UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia curriculum Biomedico e Biomolecolare

ELABORATO FINALE

Alterazioni indotte dalla microgravità simulata in cellule PDAC: potenziale ruolo della Tricostatina A nel ripristino del fenotipo cellulare

Candidata: Giorgia Gribaudo

Tutor interno: Dott.ssa Maria Angela Masini

Stage svolto presso Università del Piemonte Orientale

Co-relatore: Dott.ssa Corinna Anais Pagano

Anno Accademico 2024/2025

INDICE

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

1. INTRODUZIONE 1

1.1 Aspetti anatomo-istologici e funzionali del pancreas e delle sue neoplasie 1

1.1.1 Pancreas esocrino e pancreas endocrino 1

1.1.2 Neoplasie del pancreas endocrino 5

1.1.3 Neoplasie del pancreas esocrino 9

1.2 Adenocarcinoma Pancreatico Duttale 12

1.2.1 Fattori di rischio modificabili 13

1.2.2 Lesioni pancreatiche pre-neoplastiche 15

1.2.3 Malattie ereditarie predisponenti 19

1.2.4 Basi molecolari e cellulari dello sviluppo neoplastico del PDAC 22

1.2.5 Alterazione della regolazione epigenetica 30

1.2.6 Microambiente tumorale 32

1.2.7 Terapie 37

1.3 Tricostatina A 42

1.3.1 Gli enzimi istone deacetilasi 42

1.3.2 Inibitori dell'istone deacetilasi 45

1.3.3 Caratteristiche ed effetti della tricostatina A 49

1.4 Microgravità 52

1.4.1 Metodi di simulazione della microgravità 53

1.4.2 Effetti della microgravità sulle cellule tumorali 57

2. MATERIALI E METODI 59

2.1 Colture cellulari ed esposizione alla microgravità 59

2.2 Tricostatina A 60

2.3 Saggio MTT per la proliferazione cellulare 60

2.4 Analisi proteomica 61

2.5 Western Blot 62

2.6 Estrazione RNA, retrotrascrizione e qRT-PCR 63

2.7 Analisi statistica 65

3. SCOPO DEL LAVORO 66

4. RISULTATI 67

4.1 Effetto della tricostatina A sulle colture cellulari 2D e 3D 67

4.2 Effetto della tricostatina A sugli sferoidi di adenocarcinoma pancreatico 67

4.2.1 Modulazione dei pathway proteomici 68

4.2.2 Effetto sull'apoptosi (caspasi 3, 8, 9 e BAD) 68

4.2.4 Modulazione dei markers metastatici 71

4.2.5 Effetto sulle giunzioni cellulari 72

5. DISCUSSIONE 76

6. CONCLUSIONI 82

7. BIBLIOGRAFIA 83

8. SITOGRAFIA 104

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ACC: Acinar Cell Carcinoma (carcinoma a cellule acinari).

ACTB: Actin Beta.

ACTC1: Actin Alpha Cardiac Muscle 1.

ACTN4: Actinin Alpha 4.

ACTR2: Actin-Related Protein 2.

ADAMT1S: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 1.

AGR2: Anterior Gradient 2.

AKT: Protein kinase B.

ALDH1A3: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A3.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

ARID1A: AT-rich Interaction Domain 1A.

ARPC5: Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 5

AT: Ataxia-Telangiectasia (atassia-telangectasia).

ATM: Ataxia-Telangiectasia Mutated.

ATRX: Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked.

BAD: Bcl-2-associated death promoter.

BCA: Bicinchoninic Acid assay (dosaggio con acido bicinconinico).

BER: Base Excision Repair (riparazione per escissione di una base).

BET: Bromodomain and Extra-Terminal.

BID: BH3 interacting domain death agonist.

BIM: Bcl-2 interacting mediator of cell death.

BMI: Body Mass Index (indice di massa corporea).

BNC1: Basonuclin 1.

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase.

BRCA: Breast Cancer gene.

BRG1: Brahma-Related Gene 1

BSA: Bovine Serum Albumin (albumina sierica bovina).

CAA: Cancer-Associates Adipocytes (adipociti tumore-associati).

CAF: Cancer-Associated Fibroblast (fibroblasti tumore-associati).

cAMP: cyclic Adenosine MonoPhosphate (adenosina monofosfato ciclica).

CCL2: C-C Motif Chemokine Ligand 2.

CD44: Cluster of Differentiation 44.

CDC42: Cell Division Control protein 42 homolog.

CDCP1: CUB Domain-Containing Protein 1.

CDH1: Cadherin 1.

CDK: Cyclin-Dependent Kinase.

cDNA: complementary DNA (DNA complementare).

CDT1: Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1.

CDX2: Caudal-type homeobox transcription factor 2.

CFL1: Cofilin-1.

CHEK2: Checkpoint Kinase 2.

circRNA: circular RNA.

Co-SMAD: Common SMAD.

CSC: Cancer Stem Cells (cellule staminali tumorali).

CTFR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

CTNNA1: Catenin Alpha 1.

CURD: Cancer Up-Regulated Drug Resistant.

CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12.

DAXX: Death Domain-Associated Protein.

DCP: pancreaticoduodenectomy (duodenocefalopancreasectomie).

DDA: Data-Dependent Acquisition (acquisizione dipendente dai dati).

DDR: DNA Damage Response (pathway di riparazione del DNA).

dFdC: 2',2'-Difluorodeoxycytidine (2',2'-difluoro-2'-desossicitidina).

dFdCTP: 2',2'-Difluorodeoxycytidine Triphosphate.

DIA: Data-Indipendent Acquisition (acquisizione indipendente dai dati).

dMMR/MSI-H: deficient Mismatch Repair/ Microsatellite Instability-High.

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetilsolfossido).

DNA: Deoxyribonucleic Acid (acido desossiribonucleico).

DNM2: Dynamin 2.

dNTPs: Deoxynucleotide Triphosphates (deossinucleotidi trifosfato).

DPC4: Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4.

DR: Desmoplastic Reaction (reazione desmoplastica).

DTT: Dithiothreitol (ditiotreitolo).

ECM: Extracellular Matrix (matrice extracellulare).

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (acido etilendiamminotetraacetico).

EGF: Epidermal Growth Factor.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (transizione epitelio-mesenchimale).

EPCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule.

Erk: extracellular signal-regulated kinase (chinasi regolata da segnali extracellulari).

EZR: Ezrin.

Fak: Focal Adhesion Kinase.

FAMMM: Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome (Melanoma Familiare con Nevi Multipli Atipici).

FAP: Familial Adenomatous Polyposis (Poliposi adenomatosa familiare).

FBS: Fetal Bovine Serum (siero fetale bovino).

FDA: Food and Drug Administration.

FFX: FOLFIRINOX.

FGL1: Fibrinogen-Like Protein 1.

FLNB: Filamin B.

FoXo: Forkhead box O.

FRD: False Discovery Rate (tasso di false scoperte).

FSCN1: Fascin Actin-Bundling Protein 1.

GAP: GTPase-activating proteins (proteine attivatrici dell'attività GTPasica).

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

GDP: Guanosine Diphosphate (guanosina difosfato).

GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor (fattore di scambio di nucleotidi guaninici).

Gem: Gemcitabina.

GemCap: Gemcitabine plus Capecitabine (Gemcitabina e Capecitabina).

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory (Osservatorio Globale sul Cancro).

GLUD1: Glutamate Dehydrogenase 1 (Glutammato Deidrogenasi 1).

GLUT: Glucose Transporter (trasportatore del glucosio).

GNAS: Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating activity polypeptide.

GOT1: Glutamate Oxaloacetate Transaminase 1 (Glutammato-Ossalacetato Transaminasi 1).

GTP: Guanosine Triphosphate (guanosine trifosfato).

HAT: Histone Acetyltransferase (acetiltransferasi della lisina istonica).

HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome (sindrome ereditaria del carcinoma mammario e ovarico).

HBP: Hexosamine Biosynthetic Pathway (via biosintetica delle esosamine).

HDAC: Histone Deacetylase (istone deacetilasi).

HDACI: Histone Deacetylase Inhibitor (inibitore delle istone deacetilasi).

HDM: Histone Demethylase (istone demetilasi).

HDM2: Human Double Minute 2.

HG-PanIN: High Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia.

HIF-1α: Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha

HLA-DRB1: Human Leukocyte Antigen.

HMGA1: High Mobility Group A1.

HMT: Histone Methyltransferase (istone metiltransferasi).

HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (carcinoma colorettale ereditario non poliposico).

Hos: Homolog of Sir2.

HRAS: Harvey Rat Sarcoma virus oncogene.

HRP: Horseradish peroxidase (perossidasi di rafano).

HSL: Hormone-Sensitive Lipase (lipasi ormone-sensibile).

HSP90β: Heat shock protein 90 kDa beta.

HSPA: Heat Shock Protein Family A.

I-SMAD: Inhibitory SMAD.

IL: Interleukin (interleuchina).

INF-γ: Interferon gamma (interferone gamma).

IPMN: Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (neoplasia papillare mucinosa intraduttale).

IRS-1: Insulin Receptor Substrate 1.

ISS: International Space Station (Stazione Spaziale Internazionale).

ITGB1: Integrin Subunit Beta 1.

ITPN: Intraductal Tubulopapillary Neoplasm (neoplasia tubulopapillare intraduttale).

KDM6A: Lysine Demethylase 6A.

KLF4: Krüppel-like factor 4.

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue.

LCNEC: Large Cell Neuroendocrine Carcinoma (carcinoma neuroendocrino a grandi cellule).

LDHA: Lactate dehydrogenase A.

LF: Li-Fraumeni syndrome (sindrome di Li-Fraumeni).

LG-panIN: Low Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia.

LGALS3: Lectin, Galactoside-binding, Soluble, 3.

LGALS3BP: Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3 Binding Protein.

lncRNA: long non-coding RNA.

LS: Lynch Syndrome (sindrome di Lynch).

MAFA: MAF BZIP Transcription Factor A.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MCN: Mucinous Cystic Neoplasm (neoplasia cistica mucinosa).

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell (cellule soppressorie di derivazione mieloide).

MEF2: myogenic transcription factor 2.

Mek: mitogen-activated protein kinase kinase (chinasi chinasi attivata da mitogeni).

MEN1: Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (Neoplasia Endocrina Multipla di tipo I).

miNENs: Mixed Neuroendocrine–Nonneuroendocrine Neoplasms (neoplasia miste neuroendocrine–non neuroendocrine).

miRNA: micro-RNA.

MLH1: MutL homolog 1.

MLL: Mixed-Lineage Leukemia

MMP: Matrix Metalloproteinase (metalloproteinasi di matrice).

MMR: Mismatch Repair.

MO25: Mouse protein-25.

mRNA: messenger RNA (RNA messaggero).

MS: Mass Spectrometry (spettrometria di massa).

MSH: MutS Homolog.

MSI: Microsatellite Instability (instabilità dei microsatelliti).

mTOR: mechanistic target of rapamycin.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (bromuro di (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)).

MUC: Mucin.

MYH9: Myosin Heavy Chain 9.

MYL6: Myosin Light Chain 6.

NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato)

NASA: National Aeronautics and Space Administration.

NENs: Neuroendocrine Neoplasms (neoplasie neuroendocrine).

NER: Nucleotide Excision Repair (riparazione per escissione di nucleotidi).

NET: Neutrophil Extracellular Trap (trappola extracellulare dei neutrofili).

NF-kB: Nuclear Factor-kappa B.

NF-panNETs: Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms (neoplasie neuroendocrine del pancreas non funzionanti).

NF1: Neurofibromatosis type 1 (Neurofibromatosi di tipo 1).

NK: Natural Killer.

NPTX2: Neuronal Pentraxin 2.

NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog.

NTRK: Neurotrophic tropomyosin receptor kinase.

Oct4: Octamer-binding transcription factor 4.

OR: odds ratio

PA2G4: Proliferation-Associated 2G4.

PALB2: Partner and Localizer of BRCA2.

panIN: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (neoplasia intraepiteliale pancreatica).

panNECs: Pancreatic Neuroendocrine Carcinomas (carcinomi neuroendocrini del pancreas).

panNENs: Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms (neoplasie neuroendocrine del pancreas).

panNETs: Pancreatic Neuroendocrine Tumors (tumori neuroendocrini del pancreas).

PARP: Poly(ADP-ribose) Polymerase.

PaSC: Pancreatic Stellate Cell (cellule stellate del pancreas).

PBS: Phosphate-Buffer Saline (tampone fosfato salino).

PD-1: Programmed cell Death protein 1.

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1.

PDAC: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (adenocarcinoma pancreatico duttale).

PDGFRβ: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta.

Pdk1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1.

PFN1: Profilin 1.

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (fosfatidilinositolo-3-chinasi).

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha.

PIP_2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato).

PIP_3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (fosfatililinositolo-3,4,5-trifosfato).

PJS: Peutz-Jeghers syndrome (sindrome di Peutz-Jeghers).

PKM: Pyruvate Kinase Muscle.

PMN: Polymorphonuclear (polimorfonucleati, neutrofili).

PMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2.

PODXL: Podocalyxin-like.

ppENK: preproenkephalin.

PPP1CB: Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Beta.

PPP2R1A: Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit A, Alpha.

PRSS1: Protease, Serine, 1.

PS: Penicillin-Streptomycin (penicillina-streptomicina).

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog.

qRT-PCR: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.

R-SMAD: Receptor-regulated SMAD.

r-µg: real microgravity (microgravità reale).

RAB5C: Ras-related protein Rab-5C

RAB7A: Ras-related protein Rab-7a.

RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1

Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma (fibrosarcoma rapidamente accelerato).

RAL: Ras-related protein Ral.

RalGEF: Ral guanine nucleotide exchange factor.

RAP1A: Ras-related protein 1a.

Ras: Rat sarcoma virus.

RB1: Retinoblastoma-1.

RCCS: Rotary Cell Culture System (sistema a colture cellular rotanti).

RET: Rearranged During Transfection.

RGD: Arginine-Glycine-Aspartic motif.

RKIP: Raf Kinase Inhibitor Protein.

RNA: Ribonucleic Acid (acido ribonucleico).

RNF43: Ring Finger Protein 43.

ROS: Reactive Oxygen Species (specie reattive dell'ossigeno).

Rpd3: reduced potassium dependency 3.

RPM: Random Positioning Machine.

RPRM: Reprimo.

RTKs: Receptor Tyrosine Kinases (recettori tirosin-chinasici).

RWV: Rotating Wall Vessel (bioreattore a parete rotante).

s-µg: simulated microgravity (microgravità simulata).

S100A4: S100 calcium-binding protein A4.

SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid.

SARP2: Secreted Apoptosis Related Protein-2.

SCNEC: Small Cell Neuroendocrine Carcinoma (carcinoma neuroendocrino a piccole cellule).

SDCBP: Syndecan Binding Protein.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (sodio dodecil solfato).

SERPINH1: Serpin Family H Member 1.

SFN: Stratifin.

SIRT: Sirtuin.

SLC2A1: Solute Carrier Family 2 Member 1.

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4.

SOCS-1: Suppressor of Cytokine Signaling 1.

Sox2: SRY-box transcription factor 2

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine.

SPE: Solid Phase Extraction (estrazione in fase solida).

SPINK1: Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 1.

SPN: Solid Pseudopapillary Neoplasm (neoplasia solida pseudopapillare).

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

STK11: Serine/Threonine Kinase 11 (serina/treonina chinasi 11).

STRAD: STE20-related adapter protein.

SWATH-MS: Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra.

TAM: Tumor-Associated Macrophage (macrofagi tumore-associati).

TAN: Tumor-Asociated Neutrophil (neutrofili tumore-associati).

TCA: Tricarboxylic Acid Cycle (ciclo degli acidi tricarbossilici).

TFF1: Trefoil Factor 1.

TGF-β: Transforming Growth Factor beta.

TME: Tumor Microenvironment (microambiente tumorale).

TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha.

TOF: Time of Flight (tempo di volo).

TP53: Tumor Protein p53.

TRK: Tropomyosin Receptor Kinase.

TSA: Trichostatin A (tricostatina A).

TSC: Tuberous Sclerosis Complex (Complesso dell Sclerosi Tuberosa).

TSLC1: Tumor Suppressor in Lung Cancer 1.

TUBA: Tubulin Alpha.

TUBB: Tubulin Beta Class I

UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate N-acetylglucosamine.

VCL: Vinculin

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare).

VHL: von Hippel-Lindau disease (malattia di von Hippel-Lindau).

VIP: Vasoactive Intestinal Peptide (Peptide Vasoattivo Intestinale).

WDHA: Watery Diarrhea, Hypokalemia, Achlorhydria (diarrea acquosa, ipokaliemia, acloridia).

WHO: World Health Organization (Organizzazione Mondiale della Sanità).

YWHAG: Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma.

YWHAQ: Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta.

ZEB: Zinc finger E-box-binding homeobox.

1. INTRODUZIONE

1.1 Aspetti anatomo-istologici e funzionali del pancreas e delle sue neoplasie

Il pancreas è un organo ghiandolare situato in profondità nella regione epigastrica, ventralmente rispetto alle vertebre lombari; convenzionalmente, usando come punto di riferimento i vasi mesenterici, viene suddiviso in quattro regioni ovvero testa, collo, corpo e coda. La testa, situata tra la vena mesenterica superiore e la vena porta, è la parte più larga del pancreas e si adagia sulla curva del duodeno; la testa comprende una porzione detta processo uncinato che si estende verso sinistra con la forma, appunto, di un uncino. Il collo è sopra ai vasi mesenterici superiori e collega la testa al corpo, il quale si posiziona tra la borsa omentale e lo stomaco. Il parenchima pancreatico è suddiviso in acini lobulari da setti fibrosi contenenti arterie, vene e una quantità variabile di grasso (3-20%) [1, 2].

Dalla coda del pancreas, a partire dalla confluenza di 20-30 dotti più piccoli, si forma il dotto pancreatico principale o dotto di Wirsung; solo il 41-52.5% della popolazione presenta anche un dotto ausiliario chiamato dotto di Santorini, il quale ha la funzione di drenare la parte anteriore e superiore della testa del pancreas. Il dotto pancreatico decorre accanto al dotto biliare per unirsi al dotto biliare comune a livello della papilla duodenale maggiore, formando così l'ampolla epato-pancreatica o ampolla di Vater che ha la funzione di regolare il rilascio di bile e succhi pancreatici all'interno dell'intestino [1-3].

Testa e collo del pancreas sono irrorati dalle arterie pancreaticoduodenali superiore e inferiore, le quali si anastomizzano in arcate fondamentali per un corretto apporto di sangue; l'apporto di sangue a corpo e coda è invece assicurato da più diramazioni dell'arteria splenica. Il drenaggio venoso è a carico del sistema portale: corpo e coda afferiscono alla vena splenica, mentre testa e collo afferiscono alle vene pancreaticoduodenali che a loro volta si riversano nella vena mesenterica superiore; quest'ultima e la vena splenica si uniscono poi nella vena porta [4].

A livello istologico si identificano pancreas esocrino e pancreas endocrino.

1.1.1 Pancreas esocrino e pancreas endocrino

Il pancreas esocrino (Figura 2) rappresenta il 95% della massa dell'organo e ha la funzione di secernere enzimi digestivi nel duodeno, tipicamente tripsina, chimotripsina e lipasi pancreatica [5, 6]. L'unità funzionale del pancreas esocrino è composta da cellule acinose disposte attorno a un duttolo drenante, pertanto questa porzione viene classificata come ghiandola tubulo acinosa composta; ogni acino è separato dall'altro da tessuto connettivo vascolarizzato. Le cellule acinose hanno forma piramidale: la base – a contatto con la lamina propria – presenta il nucleo circondato

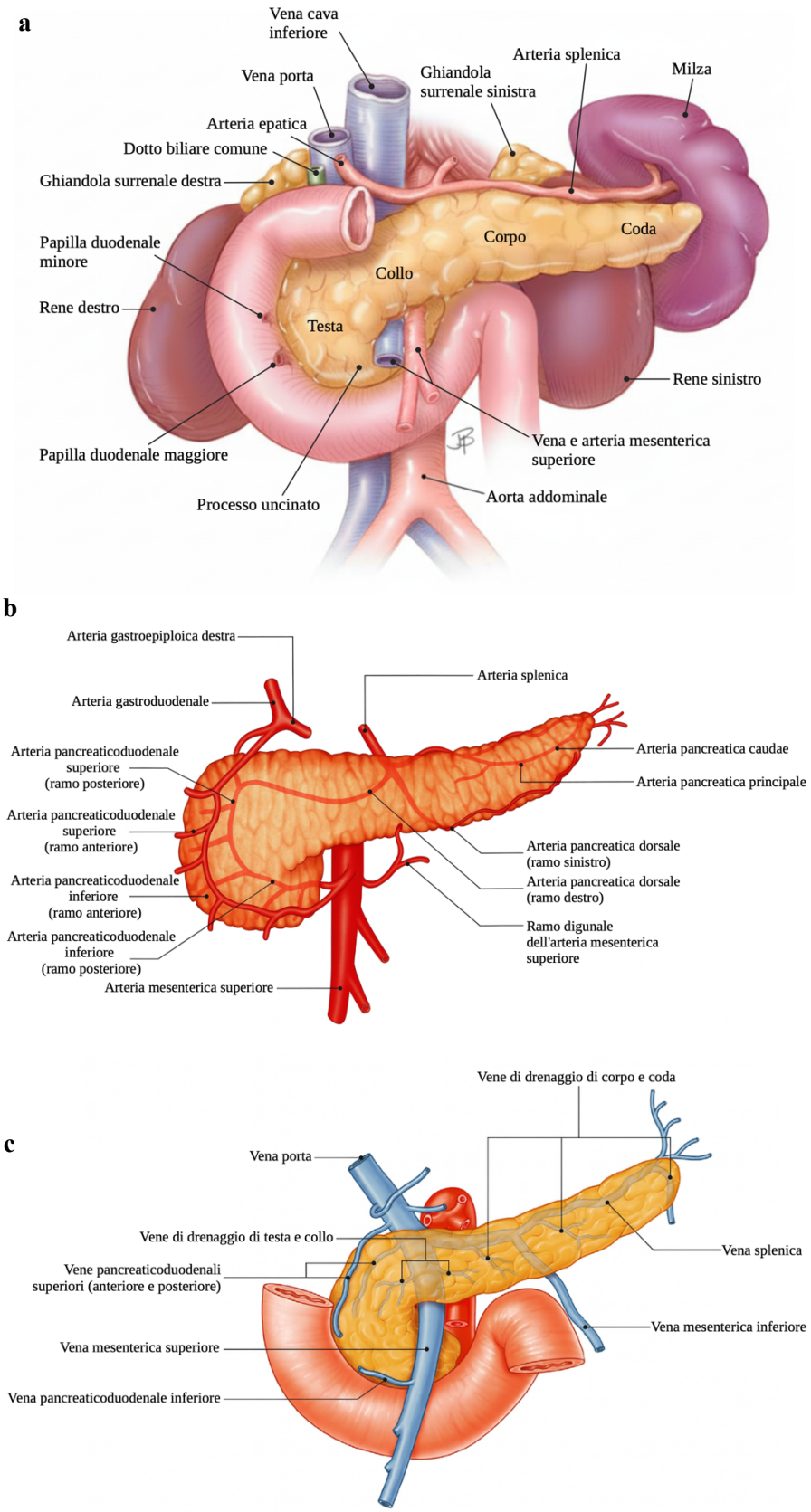


Figura 1 – a) pancreas e sue relazioni anatomiche con organi e strutture circostanti (adattato da: Longnecker, 2014). b) apporto arterioso del pancreas e c) drenaggio venoso del pancreas (adattato da: Madahevan, 2019).

da citoplasma basofilo ed è caratterizzato dalla presenza di abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, oltre a polisomi e mitocondri contenenti granuli della matrice; la membrana basale presenta inoltre molti recettori per il neurotrasmettitore acetilcolina e l'ormone colecistochinina, che stimolano la secrezione degli enzimi. L'apice si affaccia invece sul lume del duttolo ed è ricco di granuli secretori, chiamati granuli zimogeni, contenenti proenzimi; la superficie dell'apice è ricoperta da microvilli, al di sotto dei quali vi è una fitta rete di actina coinvolta nell'esocitosi dei granuli contenenti zimogeno. L'apparato di Golgi si localizza tra nucleo e granuli zimogeni, e la sua dimensione è inversamente proporzionale alla quantità di granuli [3, 7].

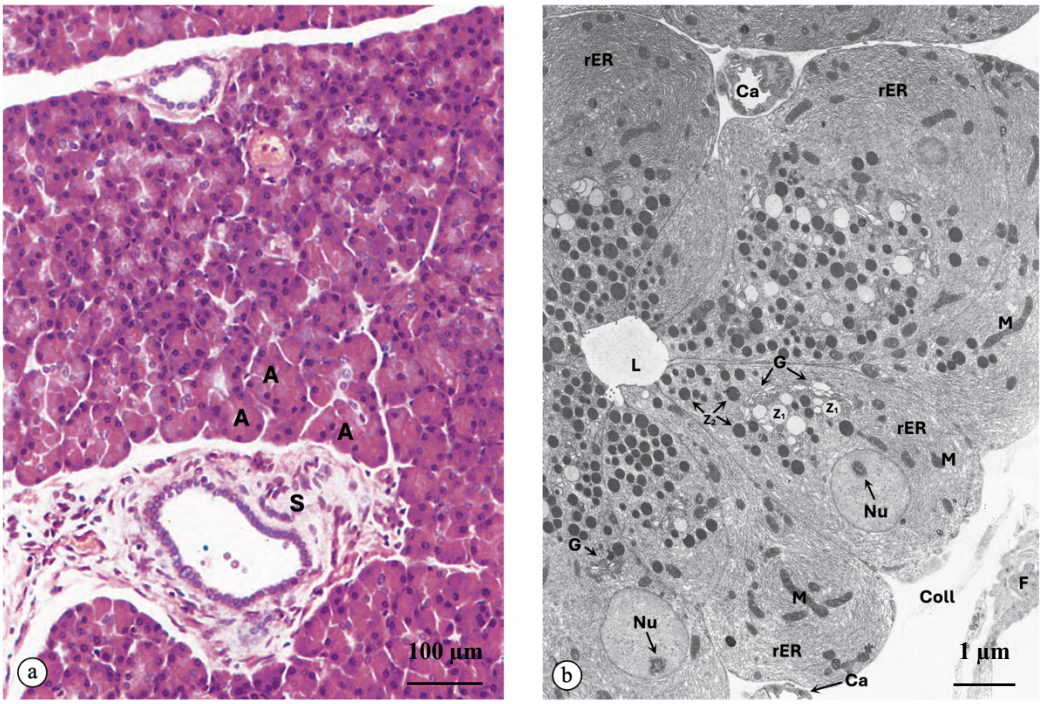


Figura 2 – a) immagine al microscopio ad altro ingrandimento della disposizione generale degli acini **A**, con tessuto di sostegno **S**. Colorazione con ematossilina-eosina. b) immagine al microscopio elettronico x8500 che mostra in dettaglio parte dell'acino e il suo lume centrale **L**. Le cellule piramidali mostrano un nucleo alla base con nucleoli **Nu** caratterizzati da cromatina dispersa; si osservano anche un reticolo endoplasmatico **rER** ben sviluppato e i mitocondri **M**. Sopra al nucleo si posiziona l'apparato di Golgi **G**. Di particolare interesse sono i granuli di zimogeno appena formati $\mathbf{Z_1}$ che appaiono più grandi ed elettron-densi rispetto ai granuli maturi $\mathbf{Z_2}$, che si concentrano nella parte apicale del citoplasma; verso il lume si apprezzano microvilli piccoli e irregolari, associati al processo di esocitosi dei granuli. Per ultimo si osservano piccoli capillari **Ca**, collagene **Coll** e fibroblasti **F** che supportano e avvolgono l'acino (adattato da: Young et al., 2014).

Il pancreas endocrino costituisce l'1-2% della massa dell'organo ed è deputato alla secrezione di insulina, glucagone, somatostatina e polipeptide pancreatico all'interno del sangue [5]. L'unità funzionale è rappresentata dalle isole di Langherans (Figura 3), ovvero cluster sferici e altamente vascolarizzati formati da circa 3000 cellule; un pancreas adulto contiene circa 1 milione di isole, localizzate principalmente in corpo e coda. Le isole di Langherans contengono cinque tipologie distinte di cellule:

- cellule α che, disposte in posizione periferica, secernono glucagone e rappresentano il 15-20% della massa endocrina.

- cellule β che, disposte al centro dell'isola di Langherans, rappresentano il 50-80% della massa del pancreas endocrino e secernono insulina.
- cellule δ, comprendenti cellule D e D1. Le cellule D costituiscono il 5-10% del volume delle isole e sono deputate alla secrezione di somatostatina, mentre le cellule D1 secernono polipeptide pancreatico.
- cellule PP, anch'esse deputate alla secrezione di polipeptide pancreatico.
- cellule ε o cellule G, rappresentanti l'1% della massa endocrina e secernenti grelina.

Le cellule α si distribuiscono uniformemente nel pancreas, mentre le cellule β e δ sono concentrate in coda e corpo. Le isole di Langherans ricevono per prime la maggior parte del delivery di sangue arterioso al pancreas, e richiedono il 20% dell'apporto totale; grazie all'ordine con cui le cellule vengono perfuse (prima le cellule β, poi le α e infine le δ) si può affermare che le cellule β sono in grado di inibire la secrezione delle cellule α, le quali a loro volta possono stimolare le cellule δ [3, 8].

Sebbene siamo descritti separatamente, le porzioni endocrina ed esocrina sono in stretta relazione l'una con l'altra infatti il pancreas endocrino regola la secrezione del pancreas esocrino [8].

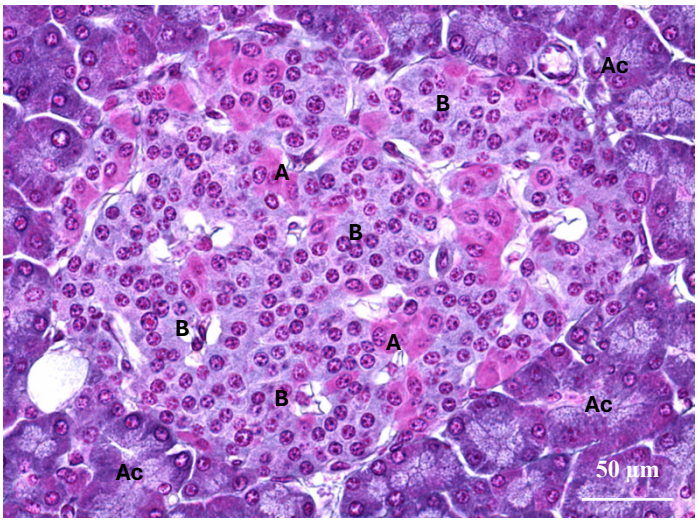


Figura 3 – immagine al microscopio di un'isola di Langherans in cui si possono distinguere le cellule β **B** – colorate in azzurro pallido – e le cellule α **A** – colorate in rosa; si noti come le cellule β siano in quantità maggiore rispetto alle cellule α. L'isola è circondata dagli acini **Ac** del pancreas esocrino. Questa colorazione non permette la visualizzazione delle cellule δ. Colorazione con metodo Gomori, ingrandimento 400x (adattato da: [a]).

Il pancreas è ampiamente coinvolto nel metabolismo dei carboidrati per via della sua ricca secrezione enzimatica, che include proenzimi come tripsinogeno e chimotripsinogeno, amilasi e lipasi pancreatica, colesterolo esterasi, ribonucleasi, deossiribonucleasi ed elastasi; in particolare, amilasi e lipasi pancreatiche convertono – rispettivamente – i grassi in acidi grassi e i carboidrati in monogliceridi, inoltre rompono il glicogeno e i carboidrati formando monosaccaridi. Gli esteri del colesterolo sono poi metabolizzati dall'enzima colesterolo esterasi in colesterolo e acidi grassi,

mentre l'enzima elastasi degrada l'elastina, ovvero la componente principale delle fibre elastiche. La funzione principale del pancreas esocrino è quella di favorire un'efficiente digestione del cibo e l'assorbimento dei micronutrienti: gli enzimi rompono i macronutrienti, ad esempio le proteine in piccoli peptidi e amminoacidi, i trigliceridi in monogliceridi, e i carboidrati in zuccheri facilmente digeribili dal piccolo intestino. Sebbene il pancreas possieda una secrezione basale, normalmente si studia la secrezione enzimatica in risposta a un pasto: quest'ultima si compone di quattro fasi, ovvero fase cefalica, fase gastrica, fase intestinale e fase dei nutrienti assorbiti [9].

Per quanto riguarda il pancreas endocrino, vi è una fine regolazione tra gli enzimi prodotti dalle isole di Langherans. Nel momento in cui aumentano i livelli di glucosio nel sangue, ad esempio dopo un pasto, viene rilasciata insulina da parte delle cellule β che va a legarsi ai suoi recettori sulla superficie delle cellule; non solo l'aumento del glucosio, ma anche di acidi grassi, amminoacidi, cortisolo, secretina, colecistochinina e gastrina favoriscono il rilascio di insulina. L'insulina viene contro-regolata dal glucagone rilasciato dalle cellule α: questo agisce principalmente sugli epatociti attivando gli enzimi lipasi e glicogenolitici, così da indurre gluconeogenesi e quindi aumento di glucosio nel sangue. La somatostatina secreta dalle cellule δ inibisce il rilascio di insulina e glucagone, ma anche la produzione di acido cloridrico da parte dello stomaco; la grelina stimola la fame e controlla le fibre muscolari del tratto gastrointestinale, mentre il polipeptide pancreatico aumenta la secrezione da parte delle cellule intestinali ma inibisce il rilascio di enzimi pancreatici [3].

1.1.2 Neoplasie del pancreas endocrino

I tumori neuroendocrini (NENs) sono neoplasie che originano dalle cellule del sistema neuroendocrino diffuso nel nostro organismo, e di essi tra i più comuni vi sono i tumori neuroendocrini pancreatici (panNENs) [10]. Secondo la classificazione del 2025 fornita dalla WHO (*World Health Organization*) [11], la frequenza dei panNENs tra tutte le tipologie di tumori pancreatici è del 2-5%, con un'incidenza pari a meno di 1 caso ogni 100.000 persone all'anno; i fattori di rischio includono fumo di sigaretta, assunzione di alcol, storia familiare di tumori neuroendocrini, obesità e diabete. I panNENs vengono classificati in base al loro grado di differenziazione in ben differenziati e scarsamente differenziati, ma anche in funzione dell'indice mitotico e dell'indice di marcatura Ki-67 identificando i gradi G1 (basso), G2 (intermedio) e G3 (alto); Ki-67 è una proteina scoperta nel 1983 e ad oggi si tratta del marker più usato – sottoforma di percentuale – per l'investigazione della proliferazione delle cellule tumorali [12], mentre l'indice mitotico indica la velocità con cui una cellula si divide pertanto è utile per valutare l'aggressività di un tumore [13]. Nella Tabella 1 viene riassunta la classificazione più recente indicata dalla WHO [11], la quale distingue i tumori ben differenziati (Tumori Neuroendocrini del Pancreas, panNETs)

dai tumori scarsamente differenziati (Carcinomi Neuroendocrini del Pancreas, panNECs); i panNETs si distinguono a loro volta in funzionali e non funzionali. Esiste poi un'ultima classe, ovvero i tumori misti neuroendocrini e non neuroendocrini (MiNENs).

Neoplasie Neuroendocrine del Pancreas (panNENs)
panNENs ben differenziati: Tumori Neuroendocrini del Pancreas (panNETs)
Funzionanti (insulinoma, gastrinoma, VIPoma, glucagonoma)
Non funzionanti
panNENs scarsamente differenziati: Carcinomi Neuroendocrini del Pancreas (panNECs)
Tipologia a piccole cellule
Tipologia a grandi cellule
Neoplasie Miste Neuroendocrine e Non Neuroendocrine (MiNENs)
Neoplasie miste Adenocarcinoma duttale – neoplasia neuroendocrina
Carcinoma misto acinare – neoplasia neuroendocrina

Tabella 1 – Classificazione delle Neoplasie Neuroendocrine del Pancreas basata sulla classificazione WHO del 2025.

Tumori neuroendocrini del pancreas ben differenziati (panNETs)

I panNETs sono NENs ben differenziati di grado basso (G1, Ki-67 < 3% e indice mitotico < 2), intermedio (G2, Ki-67 del 3-20% e indice mitotico di 2-20) o alto (G3, Ki-67 > 20% e indice mitotico > 20) e rappresentano il 90% dei tumori neuroendocrini del pancreas [11, 14]. I panNETs si suddividono anche in funzionanti e non funzionanti: i tumori funzionanti sono in grado di secernere alte quantità di ormoni che spesso portano a sindromi da ipersecrezione ormonale e rappresentano il 10% dei tumori facenti parte di questa classe, mentre i tumori non funzionanti sono in grado di secernere ormoni ma in quantità insufficienti da creare sintomi e rappresentano il 90% dei panNETs [14, 15]. I panNETs insorgono generalmente tra la terza e la sesta decade di vita ma non mostrano differenze sostanziali tra uomini e donne; nella maggior parte dei casi sono sporadici, ma il 10-20% è associato a malattie ereditarie ovvero (in ordine decrescente di frequenza) Neoplasia Endocrina Multipla di tipo I (MEN1), malattia di von Hippel-Lindau (VHL), Complesso della Sclerosi Tuberosa (TSC), Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), malattia di Mahvash, Insulinomatosi familiare legata al gene MAFA, sindrome di Lynch e Sindrome da Melanoma Familiare con Nevi Multipli Atipici [11]. Le mutazioni caratteristiche riguardano il gene MEN1 nel 40% dei tumori, i geni DAXX e ATRX nel 45% dei tumori, e i geni legati al *pathway* mTOR nel 15% dei casi; la funzione di questi geni è legata alla regolazione del rimodellamento della cromatina, mentre i geni di mTOR sono importanti in quanto rappresentano un possibile target per il trattamento del tumore

[11, 15]. Rispetto all'adenocarcinoma pancreatico duttale e ai panNECs, i panNETs hanno una prognosi più positiva: il tasso di sopravvivenza a 10 anni è del 40-50% e migliora a seguito della resezione del tumore.

Come precedentemente accennato, i panNETs possono essere in grado di secernere ormoni, ed eventualmente causano l'insorgenza di malattie legate all'ipersecrezione ormonale; si parla in questo caso di tumori funzionanti e, in base al tipo di ormone secreto, si distinguono (in ordine dal più comune al meno comune) [11]:

- **Insulinoma**: è una tipologia di tumore composta da cellule produttrici di insulina e, a causa della secrezione incontrollata di questo ormone, causa sindrome ipoglicemica; si distribuisce equamente in tutto il pancreas. Gli insulinomi vengono principalmente diagnosticati negli adulti, specialmente intorno ai 60 anni di età, con lieve prevalenza tra le donne; il 10% degli insulinomi produce metastasi, soprattutto negli uomini in cui il tumore sia di dimensione maggiore ai 20 mm. L'elemento chiave per la diagnosi è ipoglicemia iperinsulinemica, mentre i sintomi comprendono palpitazioni e tremori, sudorazione eccessiva, debolezza, confusione mentale, svenimenti e coma ipoglicemico. L'insulinoma rappresenta il 42% di tutti i panNETs funzionanti.
- **Gastrinoma**: è una tipologia di tumore composta da cellule produttrici di gastrina e può causare la sindrome di Zollinger-Ellison; non si localizza in una zona precisa del pancreas e nel 60-90% dei casi si forma anche nel duodeno. Segni tipici della sindrome di Zollinger-Ellison sono ulcera peptica avanzata, reflusso gastroesofageo, diarrea, vomito, nausea e dolore addominale. Circa il 60% dei gastrinomi metastatizza nei linfonodi. Questa tipologia di tumore rappresenta il 4-8% dei panNETs e ha un'incidenza annua di 0.5-2 casi ogni milione di persone.
- **VIPoma**: è una tipologia di tumore in grado di secernere Peptide Vasoattivo Intestinale (VIP) e causare quindi una sindrome conosciuta come WDHA (*Watery Diarrhea, Hypokalemia, Achlorhydria* ovvero diarrea acquosa, ipokaliemia e acloridria); il 70% si localizza nel corpo e il 30% nella testa del pancreas. La sindrome WDHA è caratterizzata da diarrea acquosa secretoria che porta a perdita di peso, ipokaliemia (carenza di potassio), ipocloridria o acloridria (carenza o totale mancanza di acido cloridrico nello stomaco) e acidosi metabolica; il 75-90% dei casi di WDHA è causata proprio da un tumore secernente peptide vasoattivo intestinale. La maggior parte dei pazienti presenta metastasi distanti dal pancreas al momento della diagnosi, soprattutto nel fegato. I VIPomi rappresentano solo il 2-6% dei panNETs, con un'incidenza di 0.05-0.2 casi ogni milione di persone l'anno.
- **Glucagonoma**: è una tipologia di tumore composta da cellule secernenti glucagone e peptide derivato dal pre-proglucagone, di conseguenza può causare la sindrome da glucagonoma; si localizza prevalentemente nella coda del pancreas. Nell'80% dei casi la sindrome da glucagonoma causa eritema necrolitico migratorio e altri sintomi sono perdita di peso, trombosi venosa profonda, depressione, diabete mellito e anemia normocitica normocromica. Il glucagonoma è piuttosto raro,

infatti rappresenta solo l'1-2% dei panNETs e ha un'incidenza pari a 1 caso ogni 20 milioni di persone.
I panNETs possono anche non essere in grado di secernere ormoni e causare quindi sindromi ormonali: si parla così dei tumori non funzionanti (NF-panNETs), la cui prevalenza clinica è in aumento ed è pari a 0.4 casi ogni milione di persone all'anno. Tutti gli NF-panNETs sono da considerarsi maligni e il 55-75% viene diagnosticato con metastasi.

Tumori neuroendocrini del pancreas scarsamente differenziati (panNECs)

I panNECs sono NENs scarsamente differenziati che non prevedono una suddivisione in gradi come i panNETs, infatti si distinguono solo la tipologia a piccole cellule (SCNEC) e la tipologia a grandi cellule (LCNEC). Le mutazioni genetiche legate a questi tumori riguardano geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, come TP53, RB1 e CDKN2A. I panNECs sono piuttosto rari, infatti rappresentano solo il 2-3% dei NENs e meno dell'1% di tutte le neoplasie pancreatiche; la diagnosi avviene normalmente intorno ai 50 anni di età, e la prevalenza è lievemente maggiore negli uomini. La tipologia a grandi cellule è più comune (60% dei casi) ed è caratterizzata da cellule tonde o poligonali relativamente uniformi e con un grande nucleo, mentre la tipologia a piccole cellule è caratterizzata da cellule di media-piccola grandezza con elevato rapporto nucleo/citoplasma. I panNECs sono molto aggressivi e spesso vengono diagnosticati solo in fase avanzata, per essere trattati con chemioterapia al platino; la sopravvivenza media è inferiore a 1 anno e solo il 25% dei pazienti sopravvive oltre i 2 anni dalla diagnosi [11].

Tumori neuroendocrini misti (MiNENs)

Quella dei MiNENs è più che altro una categoria concettuale che permette di classificare neoplasie miste che presentano sia una componente neuroendocrina che una non neuroendocrina; per la diagnosi è importante che ogni componente rappresenti più del 30% della popolazione di cellule tumorali. Si identificano due grandi tipologie di MiNEN: in genere la componente neuroendocrina è rappresentata dai panNECs (molto raramente da panNETs), mentre la componente non neuroendocrina può essere un adenocarcinoma duttale o un carcinoma acinare; nel primo caso il tumore si instaura preferibilmente nella testa del pancreas, mentre nel secondo caso il tumore è equamente distribuito [11].

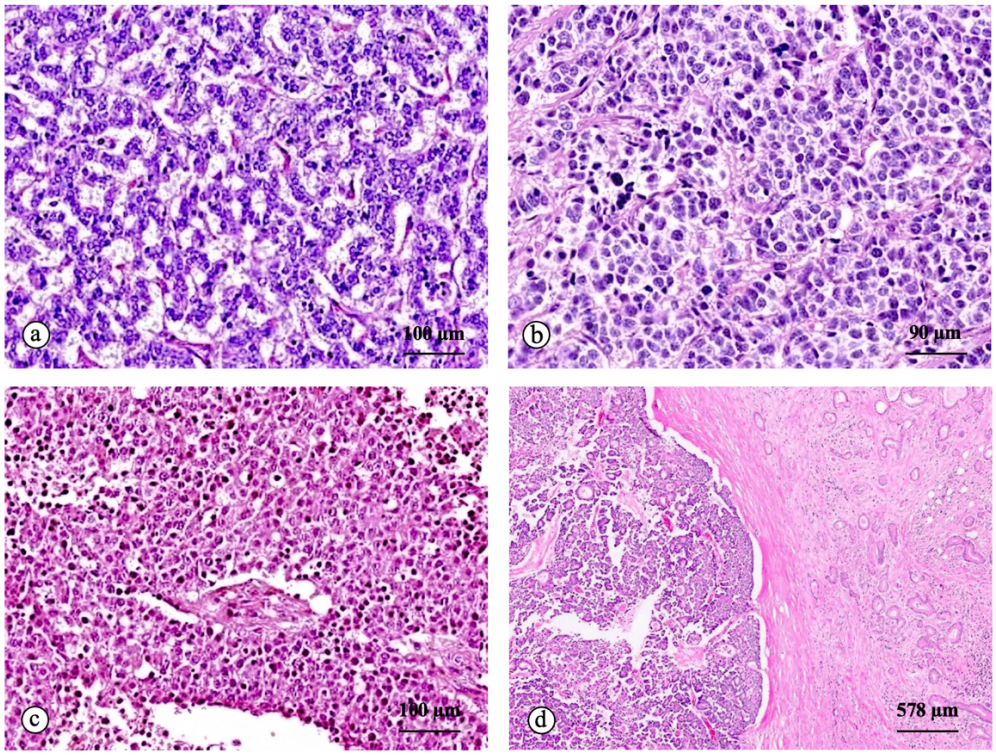


Figura 4 – Immagini al microscopio di a) panNET, b) panNEC a piccole cellule, c) panNEC a grandi cellule e d) MiNEN; in quest'ultimo di apprezza la componente neuroendocrina (panNEC) a sinistra in viola e la componente non neuroendocrina (adenocarcinoma duttale) a destra in rosa (adattato da: Klöppel et al., 2017 e [b]).

1.1.3 Neoplasie del pancreas esocrino

I tumori del pancreas esocrino rappresentano la causa più importante di morte legata alle neoplasie pancreatiche: secondo le ultime stime di GLOBOCAN aggiornate al 2022, il tumore al pancreas è al sesto posto tra le morti totali causate da tumori nel mondo, ovvero rappresenta il 4.8% delle morti totali [17, 18]. Di questa categoria di tumori, l'adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC, paragrafo 1.2) è sicuramente la tipologia più comune; vi sono comunque alcune varianti associate al PDAC e altre tipologie di tumore di origine non duttale, riassunte nella Tabella 2.

Carcinomi associati al PDAC

Alcune tipologie di carcinoma sono strettamente legate ai PDAC ma vengono identificate come entità separate a causa delle loro differenti connotazioni biologiche; spesso, comunque, questi tumori insorgono in concomitanza con focolai di adenocarcinoma pancreatico duttale [19].
Sebbene sia più comune in altri organi come intestino, utero ed esofago, di questa classe fa parte il carcinoma adenosquamoso (ASCAP) il quale rappresenta l'1-4% dei tumori pancreatici esocrini. L'ASCAP è formato da almeno il 30% di cellule squamose maligne insieme all'adenocarcinoma duttale; presenta sintomi simili a un normale adenocarcinoma pancreatico, ma i sintomi addominali sono più aggressivi e il tumore primario ha dimensioni maggiori [19, 20].

Vi è poi il carcinoma osteoclastico a cellule giganti, che è composto da tre tipologie cellulari: cellule fusiformi o pleiomorfe (le quali rappresentano la parte neoplastica), istiociti mononucleati e cellule giganti osteoclasto-simili; quest'ultime non sono maligne e possono presentare fino a 20 nuclei [17]. In uno studio condotto nel 2016 [21] è stato dimostrato che questo tumore ha una frequenza dell'1.4% tra tutte le neoplasie pancreatiche, con una lieve predominanza nelle donne.
Il carcinoma colloide è caratterizzato dalla presenza di ampi accumuli stromali extracellulari di mucina, all'interno dei quali sono sospese le cellule tumorali che costituiscono almeno l'80% della massa; il carcinoma midollare, infine, è scarsamente differenziato e caratterizzato da un elevato numero di linfociti infiltranti [21].

Neoplasie di origine duttale
PDAC
Carcinomi associati al PDAC
Carcinoma adenosquamoso
Carcinoma osteoclastico a cellule giganti
Carcinoma colloide
Carcinoma midollare
Carcinomi insorti in neoplasie intraepiteliali tumorali
Neoplasia papillare mucinosa intraduttale con carcinoma invasivo associato
Neoplasia tubulopapillare intraduttale con carcinoma invasivo associato
Neoplasia cistica mucinosa con carcinoma invasivo associato
Neoplasie di origine non duttale
Carcinoma a cellule acinari (ACC)
Pancreatoblastoma
PanNENs
Neoplasia solida pseudopapillare (SPN)

Tabella 2 – classificazione delle neoplasie maligne legate al tumore al pancreas esocrino (adattato da: Mostafa et al., 2017).

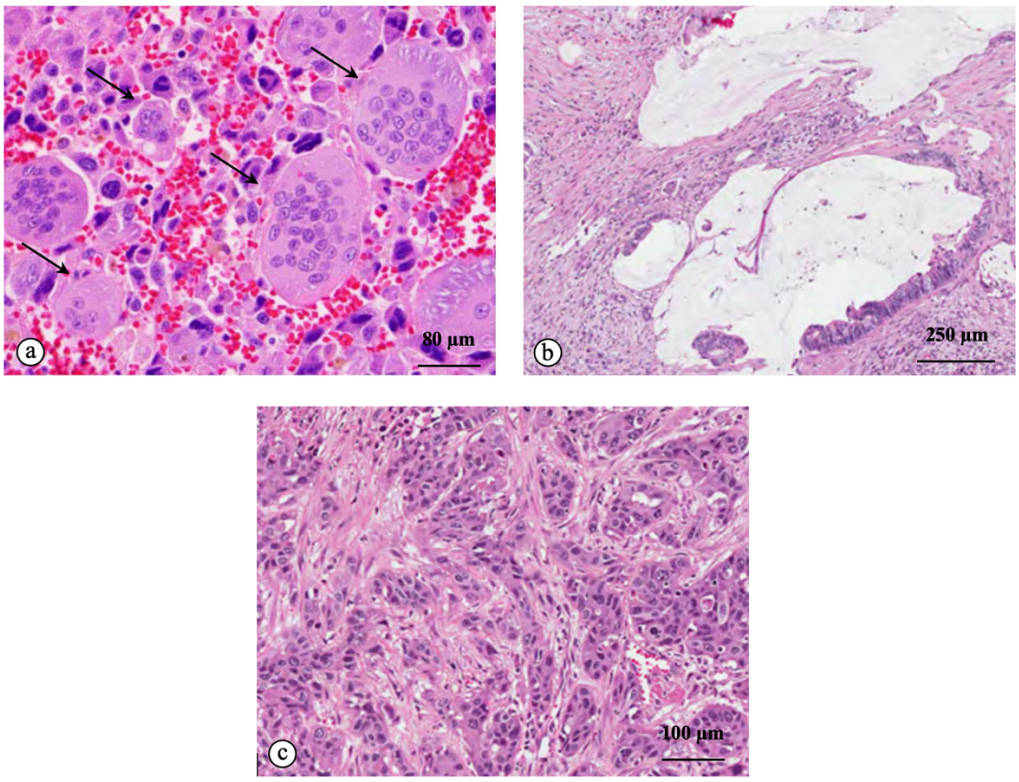


Figura 5 – Immagini al microscopio di a) carcinoma osteoclastico a cellule giganti, in cui si apprezzano numerose cellule osteoclastiche multinucleate (indicate con la freccia); b) carcinoma colloide (20X) e c) carcinoma adenosquamoso (20X) (adattato da: Muraki et al., 2016 e Luchini et al., 2020).

Neoplasie di origine non duttale

Sebbene la componente acinosa sia preponderante nel parenchima pancreatico, le neoplasie derivanti dalle cellule acinose sono piuttosto rare e rappresentano infatti il 5% dei tumori pancreatici. Di questa categoria fanno parte i panNENs, già discussi nel paragrafo precedente, e altre tre tipologie: carcinoma a cellule acinari, pancreatoblastoma e neoplasia solida psuedopapillare.

Il carcinoma a cellule acinari (ACC) è un tumore piuttosto raro, infatti rappresenta solo l'1-2% di tutti i tumori pancreatici, e colpisce principalmente uomini intorno ai 60 anni di vita. Nella maggior parte dei casi i sintomi sono aspecifici e includono dolore addominale, perdita di peso, vomito e nausea che sono correlati alla crescita tumorale e/o alla presenza di metastasi. L'ACC può insorgere in qualsiasi parte del pancreas e a livello microscopico presenta diversi pattern ovvero acinare, solido (i più frequenti) trabecolare e ghiandolare; in generale si osserva un abbondante citoplasma ricco di granuli contenenti zimogeno [22].

Anche il pancreatoblastoma è una neoplasia rara che viene diagnosticata prevalentemente nei bambini dai 3 ai 4 anni di età. Le caratteristiche distintive sono la presenza dei cosiddetti corpuscoli squamoidi che mostrano accumuli di β-catenina; il nome "blastoma" suggerisce la presenza di diverse tipologie cellulari, principalmente acinari ma anche neuroendocrine e duttali. A livello

microscopico sono osservabili aggregati di cellule, simili a cellule squamose, che sono fondamentali per una diagnosi corretta [17, 19].

La neoplasia solida pseudopapillare (SPN) rappresenta lo 0.3-2.7% dei tumori pancreatici; la maggior parte viene diagnosticata nelle giovani donne ed è ben circoscritta, tuttavia nel 10-15% dei casi il tumore mostra un comportamento maligno [23]. La maggior parte dei pazienti accusa sintomi legati all'effetto-massa, ovvero dolore addominale, nausea, vomito, dispepsia e altri sintomi legati al sanguinamento intratumorale. L'SPN si può localizzare in qualunque parte del pancreas, preferibilmente in corpo e coda, e tipicamente è ben incapsulato.

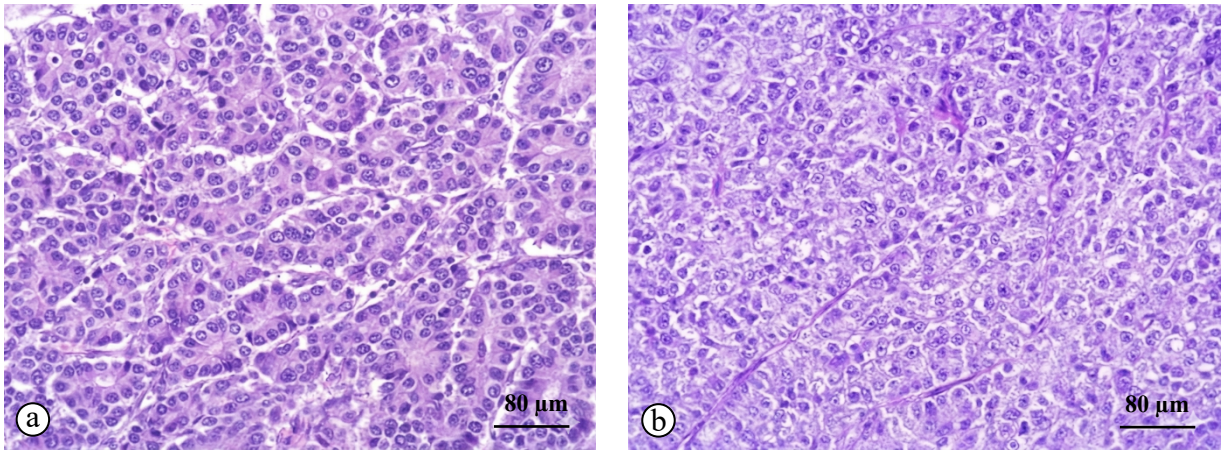


Figura 6 – carcinoma a cellule acinari con pattern a) acinare e b) solido (adattato da: La Rosa et al., 2015).

1.2 Adenocarcinoma Pancreatico Duttale

L'Adenocarcinoma Pancreatico Duttale (PDAC) è la tipologia principale di tumore al pancreas, tanto da essere ormai sinonimo di tumore pancreatico: si tratta di uno dei tumori più mortali, rappresentando la terza causa di decessi per tumore negli Stati Uniti, con una probabilità di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi pari al 10%; si stima inoltre che il tasso di incidenza sia destinato a salire dell'1% all'anno, diventando potenzialmente la seconda causa di morte per tumore nei prossimi 20-30 anni [24-26]. Come precedentemente accennato, a livello mondiale il tumore al pancreas figura come la sesta causa di decessi per tumore con più di 510000 nuovi casi nel 2022 [[18]].

In Italia nel 2024 sono state stimate circa 13585 nuove diagnosi con una leggera prevalenza negli uomini, e circa 15000 decessi nel 2022; la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è stimata al 20%, di cui 11% negli uomini e 12% nelle donne [27].

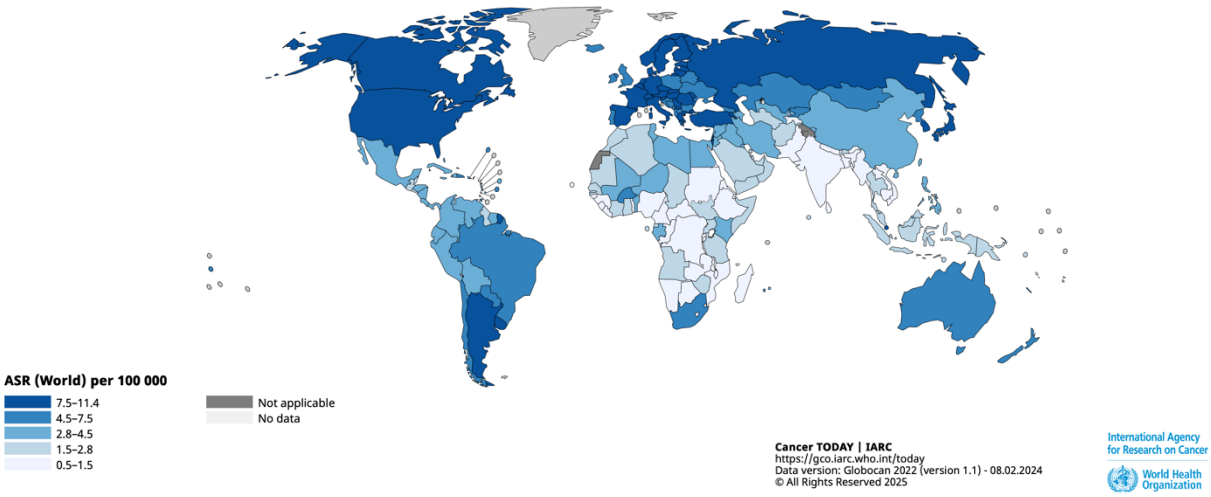


Figura 7 - Tasso di incidenza di tumore al pancreas standardizzato per età a livello mondiale. Entrambi i sessi, 2022. (da: [c])

1.2.1 Fattori di rischio modificabili

Morbidità e mortalità del tumore pancreatico sono determinate da due principali criticità cliniche: mancanza di opportune strategie per la diagnosi precoce e assenza di terapie realmente efficaci; la comprensione dei fattori di rischio, soprattutto le mutazioni delle linee cellulari somatiche e germinali, può quindi fornire biomarcatori essenziali a identificare strategie utili per la diagnosi e delineare programmi di screening e sorveglianza [28].

Il principale fattore di rischio è il fumo di sigaretta, infatti i fumatori hanno un rischio due volte più alto di sviluppare tumore al pancreas rispetto ai non fumatori; se poi il fumo è accompagnato da una predisposizione genetica, il rischio aumenta dalle 2 alle 3.7 volte e diminuisce l'età di insorgenza anche di 10 anni. Le morti per tumore pancreatico negli uomini legate al fumo sono prevalentemente in Est Europa (35.7%) e Asia dell'Est (31.3%), mentre le donne sono maggiormente colpite in Nord America (29.3%) e nella parte meridionale dell'America Latina (27.6%) [29]. Uno studio del 2012 condotto nell'*International Pancreatic Cancer Case–Control Consortium* (PanC4) ha misurato l'*odds ratio* (OR) per il tumore al pancreas relazionato alle abitudini legate al fumo [30]. La *odds ratio* indica la forza dell'associazione tra un'esposizione e un esito, ad esempio fumo e malattia: un OR pari a 1 non dimostra alcuna associazione, un OR > 1 indica che l'esposizione aumenta la probabilità dell'esito, e un OR < 1 indica che l'esposizione riduce la probabilità dell'esito; un OR = 2 indica che gli esposti hanno il doppio della probabilità dell'esito rispetto ai non esposti, un OR = 0.5 indica che gli esposti hanno la metà della probabilità dell'esito rispetto ai non esposti. Lo studio ha comparato i soggetti che non hanno mai fumato (*never smokers*) a tre categorie: *ever smokers* (soggetti che hanno fumato più di 100 sigarette nella loro vita, indipendentemente dal fatto che fumino ancora o che abbiano smesso al momento

dell'indagine), *former smokers* (ex-fumatori al momento dell'indagine) e *current smokers* (fumatore al momento dell'indagine); queste categorie mostrano un OR significativo, rispettivamente pari a 1.40, 1.17 e 2.20. È stata anche dimostrata una chiara relazione con il numero di sigarette fumate (il rischio aumenta con un numero pari o maggiore a 35 sigarette al giorno) e gli anni di attività, con una soglia fissata a 40 anni; di particolare interesse è anche il fatto che il rischio diminuisce con l'aumentare del tempo trascorso dalla cessazione del fumo di sigaretta. Secondo altri studi il rischio sembrerebbe aumentare anche con il fumo di sigari, mentre non vi sono ancora dati per quanto riguarda il fumo passivo o il fumo in gravidanza [31].

L'obesità è stata confermata solo recentemente come fattore di rischio associato al tumore al pancreas: i pazienti obesi, ovvero con indice di massa corporea (BMI) maggiore di 35 kg/m^2, hanno una probabilità di sviluppare tumore aumentata del 55%. È stato inoltre dimostrato che il rischio di morte in tali pazienti aumenta del 53% rispetto a pazienti con un BMI nella norma (minore di 25 kg/m^2); questa affermazione è particolarmente valida in pazienti obesi in un'età compresa tra i 18 e i 20 anni. Il meccanismo che sottende a questa associazione probabilmente è legato al fenomeno dell'insulino-resistenza e ai marker pro-infiammatori indotti dall'obesità stessa [32].

Il consumo intensivo di alcol, inteso come assunzione di 3 o più bevande alcoliche al giorno, è un fattore di rischio per l'insorgenza di pancreatite cronica, la quale a sua volta è un fattore che aumenta il rischio di sviluppare un tumore pancreatico. È stato dimostrato che, rispetto ai bevitori occasionali o agli astemi, i soggetti fortemente bevitori presentano un rischio aumentato fino al 60%; non vi è tuttavia una relazione con la durata del consumo di alcol. La cancerogenesi potrebbe essere direttamente legata all'alcol: l'acetaldeide, ovvero il metabolita principale dell'etanolo, è un cancerogeno già riconosciuto che probabilmente induce un danno al pancreas mediante la produzione di specie reattive dell'ossigeno ed esteri etilici [29, 33].

La pancreatite cronica è riconosciuta essere un importante fattore di rischio, specialmente in individui tra 56 e 75 anni di età, ma può essere anche a sua volta causata dal tumore al pancreas. Dagli studi risulta chiaro che il rischio aumenta di quasi tre volte in quei casi di pancreatite diagnosticata almeno 2 anni prima dalla diagnosi di tumore al pancreas, confermando il ruolo dell'infiammazione cronica nello sviluppo del tumore; la relazione è ancora più forte con l'aumentare del tempo trascorso tra insorgenza di pancreatite e diagnosi di tumore [29, 34].

Allo stesso modo della pancreatite, il diabete mellito può essere sia causa che conseguenza del tumore al pancreas. La relazione tra diabete e tumore al pancreas è piuttosto complessa in quanto entrambe condividono alcuni fattori di rischio come obesità e infiammazione, tuttavia è stato dimostrato che il diabete potrebbe essere un sintomo precoce: nel primo anno dalla diagnosi infatti il rischio aumenta di 14-15 volte, per poi diminuire di 3 volte dopo il terzo anno [29].

L'esposizione a pesticidi è un altro punto interessante, tant'è vero che alcuni studi hanno dimostrato come solfuri e glifosati siano significativamente correlati all'insorgenza di tumore pancreatico [29].

1.2.2 Lesioni pancreatiche pre-neoplastiche

Vista l'aggressività e la prognosi sfavorevole del PDAC, una sua intercettazione precoce è cruciale per fermare la progressione del tumore prima che la malattia influisca sulla sopravvivenza del paziente [35]. La maggior parte dei PDAC insorge a partire da lesioni non invasive che possono essere non cistiche (neoplasia intraepiteliale pancreatica – PanIN) o cistiche (neoplasia papillare mucinosa intraduttale – IPMN, neoplasia tubulopapillare intraduttale – ITPN, neoplasia cistica mucinosa – MCN); le prime possono essere diagnosticate solo microscopicamente con biopsie o resezioni, mentre le lesioni cistiche sono individuabili tramite esami radiologici [36].

Neoplasia intraepiteliale pancreatica (PanIN)

La neoplasia intraepiteliale pancreatica (PanIN) è la lesione pancreatica pre-neoplastica più comune nel PDAC: si tratta di una neoplasia microscopica non invasiva di grandezza inferiore a 5 mm che origina nei piccoli dotti pancreatici [35-37]. Istologicamente si identificano la *low-grade* PanIN (LG-PanIN) caratterizzata da epitelio mucinoso colonnare piatto, papillare o micropapillare, e *high-grade* PanIN (HG-PanIN) con strutture piatte, papillari o micropapillari e figure mitotiche anomale [36]. Sebbene sia stimato che l'85% dei PDAC origina dalle PanIN, le LG-PanIN si riscontrano casualmente nella popolazione generale di età superiore ai 50 anni e difficilmente progrediscono in PDAC o HG-PanIN, le quali a loro volta invece sono frequentemente associate al PDAC [35, 38]. Il profilo immunoistochimico varia in base al grado della neoplasia: le LG-PanIN esprimono MUC5AC (normalmente assente nel pancreas) e MUC6, mentre le HG-PanIN presentano MUC1; MUC2 normalmente non viene riscontrato, ma è positivo nella variante intestinale delle PanIN [37]. Le proteine MUC sono glicoproteine mucinose, ovvero molecole complesse caratterizzate da una grande quantità di oligosaccaridi legati ai residui di treonina e serina della catena polipeptidica principale tramite legami O-glicosidici; la loro funzione è quella di formare uno strato continuo di mucosa sulle cellule, ma se mutati concorrono alla cancerogenesi in termini di adesione, migrazione e riconoscimento [39].

Ad oggi la biologia delle PanIN è stata ben caratterizzata e le alterazioni genetiche precoci includono accorciamento dei telomeri e, soprattutto, mutazioni di KRAS che ne causano l'attivazione; nei rari casi in cui KRAS non sia mutato, altre alterazioni significative coinvolgono GNAS o BRAF. La progressione delle HG-PanIN è associata all'inattivazione di CDKN2A e TP53 insieme all'oncosoppressore SMAD4 in stadi più avanzati [35, 37]. Recenti sviluppi nella trascrittomica hanno permesso di individuare un graduale incremento di un ulteriore gene, TFF1, nella progressione delle LG-PanIN a HG-PanIN; è anche vero che nel passaggio da HG-PanIN a PDAC si vede un aumento della capacità proliferativa e una riduzione nel *pathway* infiammatorio legato ai fibroblasti associati al cancro (CAF). Anche l'epigenetica offre uno strumento utile

all'identificazione della progressione da PanIN a PDAC, infatti si è visto che l'ipermetilazione di alcuni geni oncosoppressori come RPRM, SARP2 e NPTX2 sono correlati all'avanzamento di PanIN [35].

Neoplasia papillare mucinosa intraduttale (IPMN)

La IPMN è la seconda lesione più comunemente legata al PDAC, in particolare si tratta di neoplasie non invasive produttrici di mucina che insorgono nei dotti pancreatici più grandi: a livello macroscopico si instaura una dilatazione nel dotto pancreatico principale o in una delle sue diramazioni, la quale presenta proiezioni papillari rivestite da epitelio colonnare secernente mucina [40]. Le IPMN si distinguono dalle PanIN in quanto hanno dimensioni maggiori (normalmente sono più grandi di 1 cm e quindi facilmente individuabili tramite radiografia) e sono strutturalmente più complesse, tuttavia a livello istologico sono facilmente confondibili. Sebbene solo in 33 casi ogni 100000 le IPMN progrediscono a PDAC, la neoplasia papillare mucinosa intraduttale del dotto principale comporta un rischio di trasformazione maligna fino al 65% [35]. La IPMN si classifica in quattro sottotipi in base alla morfologia dell'epitelio mucoso, ovvero tipologia gastrica, intestinale, pancreatobiliare e oncocitica; ogni sottotipo ha una diversa espressione di mucina: la tipologia gastrica esprime MUC5AC, la tipologia intestinale esprime MUC2 e CDX2, la tipologia pancreatobiliare esprime MUC1 e raramente MUC6, infine la tipologia oncocitica esprime MUC1, MUC6 e Heppar1 che non è presente in nessun altro sottotipo. Così come per le PanIN, anche in questo caso si identificano un *low-grade* IPMN e un *high-grade* IPMN [36]. La mutazione principalmente riscontrata nelle IPMN riguarda il gene KRAS (30-80%), seguita dal gene GNAS (40-80%): tali mutazioni sono presenti in più del 96% dei pazienti, ma solo nella metà dei casi si rilevano entrambe; KRAS è più frequente nel sottotipo pancreatobiliare, mentre GNAS è più frequente nel sottotipo intestinale e permette di distinguere le IPMN dalle altre lesioni pancreatiche [35, 37-40]. La mutazione di GNAS insieme all'inattivazione del gene RNF43 (14-75%) sono segni tipici di PDAC che origina da IMPN [35, 38, 40]. Altre mutazioni riscontrabili anche se meno frequenti, riguardano RNF43, CDKN2A e TP53 (che causa over-espressione della proteina p53) che sono mutazioni tardive associate alla progressione a *high-grade* IPMN; raramente si osservano mutazioni dei geni BRAF e KLF4, perdita della proteina p16 e del gene SMAD4 [35, 40].

Neoplasia cistica mucinosa (MCN)

La neoplasia cistica mucinosa è un tumore cistico piuttosto raro con un'incidenza del 10-45% tra i tumori pancreatici cistici asportati chirurgicamente e che rappresenta circa il 10% delle lesioni pancreatiche [41, 42]; si distingue dalle IPMN per due caratteristiche principali: non comunica con il sistema duttale pancreatico ed è circondato da epitelio colonnare mucoso con stroma di tipo

ovarico [36]. La MCN colpisce principalmente le donne e l'età alla diagnosi si aggira tra i 40 e i 60 anni; questa neoplasia normalmente si localizza nel corpo e nella coda del pancreas [42].

Le mutazioni sono simili a quelle riscontrate in altre lesioni: la mutazione su KRAS è la più comune e la sua frequenza aumenta in maniera direttamente proporzionale al grado di malignità della neoplasia. Associate al carcinoma invasivo vi sono le mutazioni sui geni CDKN2A e TP53, ed è stato osservato come la mutazione di SMAD4 sia legata alla trasformazione maligna di MCN. Al contrario delle IPMN, il gene GNAS non è mutato [36, 42].

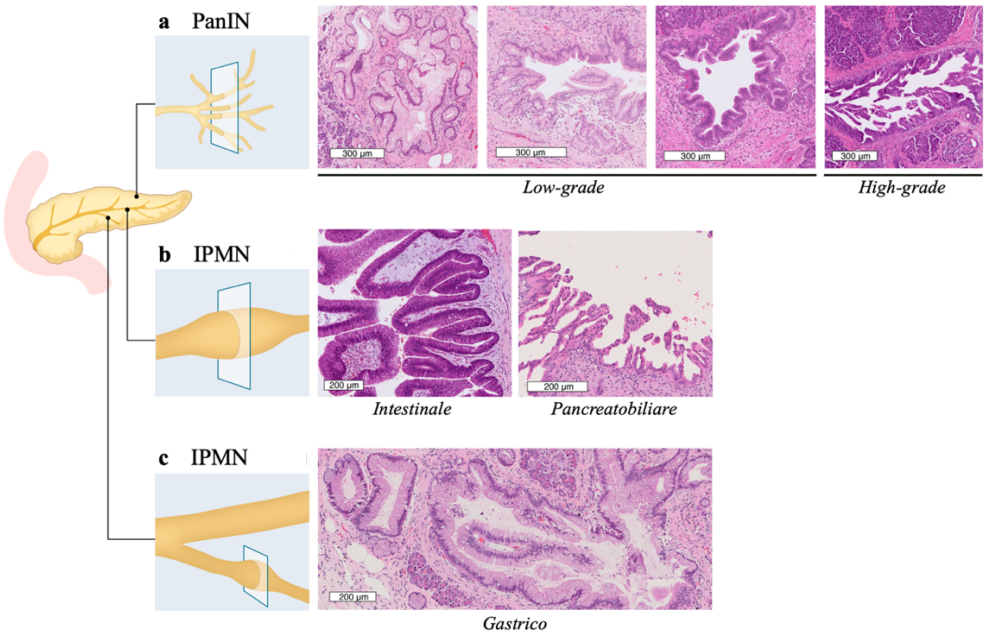


Figura 8 – anatomia e caratteristiche istologiche di PanIN e IPMN. a) Le PanIN insorgono dalle diramazioni minori del sistema pancreatico duttale; si osserva la progressione da *low-grade* a *high-grade*. b) IPMN del dotto principale e c) IPMN di un ramo minore; i sottotipi intestinale e pancreatobiliare mostrano principalmente un fenotipo *high-grade*, al contrario del sottotipo gastrico che è più comunemente una displasia *low-grade* (adattato da: Pedro et al., 2025).

Neoplasia tubulopapillare intraduttale (ITPN)

La neoplasia tubulopapillare intraduttale rappresenta meno dell'1% dei tumori esocrini del pancreas, è di dimensioni piuttosto grandi (da 1 a 15 cm) e viene diagnosticata tra i 35 e i 78 anni di età con una leggera prevalenza nelle donne; la maggior parte insorge nella testa del pancreas (50%) mentre solo il 33% insorge nella coda o nel corpo, inoltre più del 95% delle neoplasie insorgono nel dotto pancreatico principale. La ITPN è istologicamente caratterizzata da cellule cuboidali con nuclei ingrossati e più della metà di queste neoplasie è associata a PDAC.

La ITPN è associata alla mutazione di MUC1 e MUC6 ma risulta negativo a MUC2 e MUC5A: questo permette il loro differenziamento dalla IPMN in quanto quest'ultima risulta $MUC5A^{+}/MUC6^{-}$, mentre la ITPN è $MUC5A^{-}/MUC6^{+}$. La mutazione del gene TP53 è frequente al contrario di KRAS e BRAF, ma è comune la mutazione di PIK3CA suggerendo il coinvolgimento del *pathway* fosfatidilinositolo-3-chinasi/AKT nella patogenesi della malattia [35, 36].

Gene	Proteina codificata	Tipologia	Funzione	Mutazione				Fonte
				PanIN	IPMN	MCN	ITPN	
KRAS	K-Ras	Proto-oncogene, GTPasi	Codifica per proteine coinvolte in divisione, differenziamento e apoptosi. K-Ras fa parte del pathway RAS/MAPK	✓	✓	✓	✗	[d]
GNAS	Subunità α della proteina legante nucleotidi della guanina	Locus complesso	Stimola la produzione dell'adenilato ciclasi, che regola l'attività delle ghiandole endocrine	✓	✓	✗	✗	[e]
BRAF	B-Raf	Proto-oncogene, serina-treonina chinasi	Codifica per proteine coinvolte in divisione, differenziamento e apoptosi. K-Raf fa parte del pathway RAS/MAPK	✓	–	✗	✗	[f]
CDKN2A	p16, p14	Oncosoppressore	Codifica per proteine che inibiscono la divisione cellulare (p16) e prevengono la formazione tumorale (p14)	✓	–	✓	✗	[g]
TP53	p53	Oncosoppressore	Ripara il DNA danneggiato e previene la proliferazione cellulare incontrollata	✓	–	✓	✗	[h]
SMAD4	Trasduttore del segnale di TGF-β	Oncosoppressore, fattore di trascrizione	Codifica per proteine coinvolte nel pathway di TGF-β	✓	–	✓	✗	[i]
SARP2	SFRP1	Oncosoppressore	Codifica per proteine coinvolte nel pathway di Wnt, se mutato ne causa deregolazione	✓	✗	✗	✗	[j]
NPTX2	NPTX2	Oncosoppressore	Coinvolto nella formazione di sinapsi eccitatorie, viene usato come marker precoce	✓	✗	✗	✗	[k]
CDX2	CDX2	Fattore di trascrizione	Coinvolto in crescita e differenziazione cellulare, specialmente nell'intestino	✗	✓	✗	✗	[l]
RNF43	Ring Finger Protein 43	Oncosoppressore	Inibisce il segnale del pathway di Wnt	✗	✓	✗	✗	[m]
KLF4	Proteina della famiglia Kruppel	Fattore di trascrizione	Controlla la fase di transizione tra le fasi G1 e S del ciclo cellulare e media l'attività di p53	✗	–	✗	✗	[n]
PIK3CA	P110α (subunità di PI3K)	Oncogene	Ha un ruolo in proliferazione, migrazione e sopravvivenza cellulare	✗	✗	✗	✓	[o]

Tabella 3 - Geni coinvolti nelle lesioni pancreatiche pre-neoplastiche. (✓ = mutato sempre o molto spesso, – = mutato raramente, ✗ = mai mutato).

1.2.3 Malattie ereditarie predisponenti

Sebbene le cause del tumore pancreatico siano generalmente poco conosciute, una piccola percentuale (5%) è attribuibile a una predisposizione genetica data da sindromi familiari [43].

Sindrome di Lynch (LS)

La sindrome di Lynch, altrimenti chiamata carcinoma colorettale ereditario non poliposico (HNPCC), è una malattia autosomica dominante legata principalmente al tumore al colon retto, tuttavia è anche causa del 3.7% dei tumori pancreatici. La sindrome è causata da mutazioni germinali nei geni del sistema di riparazione del *mismatch* (MMR) ovvero MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2; meno frequentemente si osservano anche mutazioni germinali di EPCAM con conseguente silenziamento epigenetico di MSH2, e mutazioni del gene PALB2 [44]. Il meccanismo di riparazione degli errori di mismatch è fondamentale per il mantenimento dell'integrità genomica: tale *pathway* permette di identificare e correggere gli errori di appaiamento tra le basi ma anche inserzioni o delezioni che avvengono durante la replicazione del DNA. Le proteine MSH2 e MSH6 formano un eterodimero che costituisce un complesso proteico chiamato mutSα, il quale è responsabile dell'iniziale riconoscimento di un *mismatch*; le proteine MLH1 e PMS2 formano anch'esse un eterodimero che costituisce un altro complesso proteico chiamato mutLα, che marca il DNA in corrispondenza del sito errato in modo da avviare la riparazione [45]. Il gene PALB2 codifica per proteine che interagiscono con altre proteine (in particolare BRCA2) coinvolte nella riparazione del DNA per ricombinazione omologa [46], mentre EPCAM è coinvolto in vari processi cellulari come adesione, migrazione, proliferazione e differenziamento [47].
Nel tumore al pancreas legato a LS è stato visto che le mutazioni di MLH1 e MSH2 hanno più effetto sulla riparazione del DNA rispetto alla mutazione di MSH6 e PALB2 [44].

Sindrome dei nevi atipici familiari e mieloma multiplo (FAMMM)

La FAMMM è una malattia autosomica dominante ereditaria caratterizzata dalla presenza di un elevato numero di nevi (più di 50), insieme a una storia familiare di melanoma in parenti fino al secondo grado. La mutazione chiave in questa sindrome riguarda il gene CDKN2A, che codifica per le proteine p16, p14, p18 e p19. p16 è una chinasi ciclina-dipendente (CDK) che regola il ciclo cellulare legandosi a CDK4 e CDK6, mentre p14 inibisce la degradazione del regolatore del ciclo cellulare p53. Alterazioni nella linea germinale causano principalmente aumentato rischio di sviluppo di melanomi precoci o multipli, inoltre i soggetti con FAMMM presentano un rischio più alto di 18-22 volte di sviluppare tumore al pancreas [48].

Sindrome di Peutz-Jeghers (PJS)

La sindrome di Peutz-Jeghers è una rara malattia autosomica dominante che colpisce circa un individuo ogni 120000; è caratterizzata da polipi amartomatosi gastrointestinali, aree iperpigmentate a livello di dita, mucosa buccale e cavo orale, e neoplasie maligne che insorgono in vari organi [48, 49]. Nella maggior parte dei casi la mutazione principale riguarda il gene STK11, un oncosoppressore che codifica per la proteina serina/treonina chinasi 11 la quale, per la sua attivazione, richiede il legame con MO25 e STRAD; sebbene il collegamento tra STK11 e tumore al pancreas non sia ancora ben chiaro, si pensa che tale proteina controlli l'apoptosi nelle cellule in rapida proliferazione [48].

Sindrome ereditaria del carcinoma mammario e ovarico (HBOC)

La HBOC è una sindrome caratterizzata da una incrementata suscettibilità allo sviluppo di cancro ovarico e al seno, tuttavia si delinea anche come prima tra le sindromi ereditarie legate al tumore al pancreas [50]. Le mutazioni che portano all'insorgenza di HBOC riguardano i geni BRCA1 e BRCA2: si tratta di geni *caretaker*, ovvero oncosoppressori che riparano le rotture a doppio filamento del DNA tramite ricombinazione omologa, mantenendo così integra la stabilità genomica; tali geni controllano anche la dinamica dei centrosomi, la segregazione cromosomica e la citocinesi [51]. Altre mutazioni riguardano TP53, PTEN, CDH1, ATM, CHEK2 e PALB2. I pazienti che presentano questo profilo sono più suscettibili allo sviluppo di tumore al pancreas rispetto al resto della popolazione [48].

Poliposi adenomatosa familiare (FAP)

La FAP è una condizione autosomica dominante caratterizzata da un alto numero di polipi del colon, tuttavia vi possono essere manifestazioni anche al di fuori di questa zona. La mutazione principale riguarda il gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), un oncosoppressore che riduce l'espressione del *pathway* di Wnt/β-catenina; il gene APC è in grado di iniziare il processo di tumorigenesi legato al meccanismo dipendente da Wnt, inoltre contribuisce anche allo sviluppo di tumori resistenti ai trattamenti chemioterapici. Il rischio di sviluppo di tumore pancreatico aumenta di 4 volte in pazienti che presentano la poliposi adenomatosa familiare [48].

Sindrome di Li-Fraumeni (LF)

La sindrome di Li-Fraumeni è una malattia autosomica dominante causa di numerose neoplasie, tant'è vero che la metà dei pazienti sviluppa un tumore entro i 30 anni di vita. La LF è caratterizzata dalla mutazione germinale del gene TP53, sebbene questa sia molto rara (0.005-0.01% in tutta la

popolazione). Questa sindrome è principalmente associata a tumori al seno e adrenocorticali ma anche a sarcomi e leucemie, oltre a linfomi, melanomi e tumori a polmoni, prostata e ovaie; uno studio su 24 famiglie ha tuttavia evidenziato un rischio di sviluppo di tumore al pancreas aumentato di 7 volte in soggetti con sindrome di Li-Fraumeni [48].

Atassia-telangectasia (AT)

L'atassia-telangectasia è un disturbo autosomico recessivo caratterizzata da progressiva degenerazione cerebellare, immunodeficienza, talengectasia oculocutanea (dilatazione dei piccoli vasi), immunodeficienza e suscettibilità al cancro. La sindrome è causata dalla mutazione del gene ATM, il quale codifica per una chinasi che è volta a rilevare un danno al DNA ed eventualmente interrompere il ciclo cellulare; la ATM chinasi si occupa di fosforilare diverse proteine, come p53 e BRCA1. I pazienti che presentano un tale corredo di mutazioni presentano un rischio di sviluppare tumore al pancreas aumentato di 4 volte rispetto al resto della popolazione [52].

Pancreatite ereditaria

La pancreatite ereditaria è una condizione che si definisce come pancreatite cronica o acuta ma ricorrente, causata da varianti autosomiche dominanti dei geni PRSS1 e SPINK1: i soggetti che presentano tali mutazioni mostrano un rischio, rispettivamente, del 19% e 12% di sviluppare tumore al pancreas [52, 53]. Questa condizione è quindi associata al tumore al pancreas, tuttavia rappresenta solo una piccola parte dei casi; il fattore più importante, in questo caso, è l'infiammazione cronica dovuta alla pancreatite che accelera le mutazioni genetiche e promuove lo sviluppo del tumore [52]. Come già accennato, una delle mutazioni significative riguarda il gene PRSS1 che codifica per il tripsinogeno cationico, ovvero l'isoforma di tripsinogeno più abbondante; seguono il tripsinogeno anionico (1/3 del totale) e la mesotripsina, presente solo in tracce. I tripsinogeni sono pro-enzimi o zimogeni che sono accumulati e rilasciati dal compartimento secretorio delle cellule acinose, quindi in condizioni fisiologiche vengono attivati nel duodeno ad opera di una enterochinasi: il tripsinogeno diventa così tripsina, l'enzima digestivo principale del sistema gastrointestinale capace di auto-attivazione e autolisi. La mutazione del gene PRSS1 causa modificazioni nella struttura proteica della tripsina, e anche lievi cambiamenti sono in grado di compromettere il normale meccanismo di attivazione dell'enzima portando ad un'aumentata attivazione intrapancreatica prematura; parallelamente tale mutazione può potenziare l'attività della tripsina, incrementando così il rischio di danno pancreatico e infiammazione [54].
Un'altra mutazione ricorrente coinvolge il gene SPINK1, il quale codifica per un inibitore della secrezione pancreatica di tripsina: tale proteina è in prima linea nella difesa del pancreas contro l'attivazione prematura della tripsina, infatti è in grado di inibire fino al 13% del potenziale della

tripsina. Per prevenire la pancreatite e, di conseguenza, proteggere dal rischio di tumore pancreatico, è possibile somministrare inibitori della tripsina esogeni ai pazienti che presentano tale mutazione [55].

Fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una malattia genetica recessiva caratterizzata dalla mutazione del gene CTFR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), in particolare si verifica una perdita di funzione che porta a infezioni batteriche croniche delle vie aeree, sinusite, insufficienza pancreatica e infertilità [56]. È noto che i pazienti affetti da fibrosi cistica sono più soggetti allo sviluppo di tumori gastrointestinali, specialmente tumore del colon-retto; l'insufficienza pancreatica è strettamente legata alla fibrosi cistica, inoltre lievi mutazioni del gene CTFR predispongono alla pancreatite ricorrente ovvero un fattore di rischio per il tumore al pancreas. Sebbene la relazione tra tumore pancreatico e fibrosi cistica sia ancora in fase di studio, è stato osservato che l'incidenza del tumore in pazienti con fibrosi cistica è di 98.4 individui ogni 100000, con un rischio 3 volte maggiore rispetto alla popolazione generale [57].
La proteina codificata dal gene CTFR sulla superficie superiore delle cellule epiteliali di pancreas, intestino, fegato, vie aeree, dotto deferente e ghiandole sudoripare; agisce come canale del cloro cAMP-dipendente, come canale del bicarbonato e come modulatore di altri canali ionici in modo tale da mantenere l'equilibrio idrico e la fluidità delle secrezioni [58].

1.2.4 Basi molecolari e cellulari dello sviluppo neoplastico del PDAC

Oltre al contributo delle lesioni pancreatiche pre-neoplastiche, l'adenocarcinoma pancreatico duttale presenta una componente genetica indiscutibilmente rilevante: la trasformazione da cellule sane a tumorali rispetta un modello di progressione secondo il quale gli adenocarcinomi invasivi si sviluppano in seguito all'accumulo di molteplici mutazioni ereditarie o acquisite [59]. Le mutazioni chiave che permettono tale progressione riguardano i geni KRAS (94%), CDKN2A (> 90%), TP53 (75%) e SMAD4 (55%) [43]. Le lesioni pancreatiche, principalmente PanIN, e tali mutazioni genetiche sono strettamente collegate nella progressione tumorale: la mutazione di KRAS infatti è ritenuta essere precoce e si riscontra nella PanIN al primo stadio, quindi con l'acquisizione di ulteriori mutazioni (CDKN2A, TP53 e SMAD4) la lesione progredisce e sfocia nell'adenocarcinoma invasivo [60].

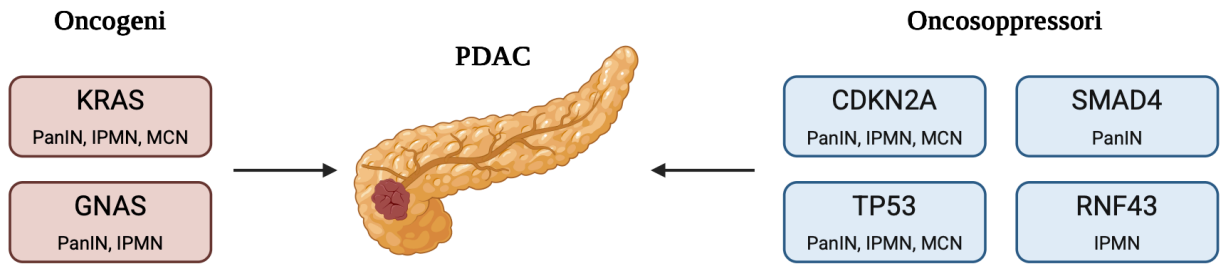


Figura 9 - Schema delle principali mutazioni genetiche nella progressione del PDAC, abbinate alle corrispondenti lesioni pancreatiche pre-neoplastiche. Creato con BioRender.com (adattato da: Cowan et al., 2014).

KRAS

Il gene KRAS codifica per due varianti di splicing (KRAS4A e KRAS4B) di un membro della famiglia Ras delle piccole GTPasi; insieme ai suoi paraloghi HRAS e NRAS, è frequentemente mutato in varie tipologie di tumore, anche se KRAS rimane quello più frequente [59, 60]. Nella maggior parte dei casi le mutazioni dei geni Ras sono mutazioni missenso nei residui *hotspot* G12, G13 e Q16: tali mutazioni compromettono l'attività GTPasica della proteina Ras, bloccandola efficacemente nel suo stato attivo legato al GTP [60]. KRAS è una proteina transmembrana che, nel suo stato attivato, è in grado di interagire con una gran varietà di proteine effettrici. I recettori presenti sulla superficie cellulare utilizzano i fattori di scambio di nucleotidi guaninici (GEF) per promuovere il rilascio di GDP: in questa forma la proteina ha maggiore affinità di legame con il GTP, pertanto vi si lega e subisce un cambio conformazionale che porta alla sua attivazione. In quanto GTPasi, KRAS ha anche la capacità di idrolizzare il GTP a GDP e disattivarsi (Figura 10a); questa capacità necessita però dell'azione di proteine attivatrici dell'attività GTPasica (GAP) [59]. KRAS va incontro a una mutazione puntiforme nel codone 12 e come risultato si ha la sostituzione della glicina con aspartato, valina, arginina o serina: in questo modo viene depotenziata l'attività GTPasica di KRAS, la quante diventa anche meno sensibile all'azione delle proteine attivatrici dell'attività GTPasica; in sostanza la mutazione porta a una forma costitutivamente attiva di KRAS che non risponde a stimoli esterni per mediare il suo effetto [59]. Di fatto quindi le mutazioni G12 e G13 influiscono sul legame con le proteine attivatrici, mentre la mutazione Q16 ha effetto sulla proprietà GTPasica intrinseca della proteina [60].

La proteina della famiglia Ras è coinvolta in tre principali pathway di segnalazione nel PDAC: Raf/Mek/Erk (MAPK), PI3K/Pdk1/Akt e RalGEFs [61]; in particolare:

- **Raf/Mek/Erk**: il ruolo del pathway *rapidly accelerated fibrosarcoma* (fibrosarcoma rapidamente accelerato, Raf)/ *mitogen-activated protein kinase kinase* (chinasi chinasi attivata da mitogeni, Mek)/ *extracellular signal-regulated kinase* (chinasi regolata da segnali extracellulari, Erk) in quanto principale via di segnalazione mediata dalla proteina Ras, è oggi ampiamente descritto.

KRAS, nella sua forma attivata legata a GTP, fosforila la proteina Raf che a sua volta esegue la fosforilazione di Mek: quest'ultima fosforila la chinasi terminale Erk che, attivata, regola la trascrizione dei geni promuoventi la crescita [62]. Correlato a questo pathway è interessante il gene RKIP, il quale codifica per una proteina che svolge il ruolo di inibitore fisiologico della via di segnalazione. Sebbene il ruolo funzionale di RKIP nell'ambito dell'adenocarcinoma pancreatico duttale non sia ancora ben chiaro, alcuni studi hanno evidenziato come una sua progressiva perdita sia associata alla trasformazione neoplastica del pancreas, a caratteristiche aggressive del PDAC e alla transizione epitelio-mesenchimale nel tumore pancreatico. Nelle cellule con down-regolazione di RKIP si osserva una maggiore capacità di migrazione e invasione, oltre a una marcata resistenza ai trattamenti farmacologici *in vitro*; ulteriori studi *in vivo* hanno confermato questo aspetto, inoltre è stato osservato come il silenziamento di RKIP sia in grado di compensare l'effetto inibitorio di KRAS su metastatizzazione e chemioresistenza nelle cellule di carcinoma pancreatico [63].

- **PI3K/Pdk1/Akt**: la mutazione del gene PIK3CA, che codifica per la subunità p110α della proteina PI3K, è presente nel 3-5% dei pazienti con tumore pancreatico e agisce scatenando le mutazioni che permettono la formazione del tumore e la sua progressione, a causa del fatto che rende la via di segnalazione costitutivamente attiva. Il pathway di PI3K, deregolato nel 60% dei pazienti con PDAC, controlla alcune funzioni chiave delle cellule immunitarie e gioca un ruolo cruciale nell'interazione tra cellule tumorali e cellule immunitarie; è stato dimostrato che è anche in grado di inibire l'apoptosi per stimolare la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali. La cascata di segnalazione di PI3K è attivata dalla stimolazione di recettori tirosin chinasici (RTKs): il recettore si auto-fosforila e recluta PI3K attivandolo, in questo modo avviene la fosforilazione del fosfatililinositolo a fosfatililinositolo-4,5-bifosfato (PIP_2) che a sua volta viene fosforilato nel secondo messaggero fosfatililinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP_3); PIP_3 è in grado di reclutare, sulla membrana delle cellule tumorali, delle proteine di segnalazione quale Pdk1: quest'ultima esegue la fosforilazione della serina-treonina chinasi Akt, la quale stimola alcuni fattori come NF-kB, HIF-1α (che regola il Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare, VEGF) e FoXo, oltre a regolare il ciclo cellulare e inibire l'apoptosi. Akt è attivata anche da mTOR, un'altra serina-treonina chinasi che quando attivata traduce alcune proteine come la ciclina D1 (coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare) e HIF-1α. L'antagonista naturale di PI3K, PTEN, è uno dei geni oncosoppressori più frequentemente alterati nel cancro e una volta mutato non è in grado di esercitare il suo potere inibitorio sul *pathway* PI3K/Pdk1/Akt [64].

- **RalGEFs**: RalGEF è una famiglia di enzimi che agisce come fattore di scambio di nucleotidi guaninici attivando due proteine appartenenti alla superfamiglia Ras, ovvero RALA e RALB; tali proteine operano come mediatori della crescita tumorale e delle metastasi nel PDAC. È stato evidenziato che il *knockdown* di RALA in modelli di tumore pancreatico primario ha condotto a

una regressione del tumore, mentre la soppressione di RALB compromette la formazione delle metastasi in sistemi sperimentali [61, 65].

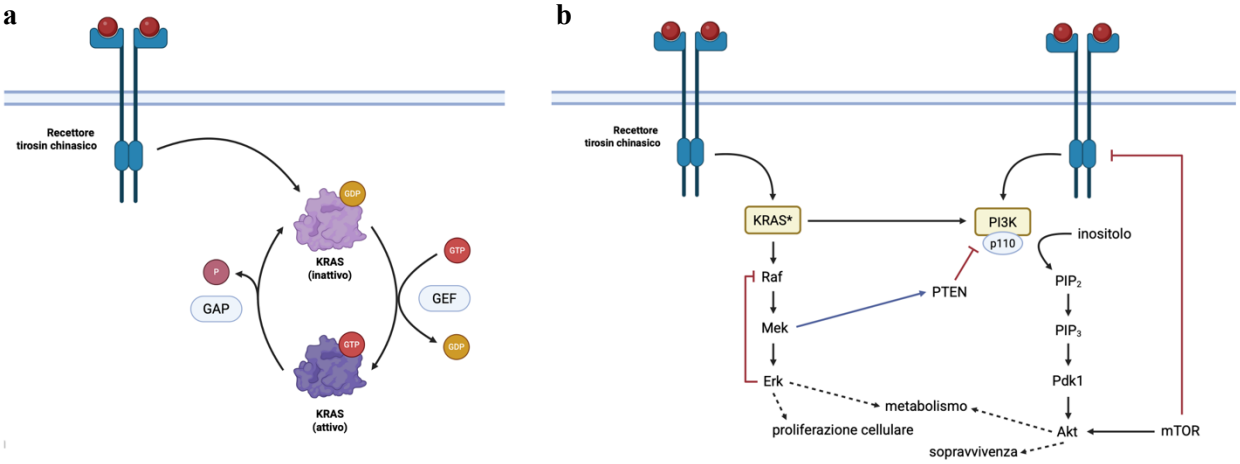


Figura 10 - a) schema di attivazione di KRAS. Creato con BioRender.com. b) network dei *pathway* Raf/Mek/Erk e PI3K/Pdk1/Akt. KRAS mutato e attivato scatena la via di segnale canonica di Raf/Mek/Erk e il *pathway* di PI3K, il quale porta a iniziazione, progressione e mantenimento tumorale. Sono presenti segnalazioni inibitorie crociate (indicate con la linea rossa che termina con una linea verticale) e circuiti di *feedback* antitumorigenici (indicati con la freccia blu); con le frecce tratteggiate sono indicate le conseguenze dei *pathway*. Creato con BioRender.com (adattato da: Eser et al., 2014 e Murthy et al., 2018)

In questo quadro già complesso, studi sperimentali hanno dimostrato che molteplici popolazioni cellulari possono essere all'origine dello sviluppo di PDAC. Sebbene le cellule duttali siano intuitivamente l'origine più probabile per l'adenocarcinoma, è stato osservato come l'espressione mirata di KRAS mediante il promotore della citochina 19 non sia sufficiente a determinare lo sviluppo né di PanIN né di PDAC. Più interessanti si sono rivelate le cellule acinari: a seguito di un danno pancreatico acuto queste cellule sono in grado di rigenerarsi a partire da cellule acinari preesistenti, passando per un intermedio simile a cellule duttali, grazie all'espressione transitoria di vie di segnalazione embrionali; cellule acinari che esprimono la forma mutata di KRAS hanno la capacità di essere riprogrammate a cellule duttali e causare PanIN in quanto vengono mantenute da KRAS stesso in uno stato metaplastico, inoltre in tali cellule la pancreatite cronica accelera la progressione prima a PanIN e poi a PDAC. Questi aspetti suggeriscono come, in modelli genetici, l'adenocarcinoma pancreatico duttale possa originare dalle cellule acinari tramite un processo chiamato metaplasia acinare-duttale. Ulteriori tipologie cellulari che possono originare la neoplasia in questione sono le cellule insulino-positive che presentano la mutazione su KRAS, e le cellule centroacinari localizzate al termine del dotto pancreatico. In modelli murini è stato osservato che il *knockout* pancreas-specifico di PTEN è associato a un aumento proliferativo delle cellule centroacinari e all'apoptosi delle cellule acinari, con conseguente trasformazione maligna. Questi dati suggeriscono che PTEN, spesso silenziato in PDAC, stabilizza le varie popolazioni cellulari

del pancreas adulto e che una sua mutazione abbia effetti a valle (con l'attivazione, ad esempio, della via di segnalazione PI3K/Pdk1/Akt) promuovendo la progressione del carcinoma pancreatico attraverso l'espansione delle cellule centroacinari [59].

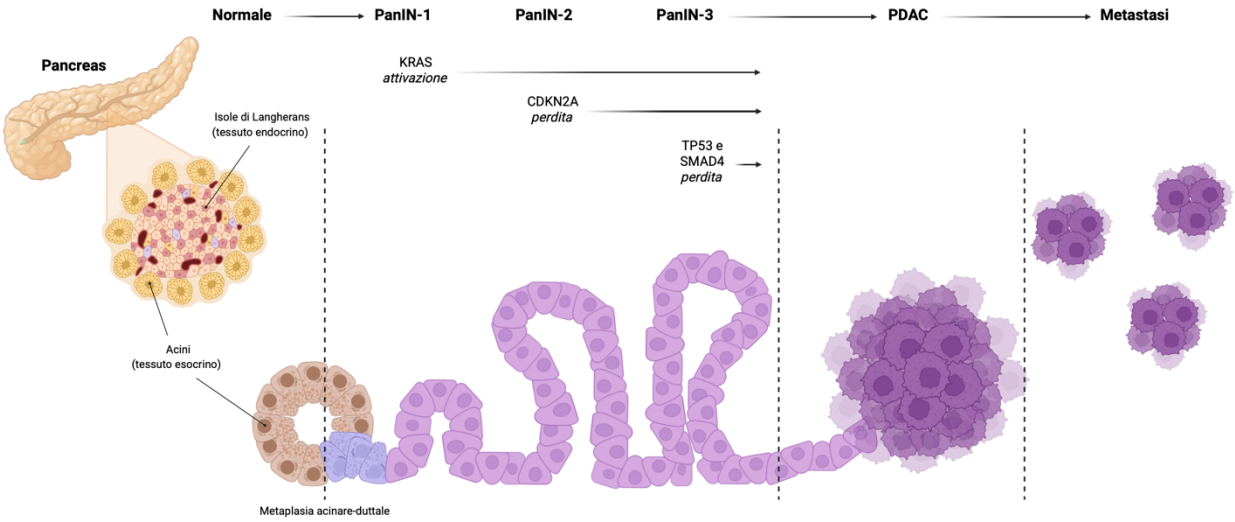


Figura 11 - Schema di sviluppo e progressione di PDAC. Le cellule acinari si trasformano in cellule duttali sviluppando PanIN; con l'accumulo delle mutazioni di KRAS, CDKN2A, TP53 e SMAD4, la lesione pancreatica progredisce dallo stadio 1 allo stadio 3 fino a formare l'adenocarcinoma pancreatico duttale che, eventualmente, può generare metastasi. Creato con BioRender.com.

La mutazione di KRAS non è solamente in grado di accelerare la progressione del PDAC tramite l'attivazione dei pathway, ma anche attraverso la riprogrammazione metabolica regolando glucosio, amminoacidi e lipidi [66]. In particolare:

- **Glucosio**: tutte le forme di tumore, incluso l'adenocarcinoma pancreatico duttale, favoriscono un massiccio utilizzo della glicolisi in condizioni anaerobie tramite un processo chiamato effetto Warburg. Il glucosio viene trasportato all'interno della cellula tramite i trasportatori della famiglia GLUT, in particolare GLUT1, GLUT2, GLUT3 e GLUT4; una volta nel citoplasma, il glucosio viene sottoposto a una sequenza di reazioni catalizzate da enzimi glicolitici che conducono alla produzione di ATP e piruvato: quest'ultimo viene successivamente ridotto a L-lattato, permettendo la produzione energetica cellulare [66]. È stato dimostrato che la mutazione di KRAS aumenta l'espressione del trasportatore GLUT1 tramite l'up-regolazione del gene SLC2A1, e degli enzimi glicolitici quali esochinasi, fosfofruttochinasi 1 e lattato deidrogenasi, promuovendo l'attività glicolitica e la produzione di lattato: in questo modo tali enzimi vengono dirottati verso la via di biosintesi delle esosamine (HBP) al fine di produrre UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) per la biosintesi di glicoproteine, glicolipidi e proteoglicani nelle cellule tumorali. In condizioni di scarso glucosio, le cellule che presentano la mutazione su KRAS tendono a sfruttare vie lisosomiali per il recupero dei nutrienti, come l'autofagia. La capacità di sopravvivenza con scarse quantità di

glucosio è supportata dalla diminuzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno dei mitocondri, in questo modo è possibile limitare l'azione del coenzima NADPH e quindi permettere lo stesso la proliferazione delle cellule tumorali. La mutazione di KRAS è quindi in grado di portare a disfunzione mitocondriale e glicolisi aerobia, entrambi aspetti chiave nelle cellule tumorali pancreatiche [66, 67].

- **Glutammina**: il metabolismo della glutammina si affianca all'effetto Warburg come caratteristica chiave delle cellule tumorali. La maggior parte delle cellule utilizza l'enzima glutammato deidrogenasi (GLUD1) per convertire il glutammato (un derivato della glutammina) in α-chetoglutarato, il quale alimenta il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) all'interno del mitocondrio. Le cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale si affidano a un *pathway* diverso in cui l'aspartato derivato dalla glutammina viene convertito dall'enzima aspartato transaminasi (GOT1) in ossalacetato, poi trasformato in malato e successivamente in piruvato. Il PDAC dipende fortemente da questa via di segnalazione, che permette di sopperire alla diminuzione di piruvato utilizzabile dalla via TCA causata dall'effetto Warburg. La glutammina rappresenta pertanto un nutriente alternativo al glucosio e la mutazione di KRAS permette di potenziare questa via di segnalazione tramite l'up-regolazione o la down-regolazione degli enzimi coinvolti [66, 68].

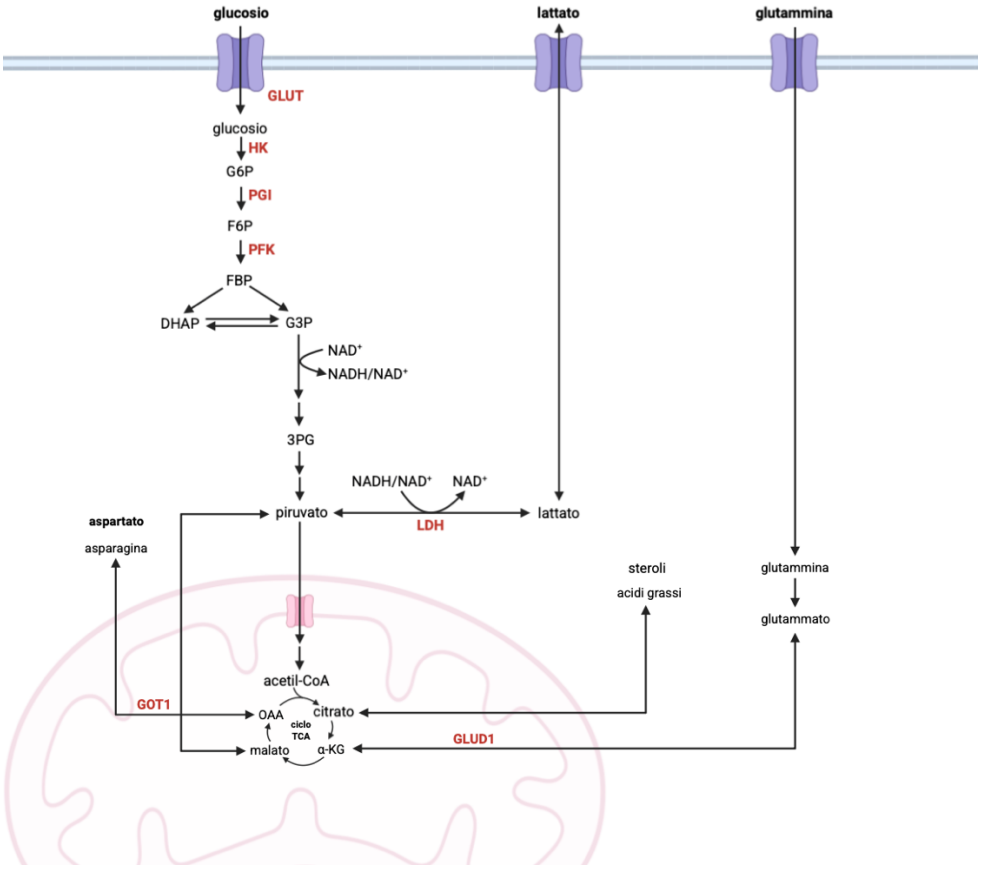


Figura 12 - Rappresentazione grafica delle alterazioni metaboliche indotte da KRAS. **G6P** glucosio-6-fosfato, **F6P** fruttosio-6-fosfato, **FBP** fruttosio-1,6-bifosfato, **DHAP** diidrossiacetone fosfato, **G3P** gliceraldeide-3-fosfato, **3PG** 3-fosfoglicerato, **α-KG** α-chetoglutarato, **OAA** ossalacetato, **HK** esochinasi, **PGI** fosfoesoso isomerasi, **PFK** fosfofruttochinasi, **LDH** lattato deidrogenasi, **GLUD1** glutammato deidrogenasi, **GOT1** aspartato transaminasi. Creato con BioRender.com (adattato da: Liu et al., 2022).

- **Acidi grassi**: una dieta ricca di grassi ma povera di carboidrati induce un'eccessiva attivazione della mutazione G12 di KRAS permettendo la riprogrammazione metabolica dell'adenocarcinoma pancreatico duttale, portando a infiammazione e fibrosi del pancreas. È stato dimostrato che la mutazione di KRAS causa un aumento della proteina 1 simile al fibrinogeno (*fibrinogen-like protein 1*, FGL1) attraverso la fosforilazione di STAT3, alterando così il metabolismo lipidico e promuovendo la proliferazione di PDAC. La mutazione di KRAS causa anche la down-regolazione dell'enzima lipasi ormone-sensibile (HSL) grazie all'attivazione della via di segnalazione di Erk così da promuovere l'accumulo di lipidi a acidi grassi nelle goccioline lipidiche, meccanismo fondamentale per la proliferazione del tumore e per la formazione di metastasi [66].

CDKN2A

CDKN2A è un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 9 che consiste in quattro esoni ovvero 1α, 1β, 2 e 3, pertanto codifica per due proteine distinte a seguito di splicing alternativo. Gli esoni 1α, 2 e 3 permettono di sintetizzare la proteina p16, la quale si lega alla chinasi 4 ciclina-dipendente (CDK4) inibendo così la sua interazione con la ciclina D: tale inibizione previene la fosforilazione della proteina retinoblastoma, risultando nell'arresto del ciclo cellulare tra le fasi G1 e S; con l'inattivazione di p16 viene meno questo controllo, con conseguente accelerazione della proliferazione cellulare [69, 70]. Gli esoni 1β, 2 e 3 sintetizzano invece la proteina p14, che ha la funzione di stabilizzare la proteina p53 inibendone la degradazione indotta da HDM2 [69]. CDKN2A, nella sua forma non mutata, promuove senescenza e apoptosi e inibisce i processi legati allo sviluppo del cancro, inoltre modula l'immunità anti-tumorale; una sua disregolazione è associata non solo al PDAC ma anche ad altre forme di cancro e, in generale, ogni sua mutazione contribuisce alla tumorigenesi [71]. Il silenziamento trascrizionale di CDKN2A svolge un ruolo chiave nello sviluppo dell'adenocarcinoma: l'ipermetilazione delle zone ricche in guanina e citosina del promotore di tale gene, mediata dall'enzima metiltransferasi, causa il silenziamento di CDKN2A stesso, favorendo anche la metastatizzazione [72].

TP53

TP53 è un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 17 coinvolto nella regolazione della divisione cellulare e che codifica per la proteina p53, ovvero un fattore di trascrizione. La mutazione su questo gene è presente nel 50-90% dei casi di tumore pancreatico e ha un ruolo cruciale nella patogenesi del cancro, causando principalmente una divisione cellulare incontrollata [71]. La sostituzione di un amminoacido porta p53 a perdere la sua capacità di legare il DNA, annullando quindi la sua funzione di fattore di trascrizione: in questo modo non è più possibile esprimere quei geni che promuovono l'arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi in risposta a un danno del DNA o a

stress cellulare. L'inattivazione di p53 si osserva tipicamente negli stadi più avanzati di PanIN a seguito della mutazione di CDKN2A: questo suggerisce che l'accumulo di mutazioni porta a una pressione selettiva per la quale è necessario inattivare p53 in modo da favorire crescita e proliferazione delle cellule tumorali. All'opposto, le mutazioni *gain of function* contribuiscono alla metastatizzazione del tumore: in modelli murini è stato dimostrato che la mutazione specifica $p53^{R175H}$ sia in grado di legare la proteina p73, inibendone la capacità di regolare il fattore PDGFRβ (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*); l'espressione di quest'ultimo viene così up-regolata, promuovendo la via di segnalazione che potenziano motilità, invasività e potenziale metastatico delle cellule tumorali [73]. TP53 ha anche un ruolo nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT), ovvero un processo fisiologico coinvolto nella guarigione delle ferite ma che, se espresso nelle cellule tumorali a causa della perdita di polarità delle cellule stesse, promuove la loro motilità e formazione di metastasi. Nella EMT sono coinvolte proteine della famiglia ZEB e Snail: una mutazione *loss of function* di p53 causa la up-regolazione di ZEB1 e inibisce la trascrizione del suo soppressore, fornendo così meccanismi per la metastatizzazione del tumore nelle sue fasi tardive di sviluppo [74].

SMAD4

SMAD4, altrimenti chiamato DPC4, è un gene oncosoppressore che codifica per un fattore di trascrizione ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 18; la sua funzione principale è quella di mediatore nel *pathway* di TGF-β, regolando così processi cellulari essenziali quali crescita, differenziamento, apoptosi e migrazione [71, 75]. Le proteine della famiglia SMAD trasducono il segnale extracellulare direttamente al nucleo e si dividono in tre categorie: recettori regolati (R-SMAD) tra cui SMAD2 e SMAD3, mediatori comuni (Co-SMAD) tra cui SMAD4, e inibitori (I-SMAD) tra cui SMAD6 e SMAD7 che interferiscono con la fosforilazione degli R-SMAD e il loro conseguente legame con Co-SMAD. Il TGF-β si lega al suo recettore di tipo II sulla membrana cellulare, il quale recluta e fosforila il recettore di tipo I: viene così fosforilato il complesso intracellulare SMAD2/3 che, attivato, si stacca dal recettore per formare un complesso eterodimerico con SMAD4; tale complesso migra nel nucleo e, grazie allo specifico dominio di legame, si lega al DNA reclutando fattori trascrizionali per l'attivazione o la repressione dei geni target. Tale via di segnalazione è implicata nella soppressione dello sviluppo tumorale nei suoi primi stadi, principalmente arrestando il ciclo cellulare tra la fase G1 e S e inducendo apoptosi tramite la trascrizione di geni pro-apoptotici [76]. Il pathway di TGF-β/SMAD4 è in grado di interagire con altre vie di segnalazione aumentando la transizione epitelio-mesenchiamale; ciò accade anche indipendentemente dalla modulazione di SMAD4, infatti TGF-β può attivare il pathway PI3K/Akt inducendo un rimodellamento del citoscheletro e la transizione verso un fenotipo

mesenchimale [75, 76]. Nella progressione da PanIN a PDAC, uno studio ha evidenziato il ruolo della proteina AGR2, essenziale per l'espressione di MUC1: TGF-β è in grado di down-regolare tale proteina sotto la mediazione di SMAD4, con conseguente diminuzione della produzione di MUC1. L'analisi di 22 linee cellulari di PDAC ha inoltre evidenziato come la mutazione di SMAD4 sia presente solo in caso di variazioni di KRAS, p53 e p16, suggerendo che l'inattivazione di SMAD4 sia un evento tardivo nella patogenesi del tumore pancreatico. Come conseguenza alla mutazione di DPC4 sia ha una ridotta citotossicità mediata dai linfociti T, diminuita produzione di citochine e chemochine e diminuita infiltrazione linfocitaria [71].

1.2.5 Alterazione della regolazione epigenetica

L'epigenetica è lo studio delle modificazioni dell'espressione genica che avvengono senza alterazioni della sequenza del DNA e che sono ereditabili a livello mitotico e, talvolta, meiotico [77]; tali modificazioni insorgono come risposta a fattori ambientali o come meccanismi di adattamento. Le alterazioni epigenetiche si riscontrano ad ogni stadio della progressione tumorale e giocano un ruolo fondamentale nella sua progressione e iniziazione [78].

Uno dei geni maggiormente mutati (6%) appartenenti alla macchina epigenetica nel PDAC è ARID1A, un oncosoppressore della famiglia dei rimodellatori della cromatina il cui knockout è associato all'insorgenza della metaplasia acinare-duttale e, quindi, di PanIN; della stessa famiglia fa parte BRG1 che, se mutato insieme a KRAS, facilita la formazione di lesioni neoplastiche simili a IPMN causando la progressione a PDAC. Ai meccanismi epigenetici contribuiscono anche gli enzimi modificatori degli istoni quali KDM6A (MLL1) e MLL2/3/4, che sono di particolare rilevanza in quanto la totalità dei casi di PDAC presenta almeno una o più mutazioni di tali geni; la mutazione dei geni MLL, insieme alla mutazione di KRAS, accelera la progressione dell'adenocarcinoma pancreatico duttale [79]. Lo scenario dell'epigenetica prevede l'azione anche di micro RNA (miRNA), *long non conding* RNA (lncRNA) e *circular* RNA (circRNA). I miRNA sono piccole sequenze di RNA non codificante che regolano l'espressione genica attraverso silenziamento post-trascrizionale dei geni mediante degradazione o inibizione della traduzione dell'mRNA; alcuni miRNA sono over-espressi in IPMN e PDAC, mentre altri down-regolati sono in grado di up-regolare la trascrizione di KRAS nel tumore. I lncRNA sono sequenze di RNA non codificanti bersaglio dei miRNA, in particolare l'over-espressione di CUDR attiva la via di segnalazione Fak/Akt/Erk incrementando l'adesione delle cellule tumorali e l'invasività delle stesse inibendo l'apoptosi. I circRNA sono invece strutture circolari che interferiscono con l'attività regolatoria dei miRNA, e quindi con l'espressione di mRNA [78].

Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è uno dei meccanismi principali nell'ambito della regolazione epigenetica e consiste nel trasferimento di un gruppo metilico dalla S-adenosil-L-metionina a uno specifico sito del DNA, normalmente una citosina, formando la 5-metilcitosina. Durante il normale sviluppo i promotori ricchi in citosina e guanina (isole CpG) non vengono metilati, permettendo quindi di mantenere attivo lo stato dei corrispondenti geni: una metilazione a questo livello previene quindi il legame dei fattori di trascrizione, mantenendo così i geni nello stato inattivato; circa il 5-10% dei geni ricchi in citosina e guanina sono metilati nel cancro e facilitano la progressione tumorale [79]. L'adenocarcinoma pancreatico duttale è associato alla metilazione di ADAMT1S e BNC1, mentre altri geni (p16, ppENK, CCND2, SPARC, SOCS-1, TSLC1) sono suscettibili a metilazioni anormali che contribuiscono alla carcinogenesi pancreatica; le modificazioni in questi geni portano, nelle cellule tumori, ad aumentata proliferazione, invasione e migrazione [78].

Modificazione degli istoni

Le modificazioni post-traduzionali degli istoni hanno forti implicazioni all'interno del nucleo, come compattamento della cromatina e posizionamento del nucleosoma; tra queste modificazioni, i processi di acetilazione e metilazione sono i più apprezzabili [79]. L'acetilazione è una modificazione estremamente comune in cui gli enzimi HAT (acetiltransferasi della lisina istonica) trasferiscono un gruppo acetile dall'acetil-CoA a un residuo di lisina presente su proteine istoniche o non istoniche: questo causa il rilassamento della cromatina e aumenta l'accessibilità ai fattori di trascrizione. Al contrario, la deacetilazione indotta dagli enzimi HDAC causa la rimozione di un gruppo acetile ripristinando la carica positiva della lisina con conseguente compattamento della cromatina [79]. Nel tumore pancreatico, ad esempio, si osserva un incremento di HAT1 rispetto al tessuto pancreatico normale portando a prognosi nefaste, infatti il *knockdown* di tale gene causa una diminuzione sia nel volume che nella proliferazione del tumore. HDAC risulta mutata meno frequentemente nel PDAC, ma nonostante questo si riscontra piuttosto frequentemente: la classe I di HDAC è la più rappresentata ed è strettamente associata alla formazione di metastasi [80]. Vi sono anche enzimi in grado di aggiungere o rimuovere gruppi metilici dagli istoni, ovvero HMT (istone metiltransferasi) e HDM (istone demetilasi): uno sbilanciamento tra l'attività di tali proteine causa alterazioni anomale della cromatina, contribuendo così alla trasformazione maligna e alla progressione del PDAC [79]. Tutti questi enzimi coinvolti nella modificazione degli istoni giocano un ruolo fondamentale nella formazione di metastasi tumorale, conferendo grande adattabilità alle cellule in fase di disseminazione: la reversibilità delle modificazioni istoniche conferisce alle cellule tumorali la capacità di andare incontro a cambiamenti dinamici in ambito epigenetico, aspetto rilevante per affrontare le difficoltà poste dalla cascata metastatica.

1.2.6 Microambiente tumorale

Instabilità genomica, mutazioni e cambiamenti epigenetici rendono l'adenocarcinoma pancreatico duttale un tumore estremamente eterogeneo a livello morfologico, cellulare e molecolare. Tale eterogeneità è riscontrabile non solo all'interno della massa cancerosa, ma anche in termini di microambiente tumorale [81]. Il microambiente tumorale (TME) è una rete dinamica che comprende le cellule tumorali e il tessuto stromale (composto da cellule immunitarie, fibroblasti, citochine, adipociti e tessuto vascolare), avvolti da matrice extracellulare e in continua interazione l'uno con l'altro [82]. La componente stromale è quindi caratterizzata da svariati fattori che permettono angiogenesi, progressione tumorale e invasione dei tessuti [83].

Tra le tipologie di cellule stromali più abbondanti vi sono i fibroblasti tumore-associati (CAF), ovvero cellule di origine mesenchimale estremamente eterogenee che contribuiscono alla modificazione del TME: questo avviene grazie a stimolazione delle strutture vascolari, stimoli immunosoppressivi e rimodellamento della matrice extracellulare [84]. I CAF presentano un fenotipo diverso dai fibroblasti fisiologici, infatti hanno un'aumentata espressione di proteine della matrice ed enzimi proteolitici che favoriscono il potenziale invasivo delle cellule tumorali [83]. Normalmente i fibroblasti sono i principali responsabili della formazione della matrice extracellulare e hanno la capacità di inibire la crescita delle cellule tumorali; la controparte tumorale stimola invece proliferazione, migrazione e invasione, immunosoppressione tumorale e secrezione di citochine e fattori proinfiammatori [83]. I CAF secernono fattori molecolari (come VEGF) che stimolano crescita e migrazione delle cellule endoteliali angiogeniche, le quali permettono lo sviluppo della vascolarizzazione tumorale che è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi e il supporto nutrizionale della massa cancerosa. I vasi neo-formati non sono identici a quelli dell'ospite, infatti il flusso non è costante e questo garantisce periodi di ipossia alternati a periodi di ossigenazione che favoriscono la proliferazione del tumore e delle metastasi; i nuovi capillari inoltre sono estremamente permeabili portando, anche in questo caso, alla più facile formazione di metastasi [82, 84]. I fibroblasti tumore-associati hanno effetto anche su svariate cellule immunitarie facenti parte del TME, come macrofagi, cellule *natural killer* (NK), cellule dendritiche, linfociti T, neutrofili, cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) e altre citochine: i fibroblasti hanno effetto immunosoppressivo dovuto alla secrezione di fattori di crescita, chemochine e molecole effettrici che potenziano la capacità di evasione immunitaria delle cellule tumorali. Alcuni importanti fattori secreti sono CCL2, IL-13, IL-6, IL-10 e IL-8 che insieme promuovono l'infiltrazione del tumore da parte dei macrofagi, che si differenziano così in macrofagi tumore-associati (TAM): tali macrofagi vengono spinti verso la polarizzazione a M2, ovvero il fenotipo macrofagico antinfiammatorio e pro-tumorigenico [83, 84]. I CAF hanno effetto anche sui linfociti T CD8 (che hanno attività citotossica) e sui linfociti T CD4 (che attivano le cellule NK). L'attività

citotossica dei linfociti CD8 viene inibita grazie alla secrezione di molecole inibitorie e citochine, così da ridurre la capacità di eliminare le cellule tumorali; i linfociti T CD4 vengono invece spinti verso la differenziazione in linfociti T regolatori per limitare l'attivazione delle cellule immunitarie anti-tumorali. Grazie a questi meccanismi i fibroblasti tumore-associati facilitano l'evasione immunitaria e la progressione del tumore [83, 84]. Come già accennato, uno dei ruoli principali dei CAF è quello di secernere la matrice extracellulare (ECM); questa è composta da svariate macromolecole quali collagene, glicoproteine (fibronectina e laminina), proteoglicani e polisaccaridi. Il rimodellamento della ECM è un passaggio fondamentale nella formazione del microambiente tumorale: fattori come CAF, TAM e ipossia causano l'eccessiva deposizione di componenti strutturali come il collagene, che vengono rimodellati da specifici enzimi portando a una struttura più lassa che facilita la migrazione cellulare. La matrice extracellulare viene modificata anche da enzimi chiamati metalloproteinasi della matrice (MMP), che sono in grado di idrolizzare le macromolecole: questo processo consente l'invasione delle cellule tumorali nei tessuti dell'ospite e la migrazione delle cellule endoteliali nella matrice, portando così alla formazione di nuovi vasi sanguigni [82, 85].

Il TME è composto anche da adipociti tumore-associati (CAA) in grado di promuovere la crescita tumorale grazie alla secrezione incontrollata di mediatori antiinfiammatori, ma anche di citochine pro-infiammatorie; tra queste, IL-6, TNF-α e IL-1β facilitano l'infiltrazione delle cellule infiammatorie nel tessuto adiposo, causando infiammazione cronica: come conseguenza vengono reclutati macrofagi e vengono prodotti ROS, sostenendo la progressione tumorale. I CAA sono in grado di rilasciare il loro contenuto tramite lipolisi, così che le cellule tumorali possano utilizzarlo per il loro metabolismo [83].

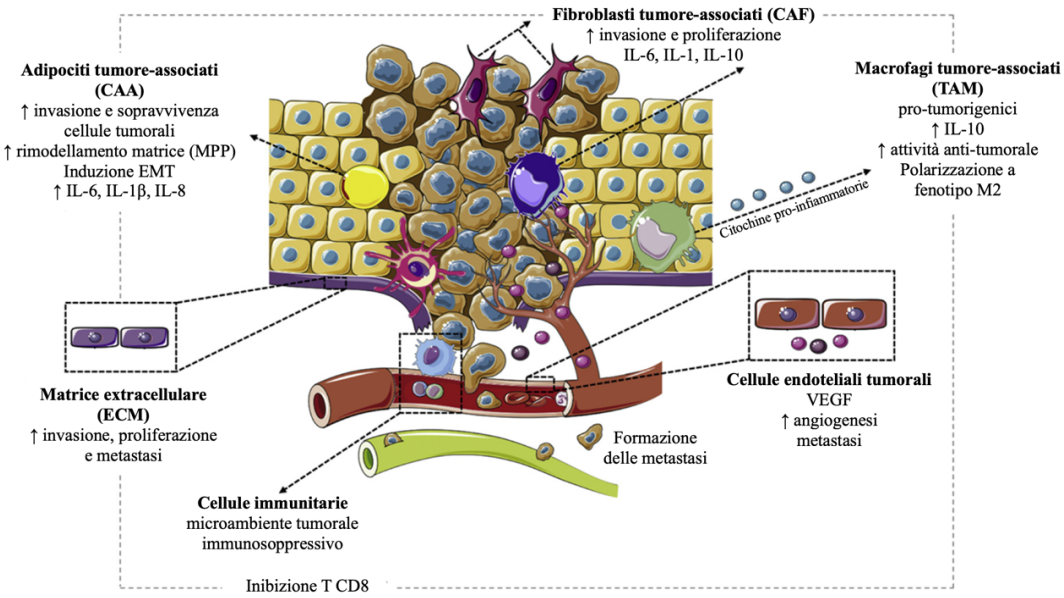


Figura 13 - Schema semplificato dei componenti del microambiente tumorale e del loro contributo alla progressione tumorale. (adattato da: Ribeiro Franco et al., 2019).

Nel PDAC, il microambiente tumorale è formato da quello che si definisce stroma desmoplastico ricco in CAF e infiltrato dalla componente immunitaria e molecole solubili [81]. Uno degli *hallmark* dell'adenocarcinoma pancreatico duttale è, infatti, la desmoplasia, ovvero la proliferazione di tessuto fibrotico con ECM alterata che favorisce crescita tumorale e metastasi; caratteristica fondamentale di tale tumore è proprio la reazione desmoplastica (DR): fasci densi di collagene si legano ai fibroblasti e come conseguenza si ha la perdita dell'integrità della membrana basale con invasione delle cellule maligne nella matrice interstiziale. La DR è anche associata a vascolarizzazione anomala, caratterizzata da numerosi piccoli capillari tortuosi e semipermeabili [86]. Il pancreas contiene una rara popolazione di fibroblasti chiamata cellule pancreatiche stellate (PaSC) che regolano la risposta a danni all'organo; nel PDAC questa funzione viene alterata per supportare la crescita del tumore, l'invasione delle cellule immunitarie e il processo metastatico, oltre alla resistenza ai farmaci. Uno dei principali geni associato ai CAF nell'adenocarcinoma è SPARC, le cui funzioni spaziano dal rimodellamento tissutale all'angiogenesi: tali funzioni sono mediate dall'azione delle metalloproteinasi e da fattori di crescita come il TGF-β. L'over-espressione di SPARC nel tessuto stromale è associata a una maggiore capacità di invasione del tumore, infatti la metilazione delle isole CpG si riscontra nel 28% dei casi di PanIN [81, 87, 88]. Altra caratteristica fondamentale del microambiente tumorale del PDAC è la mancanza di immunogenicità accompagnata da una bassa risposta immunitaria, fattori che indicano un'attivazione immunitaria insufficiente e un'eccessiva immunosoppressione [89].

Anche a livello immunitario il microambiente tumorale del PDAC è piuttosto complesso e vede la partecipazione di diverse cellule dell'immunità; in particolare:

- **Linfociti T**: il microambiente tumorale dell'adenocarcinoma pancreatico duttale comprende linfociti T citotossici $CD8^+$ (CTL altrimenti detti cellule T effettrici, Teff), linfociti T helper $CD4^+$ (Th1, Th2, Th17), linfociti T regolatori (Treg) e linfociti T *natural killer* (NK). Le cellule T sono disposte principalmente nella periferia del tumore, con prevalenza di linfociti $CD4^+$. Nel PDAC si osserva un incremento di Th2 e Treg insieme a una diminuzione di linfociti T citotossici, fattori che inducono immunosoppressione e prognosi più sfavorevole; le Treg inoltre aumentano nella progressione di PanIN a PDAC. Le cellule T effettrici sono poco rappresentate a causa dell'inibizione dell'infiltrazione dei linfociti T da parte dello stroma e, per via dell'imponente effetto immunosoppressivo del tumore, anche se fossero presenti sarebbero disattivate o avrebbero scarsa citotossicità. Le cellule Th2 producono varie interleuchine quali IL-4, IL-5, IL-3 e IL-13 che inducono la polarizzazione dei TAM verso un fenotipo M2 portando a immunosoppressione e progressione tumorale; i Th17 producono invece citochine pro-infiammatorie come IL-17, indotta da KRAS e considerata iniziatrice dell'adenocarcinoma [89, 90].

- **Macrofagi e TAM**: rispetto al tessuto pancreatico sano, nel PDAC si riscontra una significativa infiltrazione da parte dei macrofagi, specialmente nei vasi sanguigni adiacenti al tumore ma anche nel tessuto adiposo fibrotico intorno alle cellule tumorali. Le cellule trasformate richiamano i monociti circolanti grazie alla secrezione di citochine (CCL2, CXCL12, IL-3), le quali inducono il differenziamento a macrofagi che diventano così macrofagi tumore-associati. I TAM normalmente giocano un ruolo anti-tumorale, tuttavia le cellule di PDAC inibiscono la loro azione fagocitaria e ne spingono la differenziazione verso un fenotipo immunosoppressivo: citochine come IL-4 e IL-13 inducono la polarizzazione verso il sottotipo M2, caratterizzato dalla produzione di TGF-β e IL-10 che inducono Th2 e Treg; in questo modo viene promossa l'azione immunosoppressiva e si promuove la formazione di metastasi e la resistenza ai farmaci [89, 90].
- **MDSC**: le cellule mieloidi originano da cellule staminali nel midollo osseo e differenziano in diverse popolazioni come macrofagi, granulociti e mastociti; nel TME neutrofili e monociti sono generalmente in forma immatura, così vengono definiti cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Le cellule MDSC vengono trasportate e accumulate attraverso l'espressione di alcune citochine: nel caso del PDAC vengono richiamate dal midollo osseo grazie a chemochine come CCL2, INF-γ e IL-6. Queste cellule inducono immunosoppressione, mediata anche dallo stato ipossico del TME, inoltre promuovono la formazione di metastasi e sono responsabili dell'espansione dei linfociti T regolatori [89, 90].
- **Neutrofili**: nell'adenocarcinoma pancreatico duttale i neutrofili si localizzano principalmente in prossimità dell'area più densa di cellule tumorali. Il tumore è in grado di reclutare, grazie alla secrezione di fattori pro-infiammatori, neutrofili polimorfonucleati (PMN) nelle prossimità dello stroma e della massa stessa, dove secernono svariate citochine pro-infiammatorie e chemochine. Una volta nel tumore tali cellule costituiscono la popolazione dei neutrofili-tumore associati (TAN), i quali si dividono nei sottotipi N1 e N2. Il fenotipo immunostimolante N1ha azione citotossica, produce citochine e chemochine, inoltre richiama e attiva le cellule immunitarie suggerendo quindi un'azione anti-tumorale; il fenotipo immunosoppressivo N2 viene indotto da TGF-β e inibisce la funzione delle cellule T, promuovendo così la crescita tumorale e la transizione epitelio-mesenchimale. Il meccanismo alla base del funzionamento dei neutrofili è la trappola extracellulare dei neutrofili (NET), ovvero una barriera per patogeni e cellule immunitarie; nell'adenocarcinoma pancreatico duttale agisce però come promotore del tumore stesso, escludendo le cellule T citotossiche dal microambiente tumorale [89, 90].

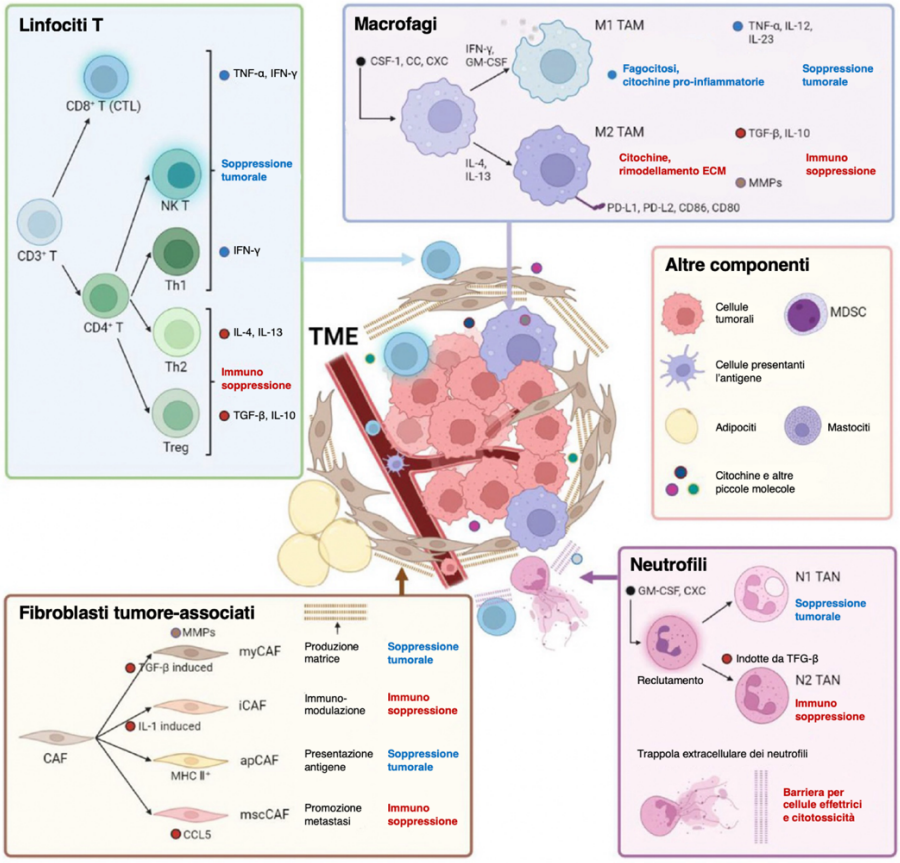


Figura 14 - Rappresentazione schematica delle componenti e dei meccanismi tipici del microambiente tumorale dell'adenocarcinoma pancreatico duttale. **myCAF** CAF miofibroblastici, **ICAF** CAF infiammatori, **apCAF** CAF presentanti l'antigene, **mscCAF** CAF derivato da cellule staminali mesenchimali. (adattato da: Zhu et al., 2023).

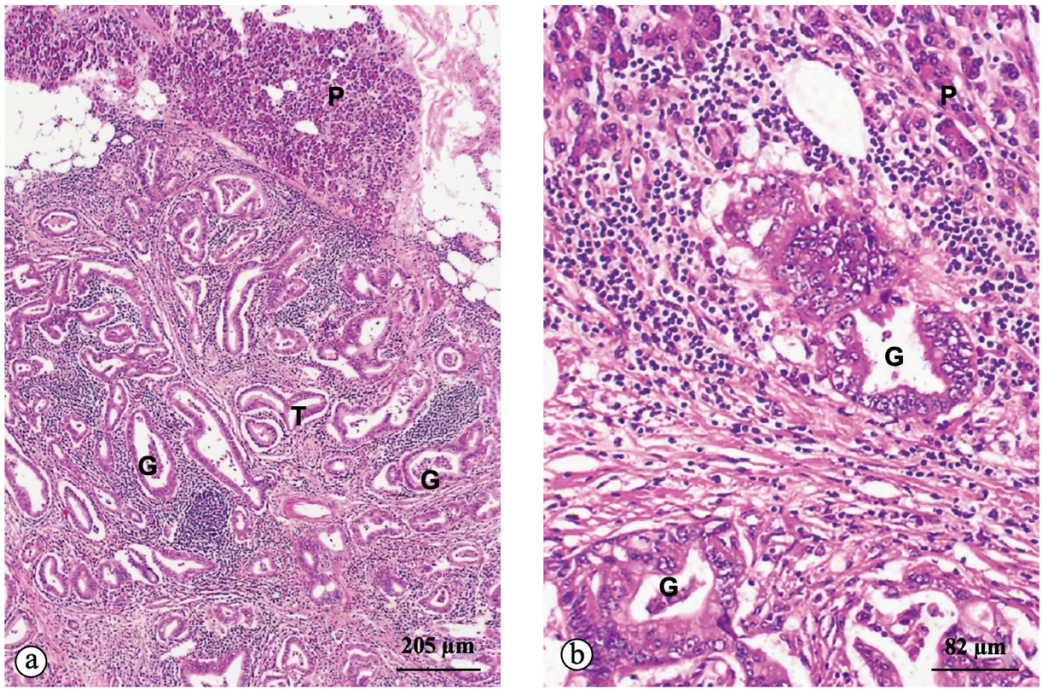


Figura 15 - Immagini istologiche dell'adenocarcinoma pancreatico duttale. a) si apprezza il tumore **T** accanto al tessuto pancreatico sano **P**; si notano le caratteristiche ghiandole tortuose **G** circondate da uno stroma denso e collagenoso (colorazione con ematossilina ed eosina, basso ingrandimento). b) si apprezza il pattern duttale con le ghiandole neoplastiche **G** di varie misure e con nucleoli sviluppati; si apprezza la differenza di grandezza rispetto agli acini del tessuto sano **P** e ai linfociti circostanti **L** (colorazione con ematossilina ed eosina, alto ingrandimento). (adattato da: Young et al., 2014).

1.2.7 Terapie

Sebbene la conoscenza dell'adenocarcinoma pancreatico duttale sia tutt'oggi piuttosto limitata e la prognosi infausta, negli ultimi anni sono stati fatti notevoli passi avanti per quanto riguarda la sopravvivenza a seguito della diagnosi: lo sviluppo di tecniche poco invasive ha permesso di rendere idoneo un numero sempre maggiore di pazienti, infatti ad oggi il 15% delle duodenocefalopancreasectomie (DCP, ovvero asportazione della testa del pancreas, duodeno, colecisti e spesso anche coledoco e parte dello stomaco) viene eseguito tramite laparoscopia. Allo stesso modo le terapie sistemiche si solo evolute grazie al crescente interesse per la genomica tumorale e le terapie mirate [91].

Strategie chirurgiche

La terapia chirurgica è considerata la soluzione migliore per allungare la vita del paziente, tuttavia meno del 20% dei soggetti affetti da tumore pancreatico è considerato candidabile alla resezione chirurgica e la situazione peggiora nei pazienti metastatici. Il tumore pancreatico si definisce resecabile se non vi è coinvolgimento dei vasi sanguigni maggiori, infatti una volta che l'arteria mesenterica superiore e il tronco celiaco sono invasi dal tumore allora non è più possibile operare [92]. La DCP è il classico intervento che si esegue quando il tumore è adatto alla resezione e ad oggi la mortalità dell'intervento si attesta tra l'1% e il 3%; la sopravvivenza a 5 anni dall'operazione è del 20%, tuttavia si osservano recidive nel 70-80% dei casi principalmente a causa della presenza di metastasi [91].

Chemioterapia

Ad oggi lo standard di cura a seguito della resezione chirurgica del tumore consiste nella chemioterapia adiuvante, ovvero un trattamento farmacologico che beneficia i pazienti che non mostrano evidenza di malattia residua dopo la terapia iniziale ma che presentano un alto rischio di recidiva [93, 94]. La chemioterapia adiuvante è in continua evoluzione, ma i trial più importanti che hanno portato allo sviluppo di trattamenti ad oggi applicati sono 3:

- **CONKO-001**: questo trial fu il primo a proporsi di investigare l'effetto della gemcitabina a lungo termine su pazienti soggetti a resezione dell'adenocarcinoma, quindi non solo su pazienti con tumore già in fase avanzata. Nel trial i pazienti cui la gemcitabina è stata somministrata per 6 mesi hanno mostrato una sopravvivenza a 5 anni pari al 20%, rispetto al 10.4% dei pazienti che non hanno ricevuto il trattamento; questo dimostra come la gemcitabina possa essere impiegata anche per la chemioterapia adiuvante [95].

- **ESPAC-4**: in questo caso si è voluta osservare la differenza tra la monoterapia con gemcitabina e la terapia combinata con gemcitabina e capecitabina (GemCap); lo studio ha evidenziato la superiorità della terapia combinata: la sopravvivenza globale dei pazienti trattati con GemCap equivale a quasi 32 mesi, contro i 28.4 mesi dei pazienti trattati con monoterapia; anche la sopravvivenza mediata libera da recidiva migliora nettamente, passando da 18 mesi con la gemcitabina a 21 mesi con la terapia combinata. Il vantaggio della terapia GemCap risiede nel fatto che può essere applicata su pazienti non adatti alla cura con FOLFIRINOX modificato, diventando così uno standard terapeutico per questa categoria [96].
- **PRODIGE-24**: il trial PRODIGE-24 dimostra l'efficacia superiore della forma modificata di FOLFIRINOX rispetto alla gemcitabina, con una sopravvivenza globale, rispettivamente, di 53 mesi e i 35.5 mesi; tale trattamento per 24 mesi resta così uno standard come adiuvante per i pazienti che hanno subito resezione chirurgica [91, 97].

Nei pazienti in cui il tumore è resecabile si può agire anche con la terapia neoadiuvante, ovvero un'azione terapeutica che mira a ridurre le dimensioni di un tumore particolarmente voluminoso prima di intervenire chirurgicamente; in tal caso è possibile utilizzare le stesse strategie impiegate con la terapia adiuvante [94].

I soggetti che presentano il tumore localmente avanzato o metastatico sono considerati non curabili e quindi trattati con intento palliativo [91]. Lo standard terapeutico ha previsto l'utilizzo della gemcitabina (Gem) fino al 2011, anno in cui è stato introdotto il FOLFIRINOX (FFX) [98]. In particolare:

- **Gemcitabina**: la gemcitabina è un analogo nucleosidico utilizzato come standard per il trattamento del PDAC, ma anche per altri tumori solidi al seno, ovaie e polmoni. Gemcitabina è il nome commerciale per il 2',2'-difluoro-2'-desossicitidina (dFdC), ovvero un analogo del nucleoside desossicitidina che viene somministrato come profarmaco per poi essere metabolizzato alla forma attiva (dFdCTP) attraverso una serie di fosforilazioni. La gemcitabina può essere inattivata con una deaminazione, il cui prodotto ha svariati ruoli all'interno della cellula in quanto regola il trasporto, l'accumulo e la citotossicità della gemcitabina. Il meccanismo d'azione più importante di questo farmaco è l'inibizione della sintesi del DNA in quanto, a seguito dell'inserimento del dFdCTP nel DNA, subito dopo viene incorporato un desossinucleotide che rende la polimerasi incapace di allungare la catena; questo processo impedisce anche la rimozione della gemcitabina da parte degli enzimi. In secondo luogo la gemcitabina induce apoptosi attraverso la via di segnalazione della caspasi, infatti ha la capacità di attivare MAPK solo nelle cellule tumorali e non in quelle sane. Non è ancora ben chiaro come mai la gemcitabina abbia effetto sull'adenocarcinoma pancreatico duttale rispetto ad altri agenti chemioterapeutici, tuttavia anche in questo caso vi sono fenomeni di resistenza: in questo senso si pensa che il microambiente tumorale giochi un ruolo fondamentale a causa della desmoplasia che porta a una scarsa distribuzione del farmaco, inoltre sembra che

l'accumulo di HIF-1α inattivi la trascrizione dei geni che codificano per i trasportatori dei desossinucleotidi compromettendo l'*uptake* della gemcitabina [99].

- **FOLFIRINOX**: si tratta di una combinazione di farmaci proposta nel 2011 che comprende irinotecan, oxaliplatino, fluorouracile e leucovorina; questo risulta più vantaggioso rispetto alla gemcitabina in quanto le cellule tumorali vengono influenzate secondo multipli meccanismi. Il fluorouracile (5-FU) è un analogo pirimidinico che interferisce con la sintesi di DNA e RNA, inibendo così la crescita cellulare e inducendo la morte nelle cellule tumorali in rapida divisione. La leucovorina (o acido folinico) ha la funzione di potenziare l'azione del 5-FU, stabilizzando il legame tra un metabolita del fluorouracile con l'enzima della classe delle sintasi che opera la sintesi del DNA: in questo modo viene prolungata l'azione citotossica del 5-FU. L'irinotecan è un inibitore dell'enzima topoisomerasi I, il quale rimuove i superavvolgimenti della catena di DNA durante la replicazione: come effetto si ha un danno al DNA, che porta all'arresto del ciclo cellulare con conseguente apoptosi delle cellule tumorali. L'oxaliplatino infine è un agente chemioterapico a base di platino che forma legami crociati con le singole catene di DNA, inibendo così replicazione e trascrizione portando ad apoptosi. Per migliorare la sicurezza di tale profilo terapeutico, è stata introdotta la forma modificata del FOLFIRINOX che prevede la diminuzione della dose di irinotecan e l'infusione continua di fluorouracile [100].

Target therapy

Secondo la definizione ufficiale fornita dalla *National Library of Medicine*, la *target therapy* (terapia mirata) è un trattamento con farmaci che bloccano la sintesi o interagiscono con specifici componenti cellulari di una malattia, al fine di arrestare la specifica disfunzione biochimica coinvolta nella malattia stessa [p]. L'identificazione di specifici target molecolari ha permesso lo sviluppo della terapia mirata per il trattamento dei tumori: il vantaggio è quello di poter fornire una terapia personalizzata al paziente in base al suo profilo genetico; in clinica la *target therapy* si usa non solo per il tumore pancreatico ma anche per mieloma multiplo, leucemia, tumore al seno, ai polmoni e al colon-retto. La terapia mirata si avvale di anticorpi monoclonali e piccole molecole inibitorie; è diretta contro fattori di crescita, molecole di segnalazione, proteine del ciclo cellulare, modulatori dell'apoptosi e molecole che promuovono l'angiogenesi [101]. Esistono svariate terapie mirate approvate dall'agenzia statunitense *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico duttale: erlotinib, un inibitore di EGFR; larotrectinib e entrectinib, inibitori di TRK usati in pazienti che non presentano la mutazione di KRAS; pembrolizumab, inibitore di PD-1 per pazienti con deficit del meccanismo di *mismatch repair*; olaparib, come terapia di mantenimento per pazienti che presentano la mutazione su BRCA [102].

La prevalenza di mutazioni nel pathway di riparazione del DNA (DDR) si attesta tra il 15% e il 20% nei casi di PDAC metastatico, pertanto una minoranza di pazienti potrebbe beneficiare di terapie mirate a questo livello. Nella cellula vi sono tre meccanismi principali che permettono l'identificazione e la riparazione di un danno al DNA: *mismatch repair* (MMR), riparazione per escissione di nucleotidi (NER) e riparazione per escissione di una base (BER); quest'ultimo in particolare rileva rotture a singolo filamento, ovvero il danno più comune al quale può andare incontro il DNA, eseguendo una riparazione attraverso l'azione delle proteine PARP1 e PARP2. Le proteine PARP sono quindi un potenziale bersaglio terapeutico e possono essere inibite per evitare, nelle cellule tumorali, la riparazione delle rotture a singolo filamento portando così la cellula ad apoptosi o senescenza. In quei pazienti che presentano mutazioni a livello dei geni BRCA, e quindi un difetto della riparazione del DNA, l'inibizione di PARP porta a una tossicità selettiva nei confronti delle cellule che presentano il difetto di riparazione. Grazie allo studio POLO si è potuta valutazione l'azione del farmaco olaparib sui pazienti con mutazioni sui geni BRCA, dimostrando una diminuzione del 47% del rischio di progressione del PDAC: grazie a questi risultati, le linee guida del *National Comprehensive Cancer Network* hanno incluso olaparib come terapia di mantenimento raccomandata e, nel 2019, la FDA ha approvato tale farmaco per il trattamento del PDAC [102, 103]. Una piccola percentuale (1-2%) di casi di adenocarcinoma pancreatico duttale presenta difetti nel meccanismo di *mismatch repair*, il quale negli ultimi anni è diventato un biomarcatore di particolare interesse. Il meccanismo di MMR gioca un ruolo chiave nel mantenimento della stabilità genomica attraverso la correzione di errori che insorgono durante la replicazione del DNA: alterazioni di tale meccanismo portano all'accumulo di errori di replicazione e allo sviluppo della cosiddetta instabilità dei microsatelliti (MSI). La MSI è caratterizzata alterazioni della lunghezza all'interno di sequenze ripetitive del DNA, caratteristica che promuove la tumorigenesi non solo nel PDAC ma anche in altre tipologie di tumori [104]. Per le tipologie di PDAC che presentano il quadro dMMR/MSI-H (difetto del sistema MMR/instabilità dei microsatelliti) è stato approvato l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale pembrolizumab, che opera la distruzione tumorale mediata dal sistema immunitario: il farmaco si lega al recettore del *checkpoint* immunitario PD-1 inibendone il legame con i suoi ligandi (PD-1 e PD-2), così da attivare la distruzione delle cellule tumorali da parte dei linfociti T. Il vantaggio di questo farmaco risiede nel fatto che può essere utilizzato su PDAC a differenti stadi di progressione, inoltre è in fase di valutazione il suo effetto in combinazione con olaparib [103, 105].

Ulteriore strategia appropriata per il trattamento del PDAC è l'utilizzo di erlotinib, farmaco approvato nel 2005 che ha la funzione di inibire il recettore di EGF (EGFR): la sua attivazione permette di attivare la cascata di segnale di *pathway* come Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt, influenzando ciclo cellulare, angiogenesi, crescita e sopravvivenza. Erlotinib è stato approvato come farmaco per il tumore al pancreas in quanto, nel PDAC, EGFR è over-espresso e questo causa

un incremento del potenziale metastatico unito al una riduzione della sopravvivenza. Lo studio che ha permesso l'approvazione di questo farmaco è PA.3, in cui i pazienti sono stati infusi con gemcitabina e successivamente con erlotinib o placebo: i risultati hanno dimostrato che erlotinib (in combinazione con Gem) ha portato a un significativo miglioramento della sopravvivenza globale, con una sopravvivenza media salita a 6.24 mesi rispetto ai 5.91 mesi del gruppo placebo [106]. Erlotinib è una piccola molecola inibitoria che agisce in virtù della struttura di EGFR: essendo questo un recettore tirosinchinasico, il farmaco compete con l'ATP nel suo dominio catalitico in modo da evitare l'autofosforilazione e la conseguente attivazione del recettore, bloccando a monte la cascata di segnale [107].

Nei rari casi in cui KRAS non sia mutato, vi sono altre mutazioni considerate iniziatrici del PDAC e quindi potenziali target per la terapia: fra queste mutazioni, meno dello 0.5% è rappresentato dalla fusione dei recettori tirosin-chinasici neutrofici (*Neurotrophic tropomyosin receptor kinase*, NTRK) [108]; tale mutazione prevede la fusione di un gene di NTRK con il gene partner, causando un'attivazione costitutiva del recettore e di conseguenza delle cascate di segnalazione come Raf/Mek/Erk e PI3K/Akt [109]. Per i soggetti affetti da PDAC che presentano questa mutazione, nel 2018 è stato approvato l'uso del'inibitore selettivo larotrectinib, cui ha fatto seguito entrectinib nel 2019; si tratta comunque di un target nuovo e raro che non consente studi su larga scala, pertanto i dati preliminari sono stati resi pubblici solo nel 2022 e dal 2020 la *American Society of Clinical Oncology* appoggia l'utilizzo di tali farmaci per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico duttale [108].

KRAS, in quanto gene più frequentemente mutato, è un target interessante per la terapia mirata: uno studio del 2013 ha identificato un inibitore selettivo per la mutazione G12C, portando all'inserimento dei farmaci sotorasib e adagrasib nelle linee guida per il trattamento di PDAC metastatico e localmente avanzato. Recenti studi hanno evidenziato il ruolo della metformina (già usata per la cura del diabete) nel trattamento dell'adenocarcinoma per pazienti con la mutazione di SMAD4, che quindi può essere considerato un biomarcatore per l'utilizzo di questa terapia. Anche il recettore tirosinchinasico RET (*Rearranged During Transfection*) si è dimostrato un buon target per quei pazienti che presentano la forma non mutata di KRAS, sebbene si tratti di una minoranza (0.6-1% dei casi di PDAC): risultati incoraggianti sono stati evidenziati in pazienti curati con selpercatinib, inibitore selettivo della fusione di RET [108]. Un recente studio condotto da un team spagnolo ha aperto la porta a nuove opzioni terapeutiche per il trattamento del PDAC: grazie all'utilizzo di tre inibitori selettivi per KRAS (daraxonrasib), EGFR (afatinib) e STAT3 (SD36), è stato possibile osservare la completa regressione del tumore in modelli murini senza evidenza di resistenza ai farmaci per 200 giorni a seguito del trattamento e con una buona tolleranza [110].

Un approccio promettente è quello dell'inibizione dell'enzima istone deacetilasi, oggetto di questo elaborato.

1.3 Tricostatina A

Oltre alle classiche mutazioni somatiche, come precedentemente accennato anche l'alterazione epigenetica ha un ruolo importante nella formazione del tumore pancreatico: in questo contesto si inserisce l'acetilazione degli istoni, che mantiene la cromatina nella sua conformazione compatta e che è regolata da due classi di enzimi ovvero istone acetiltransferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC). Gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDACI), nei quali si classifica la tricostatina A, mostrano attività anti tumorale e sono quindi di crescente interesse clinico [111].

1.3.1 Gli enzimi istone deacetilasi

La cromatina è un complesso polimerico formato da DNA e proteine che consente la compattazione e l'accessibilità della sequenza genica. L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, il quale contiene un core formato da un ottamero di proteine istoniche che consente di avvolgere 145-147 bp (paia di basi) di DNA; ogni core è collegato al successivo da una porzione di DNA *linker*, spesso associato a proteine istoniche *linker* [112, 113]. La densità e l'esatta posizione dei nucleosomi portano informazioni fondamentali per la regolazione della trascrizione: le regioni codificanti sono tipicamente ricche di nucleosomi, mentre le regioni promotrici attive ne presentano una disposizione sparsa [114]. La struttura della cromatina cambia in risposta a modificazioni epigenetiche del DNA o dei terminali istonici, portando all'attivazione o all'inibizione di un determinato gene [112]. Il 75% degli istoni nucleosomali (H2A, H2B, H3 e H4 disposti in dimeri e tetrameri) comprende il dominio che permette l'avvolgimento del DNA, mentre il restante 25-30% consiste nella coda istonica; tali code si posizionano all'N-terminale di tutte le proteine istoniche e anche al C-terminale dell'istone H2A [115]. La flessibilità della cromatina è data da due meccanismi molecolari: l'alterazione della relazione tra istoni e DNA ad opera di specifici fattori e le modifiche post-traduzionali delle code istoniche, come metilazione, acetilazione e fosforilazione. Tra quest'ultime, l'acetilazione è legata all'attivazione trascrizionale ed è la modificazione istonica più studiata: il meccanismo prevede il trasferimento, catalizzato dagli enzimi del gruppo HAT, di un gruppo acetile dall'acetil-coenzima A al gruppo ε-amminico dei residui di lisina presenti sulle code istoniche. L'effetto principale è quello di neutralizzare parzialmente la carica positiva degli istoni così da ridurre la loro affinità con il DNA, così da formare una struttura più permissiva al legame delle proteine. L'acetilazione è un processo funzionale importante per via della sua natura reversibile che dipende dalla precisione della sua reazione inversa, ovvero la deacetilazione degli istoni catalizzata dal gruppo di enzimi che prende il nome di istone deacetilasi [116]. Per contro, la deacetilazione messa in atto dagli enzimi del gruppo HDAC idrolizza il gruppo ε-amminico dei residui di lisina utilizzando ioni zinco (Zn^{2+}) [117]. Quando l'equilibrio tra HAT e HDAC viene meno si ha l'espressione aberrante di uno specifico gene, risultando in instabilità della struttura

della cromatina e malattie epigenetiche; lo sbilanciamento causa anche la repressione dell'attività enzimatica intrinseca degli enzimi stessi: l'inibizione di HAT ritarda l'espressione di un gene, mentre l'inibizione di HDAC causa la continua espressione di un gene [118]. Esistono diciotto HDAC umane, suddivise in quattro classi sulla base della loro omologia primarie con le HDAC del lievito *S. cerviasiae* e delle somiglianze nella loro sequenza. Le HDAC si dividono generalmente in due famiglie in base alla presenza di un dominio deacetilasico conservato (famiglia delle istone deacetilasi) e alla loro dipendenza dal cofattore sirtuina (famiglia delle Sir2 regolatorie) [118, 119].

Superfamiglia	**Famiglia**	**Classe**	**Proteina (*S. cervisiae*)**	**Sottoclasse**	**Proteina (umana)**
Arginasi/deacetilasi	Istone deacetilasi	I	Rdp3, Hos1, Hos2, Hos3		HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
		II	Hda1	IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
				IIb	HDAC6, HDAC10
		IV			HDAC11
Deoxyhypusine synthase-like NAD / FAD-*binding domain*	Sir2 regolatorie	III	Sir2, Hst1, Hst2, Hst3, Hst4	I	SIRT1, SIRT2, SIRT3
				II	SIRT4
				III	SIRT5
				IV	SIRT6, SIRT7

Tabella 4 - Classificazione delle HDAC (adattato da: Seto e Yoshida, 2014).

HDAC di classe I

La istone deacetilasi A1 (Hda1) di *S. cervisiae* contiene somiglianze con la sequenza del regolatore della trascrizione Rpd3 (*reduced potassium dependency 3*), a sua volta subunità del complesso Hda; Hda1 è anche simile ad altre tre proteine del lievito ovvero Hos1, Hos2 e Hos3. La prima istone deacetilasi umana di classe I purificata e clonata a partire dal lievito fu HDAC1, seguita dalla scoperta di HDAC2, HDAC3 e infine HDAC8. Le HDAC di classe I contengono il 45-94% di omologia nella sequenza amminoacidica e sono ubiquitarie, localizzate principalmente nel nucleo e nel citoplasma [119]. Queste HDAC presentano un dominio catalitico composto da circa 400 residui amminoacidi attorno ai quali si forma un canale idrofobico di residui altamente conservati: questo permette il legame con il substrato, quindi la lisina acetilata interagisce con lo ione zinco sul fondo del canale per operare l'idrolisi che porta alla deacetilazione. Per svolgere la loro attività catalitica, HDAC1, 2 e 3 formano un complesso con altre proteine e la loro attività è potenziata dal fosfatidilinositolo [117]. Recenti studi hanno dimostrato che le HDAC di classe I sono in grado di acetilare anche le proteine non istoniche, inoltre sono sensibili alla tricostatina A [116, 118]. L'unica istone deacetilasi di questa classe in grado di agire senza formare complessi è la HDAC8 [117].

HDAC di classe II

Le HDAC di classe II condividono elevata omologia di sequenza con la proteina Hda1 di S. cervisiae e presentano un dominio deacetilasico conservato al C-terminale; si suddividono in due sottotipi: il sottotipo a (IIa) comprende HDAC4, 5, 7 e 9, mentre il sottotipo b (IIb) comprende HDAC6 e 10 [118].

Le istone deacetilasi IIa presentano un core catalitico conservato al C-terminale e una regione conservata contenente più siti di legame all'N-terminale: un sito lega la proteina MEF2 (*myogenic transcription factor 2*), mentre altri due o tre presentano serine fosforilate; quest'ultime permettono il legame delle protene 14-3-3, che permettono di regolare la posizione cellulare delle HDAC. Il dominio catalitico è estremamente simile a quello delle HDAC di classe I. Le istone deacetilasi IIa, a differenza della classe I e della classe IIb, presentano un residuo istidinico al posto del residuo tirosinico: questo causa una limitata azione deacetilasica, pur senza prevenire il funzionamento dell'enzima [117].

Le istone deacetilasi IIb sono scarsamente caratterizzate [118]. HDAC6 è principalmente localizzata del citoplasma e presenta due domini deacetilasici che paiono agire indipendentemente l'uno dall'altro. Questa caratteristica interessa anche HDAC10, la quale è però in grado di spostarsi tra nucleo e citoplasma in virtù del dominio ricco in leucina presente al C-terminale [117, 119].

Le HDAC di classe II sono sensibili alla tricostatina A [116].

HDAC di classe IV

L'unico membro delle istone deacetilasi di classe IV è HDAC11, localizzata in nucleo e citoplasma e il cui dominio catalitico è uguale a quello delle classi I e II. HDAC11 forma un complesso con HDAC6, inoltre svolge un ruolo nella regolazione sia della stabilità proteica del fattore di replicazione del DNA CDT1 sia dell'espressione di IL-10. Risulta comunque poco caratterizzato a causa della sua recente individuazione [117, 118].

HDAC di classe III

Di questa classe fanno parte sette specifiche deacetilasi che non si dipendono dallo zinco, bensì dalla presenza della sirtuina: le HDAC di classe III sono omologhe della proteina Sir2 di *S. cervisiae* e sono NAD-dipendenti, in grado di catalizzare la deacetilazione di proteine sia istoniche che non istoniche [117]. SIRT1 e SIRT2 si trovano in nucleo e citoplasma, SIRT3 è localizzato in nucleo e mitocondri, SIRT4 e SIRT5 sono esclusive del mitocondrio a differenza di SIRT6 che si posiziona solo nel nucleo, infine SIRT7 si dispone nel nucleolo [119]. La struttura di SIRT1, 2, 3, 5, e 6 è ben caratterizzata; il dominio catalitico ha forma ellittica e comprende due domini grandi e due domini piccoli: i primi presentano una tasca in grado di accogliere e legare il NAD^+, mentre i secondi

comprendono due strutture che si estendono dai domini grandi e che contengono una regione in grado di legare gli ioni zinco. Oltre al dominio catalitico, alcuni di questi enzimi comprendono porzioni regolatorie al C-terminale e/o all'N-terminale. È stato dimostrato che SIRT1, 2 e 3 hanno azione deacetilasica molto marcata, a differenza di SIRT5, 6 e 7 [117].
Le HDAC di classe III sono insensibili alla tricostatina A [116].

L'adenocarcinoma pancreatico duttale, così come gli altri tumori gastrointestinali, è caratterizzato dalla over-espressione delle HDAC di classe I: il 56% dei casi di PDAC mostra positività alla colorazione immunoistochimica per HDAC1, la cui co-espressione con HIF-1α è correlata a prognosi infausta [120]. L'over-espressione di HDAC1 è legata alla progressione tumorale, alla formazione di metastasi e alla regolazione di geni coinvolti in processi di resistenza. Lo studio di modelli *in vitro* di tumore pancreatico (MIA PaCa-2 e PANC1) ha permesso di comprendere come l'aumento dell'espressione di HDAC1 sia legata all'alterazione di pathway che contribuiscono alla resistenza ai farmaci, come resistenza all'apoptosi, alterazione dei checkpoint cellulari e aumento dell'ipossia; l'over-espressione inoltre altera, aumentandola, l'attività della GTPasi, contribuendo così alla chemioresistenza [121]. HDAC2 controlla invece il ciclo cellulare, specialmente in cellule pancreatiche mesenchimali e indifferenziate: è stato dimostrato che il suo silenziamento genico riduce la crescita cellulare e accumula le cellule nella fase G2-M; questo suggerisce come HDAC2 sia essenziale per la corretta progressione del ciclo cellulare nelle cellule tumorali. L'istone deacetilasi 2 permette di proteggere le cellule cancerose dall'azione anti-tumorale del TGF-β, facilitando così la formazione di metastasi [122]. Nel tumore pancreatico, i livelli di HDAC3 sono positivamente correlati ai livelli di espressione PD-L1, nonostante questo sia presente solo in una piccola porzione di pazienti; lo studio condotto da Hu et al. ha permesso di stabilire che HDAC3 regola l'espressione di PD-L1: i risultati sono stati ottenuti inibendo l'istone deacetilasi, osservando così un decremento sia della proteina che dell'mRNA. All'opposto, quindi, l'over-espressione di HDAC3 porta all'incremento di PD-L1, permettendo l'*escape* immunologico del tumore [123].

1.3.2 Inibitori dell'istone deacetilasi

Gli inibitori delle istone deacetilasi (HDACi) si legano direttamente al sito attivo delle HDAC bloccando l'accesso al substrato, portando così all'accumulo di istoni acetilati. Questi agenti possiedono varie attività biologiche e possono influenzare differenziazione, arresto della crescita e apoptosi nelle cellule trasformate *in vitro*; studi *in vivo* hanno dimostrato il loro capacità di inibire la crescita tumorale. Storicamente gli HDACi si dividono in cinque classi strutturali: idrossamati (tricostatina A e vorinstat), carbossilati (acido butirrico), benzamidi (entinostat e tacedinaline),

chetoni elettrofili (trifluorometil chetoni) e peptidi ciclici (romidepsina); sebbene le strutture siano diverse per ogni classe, i composti sono accomunati da un farmacoforo che comprende elementi chiave dell'interazione tra inibitore ed enzima [124]. In base alla loro specificità. Gli HDACi possono essere ulteriormente suddivisi in pan-inibitori non specifici (tra cui tricostatina A e vorinostat, che agiscono sulle classi I, II e IV) e inibitori specifici per la classe I di HDAC (tra cui tacedinaline e romidepsina). I principali effetti collaterali associati all'utilizzo di tali inibitori sono nausea, disidratazione, trombocitopenia e affaticamento [125].

Secondo la definizione fornita dalla IUPAC, un farmacoforo è "un insieme di caratteristiche steriche ed elettroniche necessario per garantire interazioni supramolecolari ottimali con uno specifico bersaglio biologico e per attivare (o bloccare) la sua risposta biologica": significa quindi che la molecola deve avere le caratteristiche necessarie affinché si leghi correttamente al suo bersaglio modulandone l'attività biologica [126]. Gli HDACi classici agiscono solo sulle classi I e II delle HDAC. Il farmacoforo degli HDACi consiste in tre distinte strutture: gruppo legante lo zinco, *linker* idrofobico e *recognition cap*; il gruppo legante lo zinco si complessa con lo ione zinco dell'istone deacetilasi bloccandone di fatto l'attività catalitica, mentre il *linker* permette di posizionare gli altri due gruppi in modo che si sviluppi alta affinità con l'enzima [127].

Gli HDACi influiscono sulla trascrizione genica inducendo l'acetilazione degli istoni, in modo da mantenere la cromatina in una forma compatta inaccessibile all'azione degli enzimi; alcuni cambiamenti nell'espressione genica sono probabilmente effetti diretti degli HDACi sul promotore del gene, mentre altri sono effetti secondari e a valle. Un classico esempio di effetto inibitorio è quello dell'incremento dell'acetilazione dei promotori di p21, un inibitore dell'enzima chinasi ciclina-dipendente che permette l'arresto della proliferazione cellulare: basse concentrazioni di HDACi favoriscono l'arresto nella fase G1, mentre alte dosi bloccano il ciclo sia nella fase G1 che nella fase G2/M; in questo modo si evitano la replicazione del DNA mutato e la divisione cellulare. Gli inibitori dell'istone deacetilasi sono anche in grado di up-regolare l'espressione dei recettori di morte (come Fas e TNFR-1) e dei loro ligandi solo nelle cellule trasformate e non in quelle sane: viene così stimolata la via estrinseca dell'apoptosi con una massiccia attivazione delle caspasi-8 e 10. Gli HDACi intervengono per favorire anche la via intrinseca dell'apoptosi infatti, secondo meccanismi non ancora ben chiari, stimolano il rilascio di citocromo c da parte del mitocondrio per l'attivazione della caspasi-9. Ulteriori meccanismi d'azione sono: induzione di difetti nella mitosi per via dell'acetilazione aberrante degli istoni nell'eterocromatina, induzione dell'autofagia, accumulazione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule trasformate e inibizione di HIF con conseguente blocco dell'angiogenesi tumorale [128]. È chiaro quindi che gli HDACi non agiscono solo sulle proteine istoniche ma interferiscono con una pletora di proteine cellulari coinvolte nella regolazione di omeostasi e sopravvivenza: il loro potenziale non si limita al rimodellamento della cromatina, per questo sono strumenti versatili per il trattamento del cancro [129]. Ad oggi gli

inibitori delle HDAC hanno suscitato grande interesse nella ricerca e nell'industria farmaceutica, inoltre sono stati sviluppati nuovi inibitori con strutture diverse; i più comuni HDACi approvati o in studi clinici sono:

- **Entinostat**: certificato dalla FDA nel 2013, si tratta del primo inibitore delle HDAC a ottenere risultati positivi in uno studio clinico randomizzato e controllato di fase II sul carcinoma mammario ed è l'unico inibitore delle HDAC in sviluppo clinico per il carcinoma mammario avanzato; in generale può essere utilizzato per tumore al seno metastatico anche nelle pazienti in post-menopausa [130].
- **Belinostat**: è un nuovo inibitore facente parte della categoria degli idrossamati. Studi in vitro hanno dimostrato che belinostat induce l'accumulo di istoni acetilati e altre proteine, causando arresto del ciclo cellulare e apoptosi; il composto ha maggiore citotossicità preferenziale verso le cellule tumorali rispetto alle cellule sane [130]. È un farmaco che agisce come pan-HDACi approvato per il trattamento delle ricadute nel linfoma a cellule T periferiche; viene utilizzato anche per mesotelioma, linfoma a cellule B, cancro al colon retto, cancro al fegato e altri [131].
- **Panobinostat**: viene usato in clinica per il trattamento del mieloma multiplo e nel 2015 il suo utilizzo è stato approvato dall'FDA in combinazione con altri farmaci (bortezomib e desametasone) in quei pazienti che non avevano reagito ad almeno due regimi di trattamento precedenti [130]. Nuovi brevetti propongono il suo utilizzo per il trattamento di tumori al cervello (sia in monoterapia che in co-somministrazione ad altri farmaci), mentre altri trial clinici ne prevedono l'utilizzo su pazienti con linfoma non-Hodgkin e con mieloma multiplo recidivo [131].
- **Givinostat**: si tratta di un farmaco sviluppato per alleviare il danno ai tessuti muscolari e proteggere le microfibre del muscolo; a tal proposito nel 2024 l'FDA ha approvato il suo utilizzo per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne in pazienti dai sei anni in su [130].
- **Vorinostat**: è stato il primo HDACi ad essere approvato dall'FDA nel 2006 per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T. Sebbene possieda un grande potenziale terapeutico, il gruppo dell'acido idrossamico porta svantaggi come bassa stabilità, rapido metabolismo e scarsa selettività [130].
- **Romidepsina**: viene somministrato come profarmaco, poi ridotto all'interno della cellula nella sua forma attiva che lega gli ioni zinco nel sito attivo delle HDAC. L'FDA ne ha approvato l'utilizzo nel 2009 per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T e nel 2011 per il linfoma a cellule T periferiche; è stato visto che, nei casi in cui il tumore pancreatico non risponda ai trattamenti standard, la romidepsina è in grado di interferire con le fasi G1 e G2/M e indurre apoptosi [131].

Sebbene vi sia un crescente interesse nello studio degli HDACi per il trattamento dei tumori solidi, ad oggi non esistono inibitori approvati per il trattamento del PDAC: questo è dato principalmente dal fatto che, a causa della plasticità delle cellule di tumore pancreatico, la monoterapia risulta fallimentare e in ultima battuta up-regola i *pathway* di resistenza associati alla progressione del tumore attraverso l'interferenza con altre cascate di segnale. Esempi a supporto di tale affermazione

sono vorinostat, panbinostat e entinostat che sono stati abbandonati nei recenti trial di fase II proprio a causa della loro inefficacia in monoterapia. L'inibizione, quindi, potrebbe essere potenziata da un'appropriata combinazione degli HDACi con chemioterapici standard o *target therapy* [132, 133]. Molti inibitori sono comunque stati studiati su linee di tumore pancreatico: la tricostatina A ha mostrato la capacità di inibire la crescita cellulare arrestando il ciclo cellulare nella fase G2, mentre la romidepsina (FK-228) agisce similarmente arrestando il ciclo cellulare e inducendo apoptosi e si è dimostrata efficace nei casi di tumore recidivo [134]. Il vorinostat (SAHA, *suberoylanilide hydroxamic acid*) è in grado di down-regolare le proteine inibitorie dell'apoptosi come la survivina, inoltre potenzia la sensibilità alla radioterapia e induce citotossicità nelle cellule di tumore pancreatico; in combinazione con una piccola molecola inibitoria (JQ1), SAHA ha inibito con successo le proteine della famiglia BET, ovvero regolatori della trascrizione: con questo trattamento combinato è stato possibile reprimere l'espressione di p57 e diminuire le dimensioni del tumore. Ulteriori studi clinici hanno investigato non solo l'efficacia degli inibitori di HDAC ma anche degli inibitori degli enzimi metiltransferasi coinvolti nella metilazione del DNA: tali inibitori possono essere in grado di riattivare geni oncosoppressori metilati, portando a riprogrammazione del tumore con degradazione e morte delle cellule trasformate; dall'altro lato mocenitostat, un HDACi, ri-sensibilizza le cellule di PDAC resistenti alla gemcitabina. La combinazione di queste due tipologie di farmaci, che hanno come target due meccanismi distinti nella regolazione epigenetica della cromatina, rappresenta una strategia promettente per la prevenzione della progressione dell'adenocarcinoma pancreatico duttale [132]. Altro punto fondamentale è il processo di transizione epitelio-mesenchimale, il quale avviene precocemente nel PDAC portando le cellule sane e stabili verso un fenotipo mesenchimale essenziale alla disseminazione del tumore. L'attivatore chiave di questo processo è TGF-β, il quale potenzia l'invasione delle cellule tumorali grazie alla down-regolazione della E-caderina: questo meccanismo è associato a un'aumentata attività di HDAC1 e HDAC2, in particolare la over-espressione di HDAC2 si associa a una maggiore capacità metastatica. Sulla base di questo meccanismo, recentemente è stato investigato un analogo di KSK64, ovvero MPK544, disegnato sulla base del farmacoforo classico degli HDACi per le classi I e II delle HDAC: tale composto ha mostrato la capacità di up-regolare la E-caderina sia in cellule PANC-1 che nelle colture di sferoidi. Questo dimostra che gli inibitori di HADC2 hanno il potenziale per essere oggetto di nuove strategie terapeutiche [133].

1.3.3 Caratteristiche ed effetti della tricostatina A

La tricostatina A (TSA) è un acido idrossamico individuato per la prima volta nel 1975 durante uno screening sugli antibiotici antifungini, che ha permesso di isolare tale composto da un ceppo di *Streptomyces hygroscopicus* [135]. Sebbene sia stato scoperto come antibiotico ad azione antifungina, oggi la TSA è un noto inibitore reversibile delle classi I e II delle HDAC e risulta uno degli agenti con target validati più promettenti per la prevenzione della progressione tumorale. La sua struttura le permette di esercitare svariati effetti biochimici e biologici: è un antiossidante, antidiabetico, antinfiammatorio e anti-tumorale [136].

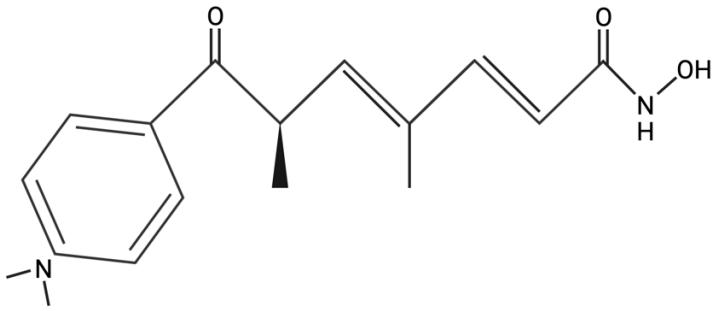


Figura 16 – struttura chimica della tricostatina A ($C_{17}H_{22}N_2O_3$). Creato con BioRender.com (adattato da: Bouyahya et al., 2022)

L'effetto antiossidante della TSA è principalmente correlato alla sua capacità di inibire gli enzimi coinvolti nella produzione di ROS [136]. In uno studio del 2012 i fibroblasti corneali umani sono stati trattati con TGF-β in presenza o assenza di TSA per valutare l'effetto del farmaco sulla differenziazione in miofibroblasti: l'attivazione dei fibroblasti e la generazione di miofibroblasti da parte del TGF-β rappresentano il primo evento biologico, nella riparazione delle ferite, responsabile di malattie fibrotiche progressive; sotto questo punto di vista è fondamentale anche la partecipazione delle specie reattive dell'ossigeno, le quali sono indotte dal TGF-β. Secondo i risultati dello studio, il TGF-β ha spinto verso la differenziazione e ha causato l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno, mentre le cellule trattate con tricostatina hanno mantenuto il fenotipo fibroblastico e hanno mostrato una quantità molto più bassa di ROS [137].
Per quanto riguarda l'effetto antidiabetico, è stato dimostrato *in vitro* che la tricostatina A è in grado di stimolare l'*uptake* di glucosio e la produzione di glicogeno in cellule muscolari scheletriche: la TSA è quindi considerata un farmaco adatto ad aumentare la sensibilità all'insulina al fine di mantenere livelli normali di glucosio nel sangue. Sebbene non sia ancora chiaro come, la tricostatina A è in grado di migliorare la via di segnalazione dell'insulina. In condizioni normali, il legame dell'insulina con il suo recettore causa l'autofosforilazione del recettore stesso e di IRS-1 portando, a seguito di ulteriori fosforilazioni, all'*uptake* di glucosio dal sangue; HDAC2 è noto per agire su

IRS-1 bloccandone così la fosforilazione e contribuendo all'insulino-resistenza: la TSA, inibitore delle istone deacetilasi, è in grado di agire su HDAC2 inibendone l'effetto [138].
Vari approcci sperimentali hanno permesso di esplorare l'effetto antinfiammatorio della tricostatina A, aspetto fondamentale per contrastare numerose patologie tra cui il cancro. In modelli murini di asma la TSA ha alleviato l'infiammazione allergica delle vie aeree riducendo l'espressione di citochine infiammatorie quali IL-4 e IL-5; allo stesso modo la tricostatina A ha diminuito la produzione di citochine proinfiammatorie in modelli di macrofagi stimolati con lipopolisaccaridi e, parallelamente, aumentato l'espressione di citochine immunosoppressive (IL-10) [136].
La TSA inibisce la crescita di diverse tipologie di cellule tumorali attraverso arresto del ciclo cellulare e apoptosi in maniera dose-dipendente e tempo-dipendente; la sua attività antitumorale è strettamente legata al suo effetto inibitorio sulle HDAC, tuttavia i meccanismi molecolari sono svariati e hanno come target molti *pathway* diversi. Il meccanismo d'azione della tricostatina A sulle cellule tumorali varia in base al tipo di tumore, in quanto i meccanismi dipendono dall'interazione tra la TSA e il target cellulare [136].

Tricostatina A e PDAC

Come precedentemente discusso, TP53 è un oncosoppressore frequentemente mutato nell'adenocarcinoma pancreatico duttale; la modificazione della proteina codificata da tale gene, p53, contribuisce alla resistenza del tumore verso le classiche terapie con gemcitabina e 5-FU e favorisce le caratteristiche aggressive del PDAC. p53, inoltre, espleta le sue funzioni attraverso la regolazione trascrizionale di p21. Gli HDACi stanno emergendo come possibili candidati per ovviare a questo problema in quanto sono in grado di indurre l'espressione di inibitori del ciclo cellulare, come appunto p21, in maniera indipendente dall'azione di p53: in questo modo p21 sarebbe in grado di bloccare la proliferazione cellulare, fornendo così il razionale per l'utilizzo di inibitori delle HDAC come la tricostatina A nel PDAC [139, 140].
Il primo studio dettagliato dell'effetto della tricostatina A sulle cellule di tumore pancreatico è stato condotto nel 2003 da Donadelli et al.: l'inibitore è stato aggiunto alle cellule a concentrazioni crescenti per differenti periodi di tempo. Dopo 48h la TSA ha mostrato un potente effetto inibitorio sulla crescita cellulare, con IC_{50} compreso tra 0.026 e 0.171 μM; sebbene in maniera meno marcata, l'arresto della crescita si è osservato anche dopo 24h dall'esposizione e l'effetto massimo si è ottenuto a 0.2 μM. In virtù delle reversibilità della TSA, è stato ulteriormente possibile constatare che la soppressione della crescita cellulare coincideva con l'inibizione dell'attività delle HDAC. Le linee cellulari sono poi state trattate per 24h per verificare se l'apoptosi fosse responsabile della riduzione della vitalità cellulare: la TSA ha indotto un aumento da 4 a 64 volte dell'arricchimento dei nucleosomi nel citoplasma alla concentrazione di 0.2 μM in modo dipendente dalla linea

cellulare; tale aumento si è accompagnato dall'incremento di 3.8-13.3 volte della caspasi-3. Oltre all'apoptosi, grazie alla colorazione dei nuclei con ioduro di propidio, è stato possibile osservare come la tricostatina A arresti il ciclo cellulare in fase G2, bloccando di fatto la crescita delle cellule. L'esecuzione di Western Blot su estratti delle linee PaCa44 e T3M4 ha evidenziato come, dopo 18h di esposizione, la TSA sia in grado di indurre l'espressione di p21 sia a livello proteico che del corrispondente mRNA. Grazie a questo studio è perciò stato possibile dimostrare che, sulle cellule di tumore pancreatico, la TSA è in grado di inibire la crescita cellulare attraverso induzione di apoptosi (legata a caspasi-3) e arresto del ciclo cellulare in fase G2; quest'ultimo aspetto si accompagna all'incremento di p21 (dimostrando così il suo legame non solo alla fase G1 ma anche alla fase G2/M) e alla down-regolazione di p27 [140]. Per meglio comprendere i meccanismi alla base dell'apoptosi, è stato estratto l'RNA dalle cellule trattate con TSA 0.2 μM per 8h così da avere la massima acetilazione dell'istone H4; l'indagine è stata eseguita su sessanta geni di particolare interesse per quanto riguarda il loro ruolo in apoptosi e ciclo cellulare, fra cui geni delle famiglie BCL, CDKN e HDAC. I risultati hanno mostrato che la TSA porta a un numero maggiore di geni up-regolati, corrispondenti ai geni pro-apoptotici (BIM), rispetto ai geni down-regolati, corrispondenti ai geni anti-apoptotici (Bcl-XL e Bcl-W). A sostegno della dimostrazione per cui la TSA arresta il ciclo cellulare in fase G2, questo studio ha dimostrato che l'inibitore permette l'up-regolazione di p21, p19 e p57 insieme alla down-regolazione di geni modulatori della transizione tra fase G2 e M come ciclina A e CDK10 [141].

Un ulteriore studio, utilizzando dieci linee cellulari di tumore pancreatico sottoposte a trattamento con Gem, 5-FU, oxaliplatino, irinotecan, gefitinib (farmaco utilizzato in *target therapy*) e TSA, ha valutato l'inibizione della crescita cellulare sia in monoterapia che in terapia combinata mediante il calcolo del valore di IC_{50}; quest'ultimo si definisce come la concentrazione di farmaco che inibisce il 50% della crescita cellulare rispetto al controllo. L'esposizione ai singoli trattamenti a varie concentrazioni per 48h ha mostrato una responsività maggiore delle cellule verso gemcitabina, irinotecan e oxaliplatino rispetto agli altri, tuttavia la completa inibizione della crescita cellulare si è ottenuta solo con TSA, oxaliplatino e gefitinib. Particolarmente interessante è stato osservare come i trattamenti che nella combinazione presentavano TSA mostrassero il valore più alto di inibizione della crescita su un alto numero di linee cellulari, suggerendo così che la tricostatina A è in grado di aumentare la citotossicità dei farmaci nel PDAC in vitro. Questa associazione si è mostrata particolarmente forte nella combinazione tra TSA e irinotecan [142].

La tricostatina A ha effetto anche sul citoscheletro e sul metabolismo energetico delle cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale. L'inibitore agisce up-regolando l'espressione di proteine, quali la citocheratina-1, -2, -7, -8, -9, -12, -18, -19, -75, -79, -85, che favoriscono la cheratinizzazione della cellula. La cheratinizzazione è un processo difficilmente reversibile che permette la formazione di un guscio corneificato intorno alla cellula: vengono interrotti il

rifornimento di energia e la comunicazione con le cellule neoplastiche adiacenti, causando la morte delle cellule secondo un effetto indiretto [143].
La tricostatina A, a causa della sua instabilità *in vivo* e tossicità non selettiva, non è impiegata come farmaco ma solo come risorsa nella ricerca pre-clinica; ad oggi esistono solo due trials clinici (NCT07065773, NCT03838926) attivi, che però non coinvolgono il PDAC [q].

1.4 Microgravità

Nel 2002 è emerso, grazie allo sviluppo nella NASA, un nuovo campo legato alle scienze della vita chiamato bioastronautica: si tratta dello studio degli effetti medici e biologici che i voli spaziali, e quindi l'assenza di gravità, hanno sugli organismi viventi [144]. In assenza di gravità si va incontro a cambiamenti fisiologici radicali come disfunzioni neurovestibolari, aumento del rischio di sviluppo di disritmie cardiache, osteoporosi, atrofia muscolare, aumento del rischio di calcoli renali e infezione, oltre all'aumentato rischio di sviluppare cancro a causa delle radiazioni e immunosoppressione; questi cambiamenti sono dovuti all'impatto che la gravità ridotta ha sulle proprietà cellulari tra cui morfologia, metabolismo e proliferazione [145, 146]. Negli ultimi anni si è sviluppato un interesse sempre maggiore verso gli effetti che l'assenza di gravità ha sulle cellule cancerose, aprendo la strada a nuove prospettive per le terapie anti-tumorali. A tal proposito gli studi vengono condotti in condizioni di microgravità, ovvero una situazione in cui l'effetto della gravità è drasticamente ridotto [147]. Le indagini possono essere eseguite in condizioni di reale microgravità (r-μg) sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS): tali ricerche risultano però costose ed è difficile distinguere gli effetti della microgravità da quelli delle radiazioni; in alternativa si opera quindi in microgravità simulata (s-μg) utilizzando diversi macchinari come il bioreattore a parete rotante (RWV), la *random positioning machine* (RPM), il sistema a colture cellulari rotanti (RCCS), clinostato 2D e clinostato 3D. È bene però tenere presente che vi sono sostanziali differenze tra microgravità reale e simulata: le cellule in r-μg vengono coltivate in un ambiente privo di forze che non prevede perturbazioni del terreno di crescita, a parte la normale diffusione dei nutrienti e dei materiali di scarto a causa del gradiente locale. Le cellule in s-μg sperimentano invece un'accelerazione residua che dipende dalla loro distanza dal centro di rotazione, oltre a un costante rimescolamento del terreno di coltura; questi aspetti, sebbene non dannosi, sono fonte di variazioni lungo il corso della procedura che potrebbero portare a una divergenza rispetto ai risultati in r-μg [148].

1.4.1 Metodi di simulazione della microgravità

Vi sono diversi metodi per simulare la microgravità, in modo da ovviare alle difficoltà e ai costi degli esperimenti in volo spaziale: la giusta metodologia deve essere scelta in base al tipo di studio che si vuole condurre. La classificazione di queste metodologie prevede quattro categorie principali: strutture di microgravità orbitanti (CubeSat, ISS) e non orbitanti (torri di caduta, voli parabolici, razzi sonda), simulatori a terra di microgravità (clinostato, RPM e RWV) e analoghi terrestri della microgravità (*bed rest* e galleggiamento). Alcune piattaforme forniscono effetti rapidi sui campioni e vengono usate per esperimenti a breve termine, mentre altre forniscono effetti più lentamente e vengono usate per esperimenti a lungo termine [149, 150].

Classificazione	Durata della µg	intensità della µg	Sistema biologico
Simulatori a terra di microgravità			
Clinostato 2D/RWV	Ore-settimane	$\leq 10^{-3}$g	Cellule, microbi, piante
Clinostato 3D/RPM	Ore-settimane	10^{-4}g	Cellule, microbi, piante
Analoghi terrestri della microgravità			
Bed rest	Ore-settimane	/	Esseri umani
Galleggiamento	Ore	/	Animali, esseri umani
Strutture di microgravità orbitanti			
CubeSat	Settimane-mesi	10^{-6}g	Microbi, piante
ISS	Mesi-anni	10^{-6}g	Cellule, microbi, piante, animali
Strutture di microgravità non orbitanti			
Torri di caduta	2.2-9.5 s	10^{-6}g	Cellule, microbi, piante
Voli parabolici	20 s ripetitivi	10^{-2}g	Cellule, microbi, piante, animali
Razzi sonda	5-20 min	$\leq 10^{-4}$g	Cellule, microbi, piante, animali

Tabella 5 - Specifiche delle metodologie di simulazione della microgravità. s: secondi, min: minuti, g: accelerazione di gravità. (adattato da: Ferranti et al., 2020).

CubeSat è un satellite modulare miniaturizzato costituito da un massimo di 12 unità di misura 10x10 cm e orbitante a 350-700 Km di altitudine; viene utilizzato per testare tecnologie destinati a satelliti più grandi e in ambito biologico si adopera per studiare la stabilità delle molecole organiche. La ISS è l'unica piattaforma in cui è possibile ottenere condizioni di microgravità costanti, orbita a 400 Km di altitudine ed è un laboratorio per la ricerca scientifica e dimostrazioni. Le torri di caduta sono piattaforme versatili utilizzate per sperimentazioni a breve termine; in biologia permettono di eseguire esperimenti focalizzati sulla fisiologia delle membrane. I voli parabolici permettono l'esposizione di esseri umani, animali, tessuti o cellule per periodi ripetuti di 20-30 secondi: per questo motivo si scelgono per studiare fenomeni acuti come risposte neurosensoriali o cardiovascolari. I razzi sonda sono razzi che oltrepassano l'atmosfera senza entrare in orbita, utilizzati per caricare più moduli sperimentali. Il *bed rest* e il galleggiamento sono metodi utilizzati principalmente sugli esseri umani, tuttavia il galleggiamento è stato adoperato anche su organismi cellulari (*Paramecium* e *Euglena*) per provare l'esistenza della percezione gravitazionale indipendente dagli statoliti [150].

Di particolare interesse per la sperimentazione in laboratorio sono i metodi si simulazione a terra che prevedono l'utilizzo di clinostato, RPM e RWV. In particolare:

- **Clinostato**: i clinostati sono macchinari rotanti introdotti nel IX secolo per studi su piante o semi a velocità piuttosto basse, ma negli anni si sono evoluti aumentando la velocità di rotazione per permettere lo studio di colture cellulari in mezzo di coltura liquido. In base alla velocità di rotazione (sempre costante) e al numero di assi di rotazione, i clinostati vengono suddivisi in categorie: si parla di clinostati 1D e 2D in caso vi sia un solo asse di rotazione, e di clinostato 3D in caso vi siano due assi di rotazione. Nel clinostato 1D l'asse di rotazione e il campione sono disposti in modo parallelo, mentre nel clinostato 2D sono disposti l'uno perpendicolare all'altro. L'orientamento dell'asse determina le proprietà del macchinario in quanto può compensare o mediare il carattere vettoriale della gravità. Un asse verticale permette di muovere il campione ma il vettore di gravità viene percepito solo verso il lato basale, infatti porre l'asse a un angolo compreso tra la posizione verticale e quella orizzontale comporta una proporzione netta della gravità terrestre [150, 151]. L'aggiunta di un asse rotazionale nel clinostato 3D, disposto perpendicolarmente all'altro asse, permette la dispersione della gravità [152].
- **Rotating wall vessel (RWV)**: il bioreattore a parete rotante rappresenta un passo successivo rispetto ai clinostati, in quanto è di dimensioni maggiori e ruota a 10-20 rpm intorno a un asse orizzontale. Il RWV è pensato per le sospensioni cellulari e fornisce un ambiente che riduce le forze di taglio garantendo al contempo un adeguato trasferimento di massa; il punto chiave alla base del suo funzionamento è il bilanciamento tra la frequenza di rotazione e la velocità di sedimentazione delle cellule, in questo modo si mantiene la sospensione cellulare le cellule restano al centro della flask [150, 153].

- **Random Positionig Machine (RPM)**: si tratta di un dispositivo che cambia la direzione della gravità agendo sul soggetto posizionato al centro della rotazione tramite due telai perpendicolari che ruotano indipendentemente: disperdendo la forza gravitazionale e compensando i vettori gravitazionali durante il tempo di funzionamento del macchinario, non viene eliminata la gravità reale. Poiché le velocità di rotazione sono limitate e la distanza dal centro di rotazione ai soggetti sperimentali è sufficientemente breve, la forza centrifuga è trascurabile [154]. La RPM si distingue dal clinostato 3D in quanto velocità e direzione di rotazione sono casuali, in questo modo i campioni biologici sono costantemente riorientati nello spazio e se la velocità è sufficientemente superiore rispetto al tempo di risposta dei sistemi biologici allora quest'ultimi sperimenteranno la condizione di microgravità. Il posizionamento dei campioni sul piatto della RPM è un aspetto critico in quanto più ci si allontana dal centro degli assi, più le forze che agiscono sui campioni diventano rilevanti e per questo motivo il numero di campioni utilizzabili contemporaneamente è limitato. La rotazione inoltre aumenta il movimento del fluido all'interno delle *flask* di coltivazione delle cellule, producendo forze di taglio e un aumento della convezione. È altresì fondamentale limitare la formazione di bolle d'aria all'interno delle *flask*. Per ottenere dati significativi, quindi, le condizioni sperimentali devono essere stabilite in maniera precisa. La RPM viene utilizzata per indurre una crescita tridimensionale, infatti è sufficiente un'alta densità cellulare all'interno del medium per stimolare l'interazione cellula-cellula e formare strutture 3D chiamate sferoidi [150].

Sferoidi

Ad oggi le colture cellulari monostrato 2D sono le più utilizzate in ambito di ricerca in quanto sono di semplice mantenimento, convenienti ed economiche, tuttavia non rispecchiano le condizioni *in vivo* tanto fedelmente quanto i sistemi 3D: questa limitazione può fornire risultati fuorvianti riguardo alle risposte previste delle cellule tumorali verso farmaci antitumorali. Normalmente le procedure di screening pre-cliniche per gli agenti terapeutici prevedono l'identificazione di composti a partire da colture in due dimensioni, per poi passare ai test su modelli animali e infine ai veri e propri trials clinici; meno del 5% degli agenti anti-tumorali e delle piccole molecole terapeutiche viene però approvato per l'immissione sul mercato, e questo scarso risultato è attribuibile al fatto che la risposta ai farmaci delle colture bidimensionali non è predittiva dell'esito degli studi clinici. Oltre a questo, i sistemi 2D presentano marcate differenze con le cellule *in vivo* che riguardano caratteristiche morfologiche, potenziale di differenziamento e proliferazione, interazione cellule-cellula e cellula-matrice e trasduzione del segnale. La consapevolezza di queste limitazioni ha così portato all'introduzione delle colture tridimensionali [155]. Il tipico modello di coltura 3D è rappresentato dagli sferoidi, ovvero aggregati cellulari sferici auto-assemblati che simulano un microambiente intracellulare complesso stabilendo interazioni cellula–cellula e

cellula–substrato *in vitro*; in virtù delle loro proprietà istologiche, trovano ampie applicazioni nei campi dello sviluppo di farmaci e dello screening di tossicità grazie alla loro semplicità, riproducibilità e somiglianza ai tessuti fisiologici [156]. Le colture 3D si possono ottenere con una moltitudine di metodi, i quali si dividono in basati sulla matrice e liberi da matrice: nel primo caso si fornisce una struttura di supporto chiamata *scaffold* formata da idrogel o materiale polimerico rigido che favorisce appunto la formazione delle strutture tridimensionali. Il metodo libero da matrice è quello che prevede la formazione degli sferoidi: in questo caso non è richiesto nessun materiale biologico esterno in quanto la matrice extracellulare è prodotta dalle cellule stesse [157]. Alla formazione degli sferoidi contribuiscono processi di adesione e differenziamento che si riscontrano anche in sviluppo embrionale e morfogenesi tissutale. In prima battuta, le fibre della ECM a lunga catena favoriscono la rapida aggregazione delle cellule in virtù dei loro molteplici motivi RGD (arginina-glicina-aspartato) che interagiscono con le integrine di superficie; successivamente vi è un lungo periodo di latenza caratterizzato dalla sovraregolazione della caderina, seguito dall'ultima fase di forte adesione cellulare dovuta ai legami omofilici caderina-caderina tra le cellule. Gli sferoidi multicellulari sono analoghi al tessuto avascolare e alla massa tumorale, infatti la diffusione di molte molecole (tra cui l'ossigeno) è limitata a 150-200 µm: per questo motivo sferoidi di circa 500 µm di diametro presentano una struttura a strati caratterizzata da un core necrotico e uno strato esterno composto da cellule quiescenti e cellule proliferanti [158].

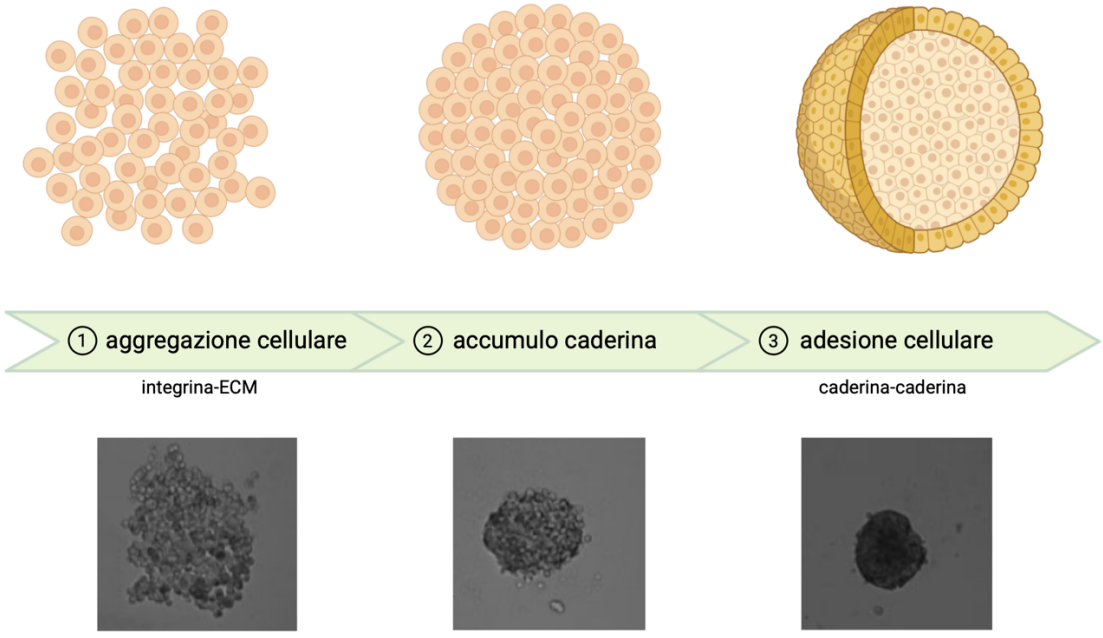


Figura 17 - Modello del processo di formazione degli sferoidi. Creato con BioRender.com (adattato da: Lin et al., 2008).

La dimensione degli sferoidi è quindi un aspetto critico che deve essere controllato in fase di sperimentazione: per gli sferoidi di cellule tumorali, ad esempio, si usano dimensioni maggiori per favorire la condizione ipossica simile all'ambiente del tumore stesso. In generale uno sferoide presenta tre livelli: quello più esterno è composto da cellule proliferative e metabolicamente attive, quello intermedio è caratterizzato da cellule quiescenti ad attività metabolica minima, infine quello più interno è formato da cellule necrotiche che hanno perso la loro funzionalità a causa della carenza di nutrienti e all'accumulo di sostanze di scarto. La forma ideale dello sferoide è circolare, in quanto favorisce una equa ripartizione dei tre livelli e soprattutto permette la riproducibilità degli esperimenti. Gli sferoidi in laboratorio possono essere formati sia in microgravità che a terra utilizzando piastre con pozzetti a U con superficie non aderente [157].

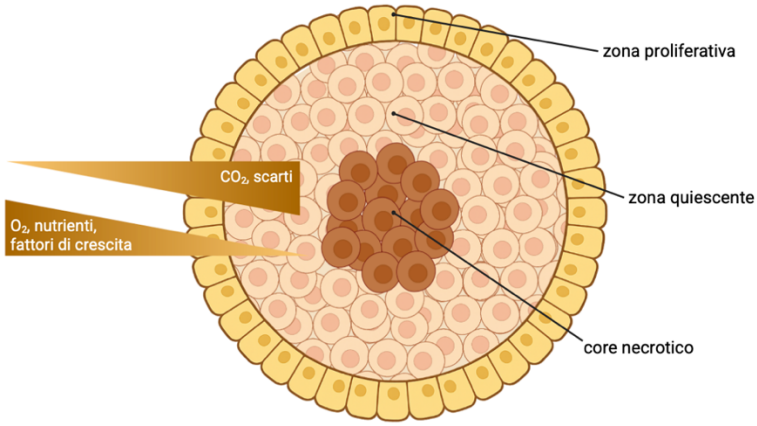


Figura 18 - Modello della struttura a livelli di uno sferoide. Creato con BioRender.com (adattato da: Park et al., 2023).

1.4.2 Effetti della microgravità sulle cellule tumorali

La microgravità è nota per avere effetti sulle adesioni focali (siti che permettono di controllare il citoscheletro), sull'organizzazione del citoscheletro e sull'adesione delle cellule tumorali e, di conseguenza, anche su migrazione, proliferazione e metastatizzazione [159]. Nelle cellule di melanoma è stato dimostrato che la microgravità simulata riduce la formazione delle adesioni focali e inibisce l'attività di FAK e RhoA inducendo alterazioni nel citoscheletro; FAK è un enzima reclutato dalle proteine leganti l'integrina e permette di formare le adesioni focali, mentre RhoA è una proteina che controlla la funzione delle proteine leganti l'actina, le quali contribuiscono alla formazione di strutture più complesse come le fibre di stress (fasci di actina e miosina), lamellipodi e filopodi. Il citoscheletro subisce ulteriori modificazioni grazie al fatto che la microgravità permette di diminuire la quantità di fibre di stress e lamellipodi [160, 161]. Simili cambiamenti del citoscheletro si riscontrano anche in cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale sottoposte a

microgravità simulata, la quale agisce su tubulina e actina filamentosa [162]. L'integrità del DNA è un aspetto importante per la sopravvivenza della cellula e alcuni studi hanno dimostrato come, in microgravità, vi sia un aumento della fosforilazione di ATM che suggerisce la presenza di danno al genoma; tale risposta sembra però essere dipendente dalla tipologia cellulare. Il danno al DNA si accompagna all'apoptosi, probabilmente legata alla down-regolazione di pathway di Erk e Akt e alla up-regolazione di geni pro-apoptotici come TP53 e PTEN [163, 164]. Si può quindi affermare che la microgravità (sia reale che simulata) induca cambiamenti a livello di genoma, trascrittoma, proteoma e metaboloma agendo a livello del citoscheletro e altri processi biologici: questo porta alla riduzione della migrazione e della proliferazione cellulare, oltre alla down-regolazione delle metalloproteasi e dei geni legati alla transizione epitelio-mesenchimale. Questi cambiamenti possono portare verso un fenotipo meno aggressivo del cancro, ma è bene sottolineare che i risultati variano in base alla linea cellulare utilizzata [165]. Gli sferoidi tumorali sono strutture singolari in quanto favoriscono selezione ed espansione delle cellule staminali tumorali (CSC), ovvero cellule che possiedono caratteristiche delle cellule staminali somatiche quali divisione asimmetrica, quiescenza e auto-rinnovamento; tali cellule hanno un ruolo chiave nella resistenza ai farmaci a causa della up-regolazione dei trasportatori di efflusso dei farmaci e di componenti per la riparazione del DNA. Recenti studi si sono focalizzati sulla relazione tra CSC e microgravità grazie alla formazione di sferoidi multicellulari, i quali rappresentano un modello intermedio tra una coltura monostrato e un tumore *in vivo* in quanto possiedono sia caratteristiche del tumore primario che delle cellule staminali [166]. In linee cellulari di PDAC l'esposizione alla microgravità induce un arricchimento di cellule staminali, infatti dopo 9 giorni di esposizione è stato visto un aumento dell'espressione dei principali geni correlati alla staminalità (Nanog, Sox2 e Oct4); le analisi proteomiche a supporto hanno poi evidenziato la up-regolazione sia della via di segnale di IL-8 (implicato nella staminalità) dopo 9 giorni, che della via di segnale ERK5 dopo solo 24 ore: ERK5 stimola la up-regolazione di IL-8 e la trascrizione di NF-kB, suggerendo così il coinvolgimento dell'asse ERK5/NF-kB/IL-8 nella regolazione del tumore. Grazie a questi risultati e insieme alla up-regolazione delle proteine legate alla staminalità (come EpCAM e RhoA), è possibile affermare che nel PDAC la microgravità simulata causa una riprogrammazione della cellula verso un fenotipo staminale e più aggressivo [167].

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari ed esposizione alla microgravità

Per questa ricerca sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale umano PaCa44, gentilmente fornite dal Prof. Massimo Donadelli dell'Università degli Studi di Verona. La linea cellulare è stata amplificata in terreno RPMI-1640 supplementato con 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*) e 1% di penicillina-streptomicina (PS); le cellule sono state mantenute in *flask* da 75 cm2: sono state diluite per favorirne la crescita e il terreno esausto è stato sostituito con terreno nuovo ad ogni passaggio. Una volta raggiunta una confluenza intorno al 100%, il terreno è stato rimosso e la *flask* lavata con PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*), quindi le cellule sono state staccate dalla *flask* tramite incubazione con Tripsina-EDTA (Tripsina 0.25%, EDTA 1mm HBSS senza Ca2+ senza Mg2+, con rosso fenolo) a 37°C e 5% di CO_2 per 3-4 minuti; l'effetto della Tripsina-EDTA è stato inibito con l'aggiunta di terreno RPMI-1640, in quantità doppia rispetto alla Tripsina aggiunta. A seguito della conta cellulare, la quantità necessaria di cellule è stata seminata in una *flask* da 25 cm^2 piena fino all'orlo di terreno RPMI-1640 in modo da avere una quantità finale di $5x10^5$ cellule/mL. Per valutare la densità cellulare delle colture è stata utilizzata la camera di Burker. Brevemente, le cellule sono state prelevate e diluite 1:10 in 5 mL di RPMI-1640 per ridurne la densità in modo da facilitare il conteggio; nella camera di conta sono poi stati caricati 10 µL di sospensione diluita e sono state contate le cellule dei riquadri definiti. La concentrazione cellulare della sospensione originale è stata calcolata mediante il prodotto tra: media delle cellule contate, fattore di diluizione (10), volume di risospensione (5 mL) e fattore di conversione della camera (10^4).

Per simulare la microgravità è stata utilizzata una RPM impostata su "*real random mode*", con una rotazione di 56 gradi/s in modo da minimizzare l'accelerazione centrifuga e lo stress causato dalle forze di taglio. L'esposizione alla microgravità è avvenuta per 9 giorni a 37°C: tale scelta si è basata sulla precedente identificazione di questa durata di esposizione come ottimale per osservare significative modulazioni delle vie di segnalazione [167]. Dopo 7 giorni è stata addizionata la tricostatina A, per una concentrazione finale di 2.5 µM. La formazione degli sferoidi è stata eseguita in triplicato indipendente e ogni esperimento prevedeva sia *flask* senza trattamento (VeH, veicolo), che *flask* con trattamento.

Tutti gli esperimenti successivi sono stati eseguiti su sferoidi di PaCa44 coltivati in condizioni di microgravità simulata.

2.2 Tricostatina A

La tricostatina A (TSA) (T8552 1 mg, lot#088M4163U) è stata acquistata dalla ditta Sigma-Aldrich Co., Ltd. (Milano, Italia) e dissolta in etanolo anidro per una concentrazione di 3.3 mM. La soluzione madre è stata conservata in ultracongelatore a -80°C fino all'utilizzo.

2.3 Saggio MTT per la proliferazione cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata con l'impiego del saggio MTT (Roche, Indianapolis, IN, USA, 11465007001), conservato a -20°C fino all'utilizzo. Tale saggio si basa sulla conversione del sale tetrazolico giallo (MTT, bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) in cristalli viola di formazano da parte di cellule metabolicamente attive; i cristalli di formazano vengono solubilizzati e la soluzione colorata viene quantificata da uno spettrofotometro *multiwell* a scansione. Il kit si compone di MTT Labeling Reagent e Solubilization Solution.

A seguito della conta cellulare tramite camera di Burker, la quantità necessaria di cellule è stata seminata in una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto trattata per l'adesione in terreno RPMI-1640 in modo da avere una quantità finale di $5x10^3$ cellule/pozzetto; la piastra è stata incubata a 37°C e 5% di CO_2 per tutta la notte così che le cellule aderissero al fondo dei pozzetti. Le cellule sono quindi state trattate a crescenti concentrazioni di TSA: 5 nM, 10 nM, 15 nM, 25 nM, 50 nM, 125 nM, 250 nM; la piastra con il trattamento è nuovamente stata incubata a 37°C e 5% di CO_2 per 48 ore. Parallelamente le cellule PaCa44 sono state seminate in quantità necessaria all'interno di una piastra a bassa adesione da 96 pozzetti con fondo a U in modo da avere una quantità finale di $5x10^4$ cellule/pozzetto; si è utilizzato terreno RPMI-1640 supplementato con il 10% di metilcellulosa. La piastra è stata incubata a 37°C e 5% di CO_2 per 9 giorni in modo da favorire la formazione degli sferoidi e, al settimo giorno, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di TSA: 0.025 µM, 0.050 µM, 0.125 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM, 5.0 µM. Terminato il periodo di incubazione richiesto, a entrambe le piastre sono stati aggiunti 10 µL di MTT Labeling Reagent (sciolto in PBS nella concentrazione di 5 mg/mL) per pozzetto; le piastre sono quindi state incubate a 37°C e 5% di CO_2 per 4 ore per favorire la formazione dei sali di formazano. Alle cellule aderenti sono stati aggiunti 100 µL di Solubilization Solution per dissolvere i sali di formazano, mentre per gli sferoidi la dissoluzione è avvenuta con il DMSO in modo da favorire anche la disaggregazione degli sferoidi. L'assorbanza a 570 nm è stata misurata usando il lettore di micropiastre Tecan Infinite 200 PRO®, quindi la vitalità cellulare è stata calcolata in base ai relativi gruppi di controllo: il risultato è stato calcolato come il delta dell'assorbanza tra i campioni e la condizione di bianco.

Entrambe le piastre presentano quattro condizioni sperimentali, ognuna allestita in triplicato tecnico: controllo (CNT, terreno RPMI-1640 e cellule), veicolo (VeH, terreno RPMI-1640, cellule

ed etanolo), trattamento (terreno RPMI-1640, cellule e TSA) e bianco (B, terreno RPMI-1640 ed etanolo). Il saggio è stato eseguito in triplicato indipendente.

2.4 Analisi proteomica

Al termine dei 9 giorni di esposizione alla microgravità e delle 48 ore di trattamento con la TSA, le cellule sono state raccolte, lavate con PBS e risospese di RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplementato con un cocktail di inibitori delle proteasi (1X, Roche, Basilea, Svizzera). La sospensione cellulare è stata sonicata due volte per 10 minuti in modo da lisare le cellule, quindi mescolata delicatamente su ghiaccio e infine centrifugata a 14000xg per 15 minuti a 4°C in modo da sedimentare i detriti; la concentrazione proteica nel surnatante è stata valutata con il saggio proteico BCA (Thermo Fisher Scientific,Waltham, MA, USA) e per lo standard si è utilizzata albumina sierica bovina (BSA). Il saggio BCA è un metodo colorimetrico molto noto per la quantifica proteica in cui i residui di cisteina, triptofano e tirosina del campione contribuiscono alla riduzione del rame Cu^{2+} a Cu^{+}: come risultato si ha un complesso di colore viola-porpora che viene quantificato con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 562 nm. Il metodo BCA prevede una *working solution* composta da 100 parti di reagente A (sodio bicinconinato, carbonato di sodio, tartrato di sodio, idrossido di sodio, bicarbonato di sodio a pH 11.25) mischiate a 2 parti di reagente B (solfato di rame (II) pentaidrato sciolto in acqua).
Le proteine del lisato cellulare sono state ridotte utilizzando 2.5 µL di ditiotreitolo (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 mM a 90°C per 20 minuti; successivamente il composto è stato alchilato con 10 µL di reagente bloccante per cisteina (Iodoacetamide, IAM, Sigma-Aldrich) 200 mM per 1 ora a temperatura ambiente al buio. La digestione proteolitica è stata eseguita con l'utilizzo di tripsina di grado sequenza (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C per tutta la notte; i peptidi risultanti sono stati desalinizzati usando micropiastre a estrazione in fase solida (SPE) Discovery® DSC-18 da 96 pozzetti (25 mg/pozzetto, Sigma-Aldrich) e preparati per le analisi. I peptidi ottenuti dalla digestione sono stati analizzati con un sistema micro-LC della ditta Eksigent Technologies (Dublin, CA, USA) equipaggiato con una colonna Halo Fused C18 (0.5x100 mm, 2.7 µm, Eksigent Technologies): la fase mobile è composta da 0.1% (*v/v*) di acido formico in acqua (A) e 0.1% (*v/v*) di acido formico in acetonitrile (B), con una portata di 15.0 µL/min. L'eluizione a gradiente ha previsto un incremento del solvente B dal 2% al 40% in 30 minuti. Inizialmente i campioni sono stati analizzati per acquisizione tradizionale dipendente dai dati (DDA) per generare una libreria spettrale. La spettrometria di massa è stata eseguita su un intervallo di massa compreso tra 100 e 1500 Da (scansione TOF, tempo di accumulo 0,25 s) con scansioni MS/MS degli ioni prodotti da 200 a 1250 Da (tempo di accumulo 5,0 ms), applicando una soglia di segnale di 30 cps;

successivamente, è stata eseguita un'acquisizione ciclica indipendente dai dati (DIA) utilizzando una finestra di 25 Da. Una scansione TOF-MS di 50 ms ha preceduto gli esperimenti MS/MS su tutti i precursori ciclicamente (36 swaths, tempo di accumulo di 40 ms per swath). La frammentazione è stata ottenuta utilizzando energia di collisione variabile (*rolling collision energy*). I dati di spettrometria di massa sono stati acquisiti con Analyst TF v.1.7 (AB SCIEX, Concord, ON, Canada). Tre replicati strumentali per campione sono stati sottoposti ad analisi DIA. I dati sono stati analizzati utilizzando i software Protein Pilot v.4.2 (AB SCIEX) e Mascot v.2.4 (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA). I parametri includevano il database UniProt Swiss-Prot delle proteine umane (versione 12/10/2018; 48.561 voci). Impostazioni di ricerca: enzima: tripsina (consentendo fino a 2 siti di taglio mancati); tolleranze: ±50 ppm (massa del peptide) e ±0,1 Da (MS/MS); modificazioni: cisteina carbamidometilata (fissa) e metionina ossidata (variabile); cariche dei peptidi: +2, +3 e +4. Secondo la validazione, il tasso di false scoperte (FDR) era dell'1%.

2.5 Western Blot

Al termine dei 9 giorni di esposizione alla microgravità simulata, gli sferoidi di PaCa44 sono stati prelevati e centrifugati per ottenere un pellet. Il lisato è stato ottenuto con l'utilizzo del RIPA buffer con NP-40 1% supplementato con un cocktail di inibitori degli enzimi proteasi e fosfatasi (PPC1010, Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

La concentrazione proteica del lisato è stata poi quantificata tramite il metodo Bradford (5000006, Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia), che prevede la costruzione di una curva di taratura preparando un campione di bianco costituito dal tampone di lisi, e campioni standard di BSA (*Bovine Serum Albumin*) alle concentrazioni di 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL, 7.5 mg/mL e 10 mg/mL; una volta creata la retta di calibrazione, si procede alla lettura del campione in esame per quantificarne la concentrazione e garantire così il caricamento di uguali quantità di proteine totali nelle successive analisi di Western Blot. La lettura è stata eseguita con il lettore Tecan Infinite 200 PRO® ad una lunghezza d'onda di 620 nm. Per la preparazione dei campioni si è proceduto portando a volume la quantità necessaria di lisato proteico con Laemmli sample buffer 1X, composto da β-mercaptoetanolo e LAEMMLI 4X, e Tris-HCl a pH 6.8.

Per la corsa elettroforetica sono stati utilizzati gel di poliacrilammide *precasted* Mini-PROTEAN TGX *stain free* (4568083, Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia), nei quali i campioni sono stati caricati in eguale quantità in condizioni denaturanti e riducenti. Per riempire la camera elettroforetica è stato utilizzato il Running buffer 1X contenente Tris-glicina SDS buffer 10X diluito con acqua milliQ.

Una volta terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato trasferito sulla membrana di nitrocellulosa da 0.2 μm (1704158, Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia) tramite l'utilizzo del sistema Trans-Blot

Turbo Bio-Rad. Terminato il trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata colorata con Rosso Ponceau e acquisita tramite Chemidoc Bio-Rad. Successivamente, la membrana è stata saturata con latte in polvere scremato 5% sciolto nel buffer PBS-0.1% Tween 20 e quindi lavata più volte con PBS Tween. La prima incubazione è stata eseguita in frigorifero a 4°C per tutta la notte; gli anticorpi primari anti-umano utilizzati sono elencati nella Tabella 6. Dopo aver effettuato diversi lavaggi con PBS Tween, è seguita una seconda incubazione con anticorpo secondario (a seconda dell'origine dell'anticorpo primario) coniugato a HRP (*Horseradish peroxidase*) per 1 ora a temperatura ambiente. La membrana è stata nuovamente lavata con PBS Tween, quindi acquisita con Chemidoc Bio-Rad e quantificata per densitometria utilizzando il software ImageLab 6.1 (Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia). I risultati sono stati normalizzati per normalizzazione sulla proteina totale.

Proteina target	Specie	Diluizione	Azienda	Località
E-caderina	rabbit	1:1000	Genetex	Dallas, TX, USA
vimentina	mouse	1:1000	Santa Cruz	Dallas, TX, USA
GAPDH	mouse	1:1000	Santa Cruz	Dallas, TX, USA
α-tubulina	mouse	1:1000	Merckmillipore	Milano, Italia
β-actina	mouse	1:1000	Cell Signaling	Danvers, MA, USA
vinculina	mouse	1:200	eBioscience	San Diego, CA, USA
Nanog	mouse	1:1000	Biorbyt	Cambridge, UK
CD44	mouse	1:1000	Santa Cruz	Dallas, TX, USA

Tabella 6 -Elenco degli anticorpi primari anti-umano utilizzati

2.6 Estrazione RNA, retrotrascrizione e qRT-PCR

Al termine dei 9 giorni di esposizione alla microgravità simulata, gli sferoidi di PaCa44 sono stati prelevati e centrifugati per ottenere un pellet, quindi l'RNA è stato estratto con l'impiego del kit PureLink® RNA Mini (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tale metodologia prevede il lisaggio e l'omogenizzazione del campione in presenza di isotiocianato di guanidinio, un sale denaturante in grado di proteggere l'RNA dagli enzimi RNasi endogeni; il buffer di lisi contiene 2-mercaptoetanolo. Dopo l'omogenizzazione, viene aggiunto etanolo e il campione è processato in specifiche colonnine contenenti una membrana in silice capace di legare il materiale genetico. Le impurità vengono dilavate con lavaggi sequenziali attraverso centrifugazione e l'RNA totale purificato viene eluito in acqua RNasi-free così da poter essere utilizzato per la retrotrascrizione a cDNA.

La retrotrascrizione dell'RNA ottenuto dalla purificazione a cDNA è stata eseguita con l'utilizzo del kit ImProm-II ™ Reverse Transcription System (A3800, Promega, Madison, WI, USA). Il campione è stato addizionato ai primer sperimentali, quindi la miscela è stata denaturata a 70°C per 5 minuti e poi raffreddata su ghiaccio; successivamente è stata aggiunta la mix contenente acqua nucleasi-free, buffer di reazione, trascrittasi inversa, cloruro di magnesio, dNTPs e inibitori delle ribonucleasi. Si verifica una prima fase di annealing a 25°C per 5 minuti, quindi la reazione si fa proseguire a 42°C per 1 ora e il campione è subito pronto per essere amplificato tramite qRT-PCR. La PCR *real time* quantitativa è stata eseguita grazie all'impiego della iTaq Universal SYBR® Green Supermix (1725124, Bio-Rad, Segrate, Milano, Italia); tale miscela a concentrazione 1x contiene il buffer di reazione con dNTPs, la DNA polimerasi iTaq, cloruro di magnesio, il colorante SYBR Green I, attivatori, stabilizzatori e una miscela di coloranti di riferimento passivi. Si procede con la formazione delle due mix: la mix 1 è composta da 10 µL di Supermix e una quantità variabile di primer Forward e Reverse, mentre la mix 2 è composta da quantità variabili di acqua RNasi/DNasi free e cDNA; i primers utilizzati sono elencati nella Tabella 7. È stata utilizzata una *multiwell* da 384 pozzetti, caricando prima la mix 1 e successivamente la mix 2; per ogni primer è stata eseguita l'analisi in triplicato tecnico. Il profilo termico impostato ha previso una prima fase di attivazione enzimatica a 95°C per 3 minuti, una seconda fase di denaturazione a 95°C per 3 minuti, una terza fase di annealing ed estensione a 59°C per 30 secondi, e una quarta e ultima fase di curva di fusione a 72°C per 5 secondi; gli ultimi tre step sono stati eseguiti a ripetizione per 39 cicli. Per la quantificazione è stato usato QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'espressione del gene 18S è stata utilizzata come controllo endogeno per normalizzare l'espressione dell'mRNA. La media del *cycle threshold* di ciascun triplicato è stata analizzata secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gene	Sequenza Forward Primer	Sequenza Reverse Primer
CDH1	5′-GAC ACC AAC GAT AAT CCT CCGA-3′	5′-GGC ACC TGA CCC TTG TAC GT-3′
ZEB1	5′-GTT ACC AGG GAG GAG CAG TGA AA-3′	5′-GAC AGC AGT GTC TTG TTG TTG TAG AAA-3′
caspasi 3	5′-CTG GTT TTC GGT GGG TGT-3′	5′-CAC TGA GTT TTC AGT GTT CTC CA-3′
caspasi 8	5′-CAG CAG CCT TGA AGG AAG TC-3′	5′-CGA GAT TGT CAT TAC CCC ACA-3′
caspasi 9	5′-CCC AAG CTC TTT TTC ATC CA-3′	5′-AGT GGA GGC CAC CTC AAA C-3′
BAD	5′-ACC AGC AGC AGC CAT CAT-3′	5′-GGT AGG AGC TGT GGC GAC T-3′
GAPDH	5′-ATC AGC AAT GCC TCC TGC AC-3′	5′-TGG TCA TGA GTC CTT CCA CG-3′
18S	5′-ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT-3′	5′-CCT TGG ATG TGG TAG CCG TTT-3′

Tabella 7 - Sequenza dei primers utilizzati nella qRT-PCR

2.7 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite con GraphPad Prism v.8.0.2 e i valori sono stati espressi come media ± SEM (errore standard della media). I gruppi non appaiati con distribuzione Gaussiana sono stati confrontanti mediante il test *t* di Student non appaiato, mentre nei casi di distribuzione non Gaussiana è stato utilizzato il test *U* di Mann-Whitney. Un valore di $p \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3. SCOPO DEL LAVORO

L'adenocarcinoma pancreatico duttale è una delle neoplasie a prognosi più sfavorevole in quanto caratterizzata da diagnosi tardiva, marcata resistenza ai trattamenti convenzionali ed elevata aggressività biologica. Recentemente è cresciuto l'interesse verso nuovi target e nuovi approcci sperimentali anche attraverso l'impiego di modelli tridimensionali, permettendo così di approfondire i meccanismi cellulari e molecolari alla base della neoplasia e della sua progressione. In questo modo si è aperta una strada verso lo sviluppo di nuovi trattamenti.

Il presente lavoro si propone di valutare le alterazioni indotte dalla microgravità simulata in cellule di PDAC e di investigare il ruolo della tricostatina A per quanto riguarda modulazione e, possibilmente, ripristino del fenotipo cellulare; a tal fine, la linea cellulare PaCa44 è stata mantenuta e utilizzata per la formazione di sferoidi tramite l'impiego di una *random positioning machine*: in questo modo è stato possibile riprodurre in maniera più fedele, rispetto alle classiche colture bidimensionali, l'architettura e le interazioni tipiche del microambiente tumorale. Gli sferoidi sono quindi stati sottoposti a trattamento con tricostatina A e successivamente analizzati mediante saggi di vitalità cellulare (MTT), analisi proteomiche, Western Blot e qRT-PCR al fine di caratterizzare gli effetti del farmaco su proliferazione e sopravvivenza cellulare, ma anche sull'espressione di specifici marcatori molecolari coinvolti nella progressione tumorale.

Questo studio mira quindi a chiarire se l'inibizione delle istone deacetilasi possa rappresentare una strategia efficace nel modulare le alterazioni fenotipiche indotte dalla microgravità simulata, contribuendo alla comprensione dei meccanismi epigenetici coinvolti nel PDAC e alla possibile identificazione di nuovi target terapeutici.

4. RISULTATI

4.1 Effetto della tricostatina A sulle colture cellulari 2D e 3D

L'effetto della tricostatina A sull'adenocarcinoma pancreatico duttale è stato valutato tramite la coltura delle cellule PaCa44 in due diverse condizioni, ovvero in monostrato bidimensionale e sferoidi tridimensionali. Le cellule sono quindi state trattate con il farmaco a diverse concentrazioni per determinarne la citotossicità e, di conseguenza, identificare il dosaggio ottimale necessario a indurre apoptosi nelle cellule di PDAC.

Le curve dose-risposta mostrano come nelle colture 2D vi sia una riduzione piuttosto marcata nella vitalità cellulare con l'aumentare della concentrazione di TSA (Figura 19.1); al contrario, nel modello tridimensionale la risposta risulta attenuata, con una curva più appiattita che suggerisce una ridotta sensibilità al farmaco (Figura 19.b).

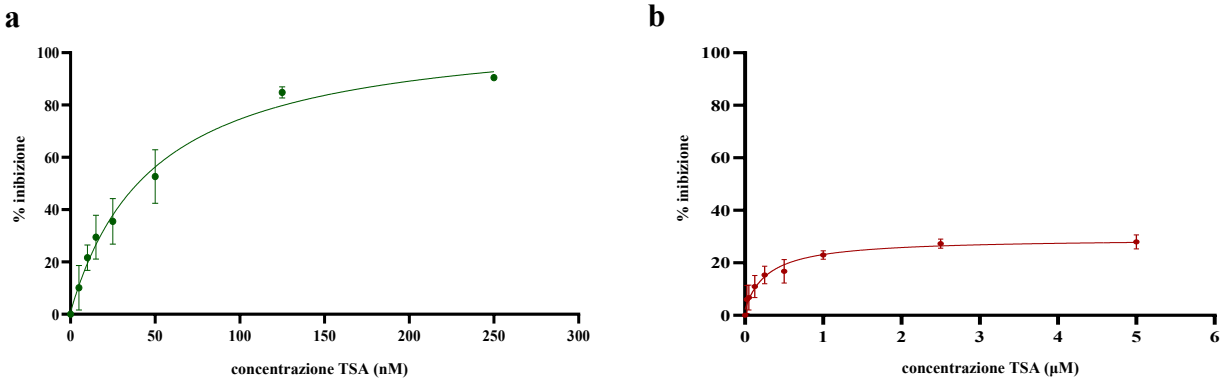


Figura 19 - Curve dose-risposta che mostrano l'effetto della TSA sulla vitalità delle cellule PaCa44 in due differenti condizioni di coltura. a) mostra le cellule 2D cresciute in aderenza e trattate con TSA per 48 ore; si osserva una pronunciata riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare, con un chiaro punto di inflessione che indica la concentrazione soglia alla quale la TSA influisce significativamente sull'attività cellulare. b) mostra la risposta delle cellule coltivate come sferoidi (3D) e trattate con TSA per 48 ore; la curva è notevolmente più appiattita, sintomo di una ridotta sensibilità alla TSA rispetto al modello bidimensionale. *n = 4*.

4.2 Effetto della tricostatina A sugli sferoidi di adenocarcinoma pancreatico

La formazione degli sferoidi in microgravità simulata a partire da cellule di tumore pancreatico, secondo la metodologia illustrata nel paragrafo 2.1, ha permesso di comprendere le alterazioni biologiche indotte dalla tricostatina A. Il trattamento infatti modula non solo i pathway proteomici ma ha effetto anche su apoptosi e vie di segnale di PI3K/AKT, IL-8 e HIF-1α oltre che su marcatori metastatici.

4.2.1 Modulazione dei pathway proteomici

È stata svolta un'estesa analisi proteomica con la tecnica SWATH-MS, usando la soglia statistica di *p*-value < 0.05 e un *fold change* > 3. I risultati dimostrano che il trattamento di 48 ore con la TSA a concentrazione 2.5 μM in un totale di 9 giorni di microgravità simulata induce la modulazione di 349 proteine, di cui 115 up-regolate (≈ 32.95%) e 234 down-regolate (≈ 67.05%) rispetto alle cellule PaCa44 di controllo esposte a microgravità nelle stesse condizioni. L'insieme dei dati ottenuti, inclusi il codice UniProt e il *fold change*, sono stati caricati sul tool bioinformatico Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in modo da identificare quali fossero le vie di segnalazione canoniche modulate in maniera statisticamente significativa. Si è osservata l'alterazione di più di cento pathway, di cui previsti 4 attivati (z-score > 2) e 31 inibiti (z-score < -2) (Figura 20.a). Con la successiva analisi delle vie di segnalazione identificate dalle analisi proteomiche, è emerso come l'esposizione delle cellule a 48 ore di TSA a concentrazione 2.5 μM porti all'inibizione di due importanti *pathway* coinvolti in proliferazione e migrazione delle cellule tumorali (Figura 20.b, 20.c). In particolare è stata osservata la down-regolazione delle proteine coinvolte nei checkpoint di regolazione del ciclo cellulare G1/S e G2/M, ovvero PA2G4, SFN, YWHAG e YWHAQ. Similarmente, è emersa la down-regolazione di altre proteine implicate nella regolazione dell'actina e altrettanto cruciali per forma e adesione cellulare, quali RHOA, Cdc42, ACTN4, EZR, MYH9, FLNB e FSCN1. A questi dati si aggiunge la down-regolazione di ITGB1, LGALS3, SDCBP, PODXL e CDCP1, proteine che svolgono un ruolo nell'adesione cellula-cellula e cellula-matrice. Oltre a queste, sono state identificate ulteriori proteine coinvolte nella risposta allo stress (HSPA1B, HSPA5 e SERPINH1) e nel metabolismo.
Questi risultati suggeriscono come la TSA 2.5 μM abbia un forte effetto anti-proliferativo sulle cellule PaCa44.

4.2.2 Effetto sull'apoptosi (caspasi 3, 8, 9 e BAD)

Il trattamento con TSA 2.5 μM ha causato l'alterazione dei pathway legati all'apoptosi. Dalla qRT-PCR è emerso come i geni relativi alla morte programmata mostrino un incremento del livello di mRNA di caspasi 3 e caspasi 9, insieme a una diminuzione di caspasi 8 e un aumento dell'mRNA di BAD (Figura 21). L'apoptosi è un processo che permette di mantenere l'omeostasi cellulare, ma ha anche un ruolo nelle patologie; la morte programmata è guidata dall'attivazione delle caspasi, in particolare le caspasi 8 e 9 (iniziatrici) attivano la caspasi 3 (esecutiva) [168]. Un aumento del livello genico delle caspasi 3 e 9 suggerisce un incremento del processo apoptotico e quindi un'azione positiva da parte della tricostatina A, che porta alla morte delle cellule tumorali. L'aumento del livello di mRNA di caspasi 3 è inoltre coerente con l'aumento genico di BAD, il quale codifica per la proteina BID che viene attivata dalla caspasi 3 per indurre un'efficiente morte cellulare [169].

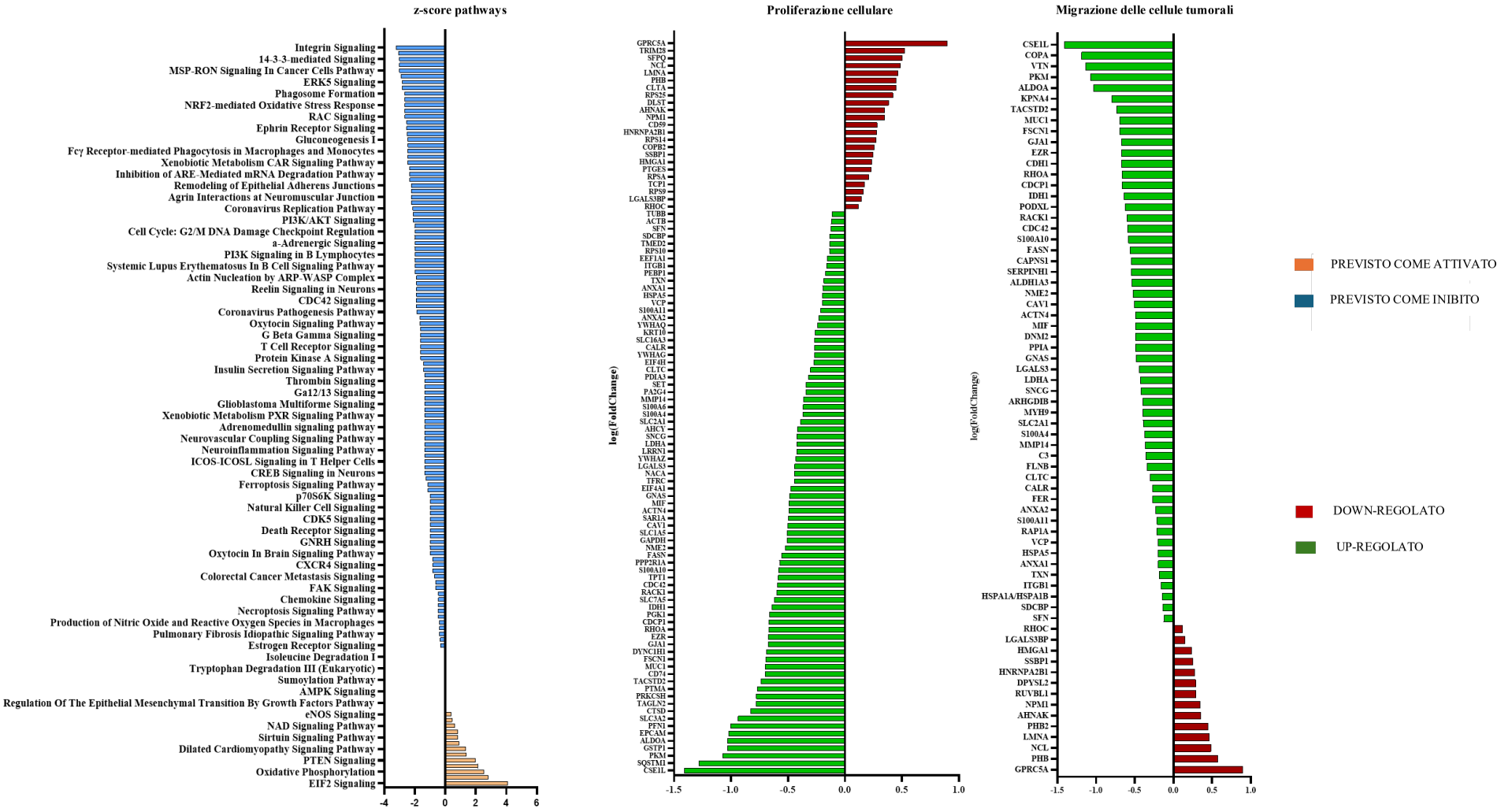


Figura 10 - Risultati dell'analisi proteomica. a) pathway canonici modulati dalle proteine espressi in modo differenziale nelle cellule PaCa44 dopo 48 ore di trattamento con TSA e esposizione alla microgravità simulata per 9 giorni. b) via di segnalazione della proliferazione valutata nelle cellule PaCa44 mantenute in SMG per 9 giorni e trattate con TSA per 48 ore. c) via di segnalazione della migrazione delle cellule tumorali nelle cellule PaCa44 mantenute in SMG per 9 giorni e trattate con TSA per 48 ore.

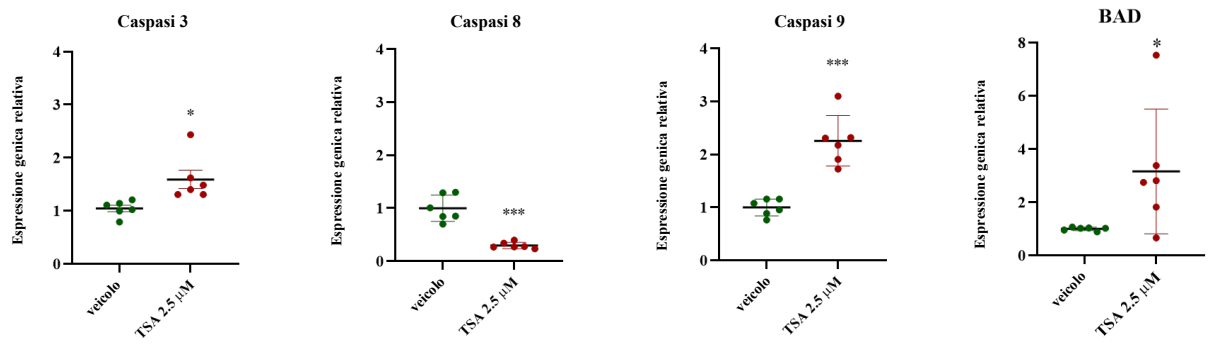


Figura 11 – Effetto della TSA sull'apoptosi. Sono mostrati i livelli relativi dell'espressione genica di caspasi 3, caspasi 8, caspasi 9 e BAD. Nelle cellule PaCa44 trattate con tricostatina A alla concentrazione di 2.5 µM, i dati sono espressi come media ± sem di $n = 6$ replicati. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.0001$.

4.2.3 Modulazione dei pathway PI3K/AKT e HIF-1α

L'analisi proteica ha evidenziato una ridotta attività delle vie di segnale PI3K/AKT e HIF-1α, modulando così l'utilizzo del glucosio, apoptosi e crescita cellulare. Più nello specifico, si è osservata la down-regolazione delle proteine coinvolte in questi *pathway* come YWHAB, YWHAH, YWHAZ, YWHAE, YWHAG, PPP2R1A, HSP90β, RAP1A, ITGB1, HSPA5, HSPA8, MMP14, SLC2A1, LDHA, RACK1 e PKM (Figura 22).

Più nello specifico, HSPA8 ha un ruolo nella risposta allo stress, nell'apoptosi, nella tumorigenesi e nel controllo del ciclo cellulare, mentre HSPA5 è coinvolto in proliferazione, migrazione e invasione delle cellule tumorali [170, 171]; la loro down-regolazione porta quindi all'alterazione del ripiegamento delle proteine e della risposta cellulare allo stress nel reticolo endoplasmatico, portando possibilmente alla morte della cellula. RAP1A è invece coinvolta in migrazione, invasione e metastatizzazione, inoltre regola l'espressione delle metalloproteinasi della matrice [172]; MMP14 ha un ruolo ben noto in metastatizzazione e invasione [173]. La down-regolazione di tali proteine potrebbe essere il motivo della riduzione di migrazione e invasione cellulare. L'alterazione della glicolisi è una delle alterazioni metaboliche più importanti nel tumore al pancreas e l'inibizione farmacologica di alcuni enzimi glicolitici, tra cui LDHA, sembra inibire l'attività tumorigenica delle cellule di PDAC; l'espressione di SLC2A1 (GLUT-1) è inoltre associata alla progressione dell'adenocarcinoma pancreatico [174]. I risultati della presente ricerca confermano queste evidenze, dimostrando che la tricostatina A causa una diminuzione di SLC2A1 e LDHA, influenzando la produzione di energia e la crescita cellulare. Relativo al metabolismo del glucosio è anche PKM2, il quale sostiene e l'effetto Warburg e catalizza la reazione finale della glicolisi [175]: la down-regolazione di tale proteina causata dalla TSA potrebbe compromettere la degradazione del glucosio per la produzione di energia. Per ultimo, la diminuzione osservata di

RACK1 sarebbe in grado di compromettere diverse vie di segnale legate a crescita cellulare, sopravvivenza e specializzazione.

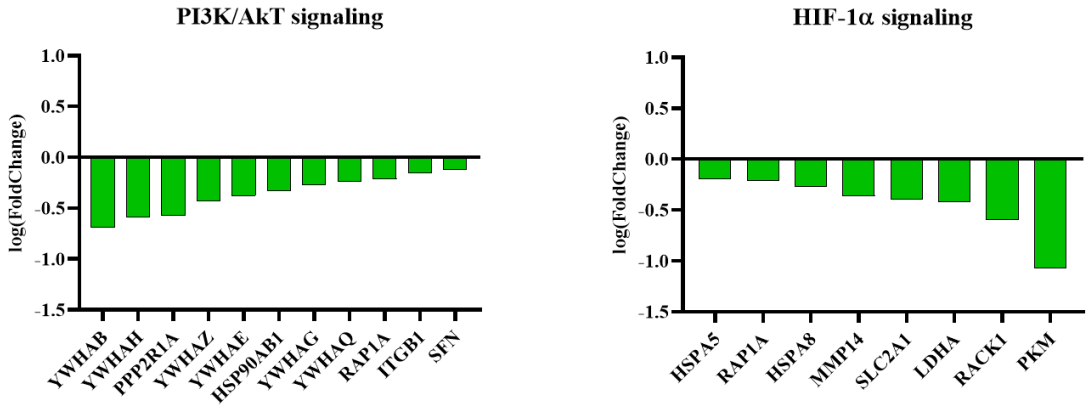


Figura 12 - Effetto della tricostatina A alla concentrazione di 2.5 μM sulle vie di segnale PI3K/AKT e HIF-1α. I grafici mostrano la variazione logaritmica media delle proteine coinvolte nei due pathway.

4.2.4 Modulazione dei markers metastatici

La tricostatina A ha la capacità di diminuire le caratteristiche legate alla staminalità delle cellule, agendo in particolare sulle vie di segnalazione di ERK5 e IL-8 portando a un decremento della loro attività (Figura 23.a). IL-8 è una interleuchina in grado di promuovere lo sviluppo di diverse tipologie di tumore, tra cui il PDAC, e alti livelli sierici suggeriscono una prognosi sfavorevole; IL-8 induce angiogenesi, migrazione aptotattica e proliferazione cellulare [176, 177]. ERK5 è invece coinvolta nella proliferazione delle cellule tumorali, ne favorisce le caratteristiche staminali e regola il ciclo cellulare nella fase G2/M inducendo il fattore NF-kB [178]. Tra le proteine legate a crescita cellulare e marcatori di staminalità è stata osservata la down-regolazione di ITGB1, PA2G4, S100A4, ALDH1A3 e EpCAM, insieme alla up-regolazione HMGA1 coinvolta nella regolazione genica e proliferazione cellulare (Figura 23.b).

Dall'analisi con Western Blot è emerso un decremento dei livelli di CD44, ma nessun cambiamento di NANOG (Figura 23.c). Entrambe le proteine sono coinvolte nella regolazione delle cellule staminali tumorali, in particolare NANOG è un fattore di trascrizione fondamentale nelle CSC e ne favorisce la transizione epitelio-mesenchimale; ne reprime inoltre l'apoptosi inducendo metastatizzazione, autorinnovamento, recidiva tumorale e resistenza ai farmaci [179]. CD44 gioca un ruolo in diversi meccanismi cellulari quali adesione, proliferazione, chemioresistenza e migrazione; si tratta inoltre di un marcatore noto delle CSC, regolando la staminalità del cancro incluso autorinnovamento, iniziazione tumorale e metastatizzazione [180, 181].

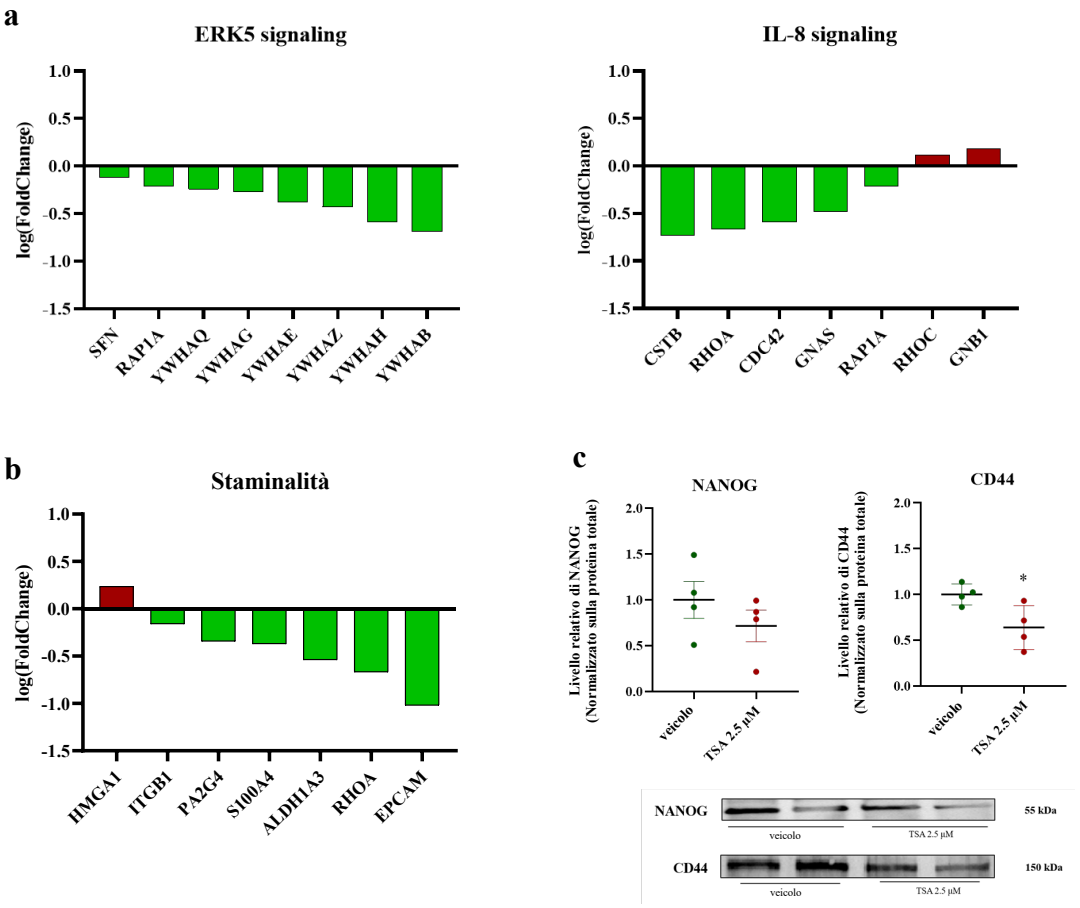


Figura 13 – Effetto della tricostatina A alla concentrazione di 2.5 µM sulle vie di segnalazione ERK e IL-8 e sulla staminalità. a, b) i grafici mostrano la variazione logaritmica media delle proteine coinvolte nei tre pathway. c) risultati dell'analisi Western Blot effettuata su NANOG e CD44 sulle cellule PaCa44 trattate con TSA alla concentrazione di 2.5 µM; i risultati sono stati normalizzati utilizzando la normalizzazione totale delle proteine con Ponceau S. I dati sono espressi come media ± sem di $n = 4$ replicati. $^{*}p < 0.05$.

4.2.5 Effetto sulle giunzioni cellulari

Ulteriore effetto della tricostatina A è stato riscontrato sulle giunzioni tra le cellule. L'analisi con qRT-PCR ha evidenziato una diminuzione dei livelli di mRNA di GAPDH (Figura 24.b), mentre l'approfondimento con Western Blot non ha mostrato modificazioni nei livelli proteici di GAPDH (Figura 24.c). GAPDH è un gene *housekeeping* sovraespresso in maniera ubiquitaria in tutte le tipologie di tumore e possiede un ruolo in proliferazione cellulare e formazione del tumore [182].
La via di segnalazione del rimodellamento delle giunzioni aderenti epiteliali è risultata down-regolata, con una diminuzione di tutte le proteine (RAB5C, VCL, TUBA4A, ACTN4, DNM2, ARPC5, ACTR2, ACTC1, RAB7A, TUBB6, TUBB4B, TUBA1B, ACTB e TUBB) a eccezione di CTNNA1 (Figura 24.a). Tali proteine sono relative ad actina e tubulina, pertanto un loro decremento suggerisce la distruzione della struttura interna della cellula portando a difetti del trasporto, indebolimento delle connessioni tra cellule, interferenza con la divisione cellulare ed effetto su

movimento delle cellule, migrazione e funzionalità in generale nelle cellule di PDAC. CTNNA1 possiede svariati ruoli in molte tipologie di tumore, influenzando processi quali sintesi delle giunzioni aderenti, trasduzione del segnale, crescita cellulare, differenziamento e metastasi [183]; una sua up-regolazione potrebbe dunque portare al rafforzamento delle connessioni tra cellule e alterare la comunicazione cellulare.

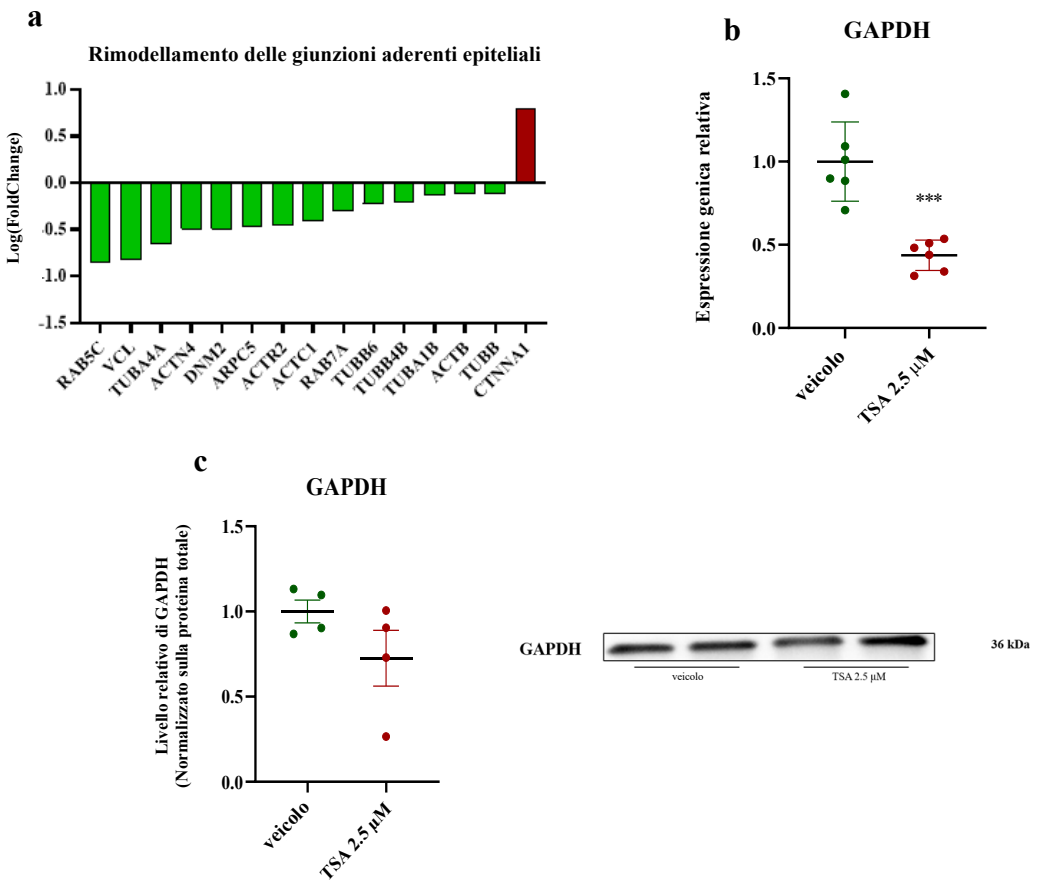


Figura 14 - Effetto della TSA su GAPDH e sui geni delle giunzioni aderenti epiteliali. a) il grafico mostra la variazione logaritmica media delle proteine coinvolte nel pathway. b) sono mostrati i livelli relativi dell'espressione genica di GAPDH nelle cellule PaCa44 trattate con tricostatina A alla concentrazione di 2.5 µM; i dati sono espressi come media ± sem di $n = 6$ replicati. *** $p < 0.0001$. c) risultati dell'analisi Western Blot effettuata su GAPDH sulle cellule PaCa44 trattate con TSA alla concentrazione di 2.5 µM; i risultati sono stati normalizzati utilizzando la normalizzazione totale delle proteine con Ponceau S.

4.3.6 Effetto su EMT e citoscheletro

Uno dei punti chiave di questa analisi è stata la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). La qRT-PCR non ha evidenziato nessun cambiamento nei livelli di mRNA di CDH1 (E-caderina) e una down-regolazione dell'mRNA di Zeb1 (Figura 25.a). Zeb1 è un repressore trascrizionale noto per indurre EMT, inoltre causa la formazione di lesioni pre-neoplastiche ed è coinvolto nella metastatizzazione del tumore pancreatico [184]; la riduzione a livello genetico di Zeb1 suggerisce quindi la soppressione dei tratti mesenchimali da parte delle cellule tumorali. A livello proteico,

l'analisi con Wester Blot ha mostrato la up-regolazione della E-caderina, senza alcuna regolazione differenziale della Vimentina (Figura 25.b).

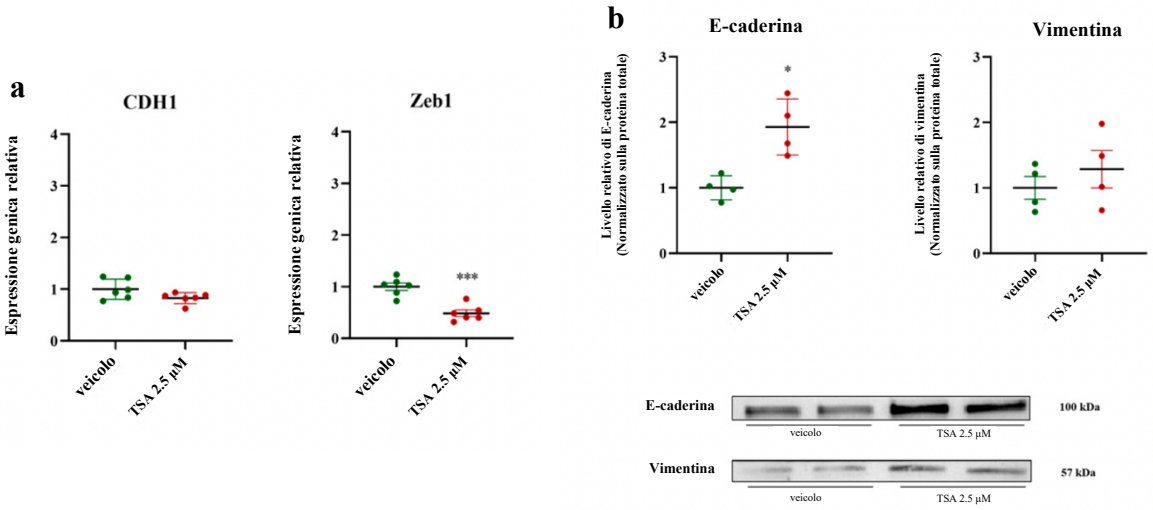


Figura 25 – Alterazione del processo di transizione epitelio-mesenchimale. a) analisi qRT-PCR dei marcatori della EMT CDH1 (E-caderina) e Zeb1 in cellule PaCa44 trattate con TSA alla concentrazione di 2.5 µM; i risultati sono espressi come media ± sem di $n = 6$ replicati. *** $p < 0.001$. b) analisi Western Blot di E-caderina (CDH1) e vimentina in cellule PaCa44 trattate con TSA alla concentrazione di 2.5 µM. I risultati sono stati normalizzati utilizzando la normalizzazione totale delle proteine con Ponceau S; i risultati sono espressi come media ± sem di $n = 4$ replicati. * $p < 0.05$.

L'analisi proteomica delle cellule esposte a microgravità simulata per 9 giorni ha mostrato una down-regolazione delle vie proteiche correlate alla regolazione della motilità basata sull'actina mediata da Rho. In particolare, la down-regolazione riguarda proteine coinvolte nelle dinamiche citoscheletriche come ACTB, ACTC1 e ACTR2, ma anche regolatori dell'actina (CFL1, PFN1 e ARPC5) e proteine della famiglia Rho come CDC42, RHOA e ITGB1; a queste si accompagna la up-regolazione di RHOC e HLA-DRB1 (Figura 26).

In ultimo è stata valutata l'espressione delle componenti del citoscheletro. I risultati del Western Blot hanno evidenziato la down-regolazione di α-tubulina e Vimentina, ma nessuna sostanziale variazione della β-actina rispetto al gruppo di controllo (Figura 27). La Vimentina è una proteina fondamentale al supporto dell'integrità meccanica del meccanismo migratorio della cellula in quanto genera una forza direzionale e regola le adesioni focali [185]; α-actina e β-tubulina rappresentano invece le unità fondamentali che compongono i microtubuli. L'analisi proteomica ha rivelato una forte down-regolazione delle proteine associate alla via di segnalazione di Cdc42: ACTR2, ARPC5, CDC42, CFL1, HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, ITGB1, MYL6 e PPP1CB (Figura 26); tale pathway facilita la trasformazione cellulare mediata da Ras, la tumorigenesi e la formazione di metastasi [186].

Nell'insieme questi risultati suggeriscono che il trattamento con la TSA altera la transizione epitelio-mesenchimale e l'organizzazione del citoscheletro, intaccando così l'abilità migratoria e invasiva delle cellule tumorali.

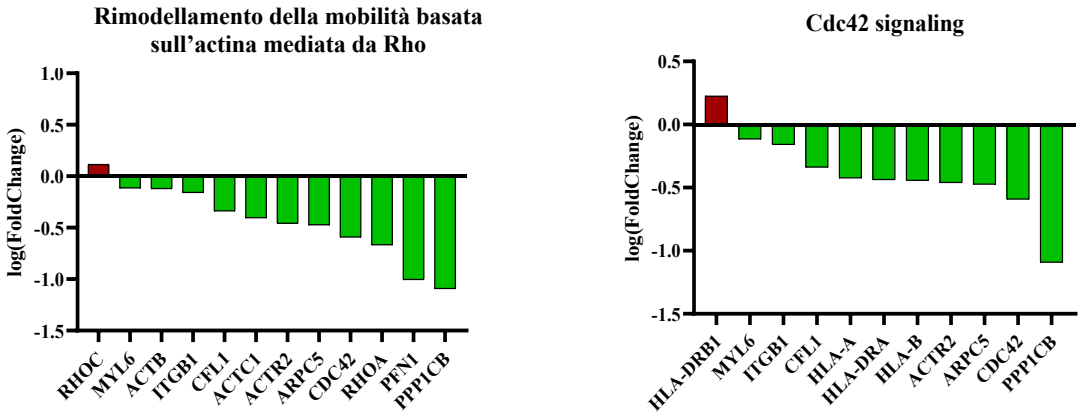


Figura 26 – Alterazione delle proteine legate alla motilità basata sull'actina mediata da Rho. Il grafico mostra la variazione logaritmica media delle proteine coinvolte nei pathway; in verde si osservano le proteine confrontate con il gruppo di controllo esposto a 9 giorni di microgravità simulata.

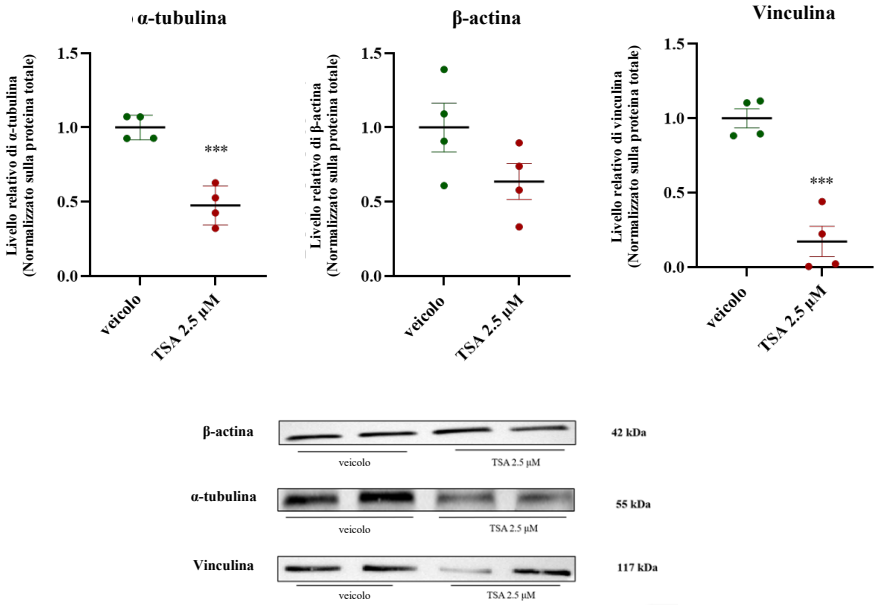


Figura 27 – Analisi Western Blot delle proteine del citoscheletro α-tubulina, β-actina e vinculina in cellule PaCa44 trattate con TSA alla concentrazione di 2.5 µM. I risultati sono stati normalizzati utilizzando la normalizzazione totale delle proteine con Ponceau S; i risultati sono espressi come media ± sem di $n = 4$ replicati. *** $p < 0.001$.

5. DISCUSSIONE

Il presente studio si è proposto di investigare gli effetti della tricostatina A su cellule di PDAC, in particolare PaCa44, coltivate sia in 2D che in 3D con la formazione di sferoidi: le successive analisi proteomiche hanno permesso di identificare i meccanismi molecolari della TSA in microgravità simulata.

I risultati hanno evidenziato come le cellule rispondano diversamente al trattamento con il farmaco in base alle condizioni di coltura, infatti la tricostatina A si è mostrata più citotossica nelle colture 2D e meno efficace sugli sferoidi: questo dimostra quanto il microambiente sia fondamentale nella valutazione dell'efficacia di un farmaco. Le colture monostrato sono esposte a superfici estremamente rigide che alterano non solo il comportamento delle cellule, ma anche espressione genica e sensibilità ai farmaci: fondamentale per la buona riuscita dei saggi di citotossicità è la corretta biosintesi degli enzimi che metabolizzano i farmaci, funzione compromessa nelle colture 2D. Le normali colture bidimensionali sono quindi una visione semplicistica che non replica la complessità architettonica di un tessuto tridimensionale, caratterizzato dalla continua comunicazione tra cellule tumorali e TME; i tumori solidi inoltre crescono in condizioni di ipossia, presentano cellule con caratteristiche staminali e mostrano crescita lenta: queste caratteristiche, tra le altre, contribuiscono alla resistenza ai farmaci e non sono presenti nelle colture monostrato [187]. Le colture cellulari tridimensionali quindi rappresentano un vantaggio in quanto mimano più fedelmente il complesso microambiente tumorale: questo include morfologia del tumore, up-regolazione delle proteine pro-angiogeniche, dispersione di fattori biologici e chimici, interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, gradiente di ossigeno e nutrienti e composizione più realistica della matrice extracellulare. Per quanto i modelli 3D stiano emergendo come strumenti utili nella ricerca sul cancro, non sono esenti da svantaggi: la complessità e l'eterogeneità dell'ambiente tridimensionale rende difficoltosa la riproducibilità e il mantenimento della coltura, inoltre i sistemi tridimensionali richiedono attrezzatura specifica e costosa; ulteriore limite è rappresentato dal rischio che i polimeri sintetici impiegati come *scaffold* possano rilasciare composti tossici, potenzialmente dannosi per le cellule [188].

Un precedente studio condotto da Masini et al. nel 2022 [167] ha dimostrato come la microgravità simulata impatti sulle cellule di adenocarcinoma pancreatico a livello di crescita cellulare, proliferazione e vie di segnale metaboliche, influenzando così il potenziale metastatico delle cellule. In particolare è noto che la microgravità simulata accelera la migrazione delle cellule tumorali innescando la transizione epitelio-mesenchimale, favorendo così il potenziale metastatico delle cellule [189, 190]. L'approccio con la tricostatina A, in quanto regolatore epigenetico che agisce sugli enzimi istone deacetilasi, rappresenta una potenziale strategia contro chemioresistenza e metastasi; gli HDACi però sono caratterizzati da scarsa farmacocinetica, limitata specificità, bassa

solubilità e permeabilità, hanno effetti tossici e possono causare resistenza tumorale mediante l'acquisizione di progressive mutazioni. Per questi motivi l'obbiettivo è quello di utilizzare i modulatori epigenetici, come la TSA, in combinazione con farmaci chemioterapici convenzionali o mediante nuove modalità di somministrazione in modo da renderli più efficaci e sensibilizzare nuovamente le cellule tumorali [191].

Per questo studio è stata utilizzata l'analisi SWATH-MS, una potente tecnologia proteomica che permette di identificare in maniera precisa le alterazioni specifiche all'interno di un panorama proteico complesso [192]; tramite questa metodologia è stato possibile evidenziare tutte le modificazioni significative dell'espressione proteica indotte dal trattamento con TSA in microgravità simulata. La tricostatina A ha agito influenzando apoptosi, citoscheletro, motilità e staminalità.

Le analisi hanno mostrato la down-regolazione di proteine associate ai checkpoint cellulari, ovvero PA2G4, SFN, YWAG e YWAQ. PA2G4 è ampiamente espresso nel PDAC ed è associato alla progressione del tumore: la down-regolazione causata dalla TSA porta all'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S in quanto viene meno la regolazione della ciclina D1 [193]. SFN, YWAG e YWAQ sono tre isoforme della famiglia proteica 14-3-3, ovvero proteine coinvolte nella regolazione della transizione tra le fasi G2/M e G1/S [194]; sono inoltre in comune nelle vie di segnalazione PI3K/AKT e ERK. È stato dimostrato che l'inibizione del *pathway* PI3K/AKT causa l'arresto della proliferazione e il blocco del ciclo cellulare in fase G1, in particolare nel tumore pancreatico tale meccanismo causa l'induzione dei fattori di trascrizione FOXO e l'inibizione dell'espressione della ciclina D1; meccanismo simile è associato all'inibizione della via di segnalazione di ERK [195, 196]. La down-regolazione coordinata di più membri della famiglia proteica 14-3-3, insieme a PA2G4, a seguito del trattamento con tricostatina A, alla concentrazione di 2.5 μM, compromette quindi la trasduzione dei segnali proliferativi di questi due *pathway*, contribuendo all'arresto del ciclo cellulare nelle fasi G1/S e G2/M.

L'effetto della tricostatina A si è mostrato evidente anche sulle dinamiche del citoscheletro e sulla mobilità cellulare, modificando direttamente i livelli di proteine regolatrici del citoscheletro (RHOA, RHOC e CDC42) e proteine strutturali ed effettrici dell'actina (ACTN4, EZR, MYH9, FLNB e FSCN1). Le proteine regolatrici del citoscheletro fanno parte della famiglia RHO, ovvero proteine che fungono da interruttori molecolari e che sono fondamentali per svariati processi cellulari tra cui l'organizzazione del citoscheletro. In particolare, RHOA permette la formazione delle fibre di stress e la polimerizzazione dell'actina, RHOC è legata a migrazione e invasione, mentre CDC42 è coinvolta nell'organizzazione dell'actina [197]. Tali proteine sono quindi fondamentali per l'attivazione delle proteine effettrici del citoscheletro, tra le quali FSCN1, ACTN4 e EZR sono di particolare importanza nel PDAC. FSCN1 è una proteina aggregatrice dell'actina che normalmente non è espressa nelle cellule epiteliali sane, bensì è associata alla progressione dei

tumori tra cui l'adenocarcinoma pancreatico duttale; la sua funzione è quella di promuovere la formazione dei filopodi, usati dalla cellula per muoversi e captare informazioni nel microambiente. Nel PDAC è stato dimostrato che FSCN1 è ampiamente espresso e accompagnato dall'espressione di fattori di trascrizione legati alla transizione epitelio-mesenchimale, dimostrando quindi la sua importanza in motilità cellulare e invasività del tumore [198]. ACTN4 è una delle isoforme della proteina α-actinina, che è particolarmente espressa nel tumore pancreatico; la sua funzione è quella di formare protrusioni quali filopodi e lamellipodi coinvolti nella migrazione cellulare e nella stimolazione di un fenotipo invasivo, infatti la sua inibizione porta, nell'adenocarcinoma pancreatico duttale, a significativi cambiamenti nella motilità cellulare [199, 200]. EZR, infine, modula l'interazione tra membrana e citoscheletro, regolando l'adesione tra le cellule e il loro movimento: la sua disfunzione è pertanto associata alla progressione del tumore fino alla formazione di metastasi [201]. A tal riguardo, il presente studio ha messo in luce anche la down-regolazione delle proteine coinvolte nell'adesione cellulare: ITGB1, LGALS3, LGALS3BP, SDCBP, PODXL e CDCP1. ITGB1 è un costituente dell'integrina, proteina plasmatica fondamentale per l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice, e quindi è correlato a infiltrazione e metastasi: nel PDAC è stato osservato come la sua up-regolazione sia correlata a prognosi infausta [202]. Le galectine, ovvero LGALS3 e LGALS3BP, sono proteine di membrana coinvolte nell'interazione cellula-cellule e cellula-matrice oltre che nella comunicazione tra cellula e stroma: nel PDAC sono necessarie per la progressione tumorale, invasività e proliferazione cellulare [203, 204]; anche PODXL è una proteina di membrana che nel PDAC è associata a prognosi sfavorevole in quanto essenziale per la metastatizzazione [205]. CDCP1 è fondamentale per comprendere la funzione e l'importanza di queste proteine, in quanto il suo scopo è quello di regolare le adesioni cellulari mediante il controllo, ad esempio, di ITGB1, influenzando la formazione di complessi attivi [206]. Considerate nel loro complesso, queste alterazioni suggeriscono che il trattamento con la tricostatina A sia in grado di determinare una perturbazione coordinata dei processi molecolari che regolano il citoscheletro, l'organizzazione dell'actina e le interazioni cellula-matrice: questo porta alla compromissione di processi cellulare fondamentali quali adesione, motilità e rimodellamento strutturale della cellula, con conseguente limitazione della crescita e proliferazione tumorale e del potenziale metastatico. È bene sottolineare che, nella regolazione della motilità basata sull'actina mediata da Rho, RHOC si è mostrata debolmente up-regolata: questo potrebbe far parte di un meccanismo compensatorio per il quale queste proteine, in virtù delle loro funzioni parzialmente ridondanti, attuano un meccanismo compensatorio volto a preservare almeno in parte la dinamica dell'actina [207]. Tale variazione risulta comunque insufficiente a controbilanciare l'alterazione dei processi di rimodellamento dell'actina indotta dalla tricostatina A.

Dall'analisi proteomica è emersa anche la down-regolazione di HSPA1A/HSPA1B, HSPA5 e SERPINH1, ovvero proteine di risposta allo stress. HSPA5 è una proteina *chaperone* espressa

principalmente nel reticolo endoplasmatico che svolge un ruolo chiave che protegge le cellule tumorali di PDAC dalla ferroptosi, ovvero una forma di morte cellulare programmata guidata dall'accumulo di ROS e ferro ma indipendente dall'attivazione delle caspasi. Precedenti studi condotti su cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale hanno dimostrato come l'acetilazione di HSPA5, e quindi un meccanismo coerente con il farmaco oggetto di questo studio, permette di rimuovere l'inibizione della ferroptosi portando alla morte cellulare [208, 209]. HSPA1A/HSPA1B sono anch'esse proteine *chaperone* appartenenti alla famiglia HSP70; vengono indotte in seguito a stress cellulare e partecipano al *folding* proteico, inoltre a livelli elevati promuovono la tumorigenesi [210]. Di particolare rilevanza è SERPINH1, proteina *chaperone* che gioca un ruolo fondamentale in biosintesi e assemblaggio del collagene: nel PDAC è particolarmente espressa a causa dello stroma desmoplastico caratteristico del tumore [211]. Tali proteine quindi appartengono a una rete di chaperoni coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi proteica e nella risposta allo stress: la riduzione dell'espressione osservata a seguito del trattamento con TSA suggerisce la compromissione di tali meccanismi, con conseguente diminuzione della crescita tumorale.

Ulteriore down-regolazione della tricostatina A è stata osservata sulle isoforme della tubulina (TUBA4A, TUBA1B, TUBB, TUBB4B e TUBB6) e sulle proteine relative all'actina (ACTN4, ARPC5, ACTR2, ACTC1 e ACTB), entrambi componenti fondamentali del citoscheletro: la variazione osservata suggerisce la compromissione di migrazione cellulare, invasività e interazione con il microambiente tumorale [212, 213].

Passando alla regolazione della transizione epitelio-mesenchimale, l'analisi con qRT-PCR ha evidenziato una diminuzione nei livelli di mRNA di Zeb1 ma nessun cambiamento di CDH1. La funzione principale di Zeb1 è quella di promuovere la EMT attraverso l'attivazione della trascrizione di geni mesenchimali, inoltre si lega alle regioni promotrici dei geni epiteliali come CDH1 per inibirne la trascrizione. In questo modo l'espressione di Zeb1 promuove la progressione tumorale sia attraverso il potenziamento della mobilità cellulare che con la modificazione del microambiente tumorale, così da facilitare migrazione e invasione [214]. Il gene CDH1 codifica per la proteina E-caderina, la cui perdita funzionale è uno degli eventi fondamentali che scatena l'invasione tumorale in quanto ha una funzione centrale nelle adesioni focali e, quindi, nell'adesione tra cellule [215]. Sebbene l'analisi dell'espressione genica non abbia evidenziato variazioni significative di CDH1, è stato osservata una up-regolazione della E-caderina a seguito delle analisi con Western Blot: questo potrebbe suggerire la presenza di modifiche post-trascrizionali o post-traduzionali, in quanto la disponibilità della E-caderina sulla membrana cellulare dipende anche da meccanismi di internalizzazione, riciclo e degradazione proteica che ne modulano i livelli indipendentemente dall'espressione dell'mRNA; questo può avvenire anche mediante la modificazione di repressori trascrizionali come ZEB1 [216-218]. L'analisi con Western Blot ha inoltre evidenziato che negli sferoidi di PaCa44 trattati con TSA non vi sono stati cambiamenti

nell'espressione della vimentina, un marker mesenchimale chiave nella EMT che ha lo scopo di protggere le cellule tumorali dagli stress meccanici dovuti al processo di metastatizzazione [185]. L'aumento della E-caderina e il livello invariato di vimentina suggeriscono una parziale transizione epitelio-mesenchimale, infatti le cellule tumorali possono presentare un fenotipo misto epiteliale e mesenchimale in cui entrambe le tipologie di markers coesistono: questo permetterebbe di mantenere caratteristiche come le adesioni cellula-cellula e il potenziale metastatico, permettendo alle cellule di muoversi come clusters e aumentare l'invasività del tumore [219]. Tale osservazione sulla vinculina non influisce comunque gli effetti anti-metastatici della TSA, che come illustrato ha un forte effetto sulla regolazione degli altri geni e markers coinvolti nella EMT. A sostegno di ciò, ulteriori analisi con Western Blot mostrano la diminuzione dell'espressione proteica di α-tubulina e vinculina, insieme a livelli invariati di β-actina: tali modificazioni confermano la riorganizzazione del citoscheletro che porta a minore motilità cellulare e riduzione del potenziale metastatico; questo avviene in virtù delle proprietà di queste due proteine. La vinculina è coinvolta nell'adesione cellula-cellula e cellula-matrice in quanto lega proteine correlate al citoscheletro quali α- e β-catenina e α-actinina, mentre la α-tubulina è uno dei due componenti strutturali dei microtubuli [220, 221]. Riassumendo, questi risultati nel complesso indicano come il trattamento con la tricostatina A sia in grado di indurre una quasi totale reversione della transizione epitelio-mesenchimale nelle cellule tumorali PaCa44, in particolare diminuendo l'espressione del fattore di trascrizione Zeb1, aumentando l'espressione della E-caderina e riorganizzando il citoscheletro mediante la riduzione di α-tubulina e vinculina. Tali modificazioni coordinate indicano un rafforzamento delle adesioni cellula-cellula e una compromissione della motilità e del potenziale invasivo, pur mantenendo marker mesenchimali come la vimentina: questo aspetto è coerente con uno stato ibrido epiteliale-mesenchimale, in cui le cellule conservano alcune capacità migratorie di gruppo ma risultano complessivamente meno invasive e più stabili nei contatti intercellulari. Di particolare interesse è stato inoltre osservare un rilevante aumento di CTNNA1 (α-catenina), che funge da adattatore tra membrana e citoscheletro collegando le giunzioni cellulari ai filamenti di actina [222]: questo aumento rappresenta un potenziale meccanismo compensatorio volto a mantenere i contatti tra le cellule nonostante le alterazioni del citoscheletro.

Per ultimo, l'analisi dell'espressione genica condotta con qRT-PCR ha permesso di osservare l'attivazione delle caspasi 3, 9 e 8, in particolare con up-regolazione delle prime due e down-regolazione dell'ultima. Con il rilascio di citocromo c da parte dei mitocondri si ha l'attivazione della caspasi-9 e quindi della via intrinseca dell'apoptosi, con conseguente attivazione della caspasi effettrice 3 che porta alla rottura del DNA e alla frammentazione della membrana; la via estrinseca è invece mediata dai recettori di morte che portano all'attivazione della caspasi-8. Un punto in comune tra le due vie è la proteina BID, codificata dal gene BAD, che una volta clivato dalla caspasi-8 trasloca nel mitocondrio inducendo il rilascio del citocromo c [223, 224]. La up-

regolazione delle caspasi 3 e 9 e di BAD suggerisce l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi, ma la down-regolazione della caspasi-8 potrebbe indicare l'esclusione della via estrinseca; tali risultati suggeriscono che il trattamento con TSA promuove l'attivazione della cascata mitocondriale, con conseguente attivazione della caspasi esecutrice e predisposizione della cellula alla morte programmata.

In conclusione, le cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale PaCa44 esposte a 9 giorni di microgravità simulata e trattate con tricostatina A alla concentrazione di 2.5 μM hanno mostrato la modulazione simultanea dei pathway di proliferazione, della riorganizzazione del citoscheletro, dell'adesione cellulare e dell'apoptosi. In particolare la riduzione dei marcatori associati a motilità cellulare e alla transizione epitelio-mesenchimale, insieme all'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi, suggerisce come l'inibizione degli enzimi istone deacetilasi possa contribuire a limitare la progressione tumorale attraverso il blocco della proliferazione cellulare, la limitazione del potenziale invasivo, l'induzione dell'apoptosi e la riorganizzazione del citoscheletro.

6. CONCLUSIONI

L'analisi proteomica condotta nell'ambito del presente studio ha permesso di mettere in luce, almeno in parte, la complessa risposta che le cellule di PDAC esposte alla microgravità simulata hanno verso la tricostatina A; tali risposte hanno coinvolto l'alterazione delle dinamiche del citoscheletro, delle adesioni cellulari e delle vie di segnalazione.

Complessivamente i risultati contribuiscono ad ampliare la comprensione degli effetti anti-tumorali che la TSA induce modificando i meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare del PDAC; si sono messi inoltre in evidenza proteine e pathway di potenziale interesse biologico. Saranno sicuramente necessari ulteriori studi volti non solo alla valutazione funzionale delle proteine identificate, specialmente per quanto riguarda le vie di segnalazione dell'apoptosi, ma anche al chiarimento di come la microgravità simulata influenza l'acetilazione degli istoni e la conseguente espressione genica. Necessario è anche indagare gli effetti sinergici della microgravità simulata e della TSA con i regimi chemioterapici già in uso come terapia per il PDAC in modo da migliorare gli esiti della malattia. Il punto di forza di questo studio è quello di evidenziare l'importanza della comprensione degli effetti che la microgravità ha sulle cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale, in modo da sviluppare approcci terapeutici innovativi per contrastare metastatizzazione e resistenza ai farmaci.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Van Hoe, L.; Claikens, B. The Pancreas: Normal Radiological Anatomy and Variants. In *Radiology of the Pancreas*; Springer-Verlag, **1999**.

[2] Bockman, D. E. Anatomy of the Pancreas. In *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*, Second Edition. Raven Press, New York, **1993**.

[3] Ateia, H. M. E.; Ahmed, S. M. A.; Abdelrahman, S. A.; Reda, S. M. Pancreas: Anatomy, Histology and Physiology. *Zagazig University Medical Journal* **2024**, *31* (1), 70–75. DOI:10.21608/zumj.2024.327569.3631.

[4] Mahadevan, V. Anatomy of the Pancreas and Spleen. *Surgery* **2019**, *37* (6), 297–301. DOI:10.1016/j.mpsur.2019.04.008.

[5] Longnecker, D. Anatomy and Histology of the Pancreas. *The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base* **2014**. DOI:10.3998/panc.2014.3.

[6] Young, B.; Woodford, P.; O'Dowd, G. Wheater's Function Histology, 6th ed.; Elsevier, **2014**

[7] Pandol, S. J. The Exocrine Pancreas; Morgan & Claypool Life Sciences, **2011**.

[8] Mingxiang, H. Mechanism of Islet of Langherans in Pancreas. *Biology and Medicine* **2022**, *14* (1). DOI:10.35248/ 0974-8369.22.14.466.

[9] Liddle, R. A. Regulation of Pancreatic Secretion. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*; Academic Press, **2018**; pp 895–929.

[10] Ro, C.; Chai, W.; Yu, V. E.; Yu, R. Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Biology, Diagnosis, and Treatment. *Chinese Journal of Cancer* **2013**, *32* (6), 312–324. DOI:10.5732/cjc.012.10295.

[11] WHO. Endocrine and Neuroendocrine Tumours. In *WHO Classification of Tumours*; World Health Organization, **2025**; pp 295–331.

[12] Andrés-Sánchez, N.; Fisher, D.; Krasinska, L. Physiological Functions and Roles in Cancer of the Proliferation Marker Ki-67. *Journal of Cell Science* **2022**, *135* (11). DOI:10.1242/jcs.258932.

[13] Kato, T. A.; Haskins , J. S. Mitotic Index Analysis. *Methods in Molecular Biology* **2023**, 2519. DOI:10.1007/978-1-0716-2433-3_3.

[14] Guilmette, J. M.; Nosé, V. Neoplasms of the Neuroendocrine Pancreas: An Update in the Classification, Definition, and Molecular Genetic Advances. *Advances in Anatomic Pathology* **2019**, *26* (1), 13–30. DOI:10.1097/PAP.0000000000000201.

[15] McKenna, L. R.; Edil, B. H. Update on Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Gland Surgery* **2014**, *3* (4), 258–275. DOI:10.3978/j.issn.2227-684X.2014.06.03.

[16] Klöppel, G.; Klimstra, D. S.; Hruban, R. H.; Adsay, V.; Capella, C.; Couvelard, A.; Komminoth, P.; La Rosa, S.; Ohike, N.; Osamura, R. Y.; Perren, A.; Scoazec, J.-Y.; Rindi, G. Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Update on the New World Health Organization Classification. *American Journal of Surgical Pathology: Reviews and Reports* **2017**, *22* (5), 233–239. DOI:10.1097/PCR.0000000000000211.

[17] Luchini, C.; Grillo, F.; Fassan, M.; Vanoli, A.; Capelli, P.; Paolino, G.; Ingravallo, G.; Renzulli, G.; Doglioni, C.; D'Amuri, A.; Mattiolo, P.; Pecori, S.; Parente, P.; Flora, A. M.; Zamboni, G.; Scarpa, A. Malignant Epithelial/Exocrine Tumors of the Pancreas. *Pathologica* **2020**, *112*, 210–226. DOI:10.32074/1591-951X-167.

[18] Sung, H.; Ferlay, J.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal for Clinicians* **2021**. DOI:10.3322/caac.21660.

[19] Mostafa, M. E.; Erbarut-Seven, I.; Pehlivanoglu, B.; Adsay, V. Pathologic Classification of "Pancreatic Cancers": Current Concepts and Challenges. *Chinese Clinical Oncology* **2017**, *6* (6). DOI:10.21037/cco.2017.12.01.

[20] Simone, C. G.; Zuluaga Toro, T.; Chan, E.; Feely, M. M.; Trevino, J. G.; George, T. J. Characteristics and Outcomes of Adenosquamous Carcinoma of the Pancreas. *Gastrointestinal Cancer Research* **2013**, *6* (3), 75–79.

[21] Muraki, T.; Reid, M. D.; Basturk, O.; Jang, K.-T.; Bedolla, G.; Bagci, P.; Mittal, P.; Memis, B.; Katabi, N.; Bandyopadhyay, S.; Sarmiento, J. M.; Krasinskas, A.; Klimstra, D. S.; Adsay, V. Undifferentiated Carcinoma With Osteoclastic Giant Cells of the Pancreas: Clinicopathologic Analysis of 38 Cases Highlights a More Protracted Clinical Course Than Currently Appreciated. *American Journal of Surgical Pathology* **2016**, *40* (9), 1203–1216. DOI:10.1097/PAS.0000000000000689.

[22] La Rosa, S.; Sessa, F.; Capella, C. Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: Overview of Clinicopathologic Features and Insights Into the Molecular Pathology. *Frontiers in Medicine* **2015**, *2* (41). DOI:10.3389/fmed.2015.00041.

[23] Lubezky, M.; Papoulas, M.; Lessing, Y.; Gitstein, G.; Brazowski, E.; Nachmany, I.; Lahat, G.; Goykhman, Y.; Ben-Yehuda, A.; Nakache, R.; Klausner, J. M. Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas: Management and Long-Term Outcome. *Journal of Cancer Surgery* **2017**, *43*, 1056–1060. DOI:10.1016/j.ejso.2017.02.001.

[24] Hidalgo, M. Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **2010**, 362, 1605–1617. DOI:10.1056/NEJMra0901557.

[25] Siegel, R. L.; Kratzer, T. B.; Giaquinto, A. N.; Sung, H.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2025. *Cancer Journal for Clinicians* **2025**, *75*, 10–45. DOI:10.3322/caac.21871.

[26] Mizrahi, J. D.; Surana, R.; Valle, J. W.; Shroff, R. T. Pancreatic Cancer. *Lancet* **2020**, *395*, 2008–2020. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30974-0.

[27] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM); Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM); Fondazione AIOM; Istituto Superiore di Sanità; Osservatorio Nazionale Screening; Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica (SIAPEC-IAP). *I Numeri Del Cancro in Italia 2025*; Intermedia Editore, **2025**.

[28] Wood, L. D.; Yurgelun, M. B.; Goggins, M. G. Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 2041–2055. DOI:10.1053/j.gastro.2018.12.039.

[29] Mack, S.; Koessler, T.; Bichard, P.; Frossard, J.-L. Pancreatic Cancer: Epidemiology, Risk Factor, and Prevention. *Onco* **2025**, *5* (37). DOI:10.3390/onco5030037.

[30] Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D. T.; Petersen, G.; Bracci, P. M.; Ji, B. T.; Negri, E.; Li, D.; Risch, H. A.; Olson, S. H.; Gallinger, S.; Miller, A. B.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Talamini, R.; Polesel, J.; Ghadirian, P.; Baghurst, P. A.; Zatonski, W.; Fontham, E.; Bamlet, W. R.; Holly, E. A.; Bertuccio, P.; Gao, Y. T.; Hassan, M.; Yu, H.; Kurtz, R. C.; Cotterchio, M.; Su, J.; Maisonneuve, P.; Duell, E. J.; Boffetta, P.; La Vecchia, C. Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer: An Analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PANC4). *Annals of Oncology* **2012**, *23* (7), 1880–1888. DOI:10.1093/annonc/mdr541.

[31] Klein, A. P. Pancreatic Cancer Epidemiology: Understanding the Role of Lifestyle and Inherited Factors. *Gastroenterology and Hepatology* **2021**, *18*, 493–502. DOI:10.1038/ s41575-021-00457- x.

[32] Michaud, D. S. Obesity and Pancreatic Cancer. *Recent Results in Cancer Research* **2016**, *208*, 95–105. DOI:10.1007/978-3-319-42542-9_6.

[33] Lucenteforte, E.; La Vecchia, C.; Silverman, D.; Petersen, G. M.; Bracci, P. M.; Ji, B. T.; Bosetti, C.; Li, D.; Gallinger, S.; Miller, A. B.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Talamini, R.; Polesel, J.; Ghadirian, P.; Baghurst, P. A.; Zatonski, W.; Fontham, E.; Bamlet, W. R.; Holly, E. A.; Gao, Y. T.; Negri, E.; Hassan, M.; Cotterchio, M.; Su, J.; Maisonneuve, P.; Boffetta, P.; Duell, E. J. Alcohol Consumption and Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis in the International Pancreatic Cancer Case–Control Consortium (PANC4). *Annals of Oncology* **2012**, *23* (2), 374–382. DOI:10.1093/annonc/mdr120.

[34] Duell, E. J.; Lucenteforte, E.; Olson, S. H.; Bracci, P. M.; Li, D.; Risch, H. A.; Silverman, D. T.; Ji, B. T.; Gallinger, S.; Holly, E. A.; Fontham, E. H.; Maisonneuve, P.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Ghadirian, P.; Kurtz, R. C.; Ludwig, E.; Yu, H.; Lowenfels, A. B.; Seminara, D.; Petersen, G. M.; La Vecchia, C.; Boffetta, P. Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control

Consortium (PANC4). *Annals of Oncology* **2012**, *23* (11), 2964–2970. DOI:10.1093/annonc/mds140.

[35] Pedro, B. A.; Wood, L. D. Early Neoplastic Lesions of the Pancreas: Initiation, Progression, and Opportunities for Precancer Interception. *The Journal of Clinical Investigation* **2025**, *135* (14). DOI:10.1172/JCI191937.

[36] Ren, B.; Liu, X.; Suriawinata, A. A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions. Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *The American Journal of Pathology* **2019**, *189* (1), 9–21. DOI:10.1016/j.ajpath.2018.10.004.

[37] Zamboni, G.; Hirabayashi, K.; Castelli, P.; Lennon, A. M. Precancerous Lesions of the Pancreas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2013**, *27*, 299–322. DOI:10.1016/j.bpg.2013.04.001.

[38] Kim, J. Y.; Hong, S.-M. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncology Research and Treatment* **2018**, *41*, 603–610. DOI:10.1159/000493554.

[39] Strous, G. J.; Dekker, J. Mucin-Type Glycoproteins . *Critical Reviews in Biochemestry and Molecular Biology* **1992**, *27*(1/2), 57–92. DOI:10.3109/10409239209082559.

[40] Wood, L. D.; Hruban, R. H. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *The Cancer Journal* **2012**, *18*(6), 492–501. DOI:10.1097/PPO.0b013e31827459b6.

[41] Ahmad, M.; Maegawa, F. B.; De La Rosa, E.; Davis, B.; Tyroch, A.; Konstantinidis, I. T. Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas in the Modern Era. Experience with 707 Patients. *The American Journal of Surgery* **2020**. DOI:10.1016/j.amjsurg.2020.09.006.

[42] Xie, W.; Huaiyu, L.; Yan, G.; Shu-Yuan, X. Update on Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas: A Narrative Review. *Journal of Pancreatology* **2021**, *4* (3), 115–121. DOI:10.1097/JP9.0000000000000074.

[43] Kearney, J. F.; Adsay, V.; Yeh, J. J. Pathology and Molecular Characteristics of Pancreatic Cancer. *urgical Oncology Clinics of North America* **2021**, *30* (4), 609–619. DOI:10.1016/j.soc.2021.06.003.

[44] Bujanda, L.; Herreros-Villanueva, M. Pancreatic Cancer in Lynch Syndrome Patients. *Journal of Cancer* **2017**, *8* (18), 3667–3674. DOI:10.7150/jca.20750.

[45] Salem, M. E.; Bodor, J. N.; Puccini, A.; Xiu, J.; Goldberg, R. M.; Grothey, A.; Korn, W. M.; Shields, A. F.; Worrilow, W. M.; Kim, E. S.; Lenz, H.-J.; Marshall, J. L.; Hall, M. J. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 Gene Specific Alterations and Tumor Mutational Burden (TMB) in 1,057 Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *International Journal of Cancer* **2020**, *147* (10), 2948–2956. DOI:10.1002/ijc.33115.

[46] Hanenberg, H.; Andreassen, P. R. PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* **2018**, *22* (12), 484–490. DOI:10.4267/2042/69016.

[47] Trzpis, M.; McLaughlin, P. M. J.; Leij, L. M. F. H.; Harmsen, M. C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *The American Journal of Pathology* **2007**, *171* (2), 386–395. DOI:10.2353/ajpath.2007.070152.

[48] Badheeb, M.; Abdelrahim, A.; Esmail, A.; Umoru, G.; Abboud, K.; Al-Najjar, E.; Rasheed, G.; Alkhulaifawi, M.; Abudayyeh, A.; Abdelrahim, M. Pancreatic Tumorigenesis: Precursors, Genetic Risk Factors and Screening. *Current Oncology* **2022**, *29*, 8693–8719. DOI:10.3390/curroncol29110686.

[49] Yee, N. S.; Furth, E. E.; Pack, M. Clinicopathologic and Molecular Features of Pancreatic Adenocarcinoma Associated with Peutz-Jeghers Syndrome. *Cancer Biology & Therapy* **2003**, *2* (1), 38–47. DOI:10.4161/cbt.191.

[50] Abe, K.; Kitago, M.; Kobayashi, Y.; Masuda, K.; Seki, T.; Yamada, M.; Goto, Y.; Ono, I.; Misu, K.; Nakamura, K.; Kitagawa, Y. Pancreatic Cancer in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Is Early Detection Possible? *The Keio Journal of Medicine* **2025**, *74* (3), 146–150. DOI:10.2302/kjm.2024-0018-OA.

[51] Yoshida, R. Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC): Review of Its Molecular Characteristics, Screening, Treatment, and Prognosis. *Breast Cancer* **2021**, *28*, 1167–1180. DOI:0.1007/s12282-020-01148-2.

[52] Kasuga, A.; Okamoto, T.; Udagawa, S.; Mori, C.; Mie, T.; Furukawa, T.; Yamada, Y.; Takeda, T.; Matsuyama, M.; Sasaki, T.; Ozaka, M.; Ueki , A.; Sasahira, N. Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *25*. DOI:10.3390/ijms23031205.

[53] Le Cosquer, G.; Maulat, C.; Bournet, B.; Cordelier, P.; Buscail, E.; Buscail, L. Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis: Pathogenesis and Diagnostic Approach. *Cancers* **2023**, *15* (3). DOI:10.3390/cancers15030761.

[54] Weiss, F. U. Pancreatic Cancer Risk in Hereditary Pancreatitis. *Frontiers in Physiology* **2014**, *5* (70). DOI:10.3389/fphys.2014.00070.

[55] Wang, Q.-W.; Zou, W.-B.; Masson, E.; Férec, C.; Liao, Z.; Chen, J.-M. Genetics and Clinical Implications of SPINK1 in the Pancreatitis Continuum and Pancreatic Cancer. *Human Genomics* **2025**, *19* (32). DOI:10.1186/s40246-025-00740-x.

[56] Knowles, M. R.; Durie, P. R. What Is Cystic Fibrosis? *New England Journal of Medicine* **2002**, *347* (6), 439–442. DOI:10.1056/nejme020070.

[57] Patel, N. J.; Chen, Q.; Luong, T. Q.; Wu, B. U. Risk of Pancreatic Cancer in Cystic Fibrosis and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Germline Variants: A Retrospective Cohort Study. *Clinical and Translational Gastroenterology* **2025**, *16*. DOI:10.14309/ctg.0000000000000857.

[58] Ooi, C. Y.; Durie, P. R. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene Mutations in Pancreatitis. *Journal of Cystic Fibrosis* **2012**, *11* (5), 355–362. DOI:10.1016/j.jcf.2012.05.001.

[59] Cowan, R. W.; Maitra, A. Genetic Progression of Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal* **2014**, *20* (1), 80–84. DOI:0.1097/PPO.0000000000000011.

[60] Luo, J. KRAS Mutation in Pancreatic Cancer. *Seminars in Oncology* **2022**, *48* (1), 10–18. DOI:10.1053/j.seminoncol.2021.02.003.

[61] Eser, S.; Schnieke, A.; Schneider, G.; Saur, D. Oncogenic KRAS Signalling in Pancreatic Cancer. *British Journal of Cancer* **2014**, *111*, 817–822. DOI:10.1038/bjc.2014.215.

[62] Adamopoulos, C.; Delle Cave, D.; Papavassiliou, A. G. Inhibition of the RAF/MEK/ERK Signaling Cascade in Pancreatic Cancer: Recent Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25*(1631). DOI:10.3390/ijms25031631 .

[63] Yang, K.; Li, Y.; Lian, G.; Lin, H.; Shang , C.; Zeng, L.; Chen, S.; Li, J.; Huang, C.; Huang, K.; Chen, Y. KRAS Promotes Tumor Metastasis and Chemoresistance by Repressing RKIP via the MAPK–ERK Pathway in Pancreatic Cancer. *International Journal of Cancer* **2018**, *142*, 2323–2334. DOI:10.1002/ijc.31248.

[64] Murthy, D.; Attri, K. S.; Singh, P. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and Therapeutics. *Frontiers in Physiology* **2018**, *9* (335). DOI:10.3389/fphys.2018.00335.

[65] Donninger, H.; Ferrill, R.; von Baby, B.; Hobbing, K. R.; Dean, W. L.; Miriyala, N.; Jigo, R.; Burlison, J.; Trent, J. O.; Monsen, R.; Clark, G. J. RALGEF Inhibitors Suppress RAS-Driven Pancreatic Cancer and Metastasis. *Journal of Biological Chemistry* **2025**, *301* (12). DOI:10.1016/j.jbc.2025.110809.

[66] Zhang, Z.; Zhang, H.; Liao, X.; Tsai, H.-I. KRAS Mutation: The Booster of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Transformation and Progression. *Froentier in Cell and Developmental Biology* **2023**, *11* (1147676). DOI:10.3389/fcell.2023.1147676.

[67] Liu, Y.-H.; Hu, C.-M.; Hsu, Y.-S.; Lee, W.-H. Interplays of Glucose Metabolism and KRAS Mutation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Death and Disease* **2022**, *13* (817). DOI:10.1038/s41419-022-05259-w.

[68] Son, J.; Lyssiotis, C. A.; Ying, H.; Wang, X.; Hua, S.; Ligorio, M.; Perera, R. M.; Ferrone, C. R.; Mullarky, E.; Shyh-Chang, N.; Kang, Y.; Fleming, J. B.; Bardeesy, N.; Asara, J. M.;

Haigis, M. C.; DePinho, R. A.; Cantley, L. C.; Kimmelman, A. C. Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway. *Nature* **2013**, *496* (7443), 101–105. DOI:10.1038/nature12040.

[69] Danishevich, A.; Bilyalov, A.; Nikolaev, S.; Khalikov, N.; Isaeva, D.; Levina, Y.; Makarova, M.; Nemtsova, M.; Chernevskiy, D.; Sagaydak, O.; Baranova, E.; Vorontsova, M.; Byakhova, M.; Semenova, A.; Galkin, V.; Khatkov, I.; Gadzhieva, S.; Bodunova, N. CDKN2A Gene Mutations: Implications for Hereditary Cancer Syndromes. *Biomedicines* **2023**, *11* (3343). DOI:10.3390/biomedicines11123343.

[70] Shalaby, A.; Sadri, N.; Xue, Y. Molecular Pathology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **2025**, *17* (21). DOI:10.3390/cancers17213549.

[71] Stefanoudakis, D.; Frountzas, M.; Schizas, D.; Michalopoulos, N. V.; Drakaki, A.; Toutouzas, K. G. Significance of TP53, CDKN2A, SMAD4 and KRAS in Pancreatic Cancer. *Current Issues in Molecular Biology* **2024**, *46*, 2827–2844. DOI:10.3390/cimb46040177.

[72] Wu, C.; Yang, P.; Liu, B.; Tang, Y. Is There a CDKN2A-Centric Network in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma? *OncoTargets and Therapy* **2020**, *13*, 2551–2562. DOI:10.2147/ott.s232464.

[73] Grant, T. J.; Hua, K.; Singh, A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **2016**, *144*, 241–275. DOI:10.1016/bs.pmbts.2016.09.008.

[74] Voutsadakis, I. A. Mutations of P53 Associated with Pancreatic Cancer and Therapeutic Implications. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* **2021**, *25* (3), 315–327. DOI:10.14701/ahbps.2021.25.3.315.

[75] Xia, X.; Wu, W.; Huang, C.; Cen, G.; Jiang, T.; Cao, J.; Huang, K.; Qiu, Z. SMAD4 and Its Role in Pancreatic Cancer. *Tumor Biology* **2014**, *36* (1), 111–119. DOI:10.1007/s13277-014-2883-z.

[76] Zhao, M.; Mishra, L.; Deng, C.-X. The Role of TGF-β/SMAD4 Signaling in Cancer. *International Journal of Biological Sciences* **2018**, *14* (2), 111–123. DOI:10.7150/ijbs.23230.

[77] van Vliet, J.; Oates, N. A.; Whitelaw, E. Epigenetic Mechanisms in the Context of Complex Diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2007**, *64*, 1531–1538. DOI:10.1007/s00018-007-6526-z.

[78] Montalvo-Javé, E. E.; Nuño-Lámbarri, N.; Nahúm López-Sánchez, G.; Ayala-Moreno, E. A.; Gutierrez-Reyes, G.; Beane, J.; Pawlik, T. M. Pancreatic Cancer: Genetic Conditions and Epigenetic Alterations. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **2023**, *27*, 1001–1010. DOI:10.1007/s11605-022-05553-0.

[79] Pandey, S.; Gupta, V. K.; Lavania, S. P. Role of Epigenetics in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Epigenomics* **2023**, *15*(2), 89–110. DOI:10.2217/epi-2022-0177.

[80] Krauß, L.; Schneider, C.; Hessmann, E.; Saur, D.; Schneider, G. Epigenetic Control of Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **2023**, *42* (4), 1113–1131. DOI:10.1007/s10555-023-10132-z.

[81] Truong, L.-H.; Pauklin, S. Pancreatic Cancer Microenvironment and Cellular Composition: Current Understandings and Therapeutic Approaches. *Cancers* **2021**, *13* (19), 5028. DOI:10.3390/cancers13195028.

[82] Weber, C. E.; Kuo, P. C. The Tumor Microenvironment. *Surgical Oncology* **2012**, *21* (3), 172–177. DOI:10.1016/j.suronc.2011.09.001.

[83] Ribeiro Franco, P. I.; Rodrigues, A. P.; de Menezes, L. B.; Pacheco Miguel, M. Tumor Microenvironment Components: Allies of Cancer Progression. *Pathology, Research and Practice* **2020**, *216* (1), 152729. DOI:10.1016/j.prp.2019.152729.

[84] Zhang, Q.; Wang, Y.; Liu, F. Cancer-Associated Fibroblasts: Versatile Mediators in Remodeling the Tumor Microenvironment. *Cellular Signalling* **2023**, *103*, 110567. DOI:10.1016/j.cellsig.2022.110567.

[85] Brassart-Pasco, S.; Brézillon, S.; Brassart, B.; Ramont, L.; Oudart, J.-B.; Monboisse, J. C. Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*. DOI:10.3389/fonc.2020.00397.

[86] Mahadevan, D.; Von Hoff, D. D. Tumor-Stroma Interactions in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, *6* (4), 1186–1197. DOI:10.1158/1535-7163.mct-06-0686.

[87] Vaz, J.; Ansari, D.; Sasor, A.; Andersson, R. SPARC: A Potential Prognostic and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2015**, *44* (7), 1024–1035. DOI:10.1097/mpa.0000000000000409.

[88] Yamashita, K.; Kumamoto, Y. CAFs-Associated Genes (CAFGs) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) and Novel Therapeutic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25* (11), 6003. DOI:10.3390/ijms25116003.

[89] Zhu, Y.-H.; Zheng, J.-H.; Jia, Q.-Y.; Duan, Z.-H.; Yao, H.-F.; Yang, J.; Sun, Y.-W.; Jiang, S.-H.; Liu, D.-J.; Huo, Y.-M. Immunosuppression, Immune Escape, and Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Focused on the Tumor Microenvironment. *Cellular Oncology* **2022**, *46* (1), 17–48. DOI:10.1007/s13402-022-00741-1.

[90] Huber, M.; Brehm, C. U.; Gress, T. M.; Buchholz, M.; Alashkar Alhamwe, B.; von Strandmann, E.; Slater, E. P.; Bartsch, J. W.; Bauer, C.; Lauth, M. The Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (19), 7307. DOI:10.3390/ijms21197307.

[91] Kolbeinsson, H. M.; Chandana, S.; Wright, G. P.; Chung, M. Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of Investigative Surgery* **2022**, *36* (1). DOI:10.1080/08941939.2022.2129884.

[92] Wei, K.; Hackert, T. Surgical Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13* (8), 1971. DOI:10.3390/cancers13081971.

[93] Springfeld, C.; Jäger, D.; Büchler, M. W.; Strobel, O.; Hackert, T.; Palmer, D. H.; Neoptolemos, J. P. Chemotherapy for Pancreatic Cancer. *La Presse Médicale* **2019**, *48* (3). DOI:10.1016/j.lpm.2019.02.025.

[94] Kerr, D. J.; Haller, D.; Verweij, J. Principles of Chemotherapy. In *Oxford Textbook of Cancer Biology*; Oxford University Press, 2019; pp 413–422.

[95] Oettle, H.; Neuhaus, P.; Hochhaus, A.; Hartmann, J. T.; Gellert, K.; Ridwelski, K.; Niedergethmann, M.; Zülke, C.; Fahlke, J.; Arning, M. B.; Sinn, M.; Hinke, A.; Riess, H. Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine and Long-Term Outcomes among Patients with Resected Pancreatic Cancer. *JAMA* **2013**, *310* (14), 1473. DOI:10.1001/jama.2013.279201.

[96] Palmer, D. H.; Jackson, R.; Springfeld, C.; Ghaneh, P.; Rawcliffe, C.; Halloran, C. M.; Faluyi, O.; Cunningham, D.; Wadsley, J.; Darby, S.; Meyer, T.; Gillmore, R.; Lind, P.; Glimelius, B.; Falk, S.; Ma, Y. T.; Middleton, G. W.; Cummins, S.; Ross, P. J.; Wasan, H.; McDonald, A.; Crosby, T.; Hammel, P.; Borg, D.; Sothi, S.; Valle, J. W.; Mehrabi, A.; Bailey, P.; Tjaden, C.; Michalski, C.; Hackert, T.; Büchler, M. W.; Neoptolemos, J. P. Pancreatic Adenocarcinoma: Long-Term Outcomes of Adjuvant Therapy in the Espac4 Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2024**. DOI:10.1200/jco.24.01118.

[97] Conroy, T.; Castan, F.; Lopez, A.; Turpin, A.; Ben Abdelghani, M.; Wei, A. C.; Mitry, E.; Biagi, J. J.; Evesque, L.; Artru, P.; Lecomte, T.; Assenat, E.; Bauguion, L.; Ychou, M.; Bouché, O.; Monard, L.; Lambert, A.; Hammel, P.; Francois, E.; Ramee, J.-F.; Castanie, H.; Pracht, M.; Ghiringhelli, F.; Maillard, E.; Couffon, C.; Volet, J.; Bourgeois, V.; Chauvenet, M.; Blanc, J.-F.; Péré-Vergé, D.; De La Fouchardiere, C.; Adenis, A.; El Hajbi, F.; Bennouna, J.; Texereau, P.; Faroux, R.; Miglianico, L.; Platini, C.; Legoux, J.-L.; Caroli-Bosc, F.-X.; Bouhier-Leporrier, K.; Gagnaire, A.; Granger, V.; Lebrun-Ly, V.; Guimbaud, R.; Touchefeu, Y.; Gasmi, M.; Di Fiore, F.; Seitz, J. F.; Etienne, P.-L.; Ligeza Poisson, C.; Rinaldi, Y.; Baba-Hamed, N.; Bachet, J. B.; Aparicio, T.; Chone, L.; Guillet, M.; Forestier, J.; Terrebonne, E.; Hebbar, M.; Breysacher, G.; Andre, T.; Khemissa-Akouz, F.; Hautefeuille, V.; Guerin-Meyer, V.; Hartwig, J.; Becouarn, Y.; Malka, D.; Louvet, C.; Raoul, J.-L.; Cany, L.; Juzina, B.; Jouffroy, C.; Gourgou, S.; Rassouli, M.; Chalchal, H.; Renouf, D.; Wong, R.; Lemay, F.; Aubin, F.; Couture, F.; Mc Whirter, E.; Welch, S.; Kavan, P.; Findlay, B.; Cripps, C.; Cano, P.; Ahmed, S.; Harb, M.; Pressnail, B.; Dowden, S.;

O'Callaghan, C. Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *JAMA Oncology* **2022**, *8* (11), 1571. DOI:10.1001/jamaoncol.2022.3829.

[98] Varzaru, B.; Iacob, R. A.; Croitoru, A. E.; Iacob, S. M.; Radu, C. E.; Dumitrescu, S. M.; Gheorghe, C. Real-Life Results of Palliative Chemotherapy in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **2023**, *15* (13), 3500. DOI:10.3390/cancers15133500.

[99] de Sousa Cavalcante, L.; Monteiro, G. Gemcitabine: Metabolism and Molecular Mechanisms of Action, Sensitivity and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *European Journal of Pharmacology* **2014**, *741*, 8–16. DOI:10.1016/j.ejphar.2014.07.041.

[100] Conroy, T.; Hammel, P.; Hebbar, M.; Ben Abdelghani, M.; Wei, A. C.; Raoul, J.-L.; Choné, L.; Francois, E.; Artru, P.; Biagi, J. J.; Lecomte, T.; Assenat, E.; Faroux, R.; Ychou, M.; Volet, J.; Sauvanet, A.; Breysacher, G.; Di Fiore, F.; Cripps, C.; Kavan, P.; Texereau, P.; Bouhier-Leporrier, K.; Khemissa-Akouz, F.; Legoux, J.-L.; Juzyna, B.; Gourgou, S.; O'Callaghan, C. J.; Jouffroy-Zeller, C.; Rat, P.; Malka, D.; Castan, F.; Bachet, J.-B. Folfirinox or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **2018**, *379* (25), 2395–2406. DOI:10.1056/nejmoa1809775.

[101] Orzetti, S.; Tommasi, F.; Bertola, A.; Bortolin, G.; Caccin, E.; Cecco, S.; Ferrarin, E.; Giacomin, E.; Baldo, P. Genetic Therapy and Molecular Targeted Therapy in Oncology: Safety, Pharmacovigilance, and Perspectives for Research and Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (6), 3012. DOI:10.3390/ijms23063012.

[102] Crowley, F.; Park, W.; O'Reilly, E. M. Targeting DNA Damage Repair Pathways in Pancreas Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **2021**, *40* (3), 891–908. DOI:10.1007/s10555-021-09983-1.

[103] Fang, Y.-T.; Yang, W.-W.; Niu, Y.-R.; Sun, Y.-K. Recent Advances in Targeted Therapy for Pancreatic Adenocarcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* **2023**, *15* (4), 571–595. DOI:10.4251/wjgo.v15.i4.571.

[104] Yin, H.; Liu, Y.; Chen, J.; Li, Z.; Pan, Y.; Zhu, F. Research Progress in Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer with Mismatch Repair and Microsatellite Instability. *Clinical and Translational Oncology* **2026**. DOI:10.1007/s12094-025-04214-3.

[105] Zhao, L.; Singh, V.; Ricca, A.; Lee, P. Survival Benefit of Pembrolizumab for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Case Series. *Journal of Medical Cases* **2022**, *13* (5), 240–243. DOI:10.14740/jmc3918.

[106] Ko, A. Erlotinib in the Treatment of Advanced Pancreatic Cancer. *Biologics: Targets & Therapy* **2008**, 83–95. DOI:10.2147/btt.s1832.

[107] Welch, S. A.; Moore, M. J. Erlotinib: Success of a Molecularly Targeted Agent for the Treatment of Advanced Pancreatic Cancer. *Future Oncology* **2007**, *3* (3), 247–254. DOI:10.2217/14796694.3.3.247.

[108] Li, B.; Zhang, Q.; Castaneda, C.; Cook, S. Targeted Therapies in Pancreatic Cancer: A New Era of Precision Medicine. *Biomedicines* **2024**, *12* (10), 2175. DOI:10.3390/biomedicines12102175.

[109] Kheder, E. S.; Hong, D. S. Emerging Targeted Therapy for Tumors with NTRK Fusion Proteins. *Clinical Cancer Research* **2018**, *24* (23), 5807–5814. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-18-1156.

[110] Liaki, V.; Barrambana, S.; Kostopoulou, M.; Lechuga, C. G.; Zamorano-Dominguez, E.; Acosta, D.; Morales-Cacho, L.; Álvarez, R.; Sun, P.; Rosas-Perez, B.; Barrero, R.; Jiménez-Parrado, S.; López-García, A.; San Roman, M.; López-Gil, J. C.; Drosten, M.; Sainz, B.; Musteanu, M.; Caleiras, E.; Dusetti, N.; Poli, V.; Sánchez-Bueno, F.; Guerra, C.; Barbacid, M. A Targeted Combination Therapy Achieves Effective Pancreatic Cancer Regression and Prevents Tumor Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2025**, *122* (49). DOI:10.1073/pnas.2523039122.

[111] Emonds, E. Molecular Determinants of the Antitumor Effects of Trichostatin a in Pancreatic Cancer Cells. *World Journal of Gastroenterology* **2010**, *16* (16), 1970. DOI:10.3748/wjg.v16.i16.1970.

[112] Han, H.; Feng, X.; He, T.; Wu, Y.; He, T.; Yue, Z.; Zhou, W. Discussion on Structure Classification and Regulation Function of Histone Deacetylase and Their Inhibitor. *Chemical Biology & Drug Design* **2023**, *103* (1). DOI:10.1111/cbdd.14366.

[113] McGinty, R. K.; Tan, S. Nucleosome Structure and Function. *Chemical Reviews* **2014**, *115* (6), 2255–2273. DOI:10.1021/cr500373h.

[114] Parmar, J. J.; Padinhateeri, R. Nucleosome Positioning and Chromatin Organization. *Current Opinion in Structural Biology* **2020**, *64*, 111–118. DOI:10.1016/j.sbi.2020.06.021.

[115] Zheng, C.; Hayes, J. J. Structures and Interactions of the Core Histone Tail Domains. *Biopolymers* **2003**, *68* (4), 539–546. DOI:10.1002/bip.10303.

[116] Sengupta, N.; Seto, E. Regulation of Histone Deacetylase Activities. *Journal of Cellular Biochemistry* **2004**, *93* (1), 57–67. DOI:10.1002/jcb.20179.

[117] Han, H.; Feng, X.; He, T.; Wu, Y.; He, T.; Yue, Z.; Zhou, W. Discussion on Structure Classification and Regulation Function of Histone Deacetylase and Their Inhibitor. *Chemical Biology & Drug Design* **2023**, *103* (1). DOI:10.1111/cbdd.14366.

[118] Park, S.-Y.; Kim, J.-S. A Short Guide to Histone Deacetylases Including Recent Progress on Class II Enzymes. *Experimental Molecular Medicine* **2020**, *52* (2), 204–212. DOI:10.1038/s12276-020-0382-4.

[119] Seto, E.; Yoshida, M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2014**, *6* (4). DOI:10.1101/cshperspect.a018713.

[120] Schneider, G.; Krämer, O. H.; Schmid, R. M.; Saur, D. Acetylation as a Transcriptional Control Mechanism—HDACs and HATs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Cancer* **2011**, *42* (2), 85–92. DOI:10.1007/s12029-011-9257-1.

[121] Wright, C. A.; Gordon, E. R.; Cooper, S. J. Genomic Analysis Reveals HDAC1 Regulates Clinically Relevant Transcriptional Programs in Pancreatic Cancer. *BMC Cancer* **2023**, *23* (1). DOI:10.1186/s12885-023-11645-0.

[122] Krauß, L.; Urban, B. C.; Hastreiter, S.; Schneider, C.; Wenzel, P.; Hassan, Z.; Wirth, M.; Lankes, K.; Terrasi, A.; Klement, C.; Cernilogar, F. M.; Öllinger, R.; de Andrade Krätzig, N.; Engleitner, T.; Schmid, R. M.; Steiger, K.; Rad, R.; Krämer, O. H.; Reichert, M.; Schotta, G.; Saur, D.; Schneider, G. HDAC2 Facilitates Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Research* **2021**, *82* (4), 695–707. DOI:10.1158/0008-5472.can-20-3209.

[123] Hu, G.; He, N.; Cai, C.; Cai, F.; Fan, P.; Zheng, Z.; Jin, X. HDAC3 Modulates Cancer Immunity via Increasing PD-L1 Expression in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* **2019**, *19* (2), 383–389. DOI:10.1016/j.pan.2019.01.011.

[124] Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S. Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (24), 5097–5116. DOI:10.1021/jm0303094.

[125] Schneider, G.; Krämer, O. H.; Fritsche, P.; Schüler, S.; Schmid, R. M.; Saur, D. Targeting Histone Deacetylases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2010**, *14* (6a), 1255–1263. DOI:10.1111/j.1582-4934.2009.00974.x.

[126] Akram, M.; Kaserer, T.; Schuster, D. Pharmacophore Modeling and Pharmacophore-Based Virtual Screening. In *In Silico Drug Discovery and Design*; CRC Press, 2015.

[127] Saharan, R.; Singh, R.; Nagar, N.; Verma, S.; Sharma, V.; Yadav, S.; Nagori, B. P. HDAC Inhibitors: A New Armour in Anti-Cancer Therapeutics. *Pharmacophore* **2011**, *2* (2), 67–76.

[128] Xu, W. S.; Parmigiani, R. B.; Marks, P. A. Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action. *Oncogene***2007**, *26* (37), 5541–5552. DOI:10.1038/sj.onc.1210620.

[129] Ocker, M. Deacetylase Inhibitors - Focus on Non-Histone Targets and Effects. *World Journal of Biological Chemistry***2010**, *1* (5), 55–61. DOI:10.4331/wjbc.v1.i5.55.

[130] Ji, J.; Xia, M.; Xia, W.; Miao, G. Structural Classification of HDAC Inhibitors and Cancer Treatment Prospects: A Review. *Letters in Drug Design & Discovery* **2025**, *22* (9), 100165. DOI:10.1016/j.lddd.2025.100165.

[131] Parveen, R.; Harihar, D.; Chatterji, B. P. Recent Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *Cancer* **2023**, *129*(21), 3372–3380. DOI:10.1002/cncr.34974.

[132] Ganji, C.; Farran, B. Current Clinical Trials for Epigenetic Targets and Therapeutic Inhibitors for Pancreatic Cancer Therapy. *Drug Discovery Today* **2022**, *27* (5), 1404–1410. DOI:10.1016/j.drudis.2021.12.013.

[133] Schiedlauske, K.; Deipenbrock, A.; Pflieger, M.; Hamacher, A.; Hänsel, J.; Kassack, M. U.; Kurz, T.; Teusch, N. E. Novel Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Induces Apoptosis and Suppresses Invasion via E-Cadherin Upregulation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Pharmaceuticals* **2024**, *17* (6), 752. DOI:10.3390/ph17060752.

[134] Damaskos, C.; Karatzas, T.; Nikolidakis, L.; Kostakis, I. D.; Karamaroudis, S.; Boutsikos, G.; Damaskou, Z.; Kostakis, A.; Kouraklis, G. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Current Evidence for Therapeutic Activities in Pancreatic Cancer. *Anticancer Research* **2015**, *35*, 3129–3136.

[135] Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.; Wakisaka, Y.; Koizumi, K. A New Antifungal Antibiotic, Trichostatin. *The Journal of Antibiotics* **1976**, *29* (1), 1–6. DOI:10.7164/antibiotics.29.1.

[136] Bouyahya, A.; El Omari, N.; Bakha, M.; Aanniz, T.; El Menyiy, N.; El Hachlafi, N.; El Baaboua, A.; El-Shazly, M.; Alshahrani, M. M.; Al Awadh, A. A.; Lee, L.-H.; Benali, T.; Mubarak, M. S. Pharmacological Properties of Trichostatin A, Focusing on the Anticancer Potential: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (10), 1235. DOI:10.3390/ph15101235.

[137] Yang, L.; Qu, M.; Wang, Y.; Duan, H.; Chen, P.; Wang, Y.; Shi, W.; Danielson, P.; Zhou, Q. Trichostatin a Inhibits Transforming Growth Factor-β–Induced Reactive Oxygen Species Accumulation and Myofibroblast Differentiation via Enhanced NF-E2-Related Factor 2-Antioxidant Response Element Signaling. *Molecular Pharmacology* **2013**, *83* (3), 671–680. DOI:10.1124/mol.112.081059.

[138] Sun, C.; Zhou, J. Trichostatin a Improves Insulin Stimulated Glucose Utilization and Insulin Signaling Transduction through the Repression of HDAC2. *Biochemical Pharmacology* **2008**, *76* (1), 120–127. DOI:10.1016/j.bcp.2008.04.004.

[139] Pagano, C. A.; Masini, M. A.; Sabbatini, M.; Gribaudo, G.; Manfredi, M.; Caprì, F. G.; Bonetto, V.; Magnelli, V.; Donadelli, M.; Corino, R.; Belay, M. H.; Robotti, E.; Marengo, E. Simulated Microgravity-Induced Alterations in PDAC Cells: A Potential Role for

Trichostatin a in Restoring Cellular Phenotype. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, *26* (10), 4758. DOI:10.3390/ijms26104758.

[140] Donadelli, M.; Costanzo, C.; Faggioli, L.; Scupoli, M. T.; Moore, P. S.; Bassi, C.; Scarpa, A.; Palmieri, M. Trichostatin A, an Inhibitor of Histone Deacetylases, Strongly Suppresses Growth of Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Molecular Carcinogenesis* **2003**, *38* (2), 59–69. DOI:10.1002/mc.10145.

[141] Moore, P. S.; Barbi, S.; Donadelli, M.; Costanzo, C.; Bassi, C.; Palmieri, M.; Scarpa, A. Gene Expression Profiling after Treatment with the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin a Reveals Altered Expression of Both Pro- and Anti-Apoptotic Genes in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *1693* (3), 167–176. DOI:10.1016/j.bbamcr.2004.07.001.

[142] Piacentini, P.; Donadelli, M.; Costanzo, C.; Moore, P. S.; Palmieri, M.; Scarpa, A. Trichostatin a Enhances the Response of Chemotherapeutic Agents in Inhibiting Pancreatic Cancer Cell Proliferation. *Virchows Archiv* **2006**, *448* (6), 797–804. DOI:10.1007/s00428-006-0173-x.

[143] Dalla Pozza, E.; Manfredi, M.; Brandi, J.; Buzzi, A.; Conte, E.; Pacchiana, R.; Cecconi, D.; Marengo, E.; Donadelli, M. Trichostatin a Alters Cytoskeleton and Energy Metabolism of Pancreatic Adenocarcinoma Cells: An in Depth Proteomic Study. *Journal of Cellular Biochemistry* **2017**, *119* (3), 2696–2707. DOI:10.1002/jcb.26436.

[144] Blaber, E.; Marçal, H.; Burns, B. P. Bioastronautics: The Influence of Microgravity on Astronaut Health. *Astrobiology* **2010**, *10* (5), 463–473. DOI:10.1089/ast.2009.0415.

[145] Grenon, S. M.; Saary, J.; Gray, G.; Vanderploeg, J. M.; Hughes-Fulford, M. Can I Take a Space Flight? Considerations for Doctors. *BMJ* **2012**, *345*. DOI:10.1136/bmj.e8124.

[146] Masini, M. A.; Bonetto, V.; Manfredi, M.; Pastò, A.; Barberis, E.; Timo, S.; Vanella, V. V.; Robotti, E.; Masetto, F.; Andreoli, F.; Fiore, A.; Tavella, S.; Sica, A.; Donadelli, M.; Marengo, E. Prolonged Exposure to Simulated Microgravity Promotes Stemness Impairing Morphological, Metabolic and Migratory Profile of Pancreatic Cancer Cells: A Comprehensive Proteomic, Lipidomic and Transcriptomic Analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, *79* (5). DOI:10.1007/s00018-022-04243-z.

[147] DeLombard, R.; Hrovat, K.; Kelly, E.; McPherson, K. Microgravity Environment on the International Space Station. *42nd AIAA Aerospace Sciences Meeting and Exhibit* **2004**. DOI:10.2514/6.2004-125.

[148] Topal, U.; Zamur, C. Microgravity, Stem Cells, and Cancer: A New Hope for Cancer Treatment. *Stem Cells International***2021**, *2021*, 1–9. DOI:10.1155/2021/5566872.

[149] Oluwafemi, F. A.; Neduncheran, A. Analog and Simulated Microgravity Platforms for Life Sciences Research: Their Individual Capacities, Benefits and Limitations. *Advances in Space Research* **2022**, *69* (7), 2921–2929. DOI:10.1016/j.asr.2022.01.007.

[150] Ferranti, F.; Del Bianco, M.; Pacelli, C. Advantages and Limitations of Current Microgravity Platforms for Space Biology Research. *Applied Sciences* **2020**, *11* (1), 68. DOI:10.3390/app11010068.

[151] Hasenstein, K. H.; van Loon, J. J. W. A. Clinostats and Other Rotating Systems—Design, Function, and Limitations. In *Generation and Applications of Extra-Terrestrial Environments on Earth*; River Publishers, 2015; pp 147–156.

[152] Kim, S. M.; Kim, H.; Yang, D.; Park, J.; Park, R.; Namkoong, S.; Lee, J. I.; Choi, I.; Kim, H.-S.; Kim, H.; Park, J. An Experimental and Theoretical Approach to Optimize a Three-Dimensional Clinostat for Life Science Experiments. *Microgravity Science and Technology* **2016**, *29* (1–2), 97–106. DOI:10.1007/s12217-016-9529-2.

[153] Ayyaswamy, P. S.; Mukundakrishnan, K. Optimal Conditions for Simulating Microgravity Employing NASA Designed Rotating Wall Vessels. *Acta Astronautica* **2007**, *60* (4–7), 397–405. DOI:10.1016/j.actaastro.2006.09.008.

[154] Kim, T. Y. Theoretical Study on Microgravity and Hypogravity Simulated by Random Positioning Machine. *Acta Astronautica* **2020**, *177*, 684–696. DOI:10.1016/j.actaastro.2020.07.047.

[155] Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. Three-Dimensional Cell Culture Systems as an *in vitro* Platform for Cancer and Stem Cell Modeling. *World Journal of Stem Cells* **2019**, *11* (12), 1065–1083. DOI:10.4252/wjsc.v11.i12.1065.

[156] Shao, C.; Chi, J.; Zhang, H.; Fan, Q.; Zhao, Y.; Ye, F. Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies. *Advanced Materials Technologies* **2020**, *5* (9). DOI:10.1002/admt.202000183.

[157] Park, S. Y.; Hong, H. J.; Lee, H. J. Fabrication of Cell Spheroids for 3D Cell Culture and Biomedical Applications. *BioChip Journal* **2022**, *17* (1), 24–43. DOI:10.1007/s13206-022-00086-9.

[158] Lin, R.; Chang, H. Recent Advances in Three-dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research. *Biotechnology Journal* **2008**, *3* (9–10), 1172–1184. DOI:10.1002/biot.200700228.

[159] Lin, X.; Zhang, K.; Wei, D.; Tian, Y.; Gao, Y.; Chen, Z.; Qian, A. The Impact of Spaceflight and Simulated Microgravity on Cell Adhesion. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (9), 3031. DOI:10.3390/ijms21093031.

[160] Zhao, T.; Li, R.; Tan, X.; Zhang, J.; Fan, C.; Zhao, Q.; Deng, Y.; Xu, A.; Lukong, K. E.; Genth, H.; Xiang, J. Simulated Microgravity Reduces Focal Adhesions and Alters

Cytoskeleton and Nuclear Positioning Leading to Enhanced Apoptosis via Suppressing FAK/Rhoa-Mediated Mtorc1/NF-KB and ERK1/2 Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (7), 1994. DOI:10.3390/ijms19071994.

[161] Tan, X.; Xu, A.; Zhao, T.; Zhao, Q.; Zhang, J.; Fan, C.; Deng, Y.; Freywald, A.; Genth, H.; Xiang, J. Simulated Microgravity Inhibits Cell Focal Adhesions Leading to Reduced Melanoma Cell Proliferation and Metastasis via FAK/Rhoa-Regulated mTORC1 and AMPK PATHWAYS. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1). DOI:10.1038/s41598-018-20459-1.

[162] Matsuda, Y.; Ishiwata, T.; Kawamoto, Y.; Kawahara, K.; Peng, W.-X.; Yamamoto, T.; Naito, Z. Morphological and Cytoskeletal Changes of Pancreatic Cancer Cells in Three-Dimensional Spheroidal Culture. *Medical Molecular Morphology* **2010**, *43* (4), 211–217. DOI:10.1007/s00795-010-0497-0.

[163] Singh, R.; Rajput, M.; Singh, R. P. Simulated Microgravity Triggers DNA Damage and Mitochondria-Mediated Apoptosis through ROS Generation in Human Promyelocytic Leukemic Cells. *Mitochondrion* **2021**, *61*, 114–124. DOI:10.1016/j.mito.2021.09.006.

[164] Dietz, C.; Infanger, M.; Romswinkel, A.; Strube, F.; Kraus, A. Apoptosis Induction and Alteration of Cell Adherence in Human Lung Cancer Cells under Simulated Microgravity. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*(14), 3601. DOI:10.3390/ijms20143601.

[165] Grimm, D.; Corydon, T. J.; Sahana, J.; González-Torres, L. F.; Kraus, A.; Marchal, S.; Wise, P. M.; Simonsen, U.; Krüger, M. Recent Studies of the Effects of Microgravity on Cancer Cells and the Development of 3D Multicellular Cancer Spheroids. *Stem Cells Translational Medicine* **2025**, *14* (3). DOI:10.1093/stcltm/szaf008.

[166] Grimm, D.; Wehland, M.; Corydon, T. J.; Richter, P.; Prasad, B.; Bauer, J.; Egli, M.; Kopp, S.; Lebert, M.; Krüger, M. The Effects of Microgravity on Differentiation and Cell Growth in Stem Cells and Cancer Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine* **2020**, *9* (8), 882–894. DOI:10.1002/sctm.20-0084.

[167] Masini, M. A.; Bonetto, V.; Manfredi, M.; Pastò, A.; Barberis, E.; Timo, S.; Vanella, V. V.; Robotti, E.; Masetto, F.; Andreoli, F.; Fiore, A.; Tavella, S.; Sica, A.; Donadelli, M.; Marengo, E. Prolonged Exposure to Simulated Microgravity Promotes Stemness Impairing Morphological, Metabolic and Migratory Profile of Pancreatic Cancer Cells: A Comprehensive Proteomic, Lipidomic and Transcriptomic Analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, *79* (5). DOI:10.1007/s00018-022-04243-z.

[168] Jakubowska, K.; Gurzińska-Ustymowicz, K.; Famulski, W.; Cepowicz, D.; Jagodzinska, D.; Pryczynicz, A. Reduced Expression of Caspase-8 and Cleaved Caspase-3 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Oncology Letters* **2016**, *11* (3), 1879–1884. DOI:10.3892/ol.2016.4125.

[169] McIlwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, *5* (4). DOI:10.1101/cshperspect.a008656.

[170] Wang, Q.; Ke, S.; Liu, Z.; Shao, H.; He, M.; Guo, J. HSPA5 Promotes the Proliferation, Metastasis and Regulates Ferroptosis of Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (6), 5144. DOI:10.3390/ijms24065144.

[171] Tian, H.; Ding, M.; Guo, Y.; Zhu, Z.; Yu, Y.; Tian, Y.; Li, K.; Sun, G.; Jiang, R.; Han, R.; Yan, F.; Kang, X. Effect of HSPA8 Gene on the Proliferation, Apoptosis and Immune Function of HD11 Cells. *Developmental & Comparative Immunology* **2023**, *142*, 104666. DOI:10.1016/j.dci.2023.104666.

[172] Yi-Lei, Z.; Yi-Lei, Z.; Ruo-Chen, W.; Ken, C.; Brian Z., R.; Li, S.; Ruo-Chen, W.; Ken, C.; Brian Z., R.; Li, S. Roles of RAP1 Signaling in Tumor Cell Migration and Invasion. *Cancer Biology & Medicine* **2017**, *14* (1), 90–99. DOI:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0086.

[173] Vos, M. C.; van der Wurff, A. A.; van Kuppevelt, T. H.; Massuger, L. F. The Role of Mmp-14 in Ovarian Cancer: A Systematic Review. *Journal of Ovarian Research* **2021**, *14* (1). DOI:10.1186/s13048-021-00852-7.

[174] Yan, L.; Raj, P.; Yao, W.; Ying, H. Glucose Metabolism in Pancreatic Cancer. *Cancers* **2019**, *11* (10), 1460. DOI:10.3390/cancers11101460.

[175] Nieborak, A.; Lukauskas, S.; Capellades, J.; Heyn, P.; Santos, G. S.; Motzler, K.; Zeigerer, A.; Bester, R.; Protzer, U.; Schelter, F.; Wagner, M.; Carell, T.; Hruscha, A.; Schmid, B.; Yanes, O.; Schneider, R. Depletion of Pyruvate Kinase (PK) Activity Causes Glycolytic Intermediate Imbalances and Reveals a PK-TXNIP Regulatory Axis. *Molecular Metabolism* **2023**, *74*, 101748. DOI:10.1016/j.molmet.2023.101748.

[176] Feng, L.; Qi, Q.; Wang, P.; Chen, H.; Chen, Z.; Meng, Z.; Liu, L. Serum Levels of IL-6, IL-8, and Il-10 Are Indicators of Prognosis in Pancreatic Cancer. *Journal of International Medical Research* **2018**, *46* (12), 5228–5236. DOI:10.1177/0300060518800588.

[177] Kuwada, Y.; Sasaki, T.; Morinaka, K.; Kitadai, Y.; Mukaida, N.; Chayama, K. Potential Involvement of IL-8 and Its Receptors in the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Oncology* **2003**. DOI:10.3892/ijo.22.4.765.

[178] Monti, M.; Celli, J.; Missale, F.; Cersosimo, F.; Russo, M.; Belloni, E.; Di Matteo, A.; Lonardi, S.; Vermi, W.; Ghigna, C.; Giurisato, E. Clinical Significance and Regulation of ERK5 Expression and Function in Cancer. *Cancers* **2022**, *14*(2), 348. DOI:10.3390/cancers14020348.

[179] Najafzadeh, B.; Asadzadeh, Z.; Motafakker Azad, R.; Mokhtarzadeh, A.; Baghbanzadeh, A.; Alemohammad, H.; Abdoli Shadbad, M.; Vasefifar, P.; Najafi, S.; Baradaran, B. The Oncogenic Potential of NANOG: An Important Cancer Induction Mediator. *Journal of Cellular Physiology* **2020**, *236* (4), 2443–2458. DOI:10.1002/jcp.30063.

[180] Li, X.-P.; Zhang, X.-W.; Zheng, L.-Z.; Guo, W.-J. Expression of CD44 in Pancreatic Cancer and Its Significance. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **2015**, *8* (6), 6724–6731.

[181] Wang, L.; Zuo, X.; Xie, K.; Wei, D. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 31–42. DOI:10.1007/978-1-4939-7401-6_3.

[182] Wang, J.; Yu, X.; Cao, X.; Tan, L.; Jia, B.; Chen, R.; Li, J. GAPDH: A Common Housekeeping Gene with an Oncogenic Role in Pan-Cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2023**, *21*, 4056–4069. DOI:10.1016/j.csbj.2023.07.034.

[183] Huang, J.; Wang, H.; Xu, Y.; Li, C.; Lv, X.; Han, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Yu, Z. The Role of CTNNA1 in Malignancies: An Updated Review. *Journal of Cancer* **2023**, *14* (2), 219–230. DOI:10.7150/jca.79236.

[184] Krebs, A. M.; Mitschke, J.; Lasierra Losada, M.; Schmalhofer, O.; Boerries, M.; Busch, H.; Boettcher, M.; Mougiakakos, D.; Reichardt, W.; Bronsert, P.; Brunton, V. G.; Pilarsky, C.; Winkler, T. H.; Brabletz, S.; Stemmler, M. P.; Brabletz, T. The EMT-Activator ZEB1 Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer. *Nature Cell Biology* **2017**, *19* (5), 518–529. DOI:10.1038/ncb3513.

[185] Usman, S.; Waseem, N. H.; Nguyen, T. K.; Mohsin, S.; Jamal, A.; Teh, M.-T.; Waseem, A. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers* **2021**, *13* (19), 4985. DOI:10.3390/cancers13194985.

[186] Aguilar, B.; Zhou, H.; Lu, Q. Cdc42 Signaling Pathway Inhibition as a Therapeutic Target in Ras- Related Cancers. *Current Medicinal Chemistry* **2017**, *24* (32). DOI:10.2174/0929867324666170602082956.

[187] Barbosa, M. A.; Xavier, C. P.; Pereira, R. F.; Petrikaitė, V.; Vasconcelos, M. H. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers* **2021**, *14* (1), 190. DOI:10.3390/cancers14010190.

[188] Abuwatfa, W. H.; Pitt, W. G.; Husseini, G. A. Scaffold-Based 3D Cell Culture Models in Cancer Research. *Journal of Biomedical Science* **2024**, *31* (1). DOI:10.1186/s12929-024-00994-y.

[189] Ranieri, D.; Proietti, S.; Dinicola, S.; Masiello, M. G.; Rosato, B.; Ricci, G.; Cucina, A.; Catizone, A.; Bizzarri, M.; Torrisi, M. R. Simulated Microgravity Triggers Epithelial Mesenchymal Transition in Human Keratinocytes. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). DOI:10.1038/s41598-017-00602-0.

[190] Ahn, C. B.; Lee, J.-H.; Han, D. G.; Kang, H.-W.; Lee, S.-H.; Lee, J.-I.; Son, K. H.; Lee, J. W. Simulated Microgravity with Floating Environment Promotes Migration of Non-Small Cell Lung Cancers. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1). DOI:10.1038/s41598-019-50736-6.

[191] Suraweera, A.; O'Byrne, K. J.; Richard, D. J. Epigenetic Drugs in Cancer Therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* **2025**, *44* (1). DOI:10.1007/s10555-025-10253-7.

[192] Gao, Y.; Wang, X.; Sang, Z.; Li, Z.; Liu, F.; Mao, J.; Yan, D.; Zhao, Y.; Wang, H.; Li, P.; Ying, X.; Zhang, X.; He, K.; Wang, H. Quantitative Proteomics by Swath-MS Reveals Sophisticated Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma Tissues. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). DOI:10.1038/srep45913.

[193] Jia, W.; Wang, G.; Sun, S.; Chen, X.; Xiang, S.; Zhang, B.; Huang, Z. PA2G4 in Health and Disease: An Underestimated Multifunctional Regulator. *Journal of Advanced Research* **2025**, *78*, 307–323. DOI:10.1016/j.jare.2025.02.002.

[194] Gardino, A. K.; Yaffe, M. B. 14-3-3 Proteins as Signaling Integration Points for Cell Cycle Control and Apoptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2011**, *22* (7), 688–695. DOI:10.1016/j.semcdb.2011.09.008.

[195] Gao, N.; Flynn, D. C.; Zhang, Z.; Zhong, X.-S.; Walker, V.; Liu, K. J.; Shi, X.; Jiang, B.-H. G1 Cell Cycle Progression and the Expression of G1 Cyclins Are Regulated by PI3K/AKT/mTOR/P70S6K1 Signaling in Human Ovarian Cancer Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2004**, *287* (2). DOI:10.1152/ajpcell.00422.2003.

[196] Roy, S. K.; Srivastava, R. K.; Shankar, S. Inhibition of PI3K/Akt and MAPK/ERK Pathways Causes Activation of FOXO Transcription Factor, Leading to Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Journal of Molecular Signaling* **2010**, *5*, 10. DOI:10.1186/1750-2187-5-10.

[197] Mosaddeghzadeh, N.; Ahmadian, M. R. The Rho Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells* **2021**, *10* (7), 1831. DOI:10.3390/cells10071831.

[198] Morris, H. T.; Bamlet, W. R.; Razidlo, G. L.; Machesky, L. M. FSCN1 and Epithelial Mesenchymal Transformation Transcription Factor Expression in Human Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Ductal Adenocarcinoma. *Pathology - Research and Practice* **2023**, *251*, 154836. DOI:10.1016/j.prp.2023.154836.

[199] Honda, K. The Biological Role of Actinin-4 (ACTN4) in Malignant Phenotypes of Cancer. *Cell & Bioscience* **2015**, *5* (1). DOI:10.1186/s13578-015-0031-0.

[200] Parajon, E.; Robinson, D. N. Mechanoresponsive Adaptability in Pancreatic Cancer Cells and Tissue. *Biophysical Journal* **2024**, *123* (3), 275a–276a.

[201] Buenaventura, R. G.; Merlino, G.; Yu, Y. EZ-Metastasizing: The Crucial Roles of Ezrin in Metastasis. *Cells* **2023**, *12*(12), 1620. DOI:10.3390/cells12121620.

[202] Iwatate, Y.; Yokota, H.; Hoshino, I.; Ishige, F.; Kuwayama, N.; Itami, M.; Mori, Y.; Chiba, S.; Arimitsu, H.; Yanagibashi, H.; Takayama, W.; Uno, T.; Lin, J.; Nakamura, Y.; Tatsumi, Y.; Shimozato, O.; Nagase, H. Transcriptomic Analysis Reveals High ITGB1 Expression

as a Predictor for Poor Prognosis of Pancreatic Cancer. *PLOS One* **2022**, *17* (6). DOI:10.1371/journal.pone.0268630.

[203] Yang, D.; Sun, X.; Moniruzzaman, R.; Wang, H.; Citu, C.; Zhao, Z.; Wistuba, I. I.; Wang, H.; Maitra, A.; Chen, Y. Genetic Deletion of Galectin-3 Inhibits Pancreatic Cancer Progression and Enhances the Efficacy of Immunotherapy. *Gastroenterology* **2024**, *167* (2), 298–314. DOI:10.1053/j.gastro.2024.03.007.

[204] Choi, Y.-S.; Kim, M. J.; Choi, E. A.; Kim, S.; Lee, E. ji; Park, M. J.; Kim, M.-J.; Kim, Y. W.; Ahn, H.-S.; Jung, J. Y.; Jang, G.; Kim, Y.; Kim, H.; Kim, K.; Kim, J. Y.; Hong, S.-M.; Kim, S. C.; Chang, S. Antibody-Mediated Blockade for Galectin-3 Binding Protein in Tumor Secretome Abrogates PDAC Metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2022**, *119* (30). DOI:10.1073/pnas.2119048119.

[205] Saito, K.; Iioka, H.; Maruyama, S.; Sumardika, I. W.; Sakaguchi, M.; Kondo, E. PODXL1 Promotes Metastasis of the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Activating the C5ar/C5a Axis from the Tumor Microenvironment. *Neoplasia* **2019**, *21* (12), 1121–1132. DOI:10.1016/j.neo.2019.09.003.

[206] Pollan, S. G.; Huang, F.; Sperger, J. M.; Lang, J. M.; Morrissey, C.; Cress, A. E.; Chu, C. Y.; Bhowmick, N. A.; You, S.; Freeman, M. R.; Spassov, D. S.; Moasser, M. M.; Carter, W. G.; Satapathy, S. R.; Shah, K.; Knudsen, B. S. Regulation of Inside-out B1-Integrin Activation by CDCP1. *Oncogene* **2018**, *37* (21), 2817–2836. DOI:10.1038/s41388-018-0142-2.

[207] Zahra, F. T.; Sajib, M. S.; Ichiyama, Y.; Akwii, R. G.; Tullar, P. E.; Cobos, C.; Minchew, S. A.; Doçi, C. L.; Zheng, Y.; Kubota, Y.; Gutkind, J. S.; Mikelis, C. M. Endothelial Rhoa Gtpase Is Essential for in Vitro Endothelial Functions but Dispensable for Physiological in Vivo Angiogenesis. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1). DOI:10.1038/s41598-019-48053-z.

[208] Zhu, S.; Zhang, Q.; Sun, X.; Zeh, H. J.; Lotze, M. T.; Kang, R.; Tang, D. HSPA5 Regulates Ferroptotic Cell Death in Cancer Cells. *Cancer Research* **2017**, *77* (8), 2064–2077. DOI:10.1158/0008-5472.can-16-1979.

[209] Wang, Y.; Liu, Y.; Wang, C.; Kang, R.; Tang, D.; Liu, J. EP300 Promotes Ferroptosis via HSPA5 Acetylation in Pancreatic Cancer. *Scientific Reports* **2023**, *13* (1). DOI:10.1038/s41598-023-42136-8.

[210] Okusha, Y.; Guerrero-Gimenez, M. E.; Lang, B. J.; Borges, T. J.; Stevenson, M. A.; Truman, A. W.; Calderwood, S. K. MicroRNA-570 Targets the HSP Chaperone Network, Increases Proteotoxic Stress and Inhibits Mammary Tumor Cell Migration. *Scientific Reports* **2022**, *12* (1). DOI:10.1038/s41598-022-19533-6.

[211] Khan, Essak. S.; Däinghaus, T. HSP47 in Human Diseases: Navigating Pathophysiology, Diagnosis and Therapy. *Clinical and Translational Medicine* **2024**, *14* (8). DOI:10.1002/ctm2.1755.

[212] Manfredi, M.; Brandi, J.; Di Carlo, C.; Vita Vanella, V.; Barberis, E.; Marengo, E.; Patrone, M.; Cecconi, D. Mining Cancer Biology through Bioinformatic Analysis of Proteomic Data. *Expert Review of Proteomics* **2019**, *16* (9), 733–747. DOI:10.1080/14789450.2019.1654862.

[213] Pollard, T. D.; Borisy, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **2003**, *112*(4), 453–465. DOI:10.1016/s0092-8674(03)00120-x.

[214] Perez-Oquendo, M.; Gibbons, D. L. Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. *Cancers* **2022**, *14* (8), 1864. DOI:10.3390/cancers14081864.

[215] Schmalhofer, O.; Brabletz, S.; Brabletz, T. E-Cadherin, β-Catenin, and ZEB1 in Malignant Progression of Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **2009**, *28* (1–2), 151–166. DOI:10.1007/s10555-008-9179-y.

[216] Delva, E.; Kowalczyk, A. P. Regulation of Cadherin Trafficking. *Traffic* **2009**, *10* (3), 259–267. DOI:10.1111/j.1600-0854.2008.00862.x.

[217] Fujita, Y.; Krause, G.; Scheffner, M.; Zechner, D.; Leddy, H. E.; Behrens, J.; Sommer, T.; Birchmeier, W. Hakai, a C-CBL-like Protein, Ubiquitinates and Induces Endocytosis of the E-Cadherin Complex. *Nature Cell Biology* **2002**, *4*(3), 222–231. DOI:10.1038/ncb758.

[218] Peinado, H.; Olmeda, D.; Cano, A. Snail, Zeb and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype? *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7* (6), 415–428. DOI:10.1038/nrc2131.

[219] Jolly, M. K. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in Oncology* **2015**, *5*. DOI:10.3389/fonc.2015.00155.

[220] Bays, J. L.; DeMali, K. A. Vinculin in Cell–Cell and Cell–Matrix Adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2017**, *74* (16), 2999–3009. DOI:10.1007/s00018-017-2511-3.

[221] Binarová, P.; Tuszynski, J. Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells* **2019**, *8* (10), 1294. DOI:10.3390/cells8101294.

[222] Yamada, S.; Pokutta, S.; Drees, F.; Weis, W. I.; Nelson, W. J. Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell***2005**, *123* (5), 889–901. DOI:10.1016/j.cell.2005.09.020.

[223] Brentnall, M.; Rodriguez-Menocal, L.; De Guevara, R. L.; Cepero, E.; Boise, L. H. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 Have Distinct Roles during Intrinsic Apoptosis. *BMC Cell Biology* **2013**, *14* (1). DOI:10.1186/1471-2121-14-32.

[224] Kruidering, M.; Evan, G. I. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? *IUBMB Life* **2000**, *50* (2), 85–90. DOI:10.1080/713803693.

8. SITOGRAFIA

[a] Digital Hystology. https://digitalhistology.org/organs-systems/digestive/major-glands/pancreas/pancreas-13/ (accessed 2025-12-17).

[b] Ziebell, J.; Esnakula, A. K. https://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreasmixed.html (accessed 2025-12-19).

[c] IARC. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=13 (accessed 2025-12-20).

[d] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/kras/ (accessed 2026-01-11).

[e] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/gnas/ (accessed 2026-01-11).

[f] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/braf/ (accessed 2026-01-11).

[g] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/cdkn2a/ (accessed 2026-01-11).

[h] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/tp53/ (accessed 2026-01-11).

[i] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/smad4/ (accessed 2026-01-11).

[j] NIH. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6422 (accessed 2026-01-12).

[k] NIH. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4885 (accessed 2026-01-12).

[l] NIH. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1045 (accessed 2026-01-12).

[m] NIH. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54894 (accessed 2026-01-12).

[n] NIH. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9314 (accessed 2026-01-12).

[o] Medline Plus. https://medlineplus.gov/genetics/gene/pik3ca/ (accessed 2026-01-12).

[p] MeSH Browser, U.S. National Library of Medicine. https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D058990 (accessed 2026-02-11).

[q] NIH. https://clinicaltrials.gov/search?intr=Trichostatin%20A&viewType=Table&page=1 (accessed 2026-02-22).