di tumore e che possono essere causa sia di carcinoma pancreatico familiare che sporadico. La familiarità per carcinoma pancreatico sembrerebbe essere dovuta non solo alla componente genetica ma anche ad altri fattori di rischio che i membri della stessa famiglia condividono: i soggetti con storia familiare di neoplasia pancreatico hanno un rischio relativo di svilupparlo aumentato di 2, 6 e 30 volte rispetto alla popolazione generale, a seconda che i parenti affetti siano rispettivamente uno, due o tre (9). Suscettibilità ereditarie (2-5%) riconducibili a sindromi in cui sono state identificate mutazioni genetiche sono la poliposi adenomatosa familiare (FAP) e la sindrome di Lynch (7). Anche la presenza di varianti dei loci genomici dei gruppi sanguigni ABO (in particolare nei gruppi non 0) è stata correlata ad una maggiore tendenza a sviluppare tumori pancreatici, tuttavia l'esatto meccanismo che collega il carcinoma pancreatico ai gruppi sanguigni non è ancora noto (10). Oltre ai fattori genetici appena menzionati, esistono altri fattori di rischio predisponenti allo sviluppo di neoplasia in sede pancreatico. Numerosi studi indicano che alcuni aspetti nutrizionali e dietetici possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie al pancreas e per il cancro in generale: eccessivo consumo di carni rosse e di insaccati, farine e zuccheri raffinati, sovrappeso e ridotta attività fisica, fumo ed eccesso di alcool. Fattori di protezione sono rappresentati dal consumo di frutta e verdure, carboidrati non raffinati, vitamina D e calcio e dalla somministrazione di antinfiammatori non steroidei per lungo tempo (7). Il tabacco conferma avere un ruolo causativo per il tumore al pancreas ed il fumo di sigaretta, anche passivo, rappresenta il fattore di rischio più chiaramente associato allo sviluppo di tale neoplasia (11). Tra le patologie d'organo, la pancreatite cronica è considerata una condizione di rischio per questi tumori (fino a 10 volte e più rispetto alla popolazione generale), così come il diabete mellito (1,5-2 volte) e la pregressa gastrectomia (3-5 volte) (12). Nonostante il forte legame tra pancreatite cronica e cancro del pancreas, meno del 5% dei pazienti con pancreatite sviluppano il tumore (13). Per quanto riguarda il diabete, è importante differenziare il diabete di lunga durata dal diabete di nuova insorgenza; il primo, infatti sembra essere un fattore di rischio per il tumore del pancreas, mentre il secondo si è ipotizzato essere una manifestazione paraneoplastica del tumore stesso (14). Numerosi studi epidemiologici hanno mostrato un'associazione tra diabete mellito di tipo 2 di lunga data e carcinoma del pancreas (15). Altri fattori con il loro rischio relativo sono elencati nella figura 2, la quale suggerisce come il carcinoma pancreatico abbia un'eziologia multifattoriale: da una stima della percentuale della popolazione esposta a ciascun fattore di

rischio (basata sui rapporti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità) e l'entità dell'associazione, si è quantificata la percentuale di tumori pancreatici la cui eziologia è imputabile ad un determinato fattore. Si noti che alcuni dei fattori di rischio individuati sono correlati: la resistenza insulinica è associata all'obesità, ai

livelli di adiponectina, al diabete e alla sindrome metabolica, così come a fattori dietetici o a stili di vita (es: ridotta attività fisica).

Altri fattori, come i già menzionati tabacco, alcol, pancreatite, colecistectomia, ed infezione da *H. pylori* e virus epatitici sono noti trigger di infiammazione e rappresentano una via di sostentamento della carcinogenesi (16) (Figura 2).

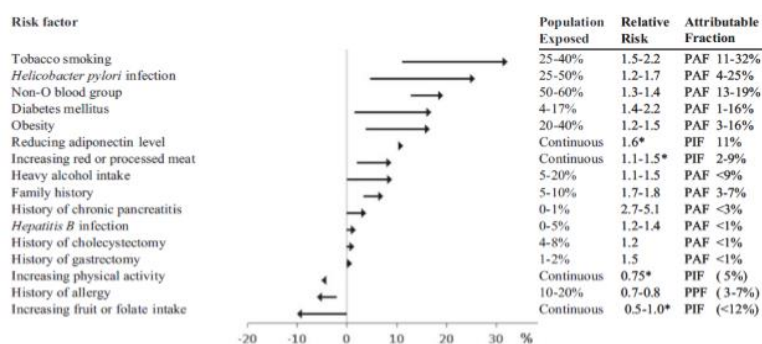


Figura 2: Tasso di mortalità europeo standardizzato per età nei due sessi dal quinquennio 1970-1974 al 2010-2014 e percentuali di predizione per il 2019 per sito tumorale in uomini (sinistra) e donne (destra) in Europa.

1.1.3 Classificazione istologica, grading e stadiazione

La classificazione istologica si basa sulla classificazione di riferimento dell'organizzazione mondiale della salute (WHO). Le neoplasie del pancreas vengono distinte in gruppi sulla base di: 1) aspetto macroscopico (intraduttale, solido, cistico); 2) linea di differenziazione cellulare (acinare, duttale, endocrina); 3) profilo immunofenotipico se la linea differenziativa della neoplasia non è chiara dall'aspetto istologico (tipicamente i tumori acinari sono caratterizzati dalla produzione di enzimi quali tripsina, chimotripsina; i duttali per la positività a MUC1 e alle citocheratine 7,8,18,19; i neuroendocrini sono positivi per cromogranina e sinaptofisina). La differenziazione di linea è l'elemento cruciale che determina sia le caratteristiche biologiche sia il comportamento clinico di una determinata neoplasia pancreatiche. I tumori dell'esocrino costituiscono circa il 95% dei tumori del pancreas. Lo schema classificativo OMS comprende sia entità rare che forme comuni e loro varianti, che non differiscono per trattamento e probabilmente prognosi. Semplificando la classificazione WHO, l'entità nosografiche possono essere ridotte a otto tipologie riportate in tabella 1 (17).

Entità nosografica	%
<i>Adenocarcinoma duttale</i>	80
<i>varianti del duttale</i>	5
<i>Cistoadenoma sieroso</i>	1
<i>Neoplasia mucinoso cistica</i>	1
<i>Neoplasia intraduttale</i>	5
<i>Carcinoma a cellule acinari</i>	1
<i>Pancreatoblastoma</i>	1
<i>Neoplasia solida-pseudopapillare</i>	1
<i>Neoplasie neuroendocrine</i>	5

Tabella 1: Classificazione istologica WHO del carcinoma pancreatico

Varianti dell'adenocarcinoma duttale sono: carcinoma adenosquamoso, colloide (adenocarcinoma mucinoso non cistico), epatoide, midollare, a cellule ad anello con castone, indifferenziato (anaplastico) e altre forme rarissime, tra cui casi eccezionali di carcinosarcoma in cui è istologicamente documentabile nel tumore una componente mesenchimale (18). Le neoplasie neuroendocrine del pancreas, indicate come Neuroendocrin Tumors (NET) sono invece un gruppo eterogeneo di lesioni che originano dalla componente endocrina della ghiandola pancreatica. La loro classificazione è basata sulle sostanze endocrine che la neoplasia è in grado o meno di secernere e vengono clinicamente distinte in due categorie: funzionanti o non funzionanti, in base alla produzione o meno di specifici ormoni e quindi associati o meno a determinati sintomi o sindromi correlate all'ormone prodotto in eccesso. I tumori neuroendocrini rappresentano appena il 3% di tutte le neoplasie del pancreas e la loro classificazione racchiude forme benigne, ben differenziate o a comportamento incerto (NET G1-G2) e forme maligne e scarsamente differenziate (NET-NEC G3) (19). Sono, inoltre, da ricordare carcinomi a differenziazione mista: carcinoma misto duttale-neuroendocrino, acinare-duttale, acinare-neuroendocrino-duttale (20).

La classificazione di malignità è basata su criteri citoarchitettonici e rappresenta un fattore prognostico essenziale e indipendente. La sua determinazione è stata codificata in G1, G2, G3 dalla classificazione WHO prendendo in considerazione l'aspetto cito-istologico e l'attività mitotica. Il grading della neoplasia, basato su criteri citoarchitettonici, prevede tre gradi. Per quanto riguarda la stadiazione esistono differenti sistemi ma il più diffuso è quello proposto dalla American Joint Committee on Cancer (AJCC) che utilizza i parametri del sistema internazionale TNM (Tumore/(linfo)Nodi/Metastasi) (2) (Figura 3).

A fianco della classificazione TNM, esiste una nomenclatura che viene utilizzata per identificare meglio il processo decisionale riguardante le opzioni di trattamento terapeutico e la prognosi.

Nella pratica clinica si definiscono dei criteri di resecabilità stabiliti dagli esami radiologici con identificazione di seguenti tre gruppi (indirettamente connessi allo status TNM): tumori locali o potenzialmente resecabili (circa il 20% delle diagnosi sono tumori candidabili a resezione chirurgica), tumori localmente avanzati o non resecabili (circa il 30% dei casi alla diagnosi), tumori metastatici che coprono il 50% delle diagnosi.

TNM classification 7th edition*	
Primary tumour (T)	
T0 = No evidence of primary tumour	
Tis = Carcinoma <i>in situ</i>	
T1 = Tumour limited to the pancreas, ≤ 2 cm in greatest dimension	
T2 = Tumour limited to the pancreas, > 2 cm in greatest dimension	
T3 = Tumour extends beyond the pancreas but without involvement of the coeliac axis or the superior mesenteric artery	
T4 = Tumour involves the coeliac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumour)	
Regional lymph nodes (N)	
NX = Regional lymph nodes cannot be assessed	
N0 = No regional lymph node metastasis	
N1 = Regional lymph node metastasis	
(A minimum number of 10 lymph nodes analysed is recommended.)	
M1	Distant metastasis

Figura 3: Classificazione TNM del carcinoma pancreatico (2).

1.2 ADENOCARCINOMA PANCREATICO (PDAC)

Nonostante le cellule duttali rappresentino solo il 20-30% del normale parenchima pancreatico, l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) costituisce il più comune (80-90%) tumore del pancreas. Nel contesto della neoplasia del pancreas parlare di tumore pancreatico significa, nella maggioranza dei casi, riferirsi all'adenocarcinoma duttale. Nelle casistiche autoptiche il 60-70% dei PDAC si localizza a livello della testa, il 10-15% a livello della coda, il 5-10% a livello del corpo mentre il 10% coinvolge tutta la ghiandola. Nelle casistiche cliniche si conferma la maggior incidenza delle lesioni cefalopancreatiche delle quali gran parte si ritrova a livello della porzione superiore in prossimità del decorso del dotto biliare, seguite dalle localizzazioni nella regione retro papillare ed infine al processo uncinato (5). L'aspetto macroscopico dell'adenocarcinoma è quello di una massa solida di consistenza dura a margini sfumati; al taglio presenta un colorito dal giallastro al brunastro, raramente sono presenti aree emorragiche o necrotiche, ma possono essere presenti aree microcistiche indicative di un tumore ben differenziato. Nei campioni chirurgici, le dimensioni sono comprese tra i 1,5 e i 5 cm, con un diametro medio di 2,5-3,5 cm. I carcinomi del corpo-coda sono solitamente più larghi alla diagnosi. Tumori con diametro inferiore ai 2 cm sono poco frequenti e solitamente coincidenti con gli incidentalomi (20).

L'aspetto microscopico più comune è quello di una struttura ghiandolare ricoperta da epitelio che, pur avendo diversi gradi di atipia, rispetta le normali caratteristiche dell'epitelio colonnare dei dotti pancreatici. La componente epiteliale è immersa in una marcata componente fibrotica (reazione desmoplastica) e l'infiltrazione neoplastica degli spazi perineurali è molto frequente (70-88% dei casi) (21). La presenza di un carcinoma *in situ*, nelle immediate vicinanze di un carcinoma invasivo, è stata riportata in una percentuale superiore al 24% e la presenza di foci multicentrici di carcinoma pancreatico invasivo primitivo in letteratura varia dallo 0% al 40% (22). La diffusione linfatica è più precoce di quella ematica che coinvolge fegato, polmone, surrene, rene, ossa, cervello e cute (23).

1.2.1 Oncogenesi del PDAC

Il PDAC origina dalle cellule dell'epitelio duttale, evolvendo da lesioni premaligne a carcinoma invasivo. La progressione neoplastica del PDAC nel pancreas è un processo graduale e dalle alterazioni precancerose al carcinoma invasivo intercorre circa un decennio, con un'importante opportunità di diagnosi precoce e un notevole impulso alla ricerca dei cambiamenti genetici che avvengono nelle cellule pancreatiche duttali delle lesioni precancerose prima che acquisiscano invasività.

In base a numerosi studi è emerso che il carcinoma pancreatico si sviluppa a partire da tre diversi precursori: neoplasia intraepiteliale pancreatico (PanIn); neoplasia intraduttale mucinosa papillare (IPMN); neoplasia cistica mucinosa (MCN) (24).

La maggioranza dei PDAC origina dalle lesioni PanIN, mentre sporadicamente dalle neoplasie IPMN e MCN. Le PanIN sono lesioni microscopiche (inferiori a 5 mm) dei dotti pancreatici più piccoli; possono essere papillari o piane e sono composte da cellule cuboidali o colonnari con varie quantità di mucina (25,26). Le lesioni PanIN sono suddivise in PanIN-1, PanIN-2 e PanIN-3 in base al grado di atipia architetturale e citologica. Nel tempo, le lesioni accumulano una serie di mutazioni genetiche che progrediscono verso una forma displastica (Figura 4). L'utilizzo di tecnologie quali NGS (Next Generation Sequencing) e della bioinformatica, hanno fornito conoscenze più approfondite circa le alterazioni genetiche che sono alla base della genesi e della progressione del cancro del pancreas, permettendo di identificare molti dei geni coinvolti, le relative modulazioni dell'espressione genica così come anche la presenza di aberrazioni cromosomiche, riarrangiamenti e alterazioni epigenetiche. Circa il 90% dei tumori del pancreas di tutti i gradi mostrano la mutazione del gene KRAS, l'oncogene virale del sarcoma di ratto di Kirsten attivante. La mutazione di questo gene, è considerato un evento precoce nel processo di tumorigenesi che porta ad un aumento della proliferazione, del differenziamento e della sopravvivenza delle cellule tumorali. A livello molecolare è noto che le mutazioni KRAS osservate, compromettono la funzionalità di un gruppo di enzimi, le GTPasi, il cui compito è

idrolizzare il GTP (guanositri-fosfato), bloccandole nella forma inattiva. Questi enzimi sono generalmente in forma attiva quando legano il nucleoside trifosfato (GTP) e in forma inattiva se legano il nucleoside difosfato (GDP). Per questa ragione sono spesso considerati degli interruttori molecolari, rendendoli particolarmente utili all'interno di una cellula come regolatori. Queste osservazioni sono supportate da diversi studi clinici al punto che si è pensato che le mutazioni KRAS potessero rappresentare un marcatore delle forme più aggressive con prognosi infausta del carcinoma epatico (27). Tuttavia, è noto che le diverse mutazioni di KRAS influenzano diverse vie di segnalazione, portando a distinte conseguenze funzionali. E' stato infatti dimostrato che nel tumore del pancreas i pazienti con una mutazione di KRAS nel codone 61 mostrano una ridotta attivazione della chinasi regolata dal segnale (ERK) e con una prognosi significativamente migliore. Quindi, risulta evidente che la mutazione KRAS sembra essere un evento necessario ma non sufficiente per sviluppare un carcinoma del pancreas. Nel 50–74% dei tumori del pancreas sono state inoltre riscontrate mutazioni inattivanti dell'oncosoppressore TP53. L'inattivazione di questo gene altera i normali meccanismi di riparazione del danno al DNA e provoca l'arresto del ciclo cellulare. In questo modo le cellule danneggiate superano il checkpoint del ciclo cellulare eludendo i segnali apoptotici (18). Anche il gene CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), può essere alterato nel carcinoma pancreatico. La mutazione in questo gene determina una perdita di regolazione dei checkpoint del ciclo cellulare mediati dalle chinasi ciclina dipendente (CDK) 4 e CDK6. In questo caso, la deregolazione del ciclo cellulare e la successiva cancerogenesi sono state rilevate nel 46-60% circa dei tumori del pancreas. Le mutazioni SMAD4, presenti nel 31-38% dei tumori pancreatici, sono più frequenti negli ultimi stadi della cancerogenesi del pancreas. La perdita della funzionalità di SMAD4 causata da delezione o mutazione omozigote porta all'aumento di TGF- β attraverso una via non canonica con un aumento della risposta pro-tumorigenica. Studi recenti, hanno evidenziato che anche la mutazione dell'oncosoppressore BRCA2, che di norma è associata con il carcinoma ereditario della mammella e dell'ovaio, si riscontra nel 7-10% dei pazienti con adenocarcinoma duttale.

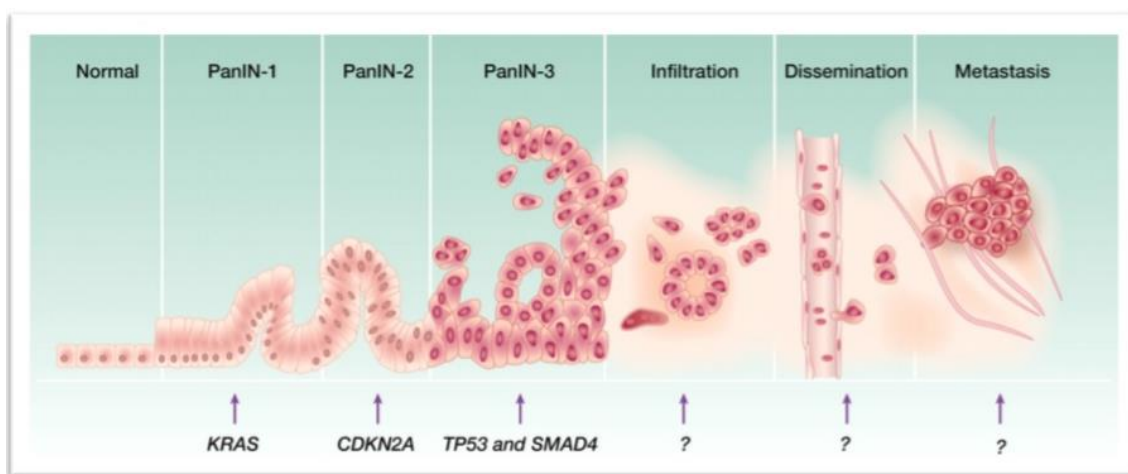


Figura 4: Diverse fasi dell' oncogenesi del carcinoma pancreatico

1.2.2 Gestione Clinica: diagnosi e trattamento

Il carcinoma pancreatico, spesso definito il "killer silenzioso", come già accennato in precedenza, è caratterizzato dalla diagnosi tardiva per mancanza di sintomi specifici precoci, dall'assenza di approcci terapeutici efficaci e da una prognosi infausta. Nelle prime fasi della sua progressione tumorale è solitamente silente e la malattia diventa evidente solamente dopo che il tumore ha invaso i tessuti circostanti o ha metastatizzato in altri organi, pertanto nella maggior parte dei pazienti, la patologia viene diagnosticata in uno stadio già avanzato e ciò contribuisce significativamente al suo elevato tasso di mortalità. In meno del 20% dei casi si presenta come un tumore localizzato e potenzialmente curabile. La diagnosi di tumore del pancreas è solitamente un sospetto che insorge sulla base della storia clinica del paziente ma è sostenuta da pochi segni confirmatori. I sintomi sono dolore addominale o della schiena, ittero, perdita di appetito con perdita di peso involontaria e cachessia. Ad oggi non esiste un programma di screening né un programma di sorveglianza per la diagnosi precoce del carcinoma del pancreas. Le tecniche di diagnostica per immagini rappresentano l'unico strumento utile a definirne la localizzazione, l'estensione della massa e determinarne la stadiazione clinica (2). Inoltre, l'importanza della diagnosi è riconducibile non solo alla definizione della presenza di un tumore pancreatico ma anche al problema di un corretto giudizio di reseccabilità al fine di definire il percorso terapeutico appropriato. Fino a quando non saranno scoperti marcatori diagnostici molecolari più sensibili e più specifici i clinici dovranno fare affidamento alla combinazione delle analisi di diagnostica per immagini, citologia e ai biomarcatori circolanti disponibili per diagnosticare i carcinomi pancreatici.

La tecnica di imaging di primo livello, utilizzata normalmente in primo impiego in un paziente che esordisce con ittero, è l'ecografia dell'addome con una sensibilità del 75-89% e una specificità del 90-99% in presenza di dotti biliari dilatati e di una massa visibile a livello della testa del pancreas. La limitazione di questa tecnica è la sua dipendenza dall'esperienza dell'operatore, dalla costituzione del paziente e dalla dimensione del tumore: risulta essere una tecnica poco oggettiva con forti limiti per la stadiazione e la valutazione di reseccabilità. La TAC (tomografia assiale computerizzata) ha una maggiore sensibilità rispetto all'ecografia e una simile specificità per quanto riguarda l'individuazione del tumore del pancreas; è molto utile nei casi in cui il paziente non presenti ittero o si abbia una limitazione della visibilità dell'ecografia a causa di meteorismo e permette inoltre l'individuazione della presenza di eventuali metastasi a distanza al fegato o ai linfonodi. I vantaggi della RM (risonanza magnetica) sono rappresentati dall'eccellente contrasto dato dal grasso peripancreatico, dalla evidenziazione dei vasi anche in assenza di mezzi di contrasto e dall'assenza di radiazioni; la scelta tra TC e RM in realtà dipende dall'esperienza dei vari centri e dalle preferenze del clinico verso l'una o l'altra metodica. L'ERCP (colangiopancreatografia retrograda endoscopica) è considerata l'indagine con più alta sensibilità perché è in grado di rilevare alterazioni anche minime del decorso e del calibro del dotto di

Wirsung ma, la sua non idoneità alla stadiazione e l'invasività intrinseca alla metodica non scevra da complicanze, hanno molto ridimensionato il suo ruolo nella diagnosi di tumore del pancreas. Un buon compromesso tecnologico tra l'approccio endoscopico e la rilevazione ecografica è l'ecografia endoscopica o ecoendoscopia (EUS); risulta utile nell'identificare tumori di piccole dimensioni che possono sfuggire all'ecografia trans-parietale e alla TC, presenta una bassa percentuale di complicanze e in centri di riferimento risulta possedere una maggiore sensibilità e specificità se confrontata con tutte le altre metodiche. A questa tecnica di imaging può inoltre essere associata una biopsia ecoendo-guidata che aumenta notevolmente l'accuratezza diagnostica. Un' ulteriore possibilità nell'imaging del pancreas è l'utilizzo della PET; è una metodica molto sensibile e specifica, è in grado di distinguere una pancreatite cronica da un tumore del pancreas nella maggioranza dei casi. Nella realtà è una tecnica che viene prevalentemente utilizzata per la stadiazione, nella valutazione della risposta ai trattamenti chemioterapici e per la ricerca di eventuali recidive qualora vi sia un sospetto di ripresa con la negatività di TC o RM (8). Nonostante le terapie sistemiche adiuvanti, la maggior parte dei pazienti presenta recidive, questo fa sì che la sopravvivenza a 5 anni nei pazienti sia minore del 5%. Circa il 20% dei pazienti è candidabile a una chirurgia radicale con intento "curativo" (con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 20%) (28). Nei pazienti sottoposti a chirurgia la chemioterapia adiuvante con 5-fluorouracile/ acido folinico o gemcitabina migliora la sopravvivenza globale rispetto alla sola chirurgia. Nel trattamento adiuvante la gemcitabina presenta gli stessi risultati in sopravvivenza globale del 5-fluorouracile/acido folinico. Il regime gemcitabina/capecitabina confrontato con la sola gemcitabina ha evidenziato un vantaggio in sopravvivenza anche se con limiti metodologici e di follow up dello studio. Un vantaggio in terapia adiuvante, sia in sopravvivenza libera da malattia che in sopravvivenza globale, è stato riportato per il regime a 3 farmaci contenente 5-fluorouracile/acido folinico, oxaliplatino e irinotecan (FOLFIRINOX) quando confrontato con la sola gemcitabina, presentando tuttavia questo regime una maggiore tossicità.

Il regime nab-paclitaxel/ gemcitabina in confronto con la sola gemcitabina nella terapia adiuvante del carcinoma del pancreas non ha raggiunto l'end point primario dello studio in sopravvivenza libera da malattia. L'efficacia della radiochemioterapia post-operatoria appare limitata ai pazienti con chirurgia non radicale.

Nella malattia localmente avanzata (borderline o non resecabile) il trattamento neoadiuvante con il regime FOLFIRINOX e nab-paclitaxel/gemcitabina o la chemioradioterapia possono essere seguite da chirurgia per i casi che raggiungono l'operabilità, e da chemioterapia e chemioradioterapia post-chirurgica.

Nella malattia metastatica è indicata la chemioterapia con intento palliativo, ed il farmaco che per lungo tempo ha rappresentato il trattamento di riferimento è stato la gemcitabina, con un beneficio

clinico e una sopravvivenza mediana di circa 6 mesi, e con questo farmaco, che rappresenta ancora il trattamento per i pazienti non suscettibili di una terapia di combinazione a più farmaci, si sono confrontati diversi regimi di chemioterapia. Sia il regime FOLFIRINOX che l'associazione di nab-paclitaxel/ gemcitabina hanno dimostrato un vantaggio significativo rispetto alla gemcitabina in risposte obiettive, sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale. Nei pazienti con mutazioni dei geni BRACA-1 e BRACA-2 (circa il 4-7%) che hanno ottenuto un controllo di malattia con un regime di chemioterapia contenente un composto del platino (FOLFIRINOX, cisplatino/gemcitabina), la somministrazione come terapia di mantenimento del farmaco PARP inibitore olaparib determina un aumento della sopravvivenza libera da progressione (al momento della stesura del volume, questo farmaco non è rimborsato dal Servizio Sanitario Nazionale). Nella popolazione KRASwt, che rappresenta circa il 10-15% degli adenocarcinomi del pancreas, un vantaggio in sopravvivenza è stato riportato della combinazione nimotuzumab, un anticorpo antiEGFR, e gemcitabina rispetto alla sola chemioterapia. Nei pazienti con mutazione di KRASG12C, che rappresentano circa il 2% degli adenocarcinomi del pancreas, l'adagrasib, un inibitore tirosinchinasico irreversibile e specifico, ha dimostrato una promettente attività (al momento della stesura del volume, questi farmaci non sono rimborsati dal Servizio Sanitario Nazionale) (7).

1.3 BIOMARCATORI CIRCOLANTI NEL CARCINOMA PANCREATICO

Negli ultimi anni, il ruolo dei biomarcatori circolanti nella gestione del paziente oncologico sta diventando sempre più importante, anche in virtù del fatto che rappresentano uno strumento utile ed economico per la loro praticità di analisi, data la disponibilità e sicurezza del prelievo venoso; inoltre sono la modalità più rapida per fare screening su larga scala. Tuttavia, l'utilizzo clinico ed i conseguenti benefici di questo strumento diagnostico sono ancora oggi molto limitati per quanto concerne il carcinoma pancreatico rispetto ad altre neoplasie solide. Inoltre, a causa delle performance diagnostiche non ottimali dei marcatori tumorali già in uso per tale patologia, c'è un continuo stimolo nel ricercare nuovi biomarcatori con maggiori sensibilità e specificità. I biomarcatori tumorali sierici attualmente impiegati nella diagnosi e follow-up del carcinoma pancreatico sono CA19-9, CA242 e CEA la cui determinazione quantitativa viene eseguita mediante l'impiego di metodiche immunometriche. (29). Il marcatore tumorale più utilizzato e raccomandato dalle linee guida per il carcinoma pancreatico è sicuramente il CA19-9, un antigene carboidrato tumore associato che ha come epitopo una forma sialilata dell'antigene Lewis a (sialil Lea) del sistema gruppo ematico di Lewis. Gli individui che sono fenotipicamente negativi per il Lewis (non hanno l'enzima Lewis fucosiltransferasi), il 5-10 % circa della popolazione, sono incapaci di sintetizzarlo e questo giustifica i falsi negativi (per il tumore pancreatico) riscontrabili

nei soggetti Lewis negativi (30). Il CA19-9, sintetizzato dalle cellule duttali pancreatiche e biliari e dagli epitelii gastrico, colico, endometriale e salivare, è normalmente presente nel sangue in quantità minime.

In corso di patologia neoplastica, le alterazioni di alcuni processi che regolano la produzione ed il passaggio in circolo delle mucine determinano un aumento dei suoi livelli sierici. La sensibilità per il test di misurazione del CA19-9 è riportata essere nell'intervallo dal 70% al 95% con una specificità compresa tra il 72% e il 90% (31). Riduzioni dei valori di CA19-9 nel post-operatorio rispetto ai valori alla diagnosi di carcinoma del pancreas sono un fattore predittivo importante per la prognosi a lungo termine del paziente (32). Recenti studi, tuttavia, hanno evidenziato i limiti del CA 19.9, che risulta alterato in pazienti affetti da patologie benigne come: ostruzioni biliari, pancreatiti croniche e ittero non maligno; viceversa, non tutti i pazienti affetti da carcinoma pancreatico hanno un elevato CA19-9; questa caratteristica ne riduce fortemente l'accuratezza diagnostica (33). Pur essendo correntemente il marcatore sierico gold standard nel carcinoma pancreatico, il CA 19.9 non è tuttavia approvato per lo screening a causa delle non ottimali specificità e sensibilità. Il CA 242 è una glicoproteina con struttura sialilata carboidrata che nella pratica clinica è utilizzato come supporto alla diagnosi di pazienti con accertato o sospetto carcinoma gastro-intestinale e sembra rivestire un ruolo importante nella diagnosi differenziale nelle lesioni pancreatiche, poiché le sue concentrazioni sono state significativamente associate con la diagnosi di carcinoma pancreatico (34). Alcuni studi hanno dimostrato che nel carcinoma pancreatico il CA242 presenti una buona specificità, non essendo marcatamente influenzato da eventuali patologie benigne come pancreatiti acute, ma una sensibilità limitata (33). Il CEA è il marcatore tumorale in assoluto più conosciuto e utilizzato per la diagnosi ed il monitoraggio di diverse neoplasie dell'apparato gastrointestinale (28), compreso il carcinoma pancreatico, tuttavia i meccanismi biologici e fisiopatologici della relazione tra CEA e carcinoma pancreatico non sono ancora determinati e sembrano di natura aspecifica poiché l'elevazione del CEA è stata riportata anche in altri differenti adenocarcinomi gastrointestinali come quello gastrico e soprattutto nel carcinoma del colon retto (35). False positività del CEA test possono essere dovute inoltre ad abitudini voluttuarie (forti fumatori), alla presenza di malattie croniche intestinali (poliposi e diverticoliti) od epatiche, alla presenza di infiammazioni o infezioni (32).

1.4 PIVKA-II

La protrombina indotta da assenza di vitamina K-II (PIVKA-II) conosciuta anche come des-gamma-carbossi-protrombina (DCP), è un precursore inattivo della protrombina fattore della coagulazione sintetizzato nel fegato secondo meccanismi vitamina k-dipendenti, La differenza che intercorre tra protrombina normale e la DCP, che possiamo definire come una protrombina anomala che ha perso la sua capacità di interagire con gli altri fattori della coagulazione, risiede nella composizione dei residui amminoacidici (Figura 5).

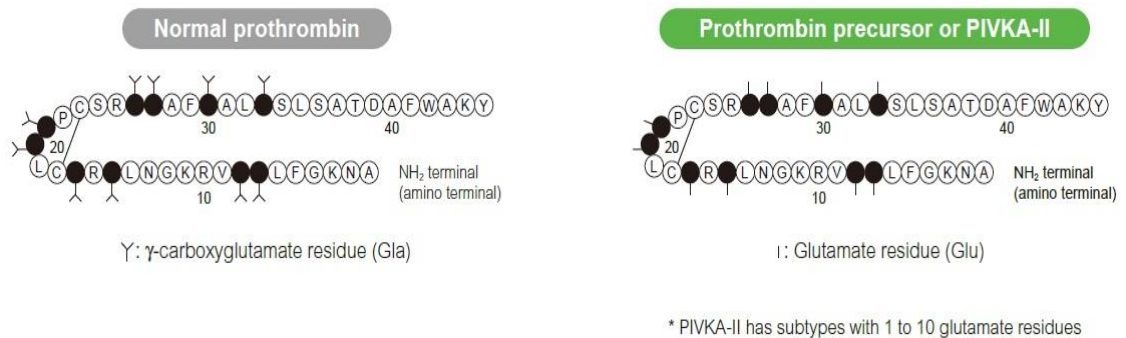


Figura 5: Differenze strutturali tra una normale protrombina funzionante e la proteina PIVKA-II

La protrombina ha al dominio N-terminale 10 Gla (acidi glutammici γ carbossilati) mancanti invece nella DCP, dovuti all' assenza di vitamina K che catalizza le reazioni di trasformazione da parte della γ - glutamil-carbossilasi (64) (Figura 6). Il precursore della protrombina ha 10 residui di Acido Glutammico nel dominio N-terminale che, normalmente, devono essere carbossilati ad acido gamma carbossilglutammico in un processo mediato dagli ioni calcio.

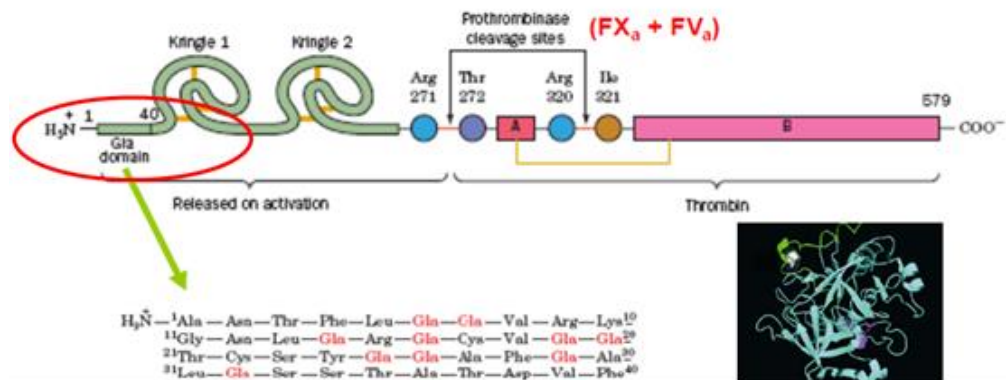


Figura 6: Struttura molecolare di PIVKA-II

La struttura del PIVKA-II è formata da 5 residui di acido-gamma-carbossi-glutammico in meno rispetto alla protrombina nativa. Si ipotizza che il PIVKA-II derivi da un difetto acquisito nella

carbossilazione post-traslazionale del precursore della protrombina, vitamina K dipendente, o da una eccessiva produzione del precursore stesso, piuttosto che da un difetto intrinseco nella carbossilazione (36).

Il rilascio di PIVKA-II da parte del fegato è un indice di diminuita carbossilazione della protrombina, ed elevati livelli di PIVKA-II corrispondono ad uno stato carenziale di vitamina K, sia esso congenito od acquisito (ad esempio avitaminosi K o trattamento prolungato con anticoagulanti orali). La vitamina K è essenziale non strettamente per la sintesi epatica di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX e X) e di due glicoproteine, le proteine C ed S con attività anticoagulante, quanto per “completare” la loro struttura mediante l’aggiunta di un carbossile, dopo che la sintesi epatica della proteina è già stata completata. La vitamina K, infatti, interferisce nella via sintetica di questi fattori a livello della carbossilazione dei loro residui di acido glutammico ad acido γ -carbossi-glutammico, che avviene ad opera di una carbossilasi vitamina K-dipendente (Figura 7). La vitamina K sotto forma ridotta (idrochinonica) è il cofattore dell’enzima che catalizza la reazione di carbossilazione dell’acido glutammico per formare l’amminoacido γ carbossiglutammico (Gla). Durante questo processo la forma idrochinonica (KH₂) è convertita in epossido da cui la vitamina K è rigenerata. Ciò fa sì che possano venir rese attive alcune proteine quali la protrombina ed i fattori VII, IX e X della coagulazione, le proteine C, M, S, Z plasmatiche, l’osteocalcina e la proteina Gla della matrice a livello dell’osso. Alcuni farmaci anticoagulanti (come la warfarina) svolgono la loro azione andando ad inibire le reductasi, bloccando la formazione della forma KH₂ e determinando una diminuzione di alcuni fattori della coagulazione. In assenza di questa vitamina i fattori continuano ad essere sintetizzati e conservano le loro proprietà immunologiche, ma sono biologicamente inattivi e sono denominati PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence). La presenza dei residui γ -carbossi-glutammici, infatti, è necessaria per il legame di queste proteine agli ioni calcio ed ai fosfolipidi di membrana, condizione fondamentale per un ottimale orientamento della loro attività proteasica. La vitamina K, pur essendo classificata come liposolubile, si comporta alla stregua delle idrosolubili, rappresentando un fattore vitale indispensabile per qualsiasi sistema cellulare. La scoperta della vitamina K origina da alcuni esperimenti sul metabolismo degli steroli effettuati dal biochimico danese Henrik Dam a partire dal 1929. In questi esperimenti si osservò come galline alimentate con una dieta priva di grassi e colesterolo sviluppavano emorragie sottocutanee e muscolari (37). Queste osservazioni portarono ad ipotizzare l’esistenza di un composto liposolubile diverso dalle altre vitamine liposolubili. In un articolo del 1935 Dam propose di nominare tale composto come vitamina K dalla prima lettera della parola “Koagulation” (coagulazione in danese). La sintesi della molecola risale invece al 1939 ad opera di Edward Doisy seguita, l’anno successivo dalla scoperta della struttura molecolare sempre ad opera del gruppo di Doisy (38).

Nel 1943, sia Dam che Doisy vinsero per le loro scoperte, il premio Nobel per la fisiologia e medicina (39). La Vitamina K è una molecola liposolubile presente in natura in diverse forme:

K1, nota come fillochinone (2-metil-3-fetil-1,4-naftochinone), proveniente da alimenti di origine vegetale e animale; K2, o menachinone, sintetizzata dalla flora batterica, in particolare da alcune specie di Escherichia (p.e. E. Coli), presente nel tessuto epatico.

Differisce dal fillochinone per un'unità isoprenica nella catena laterale in posizione 3'; MK4-MK10 o menachinoni primari contengono rispettivamente 4-10 unità isoprenoidi sul lato della catena rispettivamente.; K3 o menadione (2-metil-1,4-naftochinone), anello comune a tutte le forme di vitamina K, funge da cofattore enzimatico nella prevenzione del deficit di vitamina K subclinico, ed è stato identificato come metabolita della vitamina K formato durante l'assorbimento (40).

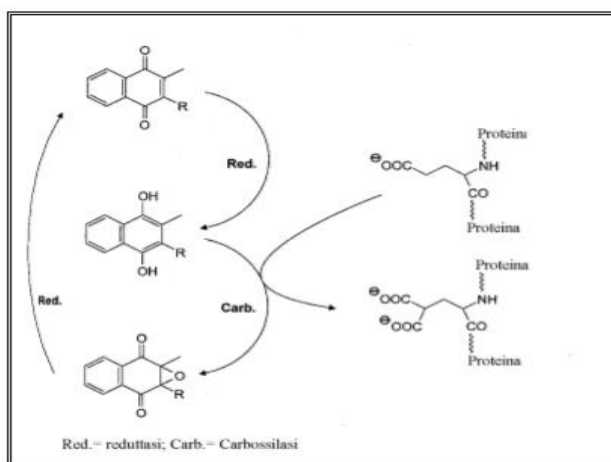


Figura 7: meccanismo di azione della vitamina K nella carbossilazione delle proteine vitamina K-dipendenti (40).

La vitamina K1 si trova nei vegetali a foglia verde come broccoli e spinaci, ma è presente in discreta quantità anche nella margarina e nel fegato ed in alcuni olii vegetali quali olio di oliva, di soia e di canola. L'MK4 deriva da alimenti di origine animale e dalla conversione diretta a partire dal fillochinone assunto con la dieta. I menachinoni da MK4 a MK9 si trovano in piccole dosi negli alimenti di origine animale e in alcuni formaggi. L'apporto medio di vitamina K stimato è 90µg/die per le donne e 120 µg/die negli uomini (41) basandosi sulle medie di assunzione giornaliera. Ad oggi non sono ancora note le conseguenze a lungo termine di una deficienza di vitamina K, e la mancanza di precise conoscenze riguardo gli effetti della vitamina K sulla fisiologia umana al di là della coagulazione, rende estremamente complessa la definizione di raccomandazioni dietetiche (40). Una barriera per guadagnare una migliore comprensione delle funzioni della vitamina K è nello sviluppo dei metodi di misura della vitamina K che è stata l'ultima delle 4 vitamine liposolubili per quanto riguarda la misurazione dei livelli esogeni.

Il grado di questa sfida analitica è una conseguenza del fatto che la vitamina K è la più lipofila e la meno abbondante delle altre liposolubili. Queste proprietà non si coniugano facilmente con

lo sviluppo di una metodica di analisi adatta per le attuali piattaforme automatizzate di chimica clinica della generazione attuale (41). Lo stato nutrizionale di Vitamina K può essere determinato sia misurando direttamente la vitamina K nel plasma sia con test funzionali di misura indiretta, come il tempo di protrombina (PT) o attraverso la misura di proteine decarbossilate come l'osteopontina o la matrix Gla protein (MGP) ed il PIVKA-II. La vitamina K è una molecola con caratteristiche non polari e i lipidi, in particolare i trigliceridi, interferiscono con la sua misura diretta nel plasma: la preparazione dei campioni per il dosaggio della vitamina K rimane un processo indaginoso e richiede laboratori altamente specializzati. Non necessariamente, inoltre, il dosaggio diretto della quantità di vitamina K nel plasma è da ritenersi migliore rispetto alla determinazione indiretta dei livelli di vitamina K e la misura delle frazioni decarbossilate delle proteine vitamina K potrebbe quindi rappresentare meglio lo stato funzionale della vitamina.

Il PT, infatti, non risulta essere abbastanza affidabile come indicatore di deficit di Vitamina K, perché aumenta quando il livello dei fattori della coagulazione è già diminuito del 30-40%. PIVKA-II invece è considerato il miglior marcatore di deficit subclinico di vitamina K, poiché la sua presenza in circolo, anche in assenza di alterazione dei test di coagulazione o sintomatologia emorragica, è comunque un segno di deficit moderato di vitamina K (42,43). Come biomarcatore dello stato carenziale di vitamina K, inoltre, il PIVKA-II ha il vantaggio, rispetto ad altre misurazioni indirette, di essere indipendente dalla funzione renale e dal profilo lipidico del paziente (Figura 8).

Methods	Main characteristics
Indirect methods	
Prothrombin time	Cannot be used as a reliable indicator of vitamin K status
Undercarboxylated osteocalcin (ucOC) or matrix Gla protein (ucMGP)	Vitamin K deficiency is associated with reduced carboxylation of vitamin K dependent proteins and higher levels of ucOC and ucMGP. Vitamin D regulates osteocalcin gene expression
PIVKA-II	Elevated in vitamin K deficiency
Urinary vitamin K metabolites (7C-aglycone and 5C-aglycone)	Vitamin K metabolites mainly tested in pediatric population
Direct methods	
High-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection	Lower sensitivity and selectivity
HPLC with fluorescence detection	Provides greater sensitivity and selectivity than UV detection. Most common method used in laboratories
HPLC with electrochemical detection (ECD)	Post-column reduction is used to convert the quinone structure of vitamin K in the corresponding hydroquinones, measured in oxidation mode
Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-APCI-MS/MS)	Provides higher sensitivity and selectivity in comparison with other techniques

Figura 8: Metodi diretti e indiretti di misurazione dei livelli di vitamina K

1.4.1 Carenza di vitamina K in oncologia e nel carcinoma pancreatico

Il ruolo maggiormente studiato della vitamina K è rappresentato dall'azione essenziale che questa esercita nel metabolismo post-trascrizionale di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX, X e in parte anche le proteine C e S) (44). A livello molecolare la funzione della vitamina K è quella di fungere da cofattore della reazione di γ -glutammina-carbossilazione. In questa reazione K

dipendente, infatti i residui di glutammato di alcuni fattori della coagulazione sono convertiti in residui di γ -glutammato, da qui il nome di proteine dipendenti dalla vitamina K (VKDP). Per poter fungere da cofattore, la vitamina K è prima ridotta nella forma attiva di idrochinone (KH₂) tramite la chinone reduttasi. Successivamente l'enzima γ -glutammilcarbossilasi ossida l'idrochinone a vitamina K epossido (KO). La vitamina K epossido è a sua volta riciclata dall'enzima microsomiale vitamina K epossido reduttasi, prima a vitamina K, poi a idrochinone. Questo ciclo è noto come il "ciclo della vitamina K-epossido" (45).

Attraverso questo ciclo di recupero una molecola di vitamina K è in grado di carbossilare intorno a 500 residui di glutammato (46) I farmaci dicumarolici inibiscono la γ -carbossilazione impedendo la conversione della vitamina nella sua forma attiva, l'idrochinone. Anche se la maggior parte dei meccanismi fisiologici a livello dei quali si osserva la partecipazione della vitamina K al di là della coagulazione (45-46) e del metabolismo osseo (40) rimangono poco conosciuti, numerosi studi dimostrano un crescente interesse della comunità scientifica riguardo al ruolo che la vitamina K ricopre in campo oncologico (Figura 9).

-
- Regulation of blood coagulation activity
 - Bone protection; prevention of osteoporosis and bone fracture
 - Prevention of vascular calcifications
 - Prevention of cancer
 - Prevention of inflammation
-

Figura 9: Principali funzioni della vitamina K

Già nei primi anni 90 è stato riscontrato un forte interesse nella connessione tra micronutrienti e carcinogenesi ed uno studio cinese ha riportato una diminuzione della mortalità cancro-relata dopo due anni di supplementazione vitaminica (47). In seguito, sono stati condotti diversi trials clinici volti a chiarire la relazione l'apporto dietetico di vitamina K e cancro che hanno dimostrato che sia il fillochinone, ma soprattutto il menachinone erano associati ad un diminuito rischio di sviluppare una neoplasia e alla mortalità cancro correlata (48,49). Inoltre, la vitamina K₂ è stata inversamente associata all'incidenza di neoplasia negli uomini (50). Parallelamente sono stati condotti numerosi studi in vitro per indagare i meccanismi alla base dell'attività anticarcinogenica della vitamina K: (Figura 10) già nel 1991 studi in vitro dimostrarono che il menadione possedeva un vasto spettro di attività antitumorale e successivamente è stato confermato che tale proprietà appartiene anche alla K₁, K₂ ed in particolare K₃. Alla luce di questi diversi ampi studi di popolazione che hanno stabilito una correlazione tra l'intake di vitamina K e la mortalità per neoplasia (50). La citotossicità della vitamina K verso le cellule tumorali è stata in seguito maggiormente delineata: sono stati descritti vari meccanismi responsabili di arresto della crescita cellulare e soppressione della proliferazione neoplastica da parte della vitamina K, e la maggior

parte di essi hanno riconosciuto un'attività di questo composto nella modulazione del bilancio ossidoriduttivo e nell'induzione di stress ossidativo nelle cellule tumorali dovuto alla sua struttura chinonica (51). Altri studi hanno suggerito che la vitamina K potesse indurre apoptosi attraverso differenti pathways biochimici, includendo l'alterazione dell'omeostasi intracellulare del calcio e l'attivazione di fattori proapoptotici: chinasi c-Jun N terminali(JNKs), pathway Fas-dipendenti and Fas-indipendenti e il fattore nucleare kb(NFKB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (52, 53). La proprietà della vitamina K di indurre arresto del ciclo cellulare e morte cellulare può essere anche spiegata attraverso l'inibizione di CDK (cyclin-dependent protein kinases) (54). La maggior parte dei fattori proapoptotici indotti dalla vitamina K sono segnali infiammatori, inclusi la sovrapproduzione di ROS (soprattutto l'idroperossido) e lo stress ossidativo prodotto nelle cellule cancerose (55).

I dati in letteratura suggeriscono anche che la vitamina K riduce nel tessuto tumorale i livelli di superossido, glutatione e NAD(P)H che sono essenziali per l'omeostasi e la sopravvivenza ipossica delle cellule cancerose.



Figura 10: Effetti antitumorali della vitamina K

Studi in vivo e in vitro hanno suggerito che l'attività antitumorale della vitamina K avviene non solo con meccanismi diretti ma anche indirettamente attraverso l'attivazione post traslazionale delle proteine Gla come, ad esempio, il PIVKA-II (50).

Per quanto riguarda il carcinoma del pancreas, diversi studi hanno valutato recentemente il ruolo della vitamina K nel contrastare l'oncogenesi del carcinoma pancreatico ed è stato confermato che l'apoptosi è il principale meccanismo coinvolto nella morte delle cellule neoplastiche indotta dalla vitamina K.

È stato inoltre dimostrato che la vitamina K causa apoptosi delle cellule di carcinoma pancreatico sia attraverso un meccanismo caspasi-dipendente e l'induzione della fosforilazione di ERK, sia attraverso l'aumento del calcio intracellulare, ROS e wild type p 53(56). In uno studio del 2003

le vitamine K1 e K2 sono state utilizzate diverse linee pancreatiche e ne hanno causato la morte tramite apoptosi attraverso un pathway caspasi dipendente (57).

Vitamin K

Induction of apoptosis

- VK-1 and VK-2 showed a time-dependent increase in cleaved caspase-3 and the proapoptotic Bcl-2 member BAX (64).
- VK-3 induces apoptosis through mediation of wild-type p53, intracellular calcium, and ROS (65).
- In combination with sorafenib, VKI inhibited cell growth and caused apoptosis via activation of JNKs/c-Jun and inhibition of the MEK-ERK pathway, 2 proposed pathways ultimately leading to caspase activation.

JNK MAP signaling pathway

- Sorafenib and VK-1 cause cell growth inhibition and apoptosis through the activation of JNK, which increases phosphorylation of c-Jun and increases FasL concentrations, activating the extrinsic apoptosis pathway (66).

Ras-Raf-MEK-ERK pathway

- Sorafenib or VK-1 alone can induce apoptosis through inhibition of phospho-MEK and phospho-ERK concentrations at high concentrations. At low concentrations, VK-1 added to sorafenib mediated inhibition of the MEK-ERK pathway and induction of apoptosis via the extrinsic pathway (66).
- In contrast, a dose-dependent increase in phospho-ERK occurred in VK-1- and VK-2-treated pancreatic cancer cells (64).
- VK-3 injections into pancreatic tumor tissues also resulted in ERK phosphorylation and growth inhibition (67).

Figura 11: Meccanismi comunemente coinvolti nell'effetto anticarcinogenico sul carcinoma pancreatico

Study (reference)	Nutrient	Chemical form	Concentration	Biomarker/endpoint studied	Result
Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells, Sata et al. (66)	Vitamin K	VK-3	Concentrations of 0, 1, 5, 10, 20, and 100 μ M menadione	To evaluate the action of menadione on cell proliferation and integrity of the rat pancreatic acinar cell line, AR4-2J.	A high concentration of 100 μ M menadione induced cell death within 4 h, whereas ~80% of cells survived after 24 h of treatment with 20 μ M menadione.
The utility of Vitamin K3 (Menadione) against pancreatic cancer, Osada et al. (77)	Vitamin K	VK-3	50 μ M and 100 μ M VK-3	To evaluate the efficacy of VK-3 against pancreatic cancer, and the molecular mechanism of VK-3 or gemcitabine-induced inhibition of proliferation.	VK-3 induced rapid phosphorylation of ERK and JNK within 30 min of application. JNK was phosphorylated after treatment of 50 μ M VK-3, but the response diminished after 60 min. In response to 100 μ M VK-3, ERK phosphorylation was observed after 10 min, and tyrosine phosphorylation was observed after 60 min. 50 μ M VK-3 also activated apoptosis, as shown by caspase-3 activation and PARP cleavage of the 112-kDa form within 6 h of treatment.
Vitamin K2 selectively induced apoptosis in ovarian TYK-nu and pancreatic MIA PaCa-2 cells out of eight solid tumor cell lines through a mechanism different from geranylgeraniol, Shibayama-Imazu et al. (65)	Vitamin K	VK-2	200 μ M VK-2	To examine the effects of VK-2, which has a geranylgeranyl side chain, on various lines of cells derived from human solid tumors and compare them with the effects of geranylgeraniol, which is shown to induce apoptosis in solid tumors.	The IC_{50} for VK-2 was estimated to be 153 μ M in Mia PaCa-2 cells and 70.8 μ M with geranylgeraniol during a 4 d incubation.
Naturally occurring K vitamins inhibit pancreatic cancer cell survival through a caspase-dependent pathway. Showalter et al. (78)	Vitamin K	VK-1, VK-2	200 μ M VK-1 and 200 μ M VK-2 vs. serial dilutions of 5-fluorouracil.	To determine whether VK-1 and VK-2 may be used to decrease pancreatic cancer cell survival.	The IC_{50} for VK-1 was estimated to be 150 μ M and 75 μ M for VK2 in the sensitive cell lines MiaPaCa2 and PL5. In comparison, 5-fluorouracil achieved equal and complete death at 1 μ M in all 4 cell lines.
Sorafenib combined vitamin k induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines through Raf-MEK-ERK and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, Wei et al. (64)	Vitamin K	VK-1, VK-2, and VK-5	PL5, Mia-PaCa-2, and PANC-1 cells were treated with 50 μ M VK-1 and 2.5 μ M sorafenib combined. This was repeated with 25 μ M VK-2 and 1 μ M VK-5 in combination with 2.5 μ M sorafenib.	To evaluate the role of naturally occurring K vitamins and sorafenib both independently and together on the growth in culture of the pancreas adenocarcinoma cells lines PL-5, PANC-1, and MiaPaCa-2.	VK-1 and sorafenib together significantly inhibited cellular proliferation compared with the single agent treatments ($P < 0.01$). VK-2 and VK-5 replicated the same results when added to sorafenib ($P < 0.01$).

Figura 12: Studi preclinici sulla vitamina K nel carcinoma pancreatico

La vitamina K è stata studiata anche nel trattamento del carcinoma pancreatico, da sola o in combinazione con sorafenib ed ha dimostrato una sostanziale riduzione della crescita tumorale, inoltre in questi studi è stata necessaria una dose inferiore di sorafenib, il che potrebbe contribuire a frenare i debilitanti effetti collaterali del farmaco (58). Il trattamento combinato con vitamina K e chemioterapici potrebbe inoltre aiutare a prevenire la recidiva dopo chirurgia (59) (Figure 11 e 12).

1.4.2 PIVKA-II biomarcatore nell'epatocarcinoma e nelle neoplasie gastrointestinali

Da quando è stata isolata per la prima volta da Liebman nel 1984, nel liquido ascitico di un paziente affetto da epatocarcinoma (HCC) (60), il PIVKA-II è stato largamente utilizzato per la gestione di tale neoplasia ed attualmente ne rappresenta un importante strumento diagnostico e prognostico (61). In un recente documento, Ueda N. e colleghi hanno dimostrato che la variante genica *exon-2-deletion splice* delle gamma-glutamil carbossilasi causa la produzione PIVKA-II in linee cellulari di carcinoma epatocellulare (62). Come numerosi studi hanno dimostrato, i livelli di PIVKA-II sono utili nei pazienti con HCC aventi livelli di AFP inferiori a 400 ng/ml, e il controllo combinato dei livelli di AFP e DCP, sia in fase di screening che durante il follow-up dei pazienti con carcinoma epatocellulare è stato proposto per migliorare sia la sensibilità che la specificità e ridurre l'area sotto la Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) (63). La somministrazione di Vitamina K in pazienti con HCC, non porta alla scomparsa del PIVKA prodotto; infatti, la concentrazione del marcatore si riduce dopo resezione epatica o chemioterapia, indicando un ruolo primario del tumore epatico nella sintesi del marcatore (64). Studi recenti dimostrano un potente effetto mitogeno del PIVKA-II su colture cellulari dose dipendente, suggerendo come la proteina sia un fattore di crescita sia di tipo autocrino che paracrino. Strutturalmente presenta due domini simili a quelli del Fattore di crescita degli epatociti (HGF), il cui recettore di superficie è sovra-espresso in HCC, di conseguenza, si ipotizza che il PIVKA-II abbia la capacità di legarsi a C-met (il recettore per HGF) causando la proliferazione cellulare dell'epatocarcinoma (65). Alcuni studi indicano come il PIVKA-II può essere usato come marcatore di prognosi avversa, indicando la possibilità di recidiva, di progressione tumorale e di invasione della vena porta (66). Il biomarcatore comunemente utilizzato nella pratica di laboratorio nella diagnosi di epatocarcinoma è l' α -fetoproteina (AFP): la combinazione dei due biomarcatori sembra essere la soluzione ideale per la differenziazione tra le patologie benigne e maligne, soprattutto nella diagnosi precoce dell'HCC (67). Numerosi studi indicano come il PIVKA-II possa essere usato nell' HCC come marcatore di prognosi avversa, indicando la possibilità di recidiva, progressione tumorale ed invasione della vena porta. È stato inoltre dimostrato che PIVKA-II è caratterizzato da una maggiore specificità e sensibilità rispetto ad AFP nell' individuazione di neoplasie maligne di piccole dimensioni (68). Recentemente è stato osservato un aumento dei livelli di PIVKA-II anche in pazienti affetti da altre neoplasie gastrointestinale come il carcinoma gastrico (69), del colon retto (70) e pancreatico (71,72). Il nostro gruppo di lavoro in uno studio pilota del 2019 ha evidenziato per la prima volta che il PIVKA-II è significativamente più alto nel PDAC rispetto alle malattie pancreatiche benigne mostrando una performance diagnostica piuttosto buona rispetto ai marcatori tumorali comunemente usati: CA 19. 9, CEA e CA 242 (73).

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il carcinoma pancreatico continua a essere una malattia caratterizzata da decorso clinico molto aggressivo e da severa prognosi. Nonostante dei recenti progressi nella gestione clinica del carcinoma pancreatico, il suo tasso di sopravvivenza globale non è aumentato durante gli ultimi due decenni (2), anche a causa di un difficile riconoscimento precoce della neoplasia. Allo stato attuale, diversi marcatori tumorali circolanti (come CA 19.9, CA 242 e CEA) sono stati proposti per la diagnosi di questo tipo di carcinoma, anche se spesso la sensibilità ma soprattutto la specificità non sono risultate ottimali (29). Recenti lavori di ricerca hanno suggerito che la vitamina K sia in grado di limitare l'oncogenesi del carcinoma pancreatico attraverso meccanismi apoptotici. Queste evidenze sono supportate da studi in vivo ed in vitro che hanno valutato come la vitamina K abbia un ruolo anti carcinogenico sia diretto (data la sua abilità intrinseca di sopprimere la crescita tumorale, indurre apoptosi e differenziazione nelle cellule tumorali) sia indiretto attraverso l'attivazione post-traduzionale di proteine come il PIVKA-II (50). In letteratura è stato inoltre ampiamente dimostrato come i tessuti di pancreas e fegato hanno una capacità latente di transdifferenziare l'uno nell'altro a causa della loro comune origine embriologica dal mesoderma: per questi motivi è ragionevole ipotizzare che l'espressione del PIVKA-II, che è caratteristica del HCC potrebbe essere razionalmente presente anche nel carcinoma pancreatico (73). A supporto di tale ipotesi di collocano recenti articoli scientifici che riportano la presenza in circolo di PIVKA-II in pazienti affetti da carcinoma pancreatico (74). Alla luce di tali evidenze scientifiche, il presente studio sperimentale è stato realizzato con i seguenti obiettivi:

- determinare la performance diagnostica di PIVKA-II in pazienti affetti da carcinoma pancreatico, ampliando la casistica dello studio pilota
- analizzare in casi selezionati l'andamento del biomarcatore alla diagnosi e dopo intervento terapeutico radicale di resezione chirurgica
- verificare se l'eventuale aumentata espressione sierica di PIVKA-II in pazienti con carcinoma pancreatico sia concomitante ad un'espressione tissutale di tale biomarcatore
- valutare e caratterizzare l'espressione di PIVKA-II in linee cellulari selezionate di carcinoma pancreatico
- identificare tramite un modello sperimentale in vitro i meccanismi molecolari di produzione e rilascio di PIVKA-II da parte di linee cellulari di carcinoma pancreatico

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione in studio: arruolamento e caratteristiche

Sono stati prospetticamente reclutati 76 pazienti (M/F 24/28, intervallo di età: 50-92 anni) affetti da carcinoma pancreatico afferenti al laboratorio marcatori tumorali (Policlinico Umberto I, Sapienza) in un periodo compreso tra gennaio 2018 e dicembre 2019.

I criteri di inclusione sono stati:

- per il gruppo 1:
 - presenza di adenocarcinoma del pancreas
 - primo riscontro di patologia neoplastica
 - nessun precedente trattamento con terapia neoadiuvante
 - assenza di altre gravi comorbilità in anamnesi personale
 - assenza di trattamento in atto o pregresso con antagonisti della vitamina K

Sono stati analizzati inoltre 55 soggetti sani, (M/F 26/34, intervallo di età: 22-70 anni) selezionati nell'ambito della popolazione di donatori di sangue abituali afferenti al centro trasfusionale del Policlinico Umberto I di Roma. Tale popolazione è stata selezionata con gli stessi criteri di inclusione del gruppo 1, ad eccezione della presenza di adenocarcinoma del pancreas. Le caratteristiche demografiche della popolazione in studio sono descritte in Tabella 2. La patologia dei pazienti 1 è stata confermata da esame istopatologico condotto nel Dipartimento di Anatomia Patologica del Policlinico Umberto I di Roma. Tutti i pazienti del gruppo 1 sono stati sottoposti a diagnosi istopatologica postoperatoria, che ha confermato la presenza di carcinoma pancreatico (21 in stadio I, 44 in stadio II, 8 nello stadio III e 3 pazienti nello stadio IV). Lo studio è stato condotto in conformità con l'attuale revisione della dichiarazione di Helsinki.

Parametri	Pazienti PDAC	Controlli
<i>Numero di casi</i>	76	55
<i>Età (anni, mediana, intervallo)</i>	73 [40-92]	71 [38 - 65]
<i>Genere (%): M - F</i>	42 - 58	24 - 31
<i>Non fumatori - Fumatori (%)</i>	58 - 42	79 - 21
<i>Etnia (%): Bianchi - Altra etnia</i>	97 - 3	51 - 4
<i>Ipertensione</i>	26	5
<i>Malattie respiratorie</i>	8	1
<i>Dislipidemia</i>	18	5
<i>CA 19,9 (mediana e intervallo)</i>	260 [33 - 290]	39 [9 - 51]
<i>PIVKA II (mediana e intervallo)</i>	464 [27 - 40783]	29 [13 - 49]
<i>Stadio del tumore</i>		
<i>I</i>	21	-
<i>II</i>	44	-
<i>III</i>	8	-
<i>IV</i>	3	-

Tabella 2: Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio

3.2 Prelievo, raccolta e conservazione dei campioni ematici

La raccolta dei campioni è avvenuta secondo un protocollo standard. Previa sottoscrizione del consenso informato per la partecipazione allo studio e acquisizione dell'anamnesi patologica personale, tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso periferico, raccolto in 2 provette da 5 ml Red Top Vacutanier (Becton, Dickinson and Company, Plymouth, Regno Unito) in assenza di anticoagulante. I campioni ematici sono stati quindi lasciati coagulare per 60-90 min e centrifugati per 10 min a 3500 rpm. La frazione di siero così ottenuta è stata infine aliquotata in provette Eppendorf da 1.5 mL e conservata a -20°C fino al momento delle determinazioni analitiche.

3.3 Determinazione di PIVKA-II

Le concentrazioni di PIVKA-II sono state misurate con il sistema automatico LUMIPULSE® G1200. Fujirebio-Europe, Gent, Belgio). LUMIPULSE® G1200 è un sistema di dosaggio per la determinazione quantitativa di biomarcatori nel siero, sulla base della tecnologia del saggio immunoenzimatico in chemiluminescenza (CLEIA); tramite un metodo di immunodosaggio sandwich a due step. Il tracciante impiegato nel LUMIPULSE® G1200 è il diossietano, un composto chemiluminescente spontaneo, che è possibile stabilizzare mediante coniugazione a un gruppo fosfato o galattosio. L'emissione luminosa si ottiene grazie all'azione dell'enzima corrispondente al gruppo stabilizzatore (fosfatasi alcalina o β -galattosidasi). Il substrato nel nostro caso (e nella maggior parte dei sistemi disponibili in commercio) è un estere di amantini-1,2diosietano-fenilfosfato (AMPPD). La fosfatasi alcalina (ALP) fosforila l'estere di amantini-1,2diosietano-fenilfosfato (AMPPD) con formazione di adamantil-diosietano instabile, che si degrada spontaneamente con la conseguente produzione di una molecola allo stato eccitato che emette radiazioni luminose, amplificabili con l'aggiunta di fluoresceina al mezzo di reazione (Figura 13).

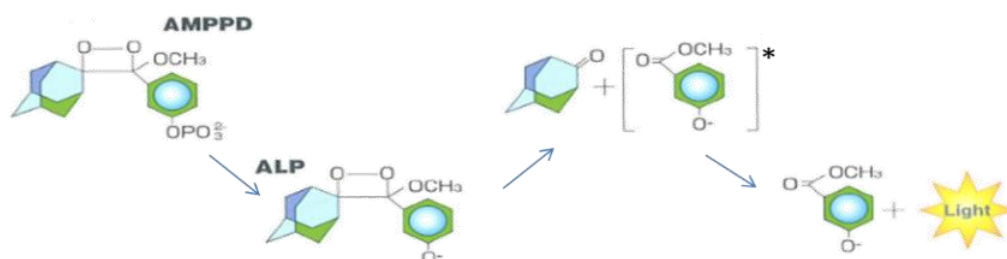


Figura 13: Fosforilazione di AMPPD

Il PIVKA-II presente nei campioni si lega specificatamente all'anticorpo monoclonale (murino) anti- PIVKA-II sulle particelle e all'anticorpo monoclonale (murino) anti- PIVKA-II marcato con fosfatasi alcalina (ALP: bovino) con formazione di immunocomplessi trimolecolari antigene-anticorpo. Le particelle vengono lavate e sciacquate per eliminare il materiale non legato. La Soluzione di substrato viene aggiunta e mescolata con le particelle.

L'AMPPD contenuto nella Soluzione di substrato viene defosforilato dalla catalisi dell'ALP indirettamente coniugata alle particelle. La luminescenza (ad una lunghezza d'onda massima di 477 nm) viene generata dalla reazione di scissione dell'AMPPD defosforilato.

Il segnale luminescente riflette il quantitativo di PIVKA-II (Figura 14). I dosaggi del PIVKA-II sono stati eseguiti come indicato dalla metodica: i calibratori liofilizzati sono stati preparati aggiungendo 0,5 mL di soluzione ricostituente ad ogni calibratore (Figura 14). I Set di calibratori PIVKA-II sono stati portati a temperatura ambiente (15-25°C) prima di essere utilizzati.

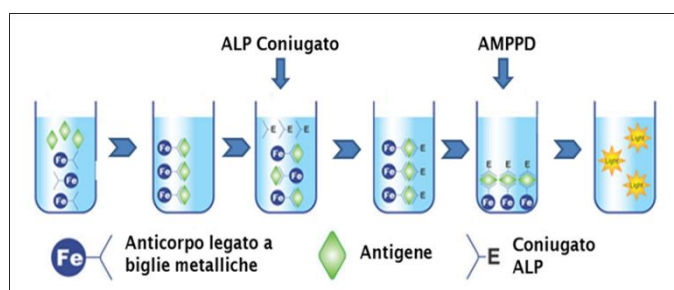


Figura 14: Dosaggio in chemiluminescenza

L'utilizzo della metodica CLEIA presenta il vantaggio di avere una sensibilità analitica fino a 10 volte superiore rispetto ai test immunocromatografici.

La curva di calibrazione viene creata sulla base dei dati di calibrazione memorizzati dallo strumento, mentre la concentrazione del PIVKA-II dei campioni sono calcolate automaticamente. Il sistema LUMIPULSE® G1200 prevede l'impiego di una curva di calibrazione master, con riduzione dei costi e dei tempi (sono sufficienti solo tre punti di calibrazione - Figura 15).

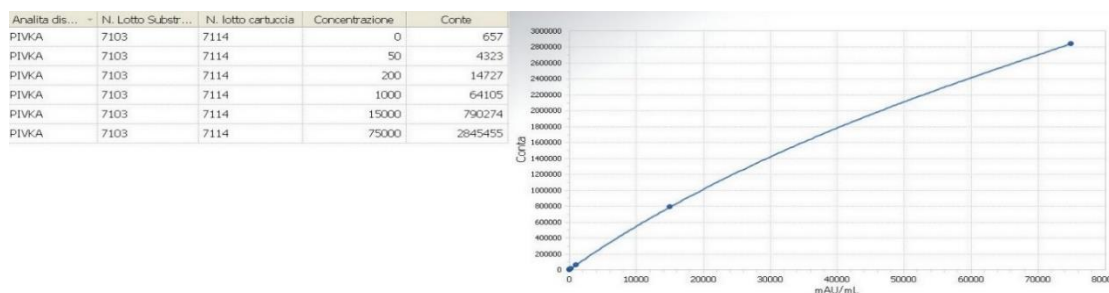


Figura 15: Curva di calibrazione del biomarcatore PIVKA-II

La reazione per la determinazione dell'analita avviene in cartage monouso per ogni paziente, e per evitare il rischio di contaminazione dei campioni, il sistema prevede l'utilizzo di puntali monouso.

I valori di normalità attesi di PIVKA-II sono <48 mAU/mL: abbiamo definito tale cut-off all'interno del nostro laboratorio poichè c'è una letteratura discordante tra studi giapponesi ed americani sul cut-off da considerare (67).

3.4 Raccolta e trattamento dei campioni tissutali

Sono state esaminate sezioni di tessuto di carcinoma pancreatico appartenenti a pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia oncologica programmata, presso la UOC Chirurgia Generale e Malattie del Pancreas del Policlinico Umberto I di Roma. Dall'intero tumore precedentemente asportato a scopo curativo ed in maniera del tutto indipendente dallo svolgimento dello studio stesso, sono stati prelevati su banco dei campioni microscopici (circa 1cm di diametro) di tessuto tumorale. Il prelievo dei campioni è stato effettuato senza pregiudicare la normale analisi istopatologica sui tessuti asportati. Non appena prelevati i campioni sono stati posti in idonei contenitori e congelati ad una temperatura di -180°C tramite immersione in azoto liquido. I campioni congelati sono stati tagliati in sezioni di 5µm di spessore mediante criostato (Reichert-Jung 2800 frigocut N, Depew, NY) a una temperatura di -28°C e posti su vetrini poly-L-lysine. Le singole sezioni ottenute sono state analizzate attraverso microscopio ottico tramite colorazione standard (Ematossilina & Eosina) e tramite test di immunofluorescenza. Le sezioni sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente per qualche minuto e quindi immerse in una soluzione di ematossilina precedentemente preparata e filtrata. Dopo un lavaggio accurato in H₂O, le sezioni sono state immerse per pochi secondi in una soluzione preparata e filtrata di eosina (eosin Y, 0.5% w/v, etanolo 90% v/v) e progressivamente passate in concentrazioni crescenti di etanolo pari rispettivamente a 70% e 96%. Infine, sono state passate in etanolo assoluto per 2 volte consecutive. Le sezioni, dopo essere state immerse in Neo-Clear (Merck, xylene substitute), sono state montate con vetrino copri oggetti e con una goccia di opportuna soluzione di montaggio (Leica CV Mount®).

3.5 Immunofluorescenza indiretta

La microscopia a fluorescenza è una tecnica di microanalisi che utilizza l'assorbimento e la conseguente emissione di radiazione luminosa da parte di particolari molecole, i fluorocromi, tramite un meccanismo di transizione elettronica. I preparati da analizzare tramite microscopia a fluorescenza vengono trattati con i fluorocromi i quali non alterano significativamente la conformazione dell'anticorpo, e le cui singole molecole sono in grado di assorbire la luce per un tempo eccezionalmente breve, ed emetterla poi nuovamente. Le molecole di fluorocromi possono assorbire solamente la luce di una certa lunghezza d'onda ed i diversi fluorocromi presentano ognuno un proprio spettro di assorbimento specifico, in funzione della struttura interna delle molecole di fluorescenza e, a volte, anche del loro ambiente circostante. Lo spettro di assorbimento rappresenta la probabilità che quanti di energia variabile in un certo intervallo di frequenza siano assorbiti dalle molecole.

Nel microscopio a fluorescenza la sorgente di luce utilizzata è una lampada di vapori di mercurio per UV; la luce passa attraverso un filtro e ciò consente di selezionare la luce di eccitazione, successivamente riflessa da uno specchio diroico e colpisce il campione; la luce di emissione passa attraverso lo specchio diroico. La combinazione di filtri di eccitazione, specchio diroico e filtri di barriera vengono selezionati in base al fluorocromo del marcatore e questi tre componenti costituiscono un unico blocco, il filtro (Figura 16).

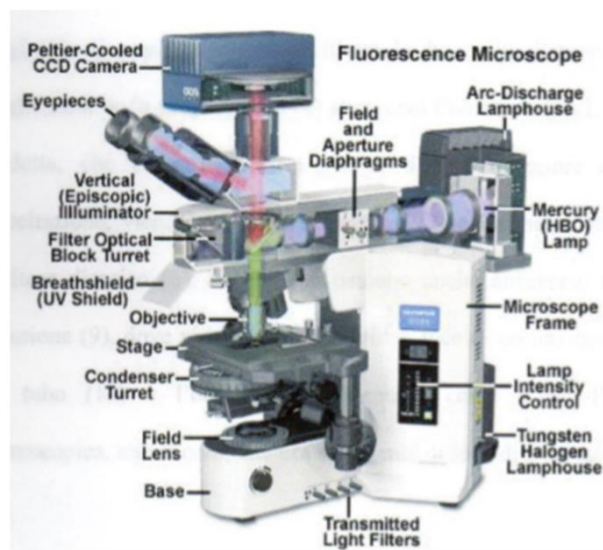


Figura 16: Microscopio a fluorescenza

In immunofluorescenza per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni od anticorpi ignoti è necessario che la controparte nota sia variamente legata ad un fluorocromo. Il fluorocromo più impiegato è l'isotiocianato di fluorescina (o semplicemente fluorescina), che assorbendo raggi ultravioletti, con l'ausilio di un microscopio illuminato da una fonte adatta,

emette luce verde. Esistono due principali metodiche che utilizzano il principio dell'immunofluorescenza, quella diretta e quella indiretta.

Nella fluorescenza diretta si utilizza un solo anticorpo marcato con un fluorocromo, mentre in quella indiretta si utilizza un anticorpo primario che si andrà a legare all'antigene dopo un periodo di incubazione, poi si aggiunge l'anticorpo secondario legato ad un fluorocromo, che andrà a legarsi all'anticorpo primario. Si possono utilizzare anticorpi monoclonali o anticorpi policlonali. Nel presente studio sono stati effettuati esperimenti in immunofluorescenza indiretta utilizzando un anticorpo primario monoclonale ed un anticorpo secondario policlonale.

Il protocollo sperimentale utilizzato per l'individuazione di PIVKA-II in sezioni di carcinoma pancreatico attraverso l'analisi in immunofluorescenza indiretta è stato messo a punto nel nostro laboratorio. Le sezioni di tessuto precedentemente fissate con acetone al 10 % su vetrini di 12 mm di diametro sono state incubate per 1 ora in ambiente umido e buio a temperatura ambiente con un anticorpo primario IgG murino monoclonale anti-PIVKA-II (EISAI, Japan) alla concentrazione di 1:100 in PBS.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lavati 3 volte con PBS per 15' e successivamente marcati con l'anticorpo secondario IgG anti-mouse monoclonale coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) alla concentrazione di 1:40 in PBS, per 1 ora in ambiente umido e buio a temperatura ambiente. Per evidenziare il citoscheletro, le sezioni sono state quindi incubate con falloidina rodaminata (falloidina-TRITC), che lega in maniera specifica l'actina, alla concentrazione 1:50 in PBS, per 45 minuti. Per marcare il nucleo è stata quindi effettuata un'incubazione per 5 minuti in ambiente umido e buio a temperatura ambiente con il colorante 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI), intercalante del DNA, che lega in regioni ricche in sequenze A-T.

Al termine dell'esperimento, i vetrini sono stati lavati 3 volte in PBS e montate con vetrini copri-oggetto tramite 30 µl di un agente montante acquoso. Come controllo è stato utilizzato PBS trattato con lo stesso anticorpo dei casi ed incubato nelle stesse condizioni sperimentali. I campioni sono stati quindi analizzati tramite il microscopio a fluorescenza rovesciato Observer della Zeiss, (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germania), collegato a un sistema Apotome e dotato del software Axio Vision per l'acquisizione delle immagini (75). Le immagini digitali sono state acquisite con la fotocamera digitale AxioCam MRm ad alta risoluzione e processate con il software 4.8.2 Axovision. Le immagini delle sezioni fluorescenti di ciascun campione sono state registrate sotto un obiettivo a due ingrandimenti diversi (20X e 40X). In particolare, le immagini sono state ottenute mediante sovrapposizione da parte del sistema Apotome, delle immagini provenienti da tre canali diversi per la fluorescenza del DAPI (visualizzazione dei nuclei cellulari, blu), del FITC (visualizzazione del PIVKA-II, verde) della falloidina rodaminata (visualizzazione del citoscheletro, rosso). L'analisi dell'immunofluorescenza indiretta è stata effettuata in diverse

sedute da due operatori distinti presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università Sapienza di Roma.

3.6 Colture cellulari

Per questo lavoro, sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico: PaCa44, Panc1, HPAF II, Capan-1. La caratterizzazione genetica e l'origine del tessuto sono riassunte in tabella 4. Tutte le linee cellulari utilizzate crescono in adesione a 37°C con 5% CO₂. Tutte le cellule PDAC sono state coltivate in RPMI 1640 (Euro Clone) a cui è stato aggiunto il 10% di siero bovino fetale (Aurogene) ed una miscela di antibiotici (100 unità di penicillina, 100mg/ml di streptomina) più 29,2 mg di L-glutamina (Aurogene). Le cellule HaCaT, cheratinociti umani immortalizzati, sono stati coltivati in D-Mem con aggiunta di 10% di siero bovino fetale (Aurogene) ed una miscela di antibiotici (100 unità di penicillina, 100mg/ml di streptomina) in presenza di L-glutamina (Aurogene). Questa linea cellulare è stata utilizzata come controllo negativo di tutti gli esperimenti.

3.6.1 Trattamenti Cellulari

Per studiare l'effetto della concentrazione di glucosio, le cellule tenute in assenza di siero per 3 ore quindi il terreno è stato sostituito con terreno completo di siero 10% in presenza di concentrazioni crescenti di glucosio che variano da 5, 25 e 50 mM per 12, 24 o 48 ore.

3.6.2 Lisi Cellulare

Le cellule sono state lisate per 30 minuti in ghiaccio utilizzando una soluzione di RIPA buffer contenente 150mM di NaCl (Sigma), 1% di NP-40 (Sigma), 50mM di Tris-HCl pH 8, 0.5% di acido deossicolico (Sigma), 0.1% di SDS (Serva), con aggiunta di inibitori delle proteasi e fosfatasi (sodio fluoruro e sodio ortovanadato) (Sigma). Successivamente i lisati sono stati centrifugati a 14000 rpm per 20 minuti a 4°C per separare il sovrantante, contenente il lisato proteico, dal pellet.

Prima della corsa elettroforetica, i campioni sono stati diluiti nel tampone di caricamento (sample buffer), contenente 25 mM Tris pH 6.8, 5% SDS, 5% β -mercaptoetanolo e blu di bromofenolo, successivamente sonicati per 30 secondi al massimo della potenza per 3-5 volte. Le proteine contenute nell'estratto cellulare sono state denaturate tramite ebollizione per 10 minuti e successivamente caricati su gel di acrilamide per la corsa elettroforetica.

3.7 Immunofluorescenza Indiretta (cellule)

In seguito ai vari trattamenti, le cellule in adesione sono state cresciute al 70% di confluenza su vetrini copri oggetto sterilizzati posti in piastre multispot, lavate in tampone fosfato salino (PBS 1X) per eliminare il terreno di coltura e successivamente lasciati essiccare a temperatura ambiente. Le cellule sono state fissate in paraformaldeide 2% (in PBS) per 30 minuti RT. Dopo tre lavaggi in PBS 1X, le cellule sono state permeabilizzate con Triton-X100 allo 0,5% per 5 minuti a temperatura ambiente e dopo un ulteriore lavaggio in PBS, è stata effettuata un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione bloccante a base di PBS/BSA 3% (Albumina bovina sierica-Sigma) e glicina 1%. I vetrini sono stati quindi fatti incubare 1 ora RT con gli anticorpi primari, lavati in PBS e incubati 45 min RT con il rispettivo anticorpo secondario. Questo procedimento è stato ripetuto nella doppia fluorescenza con il secondo anticorpo. I nuclei sono stati marcati mediante l'utilizzo di 4',6'-diamino-2-fenilindolo DAPI (1:5000 in PBS, Sigma) 30 sec RT. Infine, i vetrini sono stati lavati in PBS e montati con PBS-Glicerolo (1:1) e successivamente sono stati osservati al microscopio a fluorescenza invertito Axio Observer Z1 inverted microscope, supportato dal sistema ApoTome.2 System (Carl Zeiss Inc., Ober Kochen, Germany). Le immagini digitali sono state acquisite mediante AxioCam MRm high resolution digital camera (Zeiss) e processate con il software AxioVision 4.8.2 software (Zeiss) (Apotome- Zeiss). I seguenti anticorpi sono stati utilizzati per l'immunofluorescenza: anti PIVKA-II 1:1000 (EISAI, Japan); anti-actina 1:100 (Santa Cruz); anti-mouse Cy3 (1:1000 in PBS- Jackson) e anti rabbit Alexafluor350 (1:100- Invitrogen).

3.8 SDS-PAGE e Western Blot

Le proteine cellulari sono state separate mediante SDS-PAGE al 10% -12% in un tampone contenente 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 1% SDS a pH 8.3 con un voltaggio fisso di 200 V. Dopo la separazione, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Biorad, 0.45 di porosità) attraverso un sistema ad immersione per 2 ore a 400 mA e 100 V costanti, in un tampone contenente 3% di Tris base al 9.5% di glicina in H₂O. Una volta avvenuto il trasferimento, la membrana è stata incubata per un'ora con una soluzione di PBS, 0.1% Tween-

20, contenente il 3% di BSA (blocking solution), che permette la saturazione della membrana evitando che l'anticorpo reagisca in modo aspecifico. Le membrane sono state poi incubate per 1 ora con l'anticorpo primario, relativo al tipo di proteina da rilevare.

Gli anticorpi utilizzati sono stati diluiti nella blocking solution e sono elencati in seguito:

- anticorpo monoclonale anti- β -actina (Santa Cruz), diluito 1:1000;
- anticorpo monoclonale anti PIVKA-II 1:1000;
- anticorpo monoclonale anti Snail 1:100;

Successivamente la membrana è stata lavata tre volte per 5 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di lavaggio (PBS, 0.1% Tween-20) ed incubata per 30 minuti con l'anticorpo secondario policlonale IgG-HRP (anti-rabbit 1:10000, anti-mouse 1:10000) coniugato con l'enzima perossidasi (Bethyl) diluito nella soluzione di blocking. La membrana è stata lavata tre volte per 5 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di lavaggio (PBS, 0.1% Tween-20) ed è stata sottoposta a chemiluminescenza mediante il kit Western Bright ECL (Advansta, Menio Park, CA, USA), incubato per 1 minuto al riparo dalla luce. In presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) l'enzima perossidasi catalizza l'ossidazione del substrato fornito dal kit con sviluppo di una luminescenza che permette di impressionare una lastra per autoradiografia (CLX Posure Film, PIERCE).

3.9 Metodi statistici

I risultati sono stati analizzati mediante statistica descrittiva (media con deviazione standard, mediana con range interquartili, frequenze). Il calcolo dei coefficienti di asimmetria e curtosi e dei percentili 2.5 e 97.5 per la distribuzione dei valori di PIVKA-II è stato effettuato mediante il programma Microsoft Excel.

Le variabili sono mostrate come medie \pm deviazioni standard (S.D) o come mediane e minimo-massimo o range interquartili (IQR) in accordo alla loro distribuzione. Il confronto tra gruppi è stato effettuato mediante esame statistico non parametrico Mann-Whitney. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P < 0.05$. Per valutare la capacità di discriminazione dei biomarcatori testati, area sotto la caratteristica operativa del ricevitore sono stati calcolati la curva (ROC AUC). Per ogni AUC abbiamo stimato l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI). Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software StatsDirect 3.0.187 (Stats-Software diretto, Cheshire, Inghilterra).

4. RISULTATI

4.1 I LIVELLI SIERICI DI PIVKA-II SONO AUMENTATI IN PAZIENTI CON PDAC ALLA DIAGNOSI

Le caratteristiche dei pazienti con diagnosi di PDAC sono riportate in tabella 1. Abbiamo osservato livelli di PIVKA-II aumentati rispetto alla popolazione di controlli sani: i livelli mediani di PIVKA-II erano 464 mAU/mL (range 27–40783 mAU/mL) nei pazienti mentre i soggetti sani avevano livelli mediani di PIVKA-II pari a 33 mAU/mL (range 13–39 mAU/mL) ($P < 0.02$). La valutazione del PIVKA-II ha dimostrato una positività del biomarcatore in 71 pazienti (94%) affetti da PDAC mentre uno solo dei controlli ha mostrato livelli al di sopra del cut-off determinato in laboratorio. L'analisi della curva ROC ha mostrato un'AUC di 0.9 nel discriminare tra pazienti e controlli sani utilizzando il cut off di 48 mAU/mL che abbiamo stabilito utilizzando il metodo dello Youden Index, valore decisionale per cui PIVKA-II ha mostrato una sensibilità di 78.67% e una specificità del 90.67% per la diagnosi di PDAC.

4.2 DECREMENTO DEI LIVELLI SIERICI DI PIVKA-II DOPO INTERVENTO TERAPEUTICO

Sono stati selezionati nell'ambito della nostra casistica 7 pazienti con follow-up a 3 mesi (T3) dopo intervento terapeutico (chirurgico): le caratteristiche di questa sottopopolazione sono mostrate in tabella 3.

Parametro	Pazienti con livelli di PIVKA-II ridotti dopo resezione	Pazienti livelli di PIVKA-II NON ridotti dopo resezione
<i>Numero di casi</i>	7	4
<i>Età (anni, intervallo)</i>	73 [40-92]	71 [38 - 65]
<i>Genere (%): M - F</i>	2-5	3-1
<i>Non fumatori - Fumatori (%)</i>	2-5	1-3
<i>Etnia (%): Bianchi - Altra etnia</i>	2-5	100
<i>Ipertensione</i>	2	0
<i>Malattie respiratorie</i>	0	0
<i>Dislipidemia</i>	3	0
<i>CA 19,9 (mediana e intervallo)</i>	270 [102-290]	301[186-290]
<i>PIVKA II (mediana e intervallo)</i>	580 [474-40783]	516[283-39571]
<i>Stadio del tumore</i>		
<i>I</i>	5	3
<i>II</i>	2	1

Tabella 3: caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio sottoposta ad intervento chirurgico

In tale coorte abbiamo misurato nuovamente i valori sierici di PIVKA-II al tempo T3 osservando una considerevole e significativa diminuzione del biomarcatore rispetto alle determinazioni alla diagnosi (T0), come mostrato in figura 17.

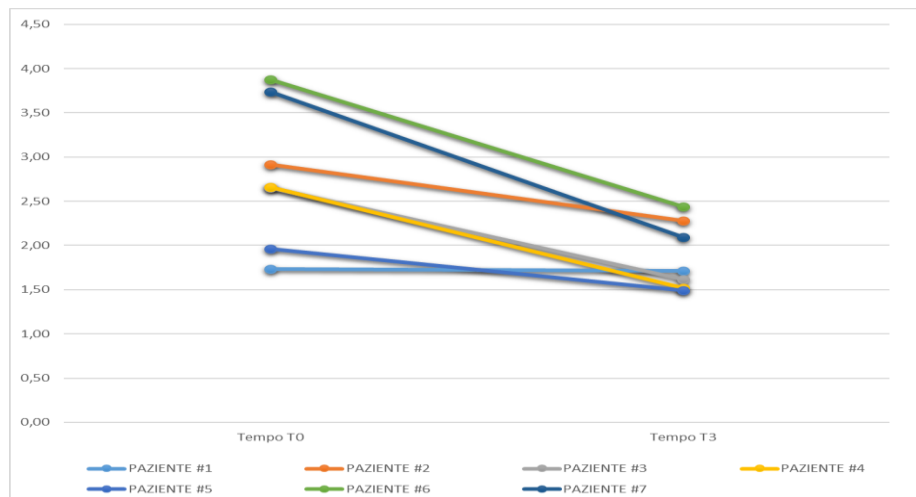


Figura 17: Decremento dei livelli di PIVKA-II al tempo 0 (diagnosi) e al tempo T3 (dopo 3 mesi dall'intervento terapeutico). Dati espressi in scala logaritmica

4.3 ESPRESSIONE TISSUTALE DI PIVKA-II IN SEZIONI DI CARCINOMA PANCREATICO

L'integrità delle sezioni di tessuto tumorale pancreatico è stata verificata preliminarmente da due operatori distinti tramite l'analisi al microscopio ottico dei vetrini trattati con ematossilina-eosina (Figura 18).

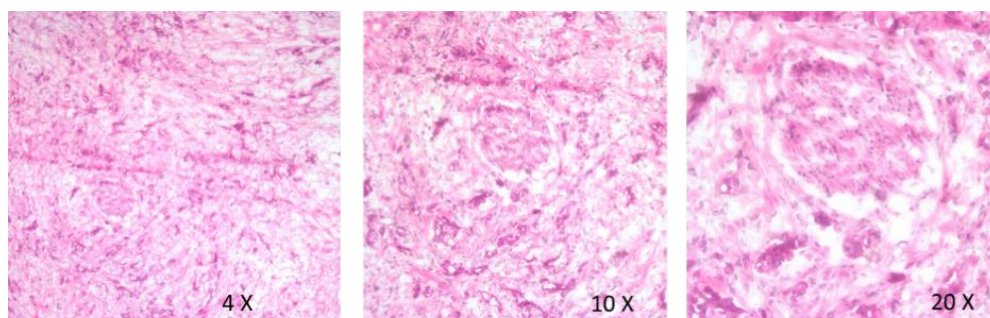


Figura 18: Colorazione in ematossilina eosina di sezioni di carcinoma pancreatico; il tessuto risulta integro e composto interamente da cellule tumorali, pleomorfe e con alterato rapporto nucleo citoplasma

L'analisi in immunofluorescenza, utilizzata per rilevare PIVKA-II in sezioni di carcinoma pancreatico prelevato in sede di intervento di resezione chirurgica ha effettivamente evidenziato un' espressione tissutale di PIVKA-II. In diverse sezioni di tessuto abbiamo osservato infatti un segnale fluorescente emesso in conseguenza del legame tra antigene- anticorpo anti PIVKAI (coniugato con un anticorpo secondario fluoresceinato). Come mostrato in figura 19 il segnale luminoso mostra un pattern caratteristicamente composto da dots. Non tutte le cellule delle sezioni esaminate hanno dimostrato una fluorescenza.

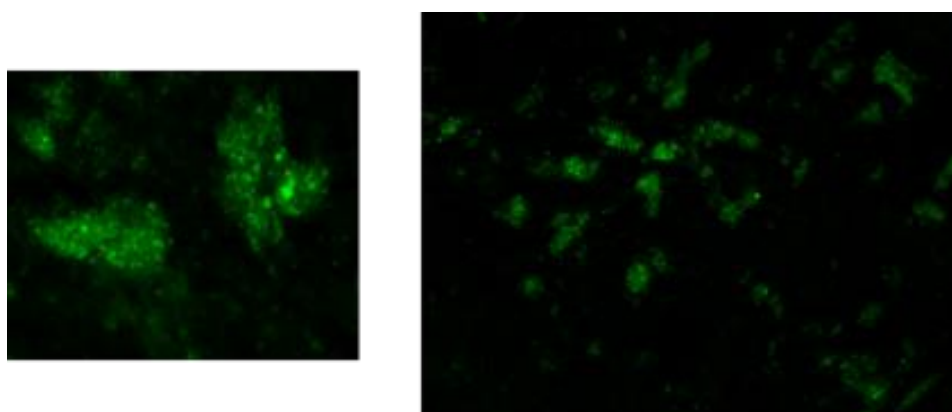


Figura 19: Positività per il PIVKA-II nelle cellule di carcinoma pancreatico, come evidenziato dalla fluorescenza verde FITC

Come evidenziato sovrapponendo le colorazioni FITC e DAPI, il PIVKA-II sembra avere una localizzazione citoplasmatica: il marcatore appare anche in area perinucleare, che sembra corrispondere alla zona Golgi (Figura 20).

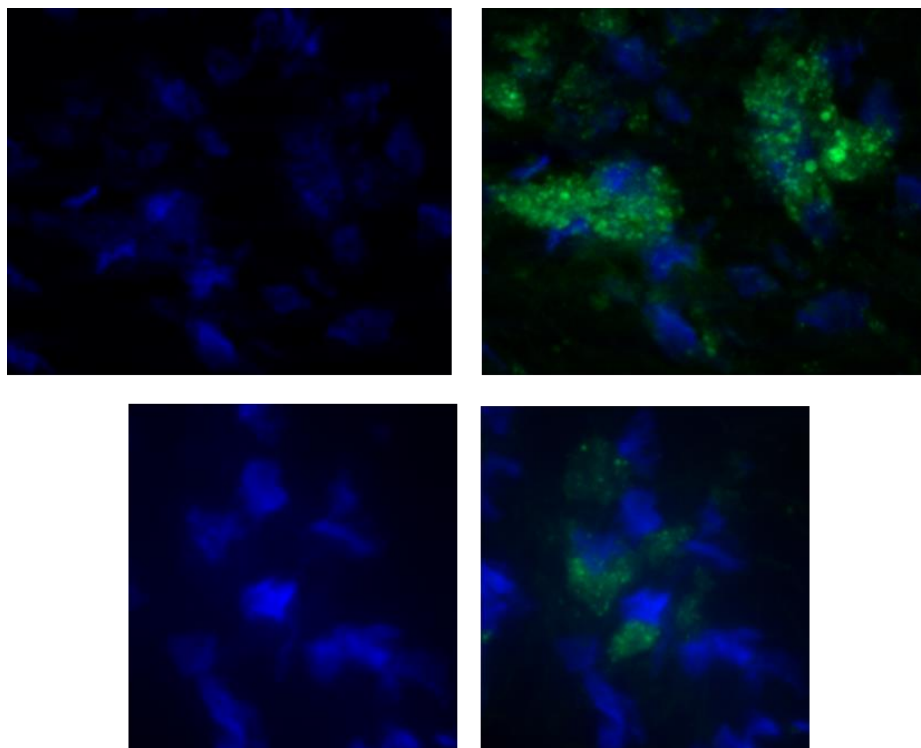


Figura 20: Pattern più espresso e localizzazione prevalentemente citoplasmatica del PIVKA-II, come mostrato dalla fluorescenza FITC in verde

Dalle immagini di fluorescenza si nota anche che l'actina citoscheletrica, rivelata dalla colorazione con rodamina, colocalizza in determinate cellule con il FITC, che evidenzia il PIVKA-II (Figura 21).

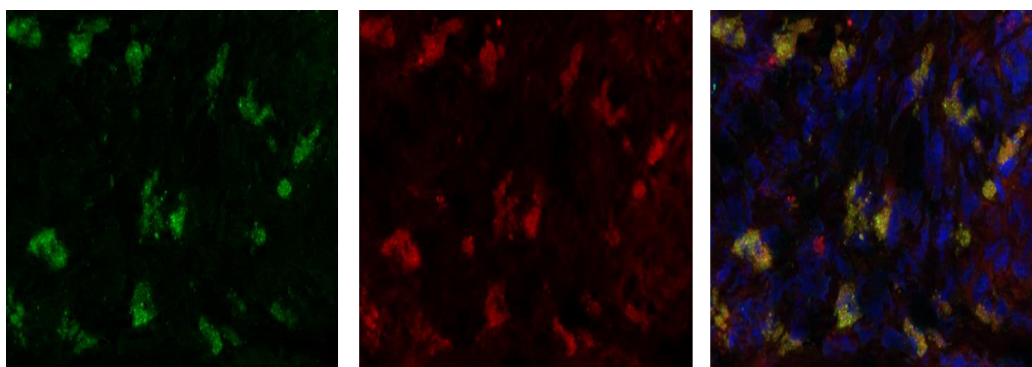


Figura 21: Colocalizzazione di PIVKA-II e actina citoscheletrica in sezioni tissutali di carcinoma pancreatico, evidenziata da colorazione con rodamina e FITC

È da segnalare anche un riscontro sporadico di localizzazione nucleare del PIVKA-II evidenziata dalla sovrapposizione della colorazione verde del FITC e quella blu del DAPI (Figura 22).

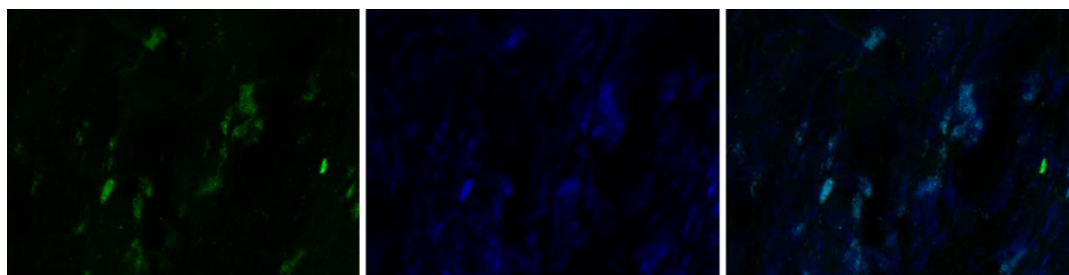


Figura 22: Localizzazione nucleare di PIVKA-II in sezioni tissutali di carcinoma pancreatico, evidenziata da colorazione delle sezioni con DAPI e FITC

4.4 PIVKA-II È ESPRESSO IN LINEE CELLULARI PDAC

Al fine di studiare “*in vitro*” il potenziale ruolo PIVKA-II come biomarcatore precoce del carcinoma pancreatico, abbiamo esaminato in un pannello di linee cellulari PDAC l’espressione della proteina PIVKA-II. Nella Tabella 4 sono riportate le caratteristiche generali delle linee cellulari prese in esame in questo studio.

nome	origine	tipo cellulare	sexo	età	grado di differenziazione	mutazioni
Panc-1	Tumore primario	epiteliale	F	56	3	KRAS, TP53,CDKN2A/p16
PaCa-44	Tumore primario	epiteliale	M	65	2	KRAS, TP53,CDKN2A/p16
Capan-1	metastasi epatica (da tumore primario della testa)	epiteliale	M	40	1	KRAS, TP53,CDKN2A/p16, SMAD4/DPC4
H-PAF-II	Ascite (metastasi epatiche, diaframmatiche e linfonodali)	epiteliale	M	44	1	KRAS, TP53,CDKN2A/p16

Tabella 4: Caratteristiche generali delle linee cellulari di PDAC selezionate per lo studio.

Le linee cellulari selezionate, raggiunta la confluenza del 70% sono state raccolte e lisate come riportato nella sezione Materiali e Metodi. I lisati crudi sono stati quindi separati mediante SDS-PAGE e successivamente analizzati in Western Blot utilizzando anticorpi specifici diretti contro PIVKA-II (Moab-anti PIVKA-II 1:1000 MYBioSource.com) e anti β -actina (1:1000 SIGMA), ed il risultato è riportato in Figura 23. Come è possibile vedere nella figura (Figura 23, pannello A), tutte le linee cellulari di origine pancreatica hanno rivelato la presenza della proteina PIVKA-II sebbene i livelli di produzione risultino diversi per ogni tipo cellulare.

Le cellule HaCat, invece, che sono un tipo cellulare completamente diverso rispetto alle cellule pancreatiche (sono infatti cheratinociti), non esprimono tale proteina rappresentando quindi il controllo negativo di questo esperimento.

Dal momento che in letteratura non sono note linee cellulari da utilizzare come controllo positivo per il PIVKA-II, abbiamo separato mediante SDS-PAGE il siero di un paziente con PDAC con un titolo di PIVKA-II dosato in precedenza mediante immunometria (Fujirebio).

Il risultato di questo esperimento ci permette di asserire che nelle cellule Panc-1, la produzione di PIVKA-II sembra essere particolarmente accentuata come confermato dalla quantizzazione della proteina riportata nel pannello B. Il corretto caricamento del gel è stato valutato utilizzando l'anticorpo diretto contro la β -actina.

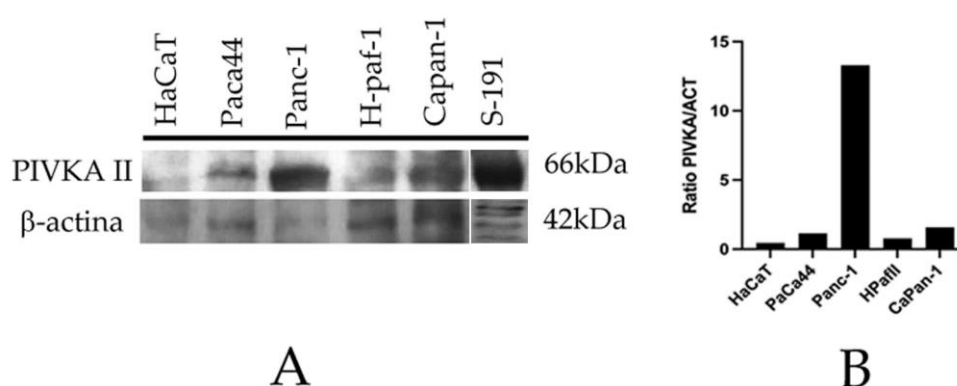


Figura 23: Espressione della proteina PIVKA-II in diverse linee cellulari. (A) Analisi Western Blot di PIVKA-II in linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico. (B) Analisi quantitativa di PIVKA-II nelle linee cellulari in rapporto alla β -actina rilevata

4.5 LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE DI PIVKA-II IN CELLULE PANC-1

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente, l'analisi mediante western blot ha evidenziato la presenza di PIVKA-II in diverse linee cellulari di origine pancreatico, pertanto, al fine di caratterizzare gli aspetti morfo-funzionali di questo nuovo biomarcatore, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla distribuzione di questa proteina nelle cellule Panc-1 utilizzando tecniche di immunofluorescenza indiretta (IFA). La Figura 24 mostra, infatti, un pannello di doppie immunofluorescenze effettuate su cellule HaCat (controllo negativo, pannelli superiori a-b) e su cellule Panc-1 (pannelli inferiori c-d) marcate con l'anticorpo monoclonale (mo-ab) diretto contro la proteina PIVKA-II (rosso) e l'anticorpo policlonale (poli-ab) diretto contro le fibre di actina presenti nelle cellule (verde). La colorazione blu (DAPI) permette invece di evidenziare i nuclei delle cellule prese in esame. Come possiamo vedere dalla figura 24, l'espressione di PIVKA-II è

esclusiva delle cellule Panc-1; diversamente, tale proteina non è presente nelle cellule HaCat, confermando il risultato osservato mediante immuno-blot.

Per quanto riguarda la localizzazione, PIVKA-II è principalmente distribuito nel citoplasma cellulare, con un arricchimento nella zona perinucleare di alcune cellule. La distribuzione è si presenta granulare e sembra associata a strutture fibrose delle cellule. Le fibre a cui si associa il PIVKA, tuttavia, non sono quelle di actina dal momento che non rilevabile la co-localizzazione tra le due proteine (MERGE). Questa osservazione, lascia supporre che le strutture a cui il PIVKA-II si associa siano dei supporti meccanici per il trasporto intracellulare della proteina. Tale distribuzione è paragonabile a quella osservata *in vivo* sulle biopsie pancreatiche.

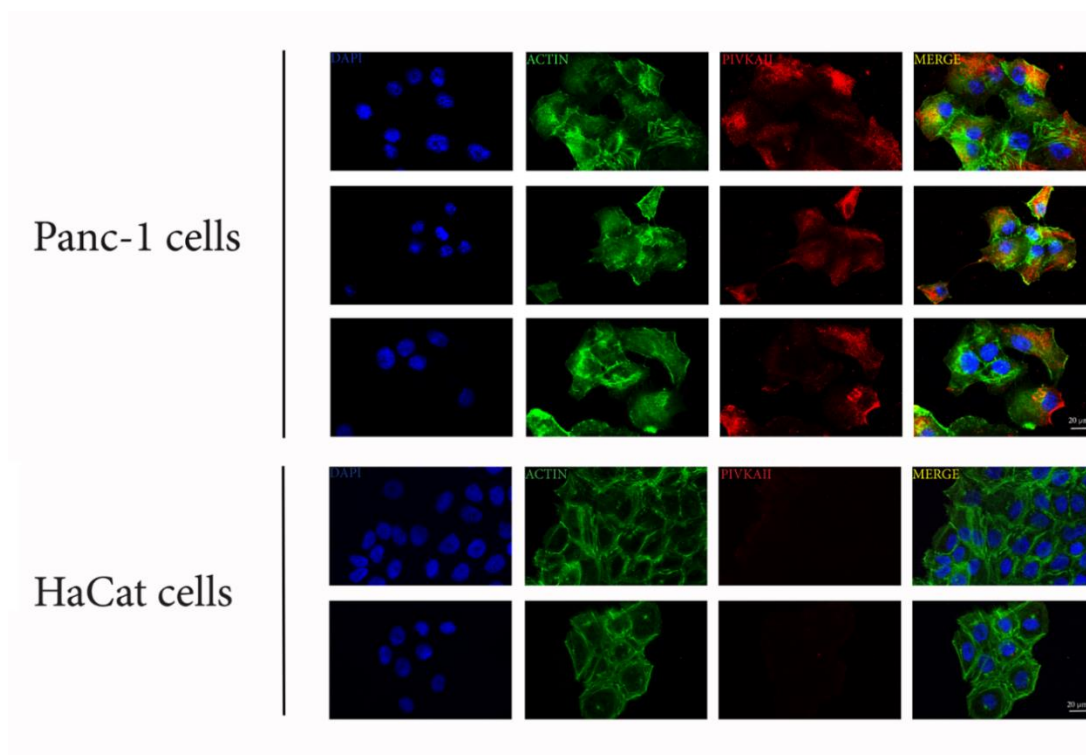


Figura 24: Localizzazione di PIVKA-II in cellule Panc-1. Doppia Immunofluorescenza indiretta (IFA) effettuata su due linee cellulari per la localizzazione di actina (verde) e di PIVKA-II (rosso).

4.6 RILASCIO DI PIVKA-II DA PARTE DI CELLULE PANC-1 ESPOSTE A GLUCOSIO ED È SIMULTANEO ALLA ATTIVAZIONE DELLA TRANSIZIONE EPITELIO MESENCHIMA

Molteplici linee di ricerca hanno suggerito che un'ampia porzione di pazienti affetti da cancro del pancreas soffre di iperglicemia o diabete, anche se il meccanismo biologico alla base di questo fenomeno è in gran parte sconosciuto.

Recentemente è stato inoltre dimostrato che la variabilità dei livelli di glicemia in linee cellulari PDAC promuove sia la proliferazione tumorale che la metastatizzazione (76,77). Alla luce di queste evidenze, abbiamo ipotizzato che il glucosio potesse svolgere un ruolo nell'indurre il rilascio della proteina PIVKA-II.

Abbiamo quindi svolto uno studio cinetico utilizzando cellule Panc-1 incubate in presenza di concentrazioni crescenti di glucosio (0 mM, 5 mM, 25 mM e 50 mM) per 24 h e 48 h. Successivamente, le cellule trattate (Pel) ed i relativi sovranatanti (Sup) sono stati raccolti, separati mediante SDS-PAGE e sottoposti ad immunoblot utilizzando diversi anticorpi (Figura 25). Il corretto caricamento dei sovranatanti è stato controllato mediante colorazione Ponceau della membrana (pannello rosa in figura 25). Come mostrato, la proteina PIVKA-II viene rilasciata in presenza di 25 mM di glucosio e aumenta in presenza di 50 mM di glucosio; diversamente, tale proteina è in assenza di glucosio o in presenza di concentrazioni molto basse di questo zucchero (5mM). Per quanto riguarda invece la produzione di PIVKA-II nelle cellule Panc-1, concentrazioni molto basse di glucosio (5 mM) ne stimolano la produzione.

Inoltre, è interessante notare che l'incremento graduale della concentrazione di Glucosio (rispettivamente 25 e 50 mM), ha un effetto inibente sulla produzione di PIVKA-II nelle cellule Panc-1. La qualità del caricamento del lisato crudo è stata valutata mediante β -actina, mentre la qualità del supernatante caricato sul gel è stata valutata mediante colorazione Ponceau della membrana di nitrocellulosa. Il siero umano S191 rappresenta il controllo positivo dell'esperimento. La transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) rappresenta un evento cruciale nell'invasione e nella formazione di metastasi di un tumore. L'EMT delle cellule tumorali è indotto tipicamente dal TGF- β [78,79], ma anche altri fattori di crescita e fattori microambientali, come HGF, EGF e FGF, sono in grado di indurre o promuovere cambiamenti fenotipici simili a seconda dei tipi cellulari. Alla luce di queste osservazioni, abbiamo voluto valutare se il rilascio di PIVKA-II nelle cellule di carcinoma pancreatico mediato dal Glucosio potesse essere in qualche modo associato alla attivazione della transizione epitelio-mesenchima. Pertanto, abbiamo valutato nelle cellule Panc-1 e in presenza di dosi crescenti di glucosio l'espressione della proteina Snail, un marcatore di attivazione della transizione epitelio-mesenchimale. Come mostrato in Figura 25 (pannello in basso a dx), concentrazioni crescenti di glucosio sono in grado di stimolare nelle cellule Panc-1 EMT come attestato dalla presenza della proteina Snail. Ulteriori studi sono attualmente in corso per valutare altri marcatori EM.

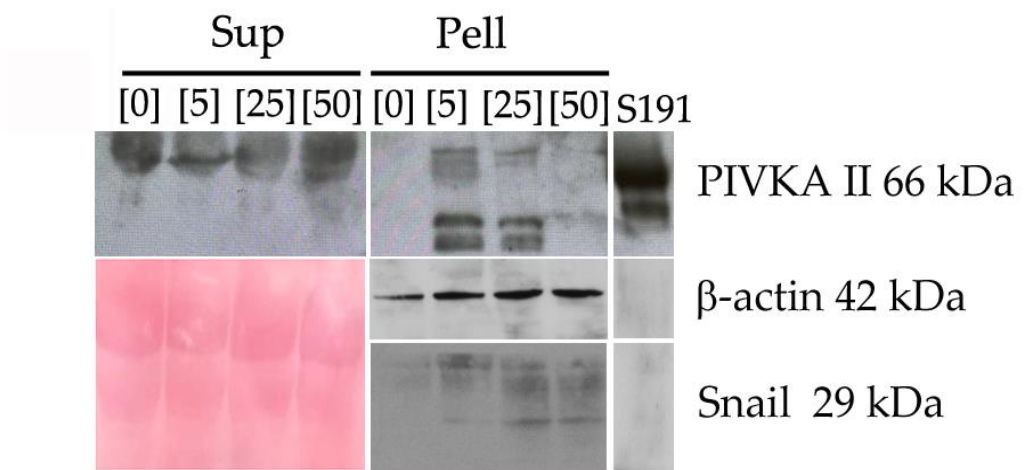


Figura 25: Cinetica di espressione e di rilascio di PIVKA-II in presenza di dosi crescenti di Glucosio in cellule Panc-1.

5. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro di ricerca abbiamo confermato, ampliando la coorte di pazienti del nostro precedente studio pilota, che i livelli sierici di PIVKA-II sono aumentati alla diagnosi di carcinoma pancreatico. E' stata inoltre rilevata per la prima volta l'espressione tissutale di PIVKA-II in tale neoplasia. Quindi, è stato riscontrato che in pazienti con carcinoma pancreatico i livelli sierici di PIVKA-II diminuiscono dopo 3 mesi dall'intervento terapeutico rispetto ai livelli alla diagnosi. Lo studio svolto *in vitro* ha poi fornito delle preziose informazioni sugli aspetti biologici di PIVKA-II: per la prima volta, infatti, abbiamo dimostrato che questa proteina è espressa in diverse linee cellulari che originano da PDAC e, tra queste, le cellule Panc-1 rappresentano il modello ideale per poter studiarne *in vitro* le caratteristiche. Infine, abbiamo dimostrato che il rilascio di PIVKA-II da parte di tali cellule di carcinoma pancreatico è indotto da dosi elevate di glucosio e che questo evento si verifica contemporaneamente all'attivazione dell'EMT. Il carcinoma del pancreas è una neoplasia maligna altamente letale e nonostante i recenti progressi nella gestione clinica, il tasso di sopravvivenza globale per questa patologia non è aumentato negli ultimi 20 anni (2). Per tale motivo il management del carcinoma pancreatico rappresenta attualmente una delle sfide maggiori sia in ambito assistenziale che di ricerca. Infatti si tratta di una neoplasia troppo spesso diagnosticata tardivamente e dunque in uno stadio avanzato, per il quale esistono poche e inefficaci terapie. La maggior parte dei pazienti alla diagnosi presenta una malattia localmente avanzata o addirittura già metastatica e non operabile tanto che, a 5 anni dalla diagnosi, la sopravvivenza globale risulta essere meno del 5%. L'esito clinico sfavorevole è dovuto sia all'aggressività delle cellule tumorali pancreatiche che sono in grado di invadere, disseminare e metastatizzare, che all'assenza di diagnosi precoce, spesso a causa anche di una scarsa e sfumata sintomatologia preclinica e ad una aspecifica sintomatologia clinica. Le recidive locali sono comuni, così come le metastasi epatiche e della cavità peritoneale. La tipologia più diffusa di neoplasia maligna pancreatico è l'adenocarcinoma duttale (95% dei casi), la cui nota resistenza alla chemio e alla radioterapia limita l'efficacia degli approcci terapeutici. Considerati questi fattori, è evidente la necessità di trovare marcatori biomolecolari attendibili utilizzabili in clinica per un'identificazione tempestiva, per una corretta valutazione prognostica ed eventuale monitoraggio nel tempo dei pazienti affetti da questa neoplasia altamente letale. Crescente attenzione è stata rivolta nei trials clinici nell'identificare un biomarcatore non invasivo, economico ma soprattutto con sensibilità e specificità tali da migliorare la diagnosi precoce del carcinoma pancreatico e conseguentemente il trattamento (29). I marcatori sierici sono i più studiati per la loro praticità di analisi, data la disponibilità e sicurezza del prelievo venoso; inoltre sono la modalità più rapida per fare screening su larga scala. Tuttavia, ad oggi non sono stati ancora identificati marcatori definitivi per la diagnosi pre-operatoria, sebbene ne siano stati valutati numerosi per la diagnosi di adenocarcinoma pancreatico. Negli

ultimi anni diversi studi in letteratura hanno confermato che PIVKA-II è un importante marcatore tumorale nell'ambito delle neoplasie gastrointestinali, in particolare per l'HCC: i valori sierici di PIVKA-II sono correlati al volume del tumore, al potenziale di metastatizzazione e alla recidiva tumorale. La positività per PIVKA-II mostrata nel nostro studio potrebbe plausibilmente trovare una spiegazione nell'origine embrionale comune di pancreas e fegato, il mesoderma.

Ad ulteriore supporto di tale riscontro è stato determinato inoltre in letteratura come pancreas e fegato abbiano una capacità latente di transdifferenziare nel reciproco tessuto; quindi, risulta ragionevole che un marcatore espresso in HCC possa essere rilevabile anche nel carcinoma pancreatico. Il CA19-9 è attualmente il biomarcatore suggerito dalle linee guida internazionali come "gold standard" per il carcinoma pancreatico ma è purtroppo caratterizzato da scarsa specificità: se ne osserva un aumento in altre patologie maligne come colangiocarcinoma, carcinoma epatico e adenocarcinoma del colon, e in patologie benigne come pancreatiti, pseudocisti pancreatiche e cirrosi. In alcuni studi il CA19-9 è stato determinato in pazienti asintomatici, con l'obiettivo di valutarne il potenziale di screening, ma i risultati ottenuti hanno mostrato i suoi limiti nella pratica clinica. Altri studi hanno evidenziato la sua bassa sensibilità e specificità, rilevando valori aumentati di CA19-9 in patologie benigne, diabete e stati infiammatori del tratto gastrointestinale (80). I risultati del nostro primo studio su PIVKA-II nel carcinoma pancreatico confermano come il CA19-9 risulti essere influenzato da eventuali stati infiammatori e patologie benigne, poiché in quest'ultima risulta alterato nel 60% dei pazienti, mostrando la sua scarsa utilità nella diagnosi differenziale. CA 242 è un marker sierologico aumentato nei pazienti con carcinoma pancreatico, è stato riportato che i suoi valori sierici correlano con le dimensioni e la differenziazione del cancro pancreatico, con l'invasione linfonodale e la presenza di metastasi epatiche. La specificità di CA 242 tuttavia è ancora non ottimale e in una coorte di pazienti affetti da carcinoma pancreatico abbiamo riscontrato una inferiore sensibilità rispetto al PIVKA-II. Un ulteriore svantaggio che riguarda il CA242 è l'utilizzo di un dosaggio immunoenzimatico per la sua determinazione: quest'ultimo presenta infatti dei limiti legati sia alla metodica manuale, sia a eventuali fattori che possono influenzare la reazione colorimetrica, dando origine a probabili falsi positivi (29). La determinazione del PIVKA-II ha invece i vantaggi del sistema di dosaggio automatizzato: maggiore standardizzazione del risultato, minore possibilità di incorrere in errori analitici e, non meno importante, la riduzione dei tempi di refertazione e dei costi. Il CEA è il secondo biomarker più comunemente usato per la diagnosi di carcinoma pancreatico, nonostante valori patologici si riscontrino solo nel 30-60% dei pazienti affetti da tale neoplasia, dati confermati anche nella nostra popolazione e da una grande quantità di studi che definiscono sensibilità e specificità di CEA nel carcinoma pancreatico come non ottimale, anche perché il CEA può essere spesso positivo in diverse condizioni non neoplastiche come infiammazioni coliche e tabagismo (33). A causa dell'insufficiente sensibilità individuale o specificità di biomarcatori di carcinoma

pancreatico già affermati, il nostro studio fa parte del costante impegno in ricerca per identificare biomarcatori diagnostici validi per il PDAC. Secondo la nostra conoscenza, questo studio pilota è il primo ad esplorare il ruolo di PIVKA-II sia come biomarcatore sierico di PDAC e ad indagarne l'espressione tissutale ed i meccanismi molecolari di produzione. I nostri risultati sono in linea con diversi casi di neoplasie gastrointestinali PIVKA-II produttrici: un aumento del PIVKA-II sopra il cut off di normalità è stato riportato da studi in letteratura, soprattutto dal Giappone, in altre neoplasie gastrointestinali come stomaco, colon e lo stesso pancreas (73). Nei tumori PIVKA-II secernenti è stato verificato un alto tasso di metastasi epatiche e una prognosi infausta. Il meccanismo di produzione di PIVKA-II non è noto nei tumori non HCC.

È stata ipotizzata una differenziazione epatoide come uno dei meccanismi di produzione del PIVKA-II da parte di tali neoplasie sebbene in una recente analisi sia stato segnalato che 10/23 casi riportati di tumori PIVKA-II secernenti (43.4%) non aveva tale differenziazione istologica. Di recente riscontro è anche un carcinoma neuroendocrino del polmone PIVKA-II secernente senza differenziazione epatoide all'analisi immunoistochimica (81). Nel 2023 in una casistica di 138 pazienti con PDAC è stato inoltre riportato che PIVKA-II può essere efficacemente utilizzato per predire invasione vascolare e metastatizzazione al contrario del gold standard CA 19.9 (AUC: PIVKA-II 0.76 vs CA19.9 0.54) (82). I primi dati ottenuti nel laboratorio di Marcatori Tumorali del Policlinico Umberto I hanno rilevato che la valutazione dei livelli sierici di PIVKA-II può dimostrarsi utile non solo per il rilevamento di carcinoma pancreatico ma anche nella diagnosi differenziale di lesioni pancreatiche. Nel primo studio condotto infatti questo biomarcatore risultava meno incline all'elevazione sopra il cut off in caso di patologie pancreatiche benigne rispetto ai biomarcatori attualmente utilizzati per carcinoma pancreatico come CA19.9, CEA e CA 242. Per rafforzare il dato ottenuto attraverso indagini su siero, nel presente lavoro di ricerca abbiamo utilizzato l'analisi in immunofluorescenza di sezioni di carcinoma pancreatico per valutare la presenza di PIVKA-II. Non essendoci riscontro in letteratura di pregresse valutazioni dell'espressione tissutale di PIVKA-II nel carcinoma del pancreas abbiamo elaborato un protocollo sperimentale all'interno del laboratorio di marcatori tumorali in collaborazione con il dipartimento di medicina sperimentale dell'Università Sapienza di Roma, dov'è avvenuta anche la lettura al microscopio Apotome. I dati emersi sono risultati incoraggianti: abbiamo riscontrato infatti l'effettiva presenza di fluorescenza FITC, a segnalare la presenza di PIVKA-II nelle sezioni esaminate. La distribuzione è risultata non omogenea in tutte le aree, ed il pattern è prevalentemente caratterizzato da dots. Per quanto riguarda la localizzazione del PIVKA-II, ad eccezione di pochissime cellule in cui la sovrapposizione con il blu del DAPI ha evidenziato una posizione nucleare del biomarcatore, quest'ultimo localizza prevalentemente in sede citoplasmatica, così come avviene, come riportato in letteratura, anche nel carcinoma epatocellulare. Il riscontro dell'espressione tissutale di PIVKA-II rafforza la nostra ipotesi della produzione di questo marcatore da parte del carcinoma pancreatico, ed apre la strada a nuovi studi

con casistica più ampia per determinarne il potenziale ruolo in ambito patogenetico, diagnostico o prognostico del PIVKA-II sia sierico che tissutale. Poiché l'espressione sierica del PIVKA-II è stata correlata con la prognosi in altri tumori PIVKA-II secernenti, abbiamo ritenuto interessante analizzare i valori di PIVKA-II sia sierico dopo intervento terapeutico per valutare il biomarcatore anche da un punto di vista prognostico, ed i nostri risultati sono stati positivi: su 7 casi selezionati, abbiamo osservato in tutti una diminuzione dei livelli di PIVKA-II dal tempo T0 al tempo T3, rafforzando la nostra ipotesi di produzione di PIVKA-II da parte del tessuto tumorale. Lo studio svolto *in vitro*, ha inoltre fornito delle preziose informazioni sugli aspetti biologici di PIVKA-II: per la prima volta, infatti, abbiamo dimostrato che questa proteina è espressa in diverse linee cellulari che originano da PDAC e, tra queste, le cellule Panc-1 rappresentano il modello ideale per poter studiare *in vitro* le caratteristiche di questo biomarcatore in relazione alla patologia neoplastica pancreatico. Come è stato ampiamente descritto nella sezione dei risultati, la caratteristica distribuzione citoplasmatica e granulare del PIVKA-II osservata *in vivo*, può essere confermata anche nel caso della linea cellulare Panc-1.

Inoltre, come abbiamo anticipato nei risultati, la proteina PIVKA sembra essere associata a strutture filamentose del citoscheletro che probabilmente forniscono il supporto meccanico necessario al trasporto intracellulare della proteina. L'importanza di questa osservazione deve essere considerata in relazione al fatto che la riorganizzazione del citoscheletro rappresenta un evento di fondamentale importanza nella biologia dei tumori e nella progressione tumorale. Tuttavia, l'analisi morfologica della distribuzione del PIVKA al momento rappresenta solo un dato preliminare, in quanto saranno necessari ulteriori studi per chiarire come si altera la struttura cellulare in risposta ad un opportuno stimolo per favorire il trasporto intracellulare della proteina. Uno dei tratti distintivi del carcinoma pancreatico è la riprogrammazione del metabolismo cellulare promossa dalle mutazioni dell'oncogene KRAS (76). È infatti noto che le cellule tumorali assorbono enormi quantità di glucosio, che viene fermentato per produrre lattato anche in presenza di ossigeno, un processo descritto come effetto Warburg. È noto che le cellule tumorali hanno un flusso glicolitico notevolmente aumentato anche in presenza di ossigeno e della normale funzione mitocondriale. Il flusso glicolitico è il processo centrale del metabolismo del carbonio in tutte le cellule, che non solo produce l'adenosina trifosfato (ATP), ma fornisce anche biomassa per i processi anabolici che supportano la proliferazione cellulare. In sostanza, la riprogrammazione delle vie metaboliche, inclusa la glicolisi potenziata, è normalmente riconosciuta come uno dei segni distintivi emergenti del cancro. Alla luce di queste osservazioni, ci siamo chiesti che influenza potesse avere il glucosio sulla proteina PIVKA-II nel nostro sistema *in vitro*. Per quanto riguarda la produzione del biomarcatore, se da una parte dosi moderate di glucosio non alterano la produzione della proteina, dosi elevate di glucosio (50mM) determinano una riduzione nella produzione del PIVKA attribuibile alla glucotossicità che si manifesta con esaurimento funzionale delle cellule stesse. Per quanto concerne invece il rilascio del

biomarcatore, nelle cellule Panc-1 nelle 48 ore di trattamento, abbiamo dimostrato che indubbiamente il glucosio rappresenta uno stimolo sufficiente a indurre il rilascio del PIVKA-II nel surnatante cellulare. In questo studio, emerge anche un dato di fondamentale importanza per classificare un biomarcatore come precoce: il rilascio del PIVKA nel surnatante delle cellule Panc-1 promosso dal glucosio, è un evento che si verifica contemporaneamente all'attivazione dell'EMT, un meccanismo biologico finemente regolato che svolge un ruolo importante nella progressione neoplastica. Durante l'EMT, le cellule epiteliali perdono molte delle loro caratteristiche e acquisiscono un fenotipo mesenchimale che permette l'invasione dei tessuti circostanti, la formazione di metastasi a distanza, la riprogrammazione metabolica, la resistenza ai chemioterapici e alla soppressione del sistema immunitario (83). L'attivazione di questo meccanismo, nel PDAC rappresenta uno dei primi eventi che si verificano al livello temporale conferendo al tumore la caratteristica aggressività (84,85). Come abbiamo dimostrato nel sistema in vitro offerto dalle Panc-1, il rilascio del PIVKA-II avviene in concomitanza con l'attivazione della EMT indotta dal glucosio. Il fatto che il rilascio di PIVKA-II sia associabile con un ben preciso momento della EMT suggerisce che PIVKA-II possa rappresentare un segnale precoce di malignità della neoplasia rendendolo uno strumento indispensabile per la diagnosi precoce del carcinoma pancreatico.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il ruolo del Laboratorio di Patologia Clinica nella individuazione precoce, in pazienti a rischio di carcinoma pancreatico, di una neof ormazione o di una recidiva, è di fondamentale importanza. Spesso, infatti, le informazioni fornite da una appropriata gestione dei biomarcatori possono rappresentare per l'oncologo uno strumento diagnostico accurato da integrare con le procedure di imaging. In questa prospettiva l'identificazione di marcatori diagnostici sensibili e specifici è cruciale nell'individuare neoplasie pancreatiche pre-invasive, nel distinguere cellule reattive ma benigne da cellule maligne, nel discernere i differenti tipi tumorali, nella diagnosi precoce e nella predizione del tempo di recidiva. Biomarcatori di natura proteica, come il PIVKA-II, quantificabili facilmente nel siero, sono i più adatti per la valutazione clinica di routine in oncologia, poiché richiedono una quantità esigua di siero, sono a costo contenuto, hanno un'alta riproducibilità e i campioni non richiedono un pretrattamento particolarmente indaginoso (ad esempio estrazione, purificazione) (86). Poiché PIVKA-II è espresso nel tessuto di carcinoma pancreatico e nel siero dei pazienti affetti da tale neoplasia (con performance analitiche migliori rispetto ai marcatori attualmente in uso quali CA19-9, CEA e CA 242), la sua determinazione potrebbe essere presa in considerazione la gestione clinica del carcinoma pancreatico. I nostri dati suggeriscono anche che la valutazione dei livelli sierici di PIVKA-II può dimostrarsi utile non solo per il rilevamento di PC ma anche nel monitoraggio della patologia post-intervento terapeutico. È stato ampiamente dimostrato in letteratura che la combinazione di più biomarcatori sierici aumenta la specificità e sensibilità rispetto ad un singolo marcatore: in questo senso l'aggiunta del PIVKA-II a complemento degli altri nell'accuratezza diagnostica potrebbe essere di cruciale importanza per facilitare il riconoscimento del carcinoma pancreatico (87). In considerazione della significativa riduzione dei livelli di PIVKA-II dopo intervento terapeutico in pazienti selezionati, possiamo ipotizzare anche un ruolo prognostico di tale marcatore, e predittivo di risposta al tipo di terapia. Un ulteriore approfondimento sull'espressione tissutale e cellulare di PIVKA-II nel carcinoma pancreatico, potrebbe essere importante per determinarne il possibile significato clinico-patologico. Le informazioni complessive derivanti dalla parte dello studio in vitro sottolineano l'importanza, nel campo della ricerca biomedica, di individuare dei modelli sperimentali preclinici utili sia per individuare specifici meccanismi cellulari coinvolti nella progressione del PDAC che per valutare gli effetti di possibili strategie terapeutiche mirate. Tale ulteriore caratterizzazione potrebbe essere utile per comprendere in misura sempre maggiore sia i meccanismi biologici del carcinoma pancreatico sia l'eventuale ruolo del biomarcatore nell'iniziazione, progressione e metastatizzazione del carcinoma pancreatico, così come avvenuto in passato per il PIVKA-II nell'epatocarcinoma (61). Sebbene i risultati ottenuti in questo studio siano da considerarsi preliminari, aprono sicuramente nuove prospettive alla diagnosi precoce del carcinoma pancreatico. Sarebbe interessante anche in futuro, correlare i livelli circolanti e l'entità

dell'espressione tissutale di PIVKA-II con i dati di imaging, alla diagnosi e dopo terapia, ed eventualmente anche a specifici pattern istologici o al grading della patologia.

In conclusione, alla luce dei nostri risultati e delle prospettive future, includere la misura del biomarcatore sierico PIVKA-II nel work up diagnostico per il carcinoma pancreatico potrebbe essere considerato un valido strumento aggiuntivo nella gestione di questa patologia maligna. Ulteriori studi multicentrici randomizzati con una numerosità campionaria più ampia saranno necessari per confermare i nostri incoraggianti dati preliminari.

7. ATTIVITA' SCIENTIFICA CORRELATA ALLO STUDIO

Farina, A.; Viggiani, V.; Cortese, F.; Moretti, M.; Tartaglione, S.; Angeloni, A.; Anastasi, E. *Combined PIVKA II and Vimentin-Guided EMT Tracking in Pancreatic Adenocarcinoma Combined Biomarker-Guided EMT Tracking in PDAC. Cancers* 2024, 16, 2362. <https://doi.org/10.3390/cancers16132362>

Farina A, Tartaglione S, Preziosi A, Mancini P, Angeloni A, Anastasi E. *PANC-1 Cell Line as an Experimental Model for Characterizing PIVKA-II Production, Distribution, and Molecular Mechanisms Leading to Protein Release in PDAC. Int J Mol Sci.* 2024 Mar 20;25(6):3498.

Tartaglione S., Farina A., Oliviero I., Cortese F., Viggiani V., Angeloni A., Anastasi E. *PIVKA-II DIAGNOSTIC THRESHOLD IN ITALIAN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA PATIENTS: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE 28° SIMPOSIO ANNUALE ELAS-ITALIA LIGAND ASSAY Bologna 20-22 novembre 2023.*

Tartaglione S, Mancini P, Viggiani V, Chirletti P, Angeloni A, Anastasi E. *PIVKA-II: A biomarker for diagnosing and monitoring patients with pancreatic adenocarcinoma. PLoS One.* 2021 May 20;16(5):e0251656.

BIBLIOGRAFIA

1. Sung, H. et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J. Clin.* 71, 209–249 (2021).
2. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. *Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol.* 2015 Sep;26 Suppl 5:v56-68.
3. Miller, K. D. et al. *Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020*. *CA Cancer J. Clin.* 70, 443–459 (2020)
4. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. *Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors*. *World J. Oncol.* 10, 10–27 (2019)
5. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N *Pancreatic adenocarcinoma*. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):1039-49.
6. Sturm N, Ettrich TJ, Perkhofer L. *The Impact of Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma on Diagnosis, Surveillance and Therapy*. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 3;14(1):217
7. AIRTUM, “I numeri del cancro in Italia”, ed. 2023
8. Landi, S..*Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681, 299-307 (2009).
9. Jacobs, E. J. et al. *Family history of cancer and risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan)*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 1421-1428 (2010).
10. Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. *Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies*. *International Journal of Epidemiology* (2014).
11. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Michaud DS, Severinsen MT. *Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Int J Cancer.* 2010 May 15;126(10):2394-403.
12. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds). *WHO classification of tumours of the digestive system (4th edition)*. WHO-IARC, Lyon, 2010.
13. Raimondi, S. et al. *Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 349-358 (2010).
14. Sah, R. P. et al. *New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 423-433 (2013).
15. Huxley, R. et al. *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. *Br J Cancer* 92, 2076-2083 (2005).
16. Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. *Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies*. *International Journal of Epidemiology* (2014).

17. Becker, A. E. *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection.* *World J Gastroenterol* 20, 11182-11198 (2014).
18. *Ductal adenocarcinoma of the pancreas: WHO classification of tumours of the digestive system.* Hruban R, Boffetta P, Hiraoka N, et al. Lyon, IARC, 2010, pp 279-291.
19. Grant TJ, Hua K, Singh A. *Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer.* *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;144:241-275. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.008. Epub 2016 Oct 15. PMID: 27865459; PMCID: PMC6260831.
20. Hamilton Stanley R. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* IARC, Lyon (2000).
21. Kloppel, G. *Clinical pathology of exocrine tumors* 467-479. Williams & Wilkins. (1998).
22. VanHeerden, J. *Pancreatic resection for the carcinoma of the pancreas: Whipple versus total pancreatectomy- an institutional prospective.* *World J Surg* 8, 880-888 (1984).
23. Kayahara, M. et al. *Lymphatic flow in carcinoma of the head of the pancreas.* *Cancer* 70, 2061-2066 (1992).
24. *Precursors to invasive pancreatic cancer.* Maitra A, Fukushima N, Takaori K. s.l. : *Adv Anat Pathol*, 2005. 12(2):81-91.
25. Jacobs, E. J. et al. *Family history of cancer and risk of Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan).* *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 1421-1428 (2010).
26. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome.* *Gastroenterology* 2000; 119:1447-53.
27. Becker, A. E. *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection.* *World J Gastroenterol* 20, 11182-11198 (2014).
28. Takaori K, Bassi C, Biankin A, Brunner TB, Cataldo I, Campbell F, et al. *International Association of Pancreatology (IAP)/European Pancreatic Club (EPC) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer.* *Pancreatology.* 2016;16:14–27
29. Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L. *Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis.* *Clin Chim Acta.* 2013;418:22–9.
30. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. *CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects.* *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:247-60. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_15
31. Liang, J. J. et al. *Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Carcinoma.* *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2, 1-10 (2009).
32. Berger, A. C. et al. *Postresection CA 19-9 Predicts Overall Survival in Patients With Pancreatic Cancer Treated With Adjuvant Chemoradiation: A Prospective Validation by RTOG 9704.* *Journal of Clinical Oncology* 26, 5918-5922 (2008)
33. Zhang Y, Yang J, Li H, Wu Y, Zhang H, Chen W. *Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis.* *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(7): 11683-91.
34. Li X, Guo X, Li H, Lin H, Sun Y. *Serum carbohydrate antigen 242 expression exerts crucial function in the diagnosis of pancreatic cancer.* *Tumor Biol.* 2014;35:5281–6. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1687-5>

35. Distler M, Pilarsly E, Kersting S, Grützmann R. Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas – A retrospective tumor marker prognostic study. *Int J Surg.* 2013; 11:1067-72.
36. Teruya M, Soundar E, Hui SR, Eldin K, Adcock D, Teruya J. PIVKII correlates with INR but not protein C or protein S concentrations in cord blood among newborns. *J Neonatal Perinatal Med* 2016;9:139–43
37. Dam H: Cholesterinstoffwechsel in Hühner-eiern und Hühnchen. *Biochem Z* 1929; 215: 475–492.
38. Binkley SB, MacCorquodale DW, Thayer SA, Doisy EA: The constitution of vitamin K. *J Biol Chem* 1940;133:721–729.
39. Guylaine Ferland. *The Discovery of Vitamin K and Its Clinical Applications.* *Ann Nutr Metab* 2012;61:213–218
40. Sarah L. Booth, *Roles for Vitamin K Beyond Coagulation,* *Annu. Rev. Nutr.* 2009. 29:89–110
41. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* *Inst. Med., Natl. Acad. Press* 2001.
42. Fusaro M, Gallieni M, Rizzo MA, Stucchi A, Delanaye P, Cavalier E, Moysés RMA, Jorgetti V, Iervasi G, Giannini S, Fabris F, Aghi A, Sella S, Galli F, Viola V, Plebani M *Vitamin K plasma levels determination in human health.* *Clin Chem Lab Med.* 2017 May 1;55(6):789-799. doi: 10.1515/cclm-2016-0783. Review.
43. Krzyżanowska P1, Drzymala-Czyż S1, Pogorzelski A2, Duś-Żuchowska M1, Skorupa W3, Bober L4, Sapiejka E5, Oralewska B6, Rohovyk N4, Moczko J7, Nowak J1, Wenska-Chyży E1, Rachel M8, Lisowska A1, Walkowiak J9. *Vitamin K status in cystic fibrosis patients with liver cirrhosis.* *Dig Liver Dis.* 2017 Jun;49(6):672-675. doi: 10.1016/j.dld.2017.01.155. Epub 2017 Jan 23.
44. Elliott MJ1, Booth SL2, Hopman WM3, Holden RM *Assessment of potential biomarkers of subclinical vitamin K deficiency in patients with end-stage kidney disease.* *Can J Kidney Health Dis.* 2014 Jun 24;1:13. doi: 10.1186/2054-3581-1-13.
45. Rick H. van Gorp, Leon J. Schurgers, *New Insights into the Pros and Cons of the Clinical Use of Vitamin K Antagonists (VKAs) Versus Direct Oral Anticoagulants (DOACs),* *Nutrients.* 2015 Nov; 7(11): 9538–9557
46. Willems B.A.G., Vermeer C., Reutelingsperger C.P.M., Schurgers L.J. *The realm of vitamin K dependent proteins: Shifting from coagulation toward calcification.* *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58:1620–1635.
47. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, et al. *Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population.* *J Natl Cancer Inst.* 1993 Sep 15;85(18):1483-92.
48. Nimptsch K, Rohrmann S, Kaaks R, Linseisen J. *Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg).* *Am J Clin Nutr.* 2010 May;91(5):1348-58.

49. Juanola-Falgarona M, Salas-Salvado J, Martinez-Gonzalez MA, Corella D Estruch R, Ros E, et al. Dietary intake of vitamin K is inversely associated with mortality risk. *J. Nutri.* 2014 Mar 19.
50. Dahlberg S, Ede J, Schött U Vitamin K and cancer. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017 Dec;77(8):555-567. doi: 10.1080/00365513.2017.1379090. Epub 2017 Sep 21. Review.
51. Ivanova D1, Zhelev Z2, Getsov P3, Nikolova B4, Aoki I5, Higashi T6, Bakalova R7. Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect. *Redox Biol.* 2018 Jun;16:352-358. doi: 10.1016/j.redox.2018.03.013. Epub 2018 Mar 20.
52. Caricchio R1, Kovalenko D, Kaufmann WK, Cohen PL Apoptosis provoked by the oxidative stress inducer menadione (Vitamin K(3)) is mediated by the Fas/Fas ligand system. *Clin Immunol.* 1999 Oct;93(1):65-74.
53. B.E. Jones, C.R. Lo, H. Liu, Z. Pradhan, L. Garcia, A. Srinivasan, K.L. Valentino, M.J. Czaja, Role of caspases and NF- κ B signaling in hydrogen peroxide- and superoxide-induced hepatocyte apoptosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 (2000) G693–G699
54. M.H. Lee, Y. Cho, D.H. Kim, H.J. Woo, J.Y. Yang, H.J. Kwon, M.J. Yeon, M. Park, S.H.Kim, C.Moon, N.Tharmalingam, T.U.Kim, J.B.Kim, Menadione induces G2/M arrest in gastric cancer cells by down-regulation of CDC25C and proteasome mediated degradation of CDK1 and cyclin B1, *Am. J. Transl. Res.* 8 (2016) 5246–5255.
55. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2015 Sep 14;13:39. doi: 10.1186/s12964-015-0118-6. Review.
56. Davis-Yadley AH, Malafa MP. Vitamins in pancreatic cancer: a review of underlying mechanisms and future applications. *Adv Nutr.* 2015;6:774-802.
57. Shibayama-Imazu T, Sakairi S, Watanabe A, Aiuchi T, Nakajo S, Nakaya K. Vitamin K(2) selectively induced apoptosis in ovarian TYU-nu and pancreatic MIA PaCa-2 cells out of eight solid tumor cell lines through a mechanism different from geranylgeraniol. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003 Jan;129(1):1-11
58. Wei G, Wang M, Carr BI. Sorafenib combined vitamin K induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines through RAF/MEK/ERK and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Journal of Cell Physiology.* 2010 July;224(1):112-9.
59. Showalter SL, Wang Z, Costantino CL, Witkiewicz AK, Yeo CJ, Brody JR, et al. Naturally occurring K vitamins inhibit pancreatic cancer cell survival through a caspase-dependent pathway. *J Gastro and Hep.* 2010 Apr;25(4):738-44
60. Liebman, Furie, Tong, Blanchard, Lo, Lee, Coleman, Furie (1984) "Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma." *The new England Journal of Medicine* vol 310 n. 22
61. Caviglia GP, Ribaldone DG, Abate ML, Ciancio A, Pellicano, R, Smedile A, Saracco GM. Performance of protein induced by vitamin K absence or antagonist-II assessed by chemiluminescence enzyme immunoassay for hepatocellular carcinoma detection: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53:734-40
62. Ueda N, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Nakanishi Y, Suzuki M, Matsuo N, Tanaka S, Nishina S, Uemura M, Takaki A, Shiratori Y, Yamamoto K. Exon 2 deletion splice variant of

- gamma-glutamyl carboxylase causes des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma cell lines. Mol Oncol. 2008 Oct;2(3):241-9. doi: 10.1016/j.molonc.2008.06.004. Epub 2008 Jun 20.*
63. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Su, G.L., Lok AS, Marrero JA. Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3 *Cancer Biomark* 2007, 3(2): 79-87.
 64. Bertino, G., Ardiri, A.M., Boemi, P.M. et al. A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma *Panminerva Med* 2008, 50(3): 221-6
 65. Inagaki YI, Tang W, Makuuchi M, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N *Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-γ-carboxyprothrombin. Liver Int. 2011 Jan;31(1):22-35. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02348.x. Epub 2010 Sep 27.*
 66. Esposito, Dorizzi (2010) "Screening e diagnosi tumori epatici" *RIMeL / IJLaM* 2010; 6 (suppl.)
 67. Viggiani, Palombi, Gennarini, D'Ettorre, De Vito, Angeloni, Frati, Anastasi. (2016) "Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA II) specifically increased in Italian hepatocellular carcinoma patients." *Scand J Gastroenterol. 2016 Oct;51(10):1257-62.*
 68. J. Ji, H. Wang, Y. Li, L. Zheng, Y. Yin, Z. Zou, F. Zhou, W. Zhou, F. Shen, C. Gao, *Diagnostic evaluation of des-gamma-Carboxy prothrombin versus α-fetoprotein for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in China: a large-scale, multicentre study, PLoS One* 11 (2016), e0153227..
 69. Takahashi, Inoe, Fukusato (2010) "Protein induced by vitamin k absence or antagonist II – producing gastric cancer." *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010 October 15; 1(4): 129-136 ISSN 2150-5330
 70. Kato, Iwasaki, Taniguchi, Onodera, Matsuda, Kawakami, Higuchi, Kato, Kato, Furukawa, (2014) "Primary colon cancer with a high serum PIVKA – II level." *International Journal of Surgery Case Reports* 6 (2015) 95–99
 71. Matsueda, Yamamoto, Yoshida, Notohara (2006) "Hepatoid carcinoma of the pancreas producing protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II) and α-fetoprotein (AFP)" *J Gastroenterol* 2006; 41:1011–1019
 72. Bednar F, Simeone DM. *Pancreatic cancer stem cell biology and its therapeutic implications. J Gastroenterol. 2011;46:1345-52.*
 73. Tartaglione S, Pecorella I, Zarrillo SR, Granato T, Viggiani V, Manganaro L, Marchese C, Angeloni A, Anastasi E. *Protein Induced by Vitamin K Absence II (PIVKA-II) as a potential serological biomarker in pancreatic cancer: a pilot study. Biochem Med (Zagreb). 2019 Jun 15;29(2):020707. doi: 10.11613/BM.2019.020707. PMID: 31223261; PMCID: PMC6559614.*
 74. Dong L, Qiu X, Gao F, Wang K, Xu X. *Protein induced by vitamin K absence or antagonist II: Experience to date and future directions. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2023 Nov;1878(6):189016. doi: 10.1016/j.bbcan.2023.189016. Epub 2023 Nov 7. PMID: 37944832.*

75. Montanari, E, Oates, A Di Meo, C et al. *Hyaluronan Based Nanohydrogels for Targeting Intracellular - ar S. Aureus in Human Keratinocytes*. 2018 *Advanced Healthcare Materials*, 7 (12). 1701483. ISSN 2192-2640
76. Jian Z, Cheng T, Zhang Z, Raulefs S, Shi K, Steiger K, Maeritz N, Kleigrew K, Hofmann T, Benitz S, Bruns P, Lamp D, Jastroch M, Akkan J, Jäger C, Huang P, Nie S, Shen S, Zou X, Ceyhan GO, Michalski CW, Friess H, Kleeff J, Kong B. *Glycemic Variability Promotes Both Local Invasion and Metastatic Colonization by Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul 26;6(4):429-449. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.07.003. PMID: 30258965; PMCID: PMC6154439.
77. Ying H., Kimmelman A.C., Lyssiotis C.A., Hua S., Chu G.C., Fletcher-Sananikone E., Locasale J.W., Son J., Zhang H., Coloff J.L., et al. *Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism*. *Cell*. 2012;149:656–670. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.058.
78. Oyanagi J, Ogawa T, Sato H, Higashi S, Miyazaki K. *Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel*. *PLoS One*. 2012;7(12):e53209. doi: 10.1371/journal.pone.0053209. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23300891; PMCID: PMC3534040.
79. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. *Nature*. 2015 Nov 26;527(7579):525-530. doi: 10.1038/nature16064. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26560028; PMCID: PMC4849281
80. Boulaiz, Ramos, Griñán-Lisón, García- Rubiño, Vicente, Marchal (2017) “What’s new in the diagnosis of pancreatic cancer: a patent review (2011-present)” *Expert Opinion on Therapeutic Patents*
81. Kurohama H, Mihara Y, Izumi Y, Kamata M, Nagashima S, Komori A, Matsuoka Y, Ueki N, Nakashima M, Ito M. *Protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II) producing large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) of lung with multiple liver metastases: A case report*. *Pathol Int*. 2017 Feb;67(2):105-109.
82. Y. Yang, G. Li, Y. Zhang, Y. Cui, J. Liu, *Protein induced by vitamin K absence II: a potential biomarker to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatic benign lesions and predict vascular invasion*, *J. Clin. Med.* (2023) 12.
83. Pastushenko I, Blanpain C. *EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis*. *Trends Cell Biol*. 2019 Mar;29(3):212-226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30594349.
84. Palamaris K, Felekouras E, Sakellariou S. *Epithelial to Mesenchymal Transition: Key Regulator of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression and Chemoresistance*. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 4;13(21):5532. doi: 10.3390/cancers13215532. PMID: 34771695; PMCID: PMC8582651.
85. Hu X, Chen W. *Role of epithelial-mesenchymal transition in chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *World J Clin Cases*. 2021 Jul 6;9(19):4998-5006. doi: 10.12998/wjcc.v9.i19.4998. PMID: 34307550; PMCID: PMC8283607.
86. Saitta C, Raffa G, Alibrandi A, Brancatelli S, Lombardo D, Tripodi G, Raimondo G, Pollicino T. *PIVKA-II is a useful tool for diagnostic characterization of ultrasound-detected liver nodules in cirrhotic patients*. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun;96(26):e7266. doi: 10.1097/MD.0000000000007266. PMID: 28658121; PMCID: PMC5500043.

87. Zhang, Yang, Li, Wu, Zhang, Chen (2015) "Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis" *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):11683-1169