

LEGGE REGIONALE 7 AGOSTO 2007, N . 7: “ PROMOZIONE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E DELL’INNOVAZIONE TECNOLOGICA IN SARDEGNA ”

FORMULARIO ANNUALITA’ 2022 (Seconda Annualità)

1 - A.R.R.D.I.A. (Asbestos Related Respiratory Diseases in Industrial Areas)

Epigenetica, esposizione lavorativa e patologie pleuro-polmonari al tempo del “SARS - COV 2”

2 – Area tematica Tender

Ricerca clinica di base . Finanziamenti Tender

3 - Settori scientifico-disciplinari MIUR :

BIO/11 - Biologia Molecolare MED/21 - Chirurgia Toracica MED/44 - Medicina del Lavoro

3a - Parole chiave:

Biomarcatori, screening tumorale, esposizione lavorativa;

4 - Coordinamento Scientifico:

Principal investigator : *Roberto Cherchi, MD*

Unità Operativa Complessa di Chirurgia Toracica – A.R.N.A.S. Brotzu, Presidio Oncologico “Armando Businco” – Via Jenner snc, 09121, Cagliari (CA) – Italia

Tel: 07052965130 – Fax: 07052965129 – email: cherchiroberto@yahoo.it

Co-investigator : *Paolo Albino Ferrari, MD*

Unità Operativa Complessa di Chirurgia Toracica – A.R.N.A.S. Brotzu, Presidio Oncologico “Armando Businco” – Via Jenner snc, 09121, Cagliari (CA) – Italia

Tel: 07052965470 – Fax: 07052966208 – email: paoloalb.ferrari@gmail.com

Roberto Cherchi

5- Curriculum scientifico del Coordinatore

Principal Investigator: Il Dott. Roberto Cherchi è dal 14-04-1983 e a tutt'oggi, dipendente del Sistema Sanitario Nazionale, Azienda Ospedaliera Brotzu – Cagliari presso UOC di Chirurgia Toracica. Dal 20-10-2014 a tutt'oggi Direttore F.F. della UOC di Chirurgia Toracica. Rappresentante per la Sardegna della Società Italiana di Chirurgia Toracica. Promotore e Co Responsabile del Progetto del V.A.T.S. Group Italia per la Chirurgia Polmonare con paziente sveglio (Awake Surgery) per l'organizzazione di una rete e di un data base nazionale per questa iper specialistica terapia chirurgica standardizzata dal 2016. Membro effettivo del Tavolo tecnico Regionale dell'Ass. Sanità sulla Telemedicina, Tavolo tecnico Regionale dell'Ass. Sanità sulle Malattie Asbesto correlate. E' stato consulente di Chirurgia Toracica, per la ASL 7 di Carbonia- Iglesias dal 01-12-12 al 31-10-2014, presso l'U.O.C. di Chirurgia Generale dell'Ospedale S. Barbara di Iglesias ASL n.7 Carbonia-Iglesias, Componente Medico della Commissione Paritetica per le Servitù Militari dal 2010 al 2015 tra Regione Autonoma della Sardegna e Ministero della Difesa. Roberto Cherchi è Perito Tecnico del Tribunale di Cagliari per le patologie pleuro polmonari e in particolare per quelle Asbesto correlate e Silicosi correlate. Ha conseguito la specializzazione in Medicina dello Sport, 70/70 e Lode, presso l'Università degli Studi di Genova; la Specializzazione in Chirurgia Toracica, 70/70 e Lode, presso l'Università degli Studi di Cagliari e la Laurea in Medicina e Chirurgia, 110/110, presso l'Università degli Studi di Cagliari .

Co-Investigator: Il Dott. Paolo Albino Ferrari è chirurgo della Divisione di Chirurgia Toracica di Cagliari, Italia. Specializzato nella disciplina di Chirurgia Toracica presso l'Università degli Studi di Sassari con lode. Ha quindi maturato una fellowship lavorando nella Divisione di Chirurgia Toracica e Trapianti di polmone dell'ISMETT-IRCCS di Palermo. Ha sviluppato esperienza di ricerca clinica nell'ambito di ricondizionamento polmonare a scopo trapiantologico e preso parte a numerosi trials clinici e preclinici. È attualmente coinvolto nel servizio operativo di broncologia e nel programma locale delle malattie polmonari interstiziali. I suoi interessi di ricerca comprendono la chirurgia polmonare e mediastinica, la chirurgia toracica minimamente invasiva, le strategie di recupero funzionale post-chirurgico e la chirurgia toracica nel paziente non intubato. Recentemente ha partecipato alla definizione di linee guida cliniche internazionali sulla gestione perioperatoria ed “enhanced-recovery” dopo chirurgia polmonare. È autore o coautore di vari articoli scientifici ed è membro di Società Scientifiche Chirurgiche nazionali ed internazionali.

Roberto Cherchi

6 - Pubblicazioni scientifiche più significative del Principal Investigator e del Co-Investigator:

- Video-assisted thoracic surgery lobectomy in patients with reduced pulmonary function: A single-center series. *Future Oncology*, 2016 , 12(23s), pp. 39-45
- Nodal management and upstaging of disease: Initial results from the Italian VATS Lobectomy Registry. *Journal of Thoracic Disease*, 2017 , 9(7), pp. 2061-2070
- A comprehensive protocol for physiokinesis therapy and enhanced recovery after surgery in patients undergoing videoassisted thoracoscopic surgery lobectomy. *Journal of Thoracic Disease* , 2018 , 10, pp. S499-S511
- A rare case of human pulmonary dirofilariasis with nodules mimicking malignancy: Approach to diagnosis and treatment. *Journal of Cardiothoracic Surgery* , 2018 , 13(1) ,
- Uniportal and three-portal video-assisted thoracic surgery lobectomy: Analysis of the Italian video-assisted thoracic surgery group database. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* , 2019 , 29(5), pp. 714-721
- What counts more: The patient, the surgical technique, or the hospital? A multivariable analysis of factors affecting perioperative complications of pulmonary lobectomy by video-assisted thoracoscopic surgery from a large nationwide registry. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* , 2019 , 56(6), pp. 1097-1103
- Clinical guidelines on perioperative management strategies for enhanced recovery after lung surgery. *Translational Lung Cancer Research* , 2019 , 8(6), pp. 1174-1187
- Predicting a Prolonged Air Leak After Video-Assisted Thoracic Surgery, Is It Really Possible? *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* , 2020
- Retrospective outcomes analysis of 99 consecutive uniportal awake lung biopsies: A real standard of care? *Journal of Thoracic Disease*, 2020 , 12(9), pp. 4717-4730
- Cardiopulmonary Assessment Prior to Lung Lobectomy: a Challenging Case in Patient With Permanent Tracheostomy *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* , 2020 , (in-press)
- Studio osservazionale “Database nazionale VATS Lobectomy” – VATSGROUP v 1.0 del 13/07/2017

- **Studio osservazionale retrsopettivo inerente la biopsia chirurgica mininvasiva in anestesia locale e sedazione nel paziente affetto da interstiziopatia polmonare indeterminata – AVATSILD v 1.0 del 10/07/2017**
- **Studio di efficacia sull'utilizzo dello Iodopovidone come sclerosante pleurico nel trattamento del pneumotorace recidivante giovanile – POVIO-DOPNX v 1.0 del 27/11/2018**
- **Studio multicentrico osservazionale retrospettivo per valutare l'associazione tra il flusso d'aria e le pressioni intrapleuriche registrate digitalmente dopo VATS Lobectomy ed il management post-operatorio - IRRB1619 v 1.0 del 03/06/2019**
- **Studio multicentrico osservazionale “Impatto prognostico della linfadenectomia toracica in corso di metastasectomia polmonare da carcinoma coloretale – THYMOTY TRIL v1.0 del 8/03/2021**
- **Echinococcosi cistica nell'uomo: indagini sierologiche e analisi biomolecolari del 22/06/2020 – in collaborazione con Istituto Zooprofilattico della Sardegna.**
- **Protocollo Operativo Regionale per sorveglianza sanitaria per lavoratori esposti all'inalazione di amianto, approvato con la Delibera di Giunta Regionale n.54/23 del Giugno 2017. Componente Ufficiale del tavolo tecnico dell'Assessorato alla Sanità**

Roberto Averb

7 - Elenco delle Unità operative

Il progetto prevede, alla data attuale, le unità operative le cui competenze chiave sono sinteticamente descritte nel seguito.

CRS4 (Unità Operativa 1)

Il Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori in Sardegna è un centro di ricerca altamente innovativo costituito nel 1990 dalla Regione Autonoma della Sardegna. Società a Responsabilità Limitata, è interamente partecipata dalla RAS attraverso l'agenzia Sardegna Ricerche. L'attività di CRS4, quale centro di ricerca multidisciplinare, è basata sull'utilizzo di tecnologie computazionali abilitanti, tra cui calcolo parallelo, modellistica matematica, visual computing e data-intensive computing e sulla loro applicazione in vari settori, tra cui le bioscienze e la medicina. Il progetto ARRDIA si avvale della disponibilità, al CRS4 di una piattaforma di sequenziamento high throughput (<http://next.crs4.it>) dotata della più recente tecnologia Illumina (1 Illumina HiSeq 3000, e 1 MiSeq). Questa infrastruttura è attualmente utilizzata per analisi genetiche complesse su larga scala in un'ampia gamma di applicazioni, tra cui il sequenziamento del genoma intero, il sequenziamento del trascrittoma, l'exome e il targeted resequencing. In questo ambito il CRS4 ha un eccellente background di ricerca e personale esperto coinvolto nello sviluppo di protocolli sperimentali NGS, e di metodi per la gestione complessa dei dati, l'analisi e l'interpretazione dei dati NGS. Contributi rilevanti in questo settore includono lo sviluppo di nuovi protocolli sperimentali e le loro applicazioni a studi di larga scala. Esempi di domini specifici per i quali abbiamo pipeline di lavoro includono la genomica, la metagenomica e la trascrittomica.

Il progetto si avvale delle competenze ed esperienze del personale del settore **Bioscienze del CRS4** (1 Direttore di ricerca, 1 ricercatore, 1 tecnologo senior, 1 tecnologo expert, 1 tecnico di laboratorio) per un impegno stimato al momento della redazione del progetto complessivamente pari a 14 mesi persona per il **primo anno** di progetto (mesi 1-12). Eventuali scostamenti saranno possibili in corso d'opera, sulla base di motivate rimodulazioni dell'attività di progetto, fermo restando il piano complessivo dei costi del progetto per la prima annualità che verranno rapportati al reale impegno. Si evidenzia che CRS4 non svolgerà le attività di estrazione degli acidi nucleici che verranno sostenute dal nuovo partner ARNAS Brotzu - Cagliari, con il quale si è in procinto di espletare la convenzione e relativo trasferimento delle quote sulla fase 2 " estrazione degli acidi

nucleici".Eventuali scostamenti saranno possibili in corso d'opera, sulla base di motivate rimodulazioni dell'attività di progetto, fermo restando il piano complessivo dei costi del progetto per la prima annualità.

AIEA ODV (Unità Operativa 2)

è una associazione a carattere nazionale avente come scopi principali :

i) la tutela delle persone esposte alle fibre di amianto e materiali che lo contengono;

ii) la diffusione di informazione circa i danni patologici causati all'uomo dall'amianto e dai prodotti che lo contengono;

iii) la raccolta di informazioni circa le tecniche più avanzate di bonifica da amianto;

iv) la promozione di convegni e dibattiti sul tema amianto ecc. L'AIEA fu fondata il 18 marzo 1989 a Casale Monferrato, raccogliendo esperienze di varie aree italiane con problematiche legate alla fibra di asbesto: Balangero in Valle di Lanzo, ove era attiva la più grande miniera di amianto bianco d'Europa; le esperienze di vari lavoratori delle Officine Grandi Riparazioni (O.G.R.) delle FF.SS. di Torino, Padova, Verona, Firenze, Santa Maria La Bruna (Napoli), Avellino, i quali erano addetti alla scoibentazione di carrozze ferroviarie isolate con amianto; Monfalcone, per i cantieri navali (le stive delle navi sono coibentate con amianto); Casale Monferrato, zona emblematica nazionale, in quanto per ottanta anni sede del maggior stabilimento Eternit per la produzione di materiali in fibrocemento. L'A.I.E.A. è una associazione senza fini di lucro, dichiarata nel suo statuto come libera da partiti, sindacati, centri di potere ecc. Ha promosso e promuove convegni e dibattiti sul tema amianto in tutta Italia. Lo scopo originario e primario è fortunatamente già stato raggiunto;

infatti la legge 257/92 ha sancito la messa al bando di tutti i tipi di amianto e dei materiali che lo contengono. Molto resta comunque da fare, per la estrema diffusione che la fibra di amianto ha avuto in questo secolo. Infatti

Roberto Clerici

oltre tremila sono i prodotti diversi che venivano realizzati con la fibra ormai definita "assassina".

Il progetto si avvale delle competenze ed esperienze di AIEA (1 addetto alla segreteria, 1 addetto amministrativo con impegno semestrale, 1 Addetta alla tutela della Privacy 1 Tecnico informatico, 2 Infermieri volontari, 1 Psicologo, 1 borsista Biologo, 1 addetto alle relazioni esterne ed interne, 1 consulente commercialista, 1 addetto stampa) per un impegno stimato al momento della redazione del progetto complessivamente pari a 57 mesi/persona per il **primo anno** di progetto (mesi 1-12). Eventuali scostamenti saranno possibili in corso d'opera, sulla base di motivate rimodulazioni dell'attività di progetto, fermo restando il piano complessivo dei costi del progetto per la prima annualità.

UNICA-MDL (Unità Operativa 3)

1. Il Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica –

Cattedra di Medicina del Lavoro dell'Università di Cagliari assolve ai seguenti mandati istituzionali:

didattica della disciplina in tutti i corsi di laurea della locale facoltà di Medicina e Chirurgia, e di formazione post-laurea attraverso la Scuola di Specializzazione di Medicina del Lavoro, ed è inoltre parte del corso di dottorato di ricerca di Medicina Molecolare e Traslazionale dell'Università di Cagliari;

2. assistenziali assistenza nell'ambito del Servizio Sanitario Regionale, in qualità di struttura

complessa dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari, nella diagnosi di patologia professionale e di supporto diagnostico specialistico agli Enti previdenziali ed alle strutture di Medicina del Lavoro nel territorio e negli ambienti di lavoro;

3. compiti di ricerca avanzata in collaborazione con i maggiori centri di ricerca Europei (rete Modernet) e degli Stati Uniti (Consorzio InterLymph, Occupational and Environmental Epidemiology Branch del National Cancer Institute degli Stati Uniti), in particolare in tema di epidemiologia delle patologie da lavoro.

Roberto Chenu

La struttura complessa di Medicina del Lavoro comprende il Laboratorio di Tossicologia Industriale, che fornisce servizi al territorio per la determinazione di elementi metallici, di inalabili persistenti, quali fibre d'amianto, e di composti organici, quali solventi, pesticidi, agenti chemioterapici e loro metaboliti, nei liquidi biologici e nei tessuti di pazienti esposti in ambito

lavorativo ed ambientale, o di pazienti ospedalizzati o monitorati a scopo diagnostico, ed il Laboratorio di Igiene Industriale, che esegue valutazioni della qualità dell'ambiente di lavoro e di vita attraverso la determinazione nell'aria di metalli, ed altri contaminanti gassosi o corpuscolati, quali silice ed amianto, ed attraverso la determinazione di inquinanti fisici, quali rumore o vibrazioni, e delle condizioni microclimatiche degli ambienti indoor (temperatura, umidità, illuminazione e ventilazione).

Il progetto si avvale delle competenze ed esperienze di UNICA-MDL (1 statistico epidemiologo e un ricercatore epidemiologo) per un impegno stimato al momento della redazione del progetto complessivamente pari a 28 mesi-persona per il **primo anno** di progetto (mesi 1-12) in merito alle valutazioni statistiche dei dati estratti dai prelievi fatti e per sovrintendere ai dettami delle norme sulla tutela della privacy. Eventuali scostamenti saranno possibili in corso d'opera, sulla base di motivate rimodulazioni dell'attività di progetto, fermo restando il piano complessivo dei costi del progetto per la prima annualità.

Fondazione del Comune di Villamar " Centro Servizi alla Persona"

(Unità Operativa 4)

La Fondazione è stata costituita come Fondazione di Partecipazione il 23 maggio 2007 dal Comune di Villamar, che ne è, allo stato, l'unico socio Fondatore-Promotore; Opera con status giuridico di organismo di diritto pubblico, prevalentemente nel settore sanitario e socio-sanitario, nel sostegno alla formazione e alla ricerca e nel sociale. Il risultato più rilevante della Fondazione è costituito dalla realizzazione della clinica di riabilitazione cardiologica e funzionale, nel Comune di Villamar, ceduta con gara di evidenza pubblica ad un operatore privato, leader in Europa del post-acuto e della riabilitazione. La Clinica Arborea è da qualche tempo operante ed è convenzionata col Sistema Sanitario pubblico.

Roberto Cerchi

Partecipare al progetto A.R.R.D.I.A. (Asbestos Related Respiratory Diseases in Industrial Areas) e ha dichiarato la propria disponibilità a contribuire in generale alla realizzazione del progetto e specificamente, anche finanziariamente, alla creazione e sviluppo di tutte le attività inerenti la Piattaforma Informatica a sostegno dello studio stesso.

Allo stato attuale ha contribuito fattivamente all'assunzione del personale, che sta lavorando per il progetto, sviluppando il bando pubblico per l'assunzione dei collaboratori e all'espletamento di tutte le funzioni inerenti l'assunzione (Selezione, colloqui, rapporti con consulente del lavoro etc)

Si ritiene che possa svolgere un ruolo attivo complementare a quello di AIEA in forza della estrema ed efficiente operatività dimostrata in occasione della selezione del personale.

Si configura l'ipotesi di una convenzione con attribuzione di budget.

Eventuali scostamenti saranno possibili in corso d'opera, sulla base di motivate rimodulazioni dell'attività di progetto, fermo restando il piano complessivo dei costi del progetto per la prima annualità.

ARNAS " G. Brotzu" - Cagliari (Unità Operativa 5)

Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale dotata di professionalità e strumentazioni di laboratorio di altissimo rilievo . Si sta configurando l'ipotesi di poter stipulare la convenzione in forza delle decisioni della Direzione Generale sul ruolo che l'azienda intende avere :

- 1) Partner
- 2) Produzione di Servizi

In funzione di questa scelta si potrà stipulare una convenzione, con relativo trasferimento per la copertura delle spese da partner oppure si richiederà un preventivo per l'estrazione di acidi nucleici sui 5400 prelievi che si prevede di effettuare nel corso dell'effettuazione del progetto.

Roberto Chenti

8 - Abstract del Progetto di Ricerca

Introduzione

Il cancro del polmone e il mesotelioma pleurico sono tumori maligni strettamente legati ad esposizione ambientale / professionale, la cui incidenza è in continuo aumento. Nonostante i progressi della chemioterapia, radioterapia e gestione chirurgica, la sopravvivenza mediana rimane inferiore a 12 mesi. Per questo, la diagnosi precoce rappresenta uno degli approcci più promettenti nel ridurre il crescente carico di patologie tumorali garantendo una migliore efficienza del trattamento chemioterapico, ma risulta difficoltosa e dipende spesso dal prelievo invasivo del liquido o del tessuto pleurico.

Attualmente, il metodo di screening più utilizzato per la sorveglianza dei soggetti a rischio per patologie neoplastiche pleuro-polmonari, come gli esposti ad inalazione di fibre di amianto, è la Tomografia Toracica computerizzata (TC del Torace), che oltre ad avere costi elevati espone i pazienti a ripetute radiazioni e rileva la malignità generalmente nella sua fase avanzata.

D'altro canto, la "biopsia liquida" è emersa recentemente come fonte sostanzialmente non invasiva per la caratterizzazione della eterogeneità tumorale. Ad essa si è affiancato un altro tipo di prelievo biologico, il respiro esalato condensato, sovrapponibile in termini di invasività ma con maggiori caratteristiche di organo specificità.

I cambiamenti genetici / epigenetici che hanno luogo durante l'evoluzione del tumore possono essere rilevati nei fluidi e utilizzati come biomarcatori del cancro. Pertanto, è stato riservato un crescente interesse nei confronti degli acidi nucleici circolanti (cell free DNA / circulating tumor DNA o cell free micro RNA) modulati epigeneticamente durante la trasformazione cellulare.

Per altro, dato che l'ipermetilazione dei geni oncosoppressori è frequentemente osservata nei tumori, è possibile utilizzare i cambiamenti epigenetici di questa natura come potenziali marcatori per rilevare e monitorare la malattia. Inoltre, gli stessi biomarcatori predittivi **possono essere utilizzati come bersagli terapeutici.**

Lo spike di industrializzazione della Regione Sardegna verificatosi negli anni '70, ha esteso il profilo ad elevato rischio, per patologie correlate ad esposizioni lavorative alla popolazione di vaste aree con propensione eco-

nomica verso il settore secondario. Particolare attenzione è stata riservata all'incidenza di patologie storicamente legate all'esposizione all'amianto, specialmente a carico dell'apparato respiratorio. Sulla scia del nuovo Protocollo di Sorveglianza Sanitaria – Regione Sardegna (Giugno 2017), lo studio ARRDIA propone la ricerca biomolecolare di specifici biomarkers con elevata sensibilità e specificità, associata alle prestazioni comprese nella sorveglianza degli ex esposti e uniformate dai Servizi di Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro (SPreSAL) della Azienda per la Tutela della Salute Sardegna (ATS) e dalla Associazione Italiana Esposti all'Amianto (AIEA). Tali biomarcatori (miRNAs, cfDNA/RNA, e ctDNA) verranno ricercati sui campioni di sangue e respiro esalato condensato, esami non invasivi e facilmente eseguibili e tutelati dalle indicazioni atte alla salvaguardia del lavoratore nell'ambito della pandemia COVID 19.

Metodi

Lo studio clinico prospettico, non interventistico, biologicamente arricchito, di fase 3, ARRDIA, è attualmente limitato alla Regione Sardegna (Italia), nella quale sono state selezionate cinque aree industriali con un maggiore inquinamento da amianto. I soggetti inclusi sono

- (1) pazienti con accertata esposizione all'amianto secondo i limiti di allarme dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e
- (2) pazienti sani non esposti senza neoplasie o malattie croniche gravi, distribuiti a parità di dimensioni dei campioni (200 soggetti per gruppo). Sono inclusi inoltre tre gruppi aggiuntivi per la convalida dei biomarcatori interesse di ricerca:
 - (3) A. mesotelioma pleurico (MM) nel numero di 10 casi, anche in considerazione dell'incidenza della patologia nella popolazione della Sardegna.
 - B. tumore del polmone (NSCLC) nel numero di 25 casi, con diagnosi accertata ma non in terapia, farmacologica o chirurgica.
 - C. Interstiziopatie polmonari. La coorte ILD (E) sarà composta da 15 pazienti con diagnosi radiologica o istologica di interstiziopatia polmonare di tipo fibrotico idiopatico (IPF) e non-IPF.

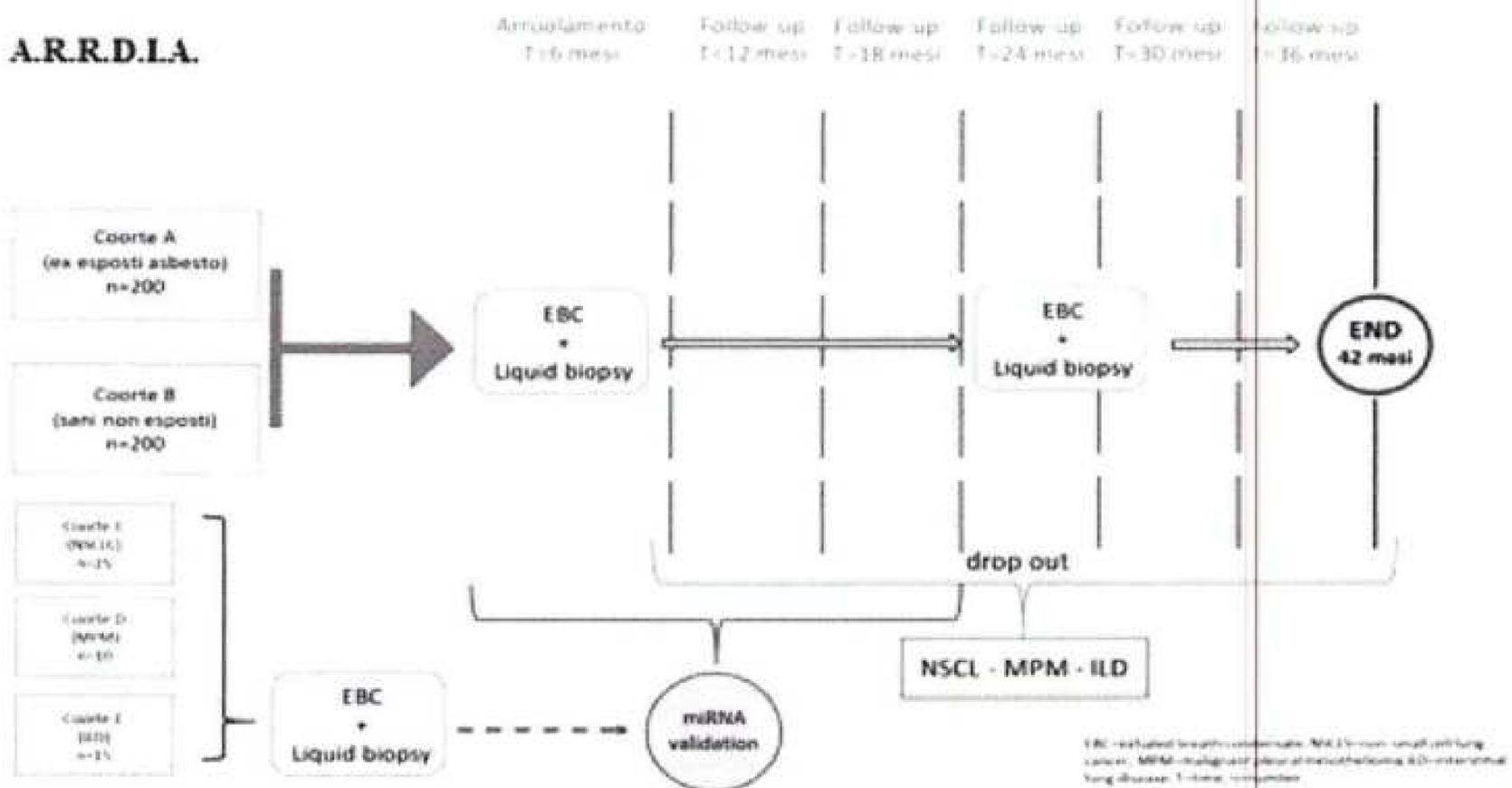
Le dimensioni dei gruppi di convalida sono stimate in base all'incidenza di ciascuna patologia specifica.

Roberto P. P.

Nei gruppi 1 e 2 i campioni di plasma ed EBC vengono raccolti e processati per l'identificazione dei biomarkers con Next Generation Sequencing, ogni 6 mesi fino alla fine dello studio. Negli altri gruppi è obbligatoria la raccolta di un singolo campione iniziale, per evitare possibili bias legati agli eventuali trattamenti medici in ragione della diagnosi (vedi figura timelapse). I prelievi successivi dovranno tenere conto della situazione clinica del momento.

Alla verifica di tecniche riproducibili per estrazione e sequenziamento di miRNA potrà essere affiancata ricerca di ctDNA e oncogeni iper/ipometilati su biopsia liquida oltre alla valutazione del genoma, in rapporto a disponibilità finanziaria. Si intende inoltre vagliare la possibilità di screening della incidenza di mutazioni oncogene ovvero del pattern mutazionale su biopsia liquida. Le curve delle caratteristiche del ricevitore (ROC) verranno utilizzate per valutare il valore dei biomarcatori plasmatici e degli EBC nella diagnosi di asbestosi, MPM, NSCLC e ILD.

ARRDIA



Timelapse: ARRDIA project

Roberto Aleschi

Risultati

I risultati preliminari riguardanti la convalida delle metodiche di estrazione e le analisi per l'identificazione dei biomarcatori nel contesto delle differenti tipologie di campionamento bioptico, avverranno nei 3 mesi successivi all'inizio dell'arruolamento (tra i sei e i nove mesi successivi alla stipula della convenzione tra RAS e CRS4. I risultati principali sono attesi entro i primi 36 mesi dall'inizio dello studio.

Conclusioni

Le evidenze scientifiche emergenti mostrano il valore innovativo diagnostico precoce e prognostico dei miRNAs, specialmente nelle patologie neoplastiche dell'apparato respiratorio e quindi riferibili al profilo di rischio della popolazione oggetto dello studio. Inoltre, la possibilità di combinare i risultati sulle indagini effettuate sui miRNAs con altre classi di biomarkers molecolari, avrà il pregio di garantire una maggiore performance nello screening e nella validazione di nuove metodologie di campionamento e analisi specifiche.

Roberto Casale

9.- Obiettivi generali, specifici e operativi che il progetto si propone di raggiungere

Gli obiettivi generali che ispirano il progetto con caratteristiche " Discovery" e validazione di biomarkers precoci su biopsia liquida e respiro esalato condensato atti ad avere effetto complementare sulle performance diagnostiche tra biomarcatori di diverse classi molecolari (miRNA, ctDNA, stato di metilazione genica, genoma).

Questi obiettivi generali danno origine ai seguenti obiettivi specifici:

OG1 Obiettivo Primario e

OG2 Obiettivi Secondari

- OG1: Validazione di tecniche di esame non invasive per l'individuazione di specifici biomarcatori precoci (MiRNA) di patologia pleuro-polmonare neoplastica e interstiziopatia, in soggetti con documentata esposizione alle fibre di asbesto.

- OG2: Determinare se l'espressione di uno o più specifici miRNA presenti nel plasma o nel EAC possa differenziare i pazienti con pregressa esposizione lavorativa ad asbesto da quelli sani.

-Valutare una possibile correlazione tra MiRNA nel plasma e nel EAC.

-Stimare la sensibilità e specificità dei MiRNA alterati usando curve di ROC.

-Creare un database digitale per raccolta dati e pannelli MiRNA specifici.

-Creare una bio-banca per lo stoccaggio dei campioni biologici fruibili per successive ricerche biomolecolari.

-Validare e Brevettare, a livello internazionale, la procedura e gli array MiRNA

● *OS1: Arruolare pazienti:*

verranno arruolati pazienti in modo da costituire una coorte di campioni con accertata esposizione all'amianto (esposti a concentrazioni di amianto superiori a 0,1 fibre/ml vs non esposti o esposti a concentrazioni inferiori a questa soglia),

un gruppo di individui non esposti come coorte di controllo e tre gruppi aggiuntivi per la convalida dei biomarcatori: pazienti con diagnosi di mesotelioma .

pleurico (MM), tumore del polmone (NSCLC) e pazienti con nuova diagnosi di malattia polmonare interstiziale. La composizione del campione e le considerazioni statistiche relative allo stesso, sono esplicitate a pag 7-9 del Progetto approvato.

● *OS2: Strutturare Piano di protezione dei dati e Piattaforma Informatica:* Con l'ausilio del DPO e Ufficio per Settore Privacy, strutturare Piano Tutela Dati, Individuare titolare del trattamento, regolare rapporti con i contitolari dei vari partners, strutturare e compilare Registro dei Trattamenti, Organizzare corsi di formazione per tutti i partecipanti al progetto.

● *OS3: Definizione del protocollo e delle metodologie sperimentali :* Al fine di definire un protocollo sperimentale sufficientemente affidabile è necessario testare 30 prelievi tra i laboratori coinvolti nel Progetto.

● *OS4: Raccogliere i campioni:* i campioni verranno raccolti inizialmente in fase di post arruolamento (6-12 mesi dopo la firma della Convenzione tra RAS-CRP e CRS4 e i 18 mesi di proroga concessi per insorgenza di Pandemia Covid 19) e, successivamente, ogni 6 mesi, nel corso dello svolgimento del progetto.

● *OS5: Sequenziare e analizzare i dati:* in seguito a estrazione degli acidi nucleici e preparazione delle librerie, i campioni verranno sequenziati con tecnologia NGS applicando i criteri della massima qualità e massima protezione dei dati. I dati saranno poi analizzati con metodologie bioinformatiche al fine di identificare potenziali biomarcatori predittivi.

● *OS6: Validare i risultati:* i biomarcatori risultati statisticamente significativi verranno analizzati con criteri statistici ed epidemiologici. Poi sottoposti a validazione sperimentale su un numero elevato di campioni e con l'ausilio di una seconda metodica analitica (Laboratorio Certificato unico in Sardegna è quello dell SC di Ematologia dell' OSPS Francesco di Nuoro).

Questi obiettivi specifici si traducono nei seguenti obiettivi realizzativi, che sono associati nel piano di lavoro, vedi Sezione 11, ad attività specifiche:

● OR1 – Gestione del progetto

Roberto Cherchi

- OR2 - Definizione specifiche di progetto
- OR3 – Acquisizione apparecchiature e installazione
- OR4 – Produzione dati di sequenziamento e analisi
- OR5 – Analisi, interpretazione e validazione
- OR6 – Disseminazione e sfruttamento dei risultati

ottenere prestazioni superiori rispetto agli approcci standard di screening

e monitoraggio, al fine ridurre i costi e i danni dei test standard attuali, limitando i tassi di falsi negativi.

10 - Stato dell'arte

Background

L'incidenza del tumore del Polmone non a Piccole Cellule (NSCLC) è in costante aumento e rappresenta la seconda tipologia di per frequenza e la principale causa di morte cancro-relata [1-3]. Allo stesso modo, benché neoplasia rara, anche l'incidenza del mesotelioma pleurico maligno (MM) risulta in progressivo aumento, come risultato di una diffusa esposizione all'asbesto [4]. Approssimativamente, l'80% dei pazienti affetti da MM ha una storia di esposizione professionale all'asbesto, considerata un fattore di rischio per lo sviluppo della malattia.

La patogenesi molecolare del NSCLC e del MM non è ad oggi ben chiara. Insieme alle più comuni mutazioni annoverate in entrambi i tipi di tumori [5-7], alterazioni epigenetiche, quali la metilazione del DNA, sono state ritrovate con profili differenti tra NSCLC e MM [8]. L'epigenoma è una componente dinamica e finemente regolata che garantisce la preservazione di un pattern di espressione normale nelle cellule. Uno dei componenti principali nella regolazione dell'espressione è la metilazione delle isole CpG all'interno della regione promoter, sia nelle cellule normali che in quelle tumorali [9, 10].

Le alterazioni nel profiling epigenetico potrebbero favorire nuove impor-

tanti intuizioni riguardo l'eziologia e la storia naturale del cancro. Poiché le alterazioni istologiche vengono precedute da molteplici modifiche epigenetiche, quest'ultime potrebbero essere utili come biomarkers per la diagnosi e valutazione del rischio di cancro. Molti tumori progrediscono in completa asintomaticità fino al raggiungimento di stadi avanzati. Nella gestione della malattia, lo sforzo principale dovrebbe essere focalizzato su diagnosi precoce, percezione rapida della progressione di malattia e monitoraggio frequente. Il gold standard attuale nella diagnosi tumorale si basa sull'esame istologico di biopsie tissutali, benché queste metodiche risultino invasive e costose. L'utilizzo di fluidi biologici definiti come "biopsie liquide", rappresenta una fonte non invasiva di biomarkers tumorali [11]. Nei tumori solidi, i biomarkers circolanti possono essere riversati nel torrente ematico attraverso vari eventi inclusa la necrosi, l'apoptosi, e altri meccanismi fisiologici nel microambiente stromale. Inoltre, le biopsie liquide possono fornire una rappresentazione della eterogeneità spaziale e temporale durante la formazione ed evoluzione del tumore. Le aberrazioni epigenetiche offrono target dinamici e reversibili per le terapie antitumorali. Alterazioni dovute a sovra-espressione, mutazione o riarrangiamento vengono sempre più frequentemente ritrovate in geni che controllano l'epigenoma.

Di seguito proponiamo una breve revisione della letteratura riguardante i biomarkers epigenetici circolanti, la loro espressione durante lo sviluppo del tumore e il loro utilizzo potenziale nella diagnosi di malignità pleuropolmonare.

Epigenetica nel tumore del polmone.

Il tumore del polmone coinvolge una sequenza di eventi genetici ed epigenetici che si accumulano nell'epitelio [12]. L'inattivazione dei geni oncosoppressori attraverso la metilazione del promoter, spesso definita come ipermetilazione, è un segno distintivo del cancro del polmone ed è un evento precoce nel processo carcinogenetico [13]. La metilazione del promoter può accoppiarsi con eventi di mutazione o delezione che inattivano un gene oncosoppressore. Generalmente, l'inattivazione di un allele è insufficiente per condurre ad una selezione clonale. Comunque, esistono evidenze secondo cui in determinati loci genici, non necessariamente entrambe le copie di alleli devono essere inattivate per procurare un impatto negativo sulla cellula, e la inattivazione parziale di un allele contribuisce alla carcinogenesi [14]. Vari fattori tossici/stress possono modificare le cellule dei mammiferi risultando in una trasformazione epigenetica del feno-

tipo senza modifiche alla sequenza di informazioni del DNA cellulare; questi includono radiazioni, tabagismo, ormoni, asbesto, arsenico, radon, nickel, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e varie sostanze chimiche. Il tumore del polmone è comunemente associato con l'esposizione al fumo di tabacco, ma l'incidenza del NSCLC nei non fumatori risulta comunque del 13-28% del totale [15]. Anche l'esposizione ad arsenico, radon e asbesto è coinvolta nella carcinogenesi polmonare [16-19]. Questi carcinogeni possono indurre un ampio range di alterazioni molecolari, sia genetiche (mutazioni puntiformi e aberrazioni genome-wide) che epigenetiche, incluse le modifiche nella metilazione del DNA e nella espressione dei miRNA. Nella Figura 1 viene mostrato l'induzione della metilazione del DNA nel sito del danneggiamento, da parte dell'asbesto.

L'inattivazione epigenetica di geni oncosoppressori, quali RASSF1A e p16, è stata osservata nei pazienti con tumore del polmone esposti all'asbesto [20-22]. L'ipermetilazione di CDKN2A può verificarsi precocemente nella genesi del cancro polmonare, essendo stata identificata nelle lesioni pre-maligne [23]. Similmente, la metilazione del promoter della famiglia del dominio associato a Ras (RASSF1A), APC, ESR1, ABCB1, MT1G e HOXC, è stata accomunata allo stadio I del NSCLC [24, 25]. Altri geni ipermetilati, come hDAB2IP, H-cadherin, DAL-1, e FBN2, sono stati correlati invece allo stadio avanzato di NSCLC [26-28], suggerendo che questi cambiamenti possono avvenire ad un timing tardivo nel processo di carcinogenesi. I fattori epigenetici possono essere responsabili delle aberrazioni del miRNoma (definito come lo spettro completo dei miRNAs di uno specifico genoma) osservate nel tumore. Infatti i miRNA sono soggetti alle stesse regolazioni epigenetiche di qualsiasi altro gene codificante proteine. Inoltre, un gruppo specifico di miRNA (definito come epi-miRNA) possono colpire direttamente gli effettori del meccanismo epigenetico (come le DNA metiltransferasi, le istone delectasi e i geni repressivi poli-combinanti complessi) influenzando indirettamente l'espressione dei geni oncosoppressori, che è controllata da fattori epigenetici. E' stata rilevata una specifica alterazione miRNA nelle neoplasie indotte da agenti cancerogeni [29]. Uno studio recente ha identificato una alterazione di miRNA associata con il NSCLC nel paziente esposto all'amianto, dove miR18b, miR-374a, miR-2-1, Let-7d, Let-7e, miR-199b-5p, miR-331-3p e miR-96 sono risultati sovraespressi, mentre miR-939, miR-671-5p, miR-605, miR-122-5p e miR-202 erano sottoespressi [30].

Roberto DeLu

L'asbesto è riconosciuto essere un mutageno, benché debole, [31-32], ed esistono molteplici reports sulla metilazione dei geni oncosoppressori nel MM [33, 34]. Al pari di altri tumori, la genesi del MM è associata con mutazioni genomiche alla pari degli errori epigenetici che portano a modifiche dell'espressione genica [32]. L'induzione della metilazione in un percorso importante dal punto di vista fenotipico avviene come risultato dell'interazione fisica tra le fibre di asbesto e la pleura parietale. La prevalenza della metilazione di RASSF1 è stata trovata nel MM (33%); è stato anche evidenziato che la metilazione di RASSF1 è associata significativamente ad un aumento della conta di corpuscoli di asbesto, con prevalenza di metilazione in APC, CDKN2A e CDKN2B [35]. L'inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A/frame di lettura alternativa (CDKN2A/ARF), i geni della neurofibromatosi tipo 2 (NF²) e della proteina 1 associata a BRCA1 (BAP1) sono gli oncosoppressori alterati rilevati più frequentemente nelle cellule di MM [36]. BAP1 è coinvolto nella modifica degli istoni e la sua inattivazione induce il disturbo della profilazione dell'espressione genica globale. È stato anche segnalato lo stato di metilazione della regione promotrice di nove geni specifici [37]. Viene descritta un'elevata frequenza di metilazione per i geni E-cadherine (71,%) e FHIT (78%) e in misura minore ACP1A (1,3%), RASSF1A (19,5%) e DARK (20%). Valori intermedi sono stati osservati per p16 (INK4a) (28,2%), APC1B (35,5%), p14 (ARF) (44,2%) e RAR-b (55,8%). Anche la linea di miRNA deregolati è stata rilevata nel MM [38-41]. Questi dati indicano quindi che la metilazione del promoter associata con alterazioni dell'espressione genica è un evento comune nel MM.

Roberto Uchii

Figure 1

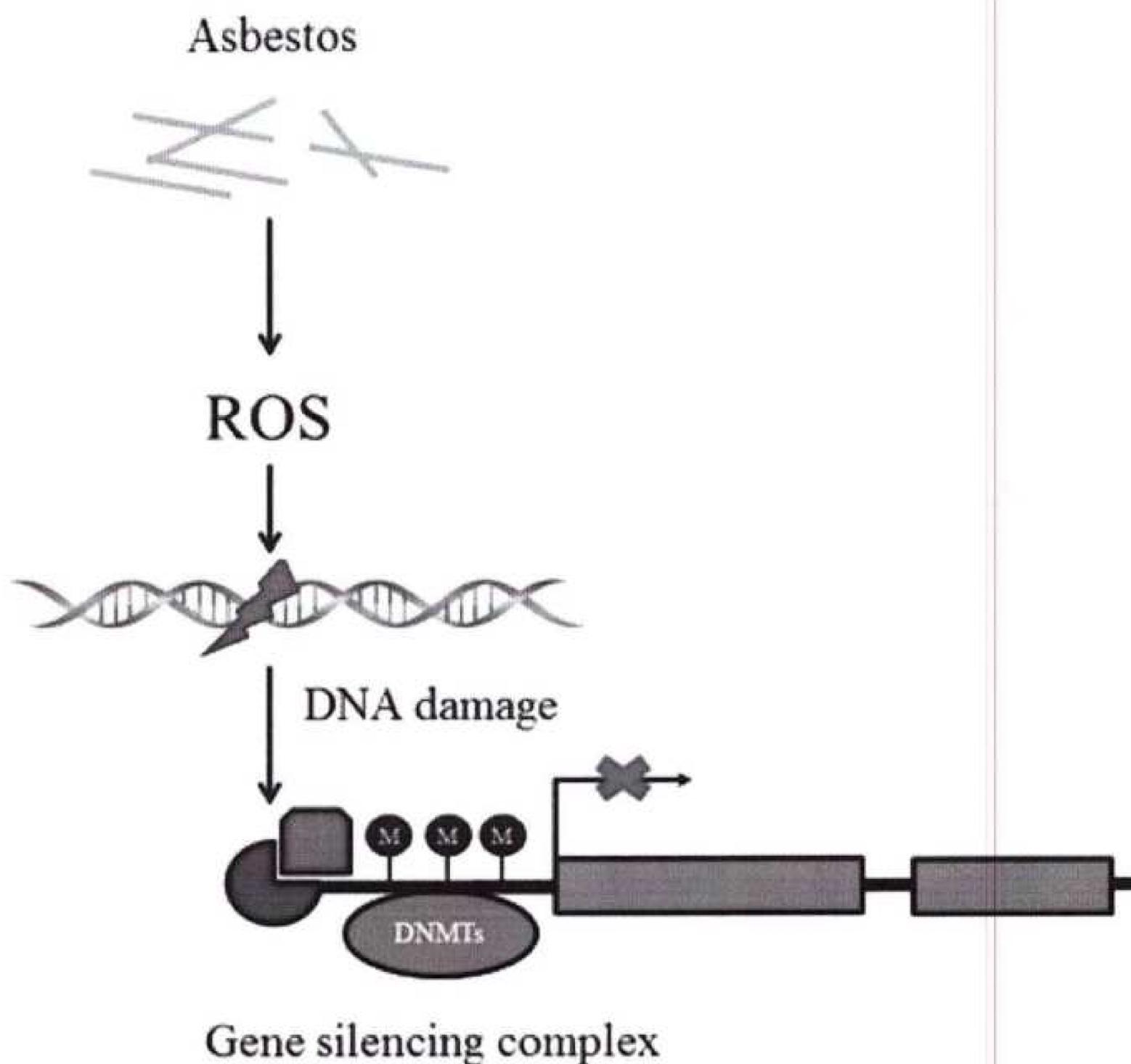


Figura 1: Danno ossidativo sul DNA e modifiche epigenetiche. La formazione di ROS indotti dall'asbesto promuove il danno del DNA (rotture, ossidazione delle basi). La metilazione del promoter CpG induce il silenziamento genico. (Tomasetti et al. 2016)

Geni regolati epigeneticamente: possibili biomarkers.

Nonostante i recenti progressi della ricerca nel NSCLC e l'utilizzo di nuovi agenti terapeutici, l'outcome rimane insoddisfacente con un rate di sopravvivenza a 5 anni di circa il 15% [3]. Al momento, la maggior parte dei tumori polmonari vengono riscontrati in uno stadio avanzato nel quale i trattamenti hanno una efficacia limitata e i tassi di sopravvivenza sono bassi. La diagnosi tardiva avviene anche nei pazienti con MM con una sopravvivenza media globale di 9.4 mesi [42]. Per questo, la diagnosi preco-

ce rappresenta uno degli approcci più promettenti per la riduzione del costante aumento del burden tumorale. Le nuove tecnologie molecolari che possono riflettere e modifiche cellulari a livello genomico/epigenomico o proteomico sono emerse recentemente come potenziali strategie per la rilevazione precoce delle neoplasie polmonari. Inoltre, l'identificazione di nuovi biomarkers predittivi per gli outcome e la risposta tumorale è di estrema importanza per ottimizzare l'efficacia terapeutica e prevenire il sovra o sotto-trattamento nei pazienti con tumore del polmone. Lo sviluppo di metodi non invasivi per rilevare e monitorare i tumori continua ad essere un problema sostanziale in oncologia. FNA, mRNA e microRNA sono rilasciati e circolano nel sangue e in altri fluidi corporei dei pazienti con tumore. Le cellule tumorali rilasciano frammenti di DNA in circolo, che possono essere ritrovati nelle frazioni di sangue cell-free, così chiamate biopsie liquide [43, 44]. Il meccanismo biologico che culmina nel rilascio di acidi nucleici circolanti rimane poco chiaro. Il Cell free DNA (cfDNA) e i cfmiRNAs possono essere rilasciati passivamente nel torrente ematico in seguito alla necrosi o all'apoptosi cellulare, a seconda della localizzazione, dimensione, metastatizzazione, vascolarizzazione e stato del tumore [45, 46]. Inoltre, i miRNAs sono coinvolti nella comunicazione inter-cellulare. I meccanismi di possibile rilascio di miRNAs includono (i) la secrezione attiva di miRNAs attraverso vescicolazione e (ii) la perdita passiva di miRNAs dalle cellule logorate. Questo processo contribuisce in maniera minore al processo di generazione di miRNAs circolanti e avviene prevalentemente in circostanze patologiche quali danno tissutale, apoptosi cellulare, processi tumorali metastatici o infiammazione cronica [47, 48]. I miRNAs circolanti vengono impacchettati in vescicole extracellulari (EVs), che includono esosomi e microvescicole, mentre i miRNAs vesicle-free sono associati a proteine o con complessi ad alta densità lipoproteica [49, 50]. Solo i miRNAs derivanti dalle vescicole extracellulari svolgono il compito di comunicazione inter-cellulare, controllando molti aspetti dello stato fisiologico umano e rappresentando, per questo motivo, degli innovativi biomarkers di malattia.

In questo contesto, i biomarkers epigenetici, in particolare la metilazione del DNA e l'espressione dei miRNA hanno delle proprietà uniche che li rende potenziali markers diagnostici e prognostici. Oltre alla stabilità della metilazione del DNA, alla resistenza dei miRNA alla degradazione da parte delle RNasi, anche gli eventi epigenetici aberranti sono frequentemente osservati nei tumori in stadio iniziale [51-53].

Roberto Chen

Biomarkers cell-free circolanti nel tumore del polmone.

Molti studi hanno rivelato la presenza di DNA metilato nel siero o nel plasma di pazienti con differenti tipi di tumori, incluso il NSCLC [53, 54]. L'ipermetilazione acquisita di uno specifico gene può essere riscontrata utilizzando il metodo con bisolfito di sodio, che converte la citosina non-metilata in uracile. Il DNA modificato viene analizzato utilizzando sia (i) la PCR metilazione-specifica, con primers che sono specifici per DNA metilato e non-metilato, o (ii) con il sequenziamento del DNA [55]. Nel caso del tumore del polmone, i geni aberranti oncosoppressori metilati, come p16INK4A, RARB2 e RASSF1A sono stati trovati nel sangue di questi pazienti [51, 56, 57]. Anche il promotore di SOX17 è stato trovato in stato di forte ipermetilazione nei tumori primitivi e nei campioni di plasma sia negli stadi operabili che negli stadi avanzati di NSCLC. Negli stadi avanzati, la metilazione del promoter SOX17 nel DNA plasmatico avrebbe una influenza statisticamente significativa sulla sopravvivenza dei pazienti con NSCLC [58].

Recentemente, modelli di espressione di miRNA sono stati usati per la rilevazione di tumori del polmone o predire la prognosi in questi pazienti. Meta-analisi sulla espressione di miRNA ne tessuti tumorali polmonari hanno identificato presenza di sette miRNA sovraregolati (miR-21, miR-210, miR-182, miR-31, miR-200b, miR-205 e miR-183) e otto sotto-regolati (miR-126-3p, miR-30a, miR-30d, miR-86-5p, miR-451a, miR-126-5p, miR-148 e miR-145) [59]. Il miR-21 potrebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo e progressione del tumore del polmone attraverso multipli percorsi e processi (i percorsi JAK/STAT, MAPK, Wnt o PPAR, e la regolazione dei cicli cellulari o dell'apoptosi) [60], ed è stato associato con un peggioramento della prognosi nei pazienti con tumore del polmone [61]. Allo stesso modo, miR-182 è stato correlato negativamente con la sopravvivenza dei pazienti con tumore del polmone [62]. miR-205 è stato trovato sovraregolato nel carcinoma squamocellulare (SCC), e potrebbe risultare utile come biomarker specifico per distinguere SCC dall'adenocarcinoma (AD) [63]. miR-126 risulterebbe sotto-regolato significativamente e la sua minor espressione sarebbe correlata con una sopravvivenza breve nel NSCLC [64].

È stato osservato che non tutti i miRNAs deregolati nei campioni di tessuto sono stati ritrovati nei campioni di siero, rafforzando ulteriormente l'idea di elevata specificità tissutale dei miRNAs e suggerendo un ruolo predittivo dei miRNAs circolanti indipendentemente dai campioni di tes-

suto [65]. Analizzando i miRNAs nel siero da un set di campioni comprendente 400 casi di NSCLC e 220 controlli, è stato identificato un profilo di 10 miRNAs (miR-20a, miR-24, miR-25, miR-145, miR-152, miR-199a-5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR-320) [66]. Livelli aumentati di miR-221, miR-222, miR-223, miR-199a-5p, miR-20a, miR-25 e miR-24 sono stati trovati in campioni di tessuto di pazienti con tumore del polmone [67]. Allo stesso modo, la famiglia miR-183 (miR-96, miR-182 e miR-183), un gruppo di oncomiRs, è stata trovata sovraespressa nei tumori polmonari e nel siero dei pazienti con NSCLC [68].

La concordanza tra espressione di miRNAs sierici e tissutali precedentemente identificati nello stesso tipo di cancro suggerisce che i miRNAs sierici potrebbero derivare dalle cellule tumorali o da tessuto/cellule affette dai tumori. Per questo, sono stati proposti molteplici pannelli di miRNAs circolanti con propositi clinici, come la diagnosi precoce, la prognosi e il monitoraggio della terapia del tumore del polmone [65, 66, 69]. Boeri et al., hanno sviluppato una identificazione di miRNA basata sull'utilizzo di una ratio, applicabile metodologicamente per l'uso clinico generale. Più recentemente, utilizzando 24-miRNA ratio, è stato messo a punto un algoritmo per la predizione, diagnosi e prognosi del tumore del polmone, che è stato capace di ridurre l'incidenza di falsi positivi nella TC a basso dosaggio, aumentando quindi l'efficacia dello screening [69].

Il valore del circulating tumor DNA (ctDNA) come biomarker negli stadi avanzati di tumore è ben definito [84, 85], ma il suo ruolo nella rilevazione degli stadi iniziali di cancro del polmone è tuttora incerto [86]. Uno studio del 2017 riporta una sensibilità del 48%, su un threshold di 2 varianti nucleotidiche singole (SNVs) in 96 pazienti stadio I-III. La sensibilità varia dal 15% per gli adenocarcinomi stadio I al 100% per gli squamocellulare stadio II-III [87]. Gli sviluppi tecnologici della Next Generation Sequencing (NGS) nello studio dei ctDNA per la rilevazione degli stadi precoci di malattia, potrà migliorare la sensibilità dei biomarkers in tale contesto. Recentemente, uno studio per la rilevazione degli stadi precoci tototumorali, ha combinato l'analisi NGS di ctDNA nel sangue con un vasto pannello di biomarkers proteici in 1005 pazienti affetti da differenti tipi di tumore in stadio I-II con 812 pazienti non tumorali [88]. Mentre la specificità dei risultati superava il 99%, la sensibilità variava dal 33% nei tumori della mammella al 98% per i tumori ovarici. La sensibilità nel tumore del polmone risultava del 54% in 10 pazienti. I biomarkers circolanti nel tumore del polmone sono riassunti nella Tabella 1.

Roberto Chelvi

Biomarkers cell-free circolanti nel mesotelioma maligno.

L'ipermetilazione del promoter di APC, CCND2, CDKN2A, CDKN2B, HPPBP1 e RASSF1 sono stati trovati nel MM [35]. L'utilizzo di DNA circolante metilato tumore-specifico ha mostrato grandi aspettative come potenziale biomarker oncologico. Recentemente, è stato descritto il silenziamento dell'espressione della trombomodulina (TM) nel MM, attraverso un meccanismo che coinvolge la metilazione PARP1-mediata del promotore TM [70]. La trombomodulina, fattore anticoagulante espresso soprattutto dalle cellule endoteliali, è interessato nei processi patologici che includono la trombosi, l'infiammazione e il cancro [71]. L'espressione eterogenea della TM è stata osservata nei tumori, che mostrano una peggiore prognosi quando l'espressione di TM è bassa o assente [72]. Visto che la metilazione del promotore TM risulta responsabile del silenziamento dell'espressione di TM stessa nei tessuti mesoteliomatosi, sono state rilevate sequenze di DNA aberrante metilato della TM in circolo nei pazienti affetti da MM. Alti livelli di DNA metilato di TM sono stati trovati nel siero di paziente mesoteliomatosi, e i suoi livelli non risultavano alterati dall'istotipo né dall'eventuale asportazione del tumore [73].

Differenti tipi di miRNA deregolati sono stati individuati nel tessuto del MM attraverso un miRNA profiling basato su microarray [38, 40, 74, 75]. Un particolare miR-score, utilizzando i dati espressi di sei microRNAs (miR-21-5p, -23a-3p, -30e-5p, -221-3p, -222-3p e -31-5p) ha permesso di predire la sopravvivenza a lungo termine con una accuratezza del 92.3% nei pazienti sottoposti a pneumonectomia extrapleurica [76]. Inoltre, tre miRNA con potenzialità diagnostiche (miR-126, miR-13 e miR-15) sono stati in grado di distinguere pleura non neoplastica da pleura MM con una sensibilità di 0.95 (95% CI, 0.89-1.00), specificità di 0.93 (95% CI, 0.87-0.99), e una accuratezza globale di 0.94 (95% CI, 0.88-1.00) [74]. Tra i vari miRNAs presenti nel tessuto di MM, ne sono stati identificati in circolo alcuni sovraregolati (miR-101, miR-25, miR-26b, miR-335, miR-223) e sottoregolati (miR-29 and miR-516) poi proposti come biomarkers clinici [77].

Dallo screening di un profilo miRNA e conseguente validazione, il miR-625-3p è stato rinvenuto francamente sovraregolato nei pazienti con MM. Questo miRNA discriminerebbe i pazienti affetti da MM da quelli sani con un sensibilità del 73%, specificità del 79.5 e una accuratezza globale dell'82% [78]. La significativa sottoespressione di miR-126 e miR-103 è stata riportata nel siero e nella frazione cellulare, rispettivamente

te, di pazienti con MM quando paragonati a pazienti sani esposti all'asbesto e pazienti sani non esposti [40, 79, 80]. I biomarkers circolanti nel MM sono riassunti nella Tabella 1.

Lung Cancer				
	cfDNA	Ref	cfmiRNAs	Ref
NSCLC	<i>P16INK4A</i>	51	Up: <i>miR-21, miR-210, miR-182, miR-31, miR-200b, miR-205, miR-183</i> Down: <i>miR-21, miR-210, miR-182, miR-31, miR-200b, miR-205 and miR-183</i>	62
NSCLC	<i>RARB2</i>	52	Up: <i>miR-20a, miR-24, miR-25, miR-199a-5p, miR-221, miR-222, miR-223</i> Down: <i>mir-145, miR-152, miR-320</i>	69
LCLC/SCLC/SCLC	<i>RASSF1A</i>	42		
NSCLC	<i>SOX17</i>	53		
Malignant Mesothelioma				
MPM	<i>APC</i>	34	Down: <i>miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-30e-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-31-5p</i>	75
MPM	<i>CCND2</i>	34	Down: <i>miR-126, miR-143, and miR-145, miR-103</i>	39,57, 73, 78,79
MPM	<i>CDKN2A/B</i>	34	Up: <i>miR-101, miR-25, miR-26b, miR-335, miR-223</i> Down: <i>miR-29 and miR-516</i>	76
MPM	<i>HPPBP1</i>	34	Up: <i>miR-625-3p</i>	77
MPM	<i>RASSF1</i>	34		
	<i>TM</i>	54		

Tabella 1: cfDNA, cell-free DNA; cfmiRNAs, cell-free microRNAs; LCLC, Large cell lung cancer; SCLC, Small cell lung cancer; NSCLC, Non-small cell lung cancer; SCLC, Squamous cell lung cancer; MPM, Malignant pleural mesothelioma (Tomasetti et al. 2016)

La sottoregolazione di miR-126 potrebbe rappresentare un marker per il rilevamento precoce di tumore. L'analisi ROC ha rivelato che miR-126 da solo può predire la presenza di MM con una buona sensibilità (75%) ma scarsa specificità (54%), e sembrerebbe riflettersi sulla prognosi [40, 73]. Per aumentare la sua specificità, i livelli di miR-126 sierici sono stati accomunati con quelli sierici di peptidi mesotelina-relati (SMRPs), i marker più studiati e utilizzati nel MM, per essere quindi proposti come markers combinati per la diagnosi precoce di MM [40]. I livelli di SMRP distinguono i pazienti con MM dai controlli sani con una sensibilità del 60-70%

e una specificità del 90-100%, discriminando meglio i pazienti sani da quelli con MM epitelioide avanzato o bifasico rispetto a quelli con MM sarcomatoide o in stadio iniziale [81, 73]. Comunque, uno studio di meta-analisi ha dimostrato che nei soggetti sintomatici o ad alto rischio, un test su sangue negativo per SMRPs non escluderebbe il MM neppure ad una soglia elevata (1-1.5 nmol/l) [81].

E' stato descritto che uno dei fattori limitanti nell'utilizzo di SMRPs come strumento di screening nella popolazione sarebbe lo stato di metilazione del gene mesotelina (MSLN) nel tumore, che causerebbe una sotto-regolazione di SMRP [82]. I casi di MM nei quali è stata evidenziata una metilazione di MSLN mostrerebbero un basso livello di SMRPs. MSLN è normalmente metilato nella pleura, e questa metilazione viene persa nella maggior parte dei tumori [82]. Ad ogni modo, in un sottogruppo di tumori, la metilazione verrebbe conservata e ciò spiegherebbe la scarsa sensibilità

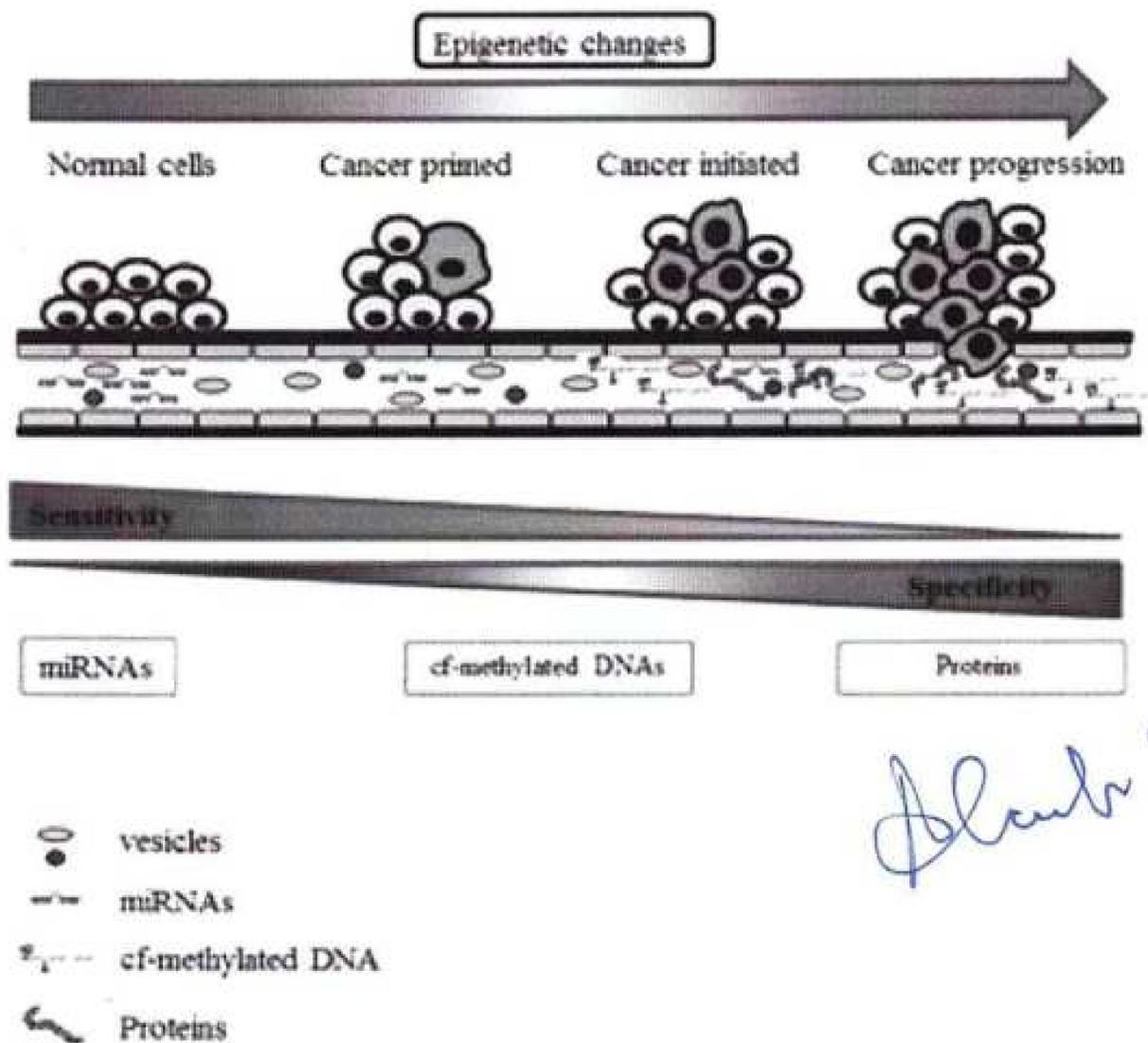
del saggio di SMRP. Sono state svolte molteplici analisi combinando SMRPs con differenti numeri di proteine, ma nessuna delle combinazioni testate ha mostrato un miglioramento sufficiente della performance di questo biomarker. L'alta sensibilità di miR-126 aumenta le performance di SMRPs in un modello predittivo di MM come precedentemente riportato [40]. Ugualmente, il miR-103a-3p circolante aumenterebbe la performance diagnostica di SMRPs mostrando un AUC di 0.93, con una sensibilità del 95% e una specificità del 81% [83]. Va sottolineato che miR-103a-3p in questo caso non è stato isolato dal plasma ma dalla frazione cellulare del sangue. Perciò, è possibile che le modificazioni nei livelli di miR-103a-3p possano essere il risultato di un effetto indiretto, come una risposta del sistema immunitario nei confronti del tumore.

Di recente è stato riscontrato che il DNA metilato circolante della TM discrimina significativamente i pazienti affetti da MM con quelli appartenenti al gruppo di controllo con una elevata specificità (82%) ma con scarsa sensibilità (60%). L'alta specificità del DNA metilato circolante completa in modo significativo le performance di miR-126 e di SMRPs nel rilevamento del MM [73]. Tale modello a 3-marcatori è stato creato per identificare il MM anche a livelli di SMRPs al di sotto del cut-off, come nel caso del fenotipo sarcomatoide. La combinazione di 10 SMRPs con miRNA circolanti e cfDNA appare essere più sostanziale rispetto alla combinazione di biomarcatori appartenenti alla stessa classe molecolare. Ciò potrebbe essere dovuto a differenze tra meccanismi di immissione in circolo degli stessi biomarcatori. Generalmente, le proteine vengono rilasciate durante i

processi di secrezione naturale i quali possono essere alterati dai processi neoplastici. Al contrario, DNA e RNA sono rilasciati in circolo soprattutto durante l'apoptosi, al necrosi e altri processi degenerativi. Pertanto, l'effetto complementare tra biomarkers di diverse classi molecolari potrebbe portare con ogni probabilità ad una migliore discriminazione tra casi di malattia e controlli (Figura 2).

Figura 2: Rilascio di biomarker epigenetico da tessuto affetto da trasformazione maligna e progressione tumorale secondaria ad un insulto tossico. Come risultato dell'esposizione a una condizione tossica, fattori di rilascio cellulare nel flusso sanguigno possono essere rilevati come biomarcatori circolanti per il rilevamento precoce e la progressione del cancro. Le proteine vengono rilasciate durante i processi di secrezione naturale, che possono essere alterati nei tumori. Al contrario, il DNA (cfDNA) e il miRNA vengono rilasciati principalmente durante apoptosi, necrosi e altri processi degenerativi. Pertanto, un effetto complementare tra biomarcatori di diverse classi molecolari dovrebbero essere più rappresentativi e poter operare sinergicamente per discriminare tra i casi di cancro e soggetti di controllo. (Tomasetti et al. 2016)

Figure 2



Nuove tecnologie da seguire: ricerca di biomarkers nel respiro esalato.

Esistono prove crescenti a sostegno dell'uso del respiro esalato (EB), incluso il condensato del respiro esalato (EBC) per il rilevamento del cancro. L'EBC, che include cellule e frammenti di DNA, può persino supportare il rilevamento di cloni resistenti all'EGFR [89]. I frammenti volatili dell'EB sono biomarcatori sensibili del cancro del polmone. I composti organici volatili (COV) possono essere catturati e analizzati da un'ampia gamma di tecnologie, inclusi GC-MS, nanosensori, sensori colorimetrici e altri metodi [90]. Nella diagnosi è stato utilizzato un sensore nano-array intelligenza artificiale e la classificazione di 17 diverse malattie da campioni di respiro di 1404 soggetti, con un'accuratezza dell'86%. Alcuni studi suggeriscono che un tale array possa discriminare i noduli polmonari benigni da quelli maligni [91], o prevedere la risposta alla terapia e la recidiva [92]. Può anche distinguere il tipo istologico [93] o prevedere i risultati dell'analisi molecolare [94]. È interessante notare che apparentemente può anche discriminare tra diversi tipi di cancro (polmone, seno, colon-retto e prostata) [95].

Conclusioni

Finora non è stato descritto alcun biomarcatore con sensibilità e specificità ragionevoli per il rilevamento di neoplasie pleuro-polmonari. Il cancro prevede cambiamenti epigenetici / genetici e queste alterazioni tumore-specifiche possono essere rilevate in vari fluidi biologici come sangue, siero, espettorato o respiro esalato condensato. La metilazione del DNA è molto stabile, può quindi essere valutata per monitorare il processo correlato al tumore. Per questo, il rilevamento di DNA/RNA privo di cellule nei pazienti affetti da tumori maligni e in particolare nel cancro del polmone appare un promettente esame diagnostico tumorale, eseguibile con prelievi non invasivi. Più recentemente, una varietà di tecniche digitali genomiche è stata sviluppata per migliorare l'identificazione di modifiche genetiche negli acidi nucleici privi di cellule. La PCR digitale è emersa come uno strumento sensibile per rilevare i cambiamenti epigenetici e le mutazioni puntiformi. La dinamica del DNA / RNA privo di cellule è stata riportata in diversi studi su tumori solidi maligni per valutare la relazione tra i livelli di DNA / RNA libero da cellule, carico tumorale e risposta al trattamento. I biomarcatori proteici vengono convenzionalmente utilizzati per la diagnosi precoce e la prognosi nel cancro del polmone e nel mesotelioma maligno.

Sfortunatamente, la specificità e l'affidabilità di questi biomarcatori non è soddisfacente. Potrebbe essere plausibile combinare i biomarcatori di diverse classi molecolari tra cui DNA/RNA cell-free e ctDNA al fine di migliorare le prestazioni complessive. Inoltre, i recenti progressi nel riscontro di nuovi miRNA mimetici/inibitori offre ulteriori opportunità terapeutiche nel trattamento di queste malattie. Si ritiene che la ricerca in quest'area fornirà risultati che saranno utilizzati per una migliore diagnosi precoce di questi neoplasie maligni di difficile gestione, specialmente in una coorte di soggetti ad alto rischio quali gli ex esposti ad amianto.

Referenze bibliografiche

- [1] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013, CA Cancer J. Clin. 63 (2013) 11–30.
- [2] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, CA Cancer J Clin. 65(2015) 87-108.
- [3] L.A. Torre, R.L. Siegel, A. Jemal, Lung Cancer Statistics, Adv. Exp. Med. Biol. 893 (2016) 1-19.
- [4] V. Neumann, S. Löseke, D. Nowak, F.J. Herth, A. Tannapfel, Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health, Dtsch. Arztebl. Int. 110 (2013) 319-326
- [5] T. Mitsudomi, Molecular epidemiology of lung cancer and geographic variations with special reference to EGFR mutation, Transl. Lung Cancer Res. 3 (2014) 205-211.
- [6] G.D. Brooks, L. McLeod, S. Alhayyani, A. Miller, P.A. Russell, Ferlin W, et al., IL-6 transsignaling promotes KRAS-driven lung carcinogenesis, Cancer Res. 2016 Jan 7.
- [7] M. Tomasetti, M. Amati, L. Santarelli, R. Alleva, J. Neuzil, Malignant mesothelioma: biology, diagnosis and therapeutic approaches, Curr. Mol. Pharmacol. 2 (2009) 190-206.
- [8] Y. Goto, K. Shinjo, Y. Kondo L. Shen, M. Toyota, H. Suzuki, et al., Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma, Cancer Res. 69 (2009) 9073–9082.
- [9] M.V. Iorio, C. Piovan, C.M. Croce, Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network, Biochim. Biophys. Acta. 1799 (2010) 694–701.
- [10] M. Jakopovic, A. Thomas, S. Balasubramaniam, D. Schrupp, G. Giaccone, S.E. Bates, Targeting the epigenome in lung cancer: expanding approaches to epigenetic therapy, Front. Oncol. 3(2013) 261.

Roberto d'Amico

- [11] E. Larrea, C. Sole, L. Manterola, I. Goicoechea, M. Armesto, M. Arestin, et al., New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies, *Int. J. Mol. Sci.* 17(2016) 5.
- [12] R.G. Dumitrescu, Epigenetic markers of early tumor development, *Methods in molecular biology* 863 (2012) 3–14. [13] S. Zöchbauer-Müller, J.D. Minna, A.F. Gazdar, Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications, *Oncologist* 7 (2002) 451-457.
- [14] A.H. Berger, A.G. Knudson, P.P. Pandolfi, A continuum model for tumour suppression, *Nature* 476 (2011) 163-169.
- [15] S. Su, Is Lung Cancer Incidence Increasing in Never-Smokers?, *J. Natl. Cancer Inst.* 108 (2015).
- [16] M. Torres-Durán, A. Ruano-Ravina, K.T. Kelsey, I. Parente-Lamelas, M. Provencio, V. Leiro-Fernández, J. et al., Small cell lung cancer in never-smokers, *Eur. Respir. J.* 2015.
- [17] M. Kreuzer, N. Fenske, M. Schnelzer, L. Walsh, Lung cancer risk at low radon exposure rates in German uranium miners, *Br. J. Cancer* 113 (2015) 1367-1369.
- [18] R. Hubaux, D.D. Becker-Santos, K.S. Enfield, S. Lam, W.L. Lam, V.D. Martinez, Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis, *Environ. Health* 11 (2012) 89.
- [19] Y. Ngamwong, W. Tangamornsuksan, O. Lohitnavy, N. Chaiyakunapruk, C.N. Scholfield, B. Reisfeld, M. Lohitnavy, Additive Synergism between Asbestos and Smoking in Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis, *PLoS One* 10 (2015) e0135798.
- [20] S. Su, Y. Jin, W. Zhang, L. Yang, Y. Shen, Y. Cao, J. Tong, Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine, *J. Occup. Health* 48 (2006) 261-266.
- [21] R. Dammann, M. Strunnikova, U. Schagdarsurengin, M. Rastetter, M. Papritz, U.E. Hattenhorst, H.S. Hofmann, et al., CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma, *Eur. J. Cancer* 41 (2005) 1223-1236.
- [22] J. Gu, Y. Wen, S. Zhu, F. Hua, H. Zhao, H. Xu, et al., Association between P(16INK4a) promoter methylation and non-small cell lung cancer: a meta-analysis *PLoS One* 8 (2013) e60107.
- [23] T. Huang, X. Chen, Q. Hong, Z. Deng, H. Ma, Y. Xin, et al., Meta-analyses of gene methylation and smoking behavior in non-small cell lung cancer patients, *Sci. Rep.* 5 (2015) 8897.
- [24] M.V. Brock, C.M. Hooker, E. Ota-Machida, Y. Han, M. Guo, S. Ames, et al., DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1118- 1128.
- [25] Q. Lin, J. Geng, K. Ma, J. Yu, J. Sun, Z. Shen, et al., RASSF1A, APC, ESRI, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135

(2009) 1675-1684.

[26] M. Yano, S. Toyooka, K. Tsukuda, H. Dote, M. Ouchida, T. Hanabata, et al., Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers, *Clin. Oncol.* 135 (2009) 1675-1684.

[27] D.S. Kim, M.J. Kim, J.Y. Lee, Y.Z. Kim, E.J. Kim, J.Y., Park Aberrant methylation of Ecadherin and H-cadherin genes in nonsmall cell lung cancer and its relation to clinicopathologic features, *Cancer* 110 (2007) 2785-2792.

[28] H. Chen, M. Suzuki, Y. Nakamura, M. Ohira, S. Ando, T. Iida, et al., Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer, *Lung Cancer.* 2005;50(1):43-9.

[29] A. Izzotti, A. Pulliero, The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217 (2014) 601-627.

[30] P. Nymark, M. Guled, I. Borze, A. Faisal, L. Lahti, K. Salmenkivi, et al., Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer, *Genes Chromosomes Cancer* 50 (2011) 585-597.

[31] Y. Sekido, Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma, *Carcinogenesis* 34 (2013) 1413-1419.

[32] D.J. Sugarbaker, W.G. Richards, G.J. Gordon, L. Dong, A. De Rienzo, G. Maulik, et al., Transcriptome sequencing of malignant pleural mesothelioma tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(2008) 3521-3526.

[33] X. Zhang, N. Tang, A.K. Rishi, H.I. Pass, A. Wali, Methylation profile landscape in mesothelioma: possible implications in early detection, disease progression, and therapeutic options, *Methods Mol. Biol.* 1238 (2015) 235-247. [34] F. Vandermeers, S. Neelature Sri-ramareddy, C. Costa, R. Hubaux, J.P. Cosse, L. Willems, The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma, *Lung Cancer* 81 (2013) 311-318.

[35] B.C. Christensen, J.J. Godleski, C.J. Marsit, E.A. Houseman, C.Y. Lopez-Fagundo, J.L. Longacker, et al., Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1555-1559.

[36] J.A. Ohar, M. Cheung, J. Talarchek, S.E. Howard, T.D. Howard, M. Hesdorffer, et al., Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 206-215.

[37] J.R. Fischer, U. Ohnmacht, N. Rieger, M. Zemaitis, C. Stoffregen, M. Kostrzewa, et al., Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma, *Lung Cancer* 54(2006) 109-116.

[38] M. Guled, L. Lahti, P.M. Lindholm, K. Salmenkivi, I. Bagwan, A.G. Nicholson, et al., CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis, *Genes Chromosomes Cancer* 48 (2009) 615-623.

[39] V. Balatti, S. Maniero, M. Ferracin, A. Veronese, M. Negrini, G. Ferrocci, et al., MicroRNAs dysregulation in human malignant pleural mesothelioma, *J. Thorac. Oncol.* 6 (2011) 844-851.

Roberto Ouelh

- [40] L. Santarelli, E. Strafella, S. Staffolani, M. Amati, M. Emanuelli, D. Sartini, et al., Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma, *PLoS One* 6 (2011) e18232.
- [41] R. Cappellesso, L. Nicolè, B. Carocchia, V. Guzzardo, L. Ventura, M. Fassan, et al., Young investigator challenge: MicroRNA-21/MicroRNA-126 profiling as a novel tool for the diagnosis of malignant mesothelioma in pleural effusion cytology, *Cancer Cytopathol.* 124 (2016) 28-37.
- [42] M.D. Saint-Pierre, C. Pease, H. Mithoowani, T. Zhang, G.A. Nicholas, S.A. Laurie, et al., Malignant Pleural Mesothelioma Outcomes in the Era of Combined Platinum and Folate Antimetabolite Chemotherapy, *Lung Cancer Int.* 2015 (2015) 590148.
- [43] T. Jiang, S. Ren, C. Zhou, Role of circulating-tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* 90 (2015) 128-134.
- [44] R. Aarthy, S. Mani, S. Velusami, S. Sundarsingh, T. Rajkumar, Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers, *Mol. Diagn. Ther.* 19 (2015) 339-350.
- [45] C. Bettegowda, M. Sausen, R.J. Leary, I. Kinde, Y. Wang, N. Agrawal, et al., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies, *Sci, Transl, Med.* 6 (2014) 224ra24.
- [46] L.A. Jr Diaz, A. Bardelli, Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 579-586. [47] M. Redova, J. Sana, O. Slaby, Circulating miRNAs as new blood-based biomarkers for solid cancers, *Future Oncol.* 9 (2013) 387-402.
- [48] K. Zen, CY. Zhang, Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers, *Med. Res. Rev.* 32 (2012) 326-348.
- [49] J.D. Arroyo, J.R. Chevillet, E.M. Kroh, I.K. Ruf, C.C. Pritchard, D.F. Gibson, et al., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108 (2011) 5003-5008.
- [50] Y. Fujita, Y. Yoshioka, T. Ochiya, Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic component, *Cancer Sci.* 2016 Jan 21.
- [51] G. Nikolaidis, O.Y. Raji, S. Markopoulou, J.R. Gosney, J. Bryan, C. Warburton, et al., DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer, *Cancer Res.* 72 (2012) 5692-5701.
- [52] E. Nadal, G. Chen, M. Gallegos, L. Lin, D. Ferrer-Torres, A. Truini, et al., Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early-stage lung adenocarcinoma, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 6842-6852.
- [53] J. Sandoval, J. Mendez-Gonzalez, E. Nadal, G. Chen, F.J. Carmona, S. Sayols, et al., A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 31 (2013) 4140-4147.
- [54] H. Schwarzenbach, D.S. Hoon, K. Pantel, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 426-437.
- [55] L.S. Kristensen, L.L. Hansen, PCR-based methods for detecting single-locus DNA me-

thylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment, *Clin. Chem.* 55 (2009) 1471-1483.

[56] A. Bearzatto, D. Conte, M. Frattini, N. Zaffaroni, F. Andriani, D. Balestra, et al., p16INK4A Hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 3782-3787.

[57] A.A. Ponomaryova, E.Y. Rykova, N.V. Cherdyntseva, T.E. Skvortsova, A.Y. Dobrodeev, A.A. Zav'yalov, et al., Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and posttreatment follow-up of lung cancer patients, *Lung Cancer* 81 (2013) 397-403.

[58] I. Balgkouranidou, M. Chimonidou, G. Milaki, E. Tsaroucha, S. Kakolyris, V. Georgoulas, et al., SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016 Jan 7.

[59] U. Võsa, T. Vooder, R. Kolde, J. Vilo, A. Metspalu, T. Annilo, Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer, *Int. J. Cancer* 132(2013) 2884-2893.

[60] W. Gao, J. Xu, L. Liu, H. Shen, H. Zeng, Y. Shu, A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer, *Biomed. Pharmacother.* 66 (2012) 21-28.

[61] W. Gao, H. Shen, L. Liu, J. Xu, J. Xu, Y. Shu, MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137 (2011) 557-566.

[62] W. Zhu, X. Liu, J. He, D. Chen, Y. Hunag, Y.K. Zhang, Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study, *BMC Cancer* 11 (2011) 393.

[63] D. Lebanony, H. Benjamin, S. Gilad, M. Ezagouri, A. Dov, K. Ashkenazi, et al., Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 2030-2037.

[64] T. Donnem, C.G. Fenton, K. Lonvik, T. Berg, K. Eklo, S. Andersen, et al., MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer, *PLoS One* 7 (2012) e29671.

[65] M. Boeri, C. Verri, D. Conte, L. Roz, P. Modena, F. Facchinetti, et al., MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108 (2011) 3713-3718.

[66] X. Chen, Z. Hu, W. Wang, Y. Ba, L. Ma, C. Zhang, et al., Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 1620-1628.

[67] S. Volinia, G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, et al., A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103 (2006) 2257-2261.

[68] P. Joshi, J. Middleton, Y.J. Jeon, M. Garofalo, MicroRNAs in lung cancer, *World J. Me-*

thodol. 4 (2014) 59-72. [69] G. Sozzi, M. Boeri, M. Rossi, C. Verri, P. Suatoni, F. Bravi, et al., Clinical utility of a plasmabased miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 768-773.

[70] L. Nocchi, M. Tomasetti, M. Amati, J. Neuzil, L. Santarelli, F. Saccucci, Thrombomodulin is silenced in malignant mesothelioma by a poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated epigenetic mechanism, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19478-1988.

[71] H. Weiler, B.H. Isermann, Thrombomodulin, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 1515-1524.

[72] P.L. Liu, J.R. Tsai, C.C. Chiu, J.J. Hwang, S.H. Chou, C.K. Wang, et al., Decreased expression of thrombomodulin is correlated with tumor cell invasiveness and poor prognosis in nonsmall cell lung cancer, *Mol. Carcinog.* 49 (2010) 874-881.

[73] L. Santarelli, S. Staffolani, E. Strafella, L. Nocchi, N. Manzella, P. Grossi, et al., Combined circulating epigenetic markers to improve mesothelin performance in the diagnosis of malignant mesothelioma, *Lung Cancer* 90 (2015) 457-464.

[74] M. Andersen, M. Grauslund, J. Ravn, J.B. Sørensen, C.B. Andersen, E. Santoni-Rugiu, Diagnostic potential of miR-126, miR-143, miR-145, and miR-652 in malignant pleural mesothelioma, *J. Mol. Diagn.* 16 (2014) 418-430.

[75] M. Cioce, F. Ganci, V. Canu, A. Sacconi, F. Mori, C. Canino, et al., Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma, *Oncogene* 33 (2014) 5319-5331.

[76] M.B. Kirschner, Y.Y. Cheng, N.J. Armstrong, R.C. Lin, S.C. Kao, A. Linton, et al., MiRscore: a novel 6-microRNA signature that predicts survival outcomes in patients with malignant pleural mesothelioma, *Mol. Oncol.* 9 (2015) 715-726.

[77] M. Lamberti, R. Capasso, A. Lombardi, M. Di Domenico, A. Fiorelli, A. Feola, et al., Two Different Serum MiRNA Signatures Correlate with the Clinical Outcome and Histological Subtype in Pleural Malignant Mesothelioma Patients, *PLoS One* 10 (2015) e0135331.

[78] M.B. Kirschner, Y.Y. Cheng, B. Badrian, S.C. Kao, J. Creaney, J.J. Edelman, et al., Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma, *Thorac. Oncol.* 7 (2012) 1184-1191.

[79] M. Tomasetti, S. Staffolani, L. Nocchi, J. Neuzil, E. Strafella, N. Manzella, et al., Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 575-581.

[80] D.G. Weber, G. Johnen, O. Bryk, K.H. Jöckel, T. Brüning, Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma-a pilot study, *PLoS One* 7 (2012) e30221. [81] K. Hollevoet, J.B. Reitsma, J. Creaney, B.D. Grigoriu, B.W. Robinson, A. Scherpereel, et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data metaanalysis, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 1541-1549.

[82] H.H. Nelson, L.M. Almquist, J.L. LaRocca, S.L. Plaza, G.M. Lambert-Messerlian, D.J. Sugarbaker, et al., The relationship between tumor MSLN methylation and serum mesothe-

lin (SMRP) in mesothelioma, *Epigenetics* 6 (2011) 1029-1034.

[83] D.G. Weber, S. Casjens, G. Johnen, O. Bryk, I. Raiko, B. Pesch, et al., Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis, *PLoS One* 9 (2014) e114483. [84] Jenkins S, Yang JHC, Ramalingam SS, et al. Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2017;12(7):1061-1070.

[85] Giroux Leprieur E, Herbrtau G, Dumenil C, et al. Circulating tumor DNA evaluated by Next-Generation Sequencing is predictive for tumor response and prolonged clinical benefit with nivolumab in advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7(5).

[86] Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologist Joint Review. *J Clin Oncol*. 2018;36(16):1631-1641. [87] Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017;545(7655):446-451.

[88] Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multianalyte blood test. *Science* (80-). 2018;359(6379):926-930.

[89] Smyth RJ1, Toomey SM2, Sartori A3, Hanrahan EO4, Cuffe SD5, Breathnach OS6, Morgan RK6 HB. Brief report on the detection of the EGFR-T790M mutation in exhaled breath condensate from lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2018;13(8):1213–1216. [PubMed: 29751135].

[90] Mazzone PJ, Wang XF, Lim S, et al. Progress in the development of volatile exhaled breath signatures of lung cancer. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(5):752–757. [PubMed: 25965541] - Nakhleh MK, Amal H, Jerjes R, et al. Diagnosis and Classification of 17 Diseases from 1404 Subjects via Pattern Analysis of Exhaled Molecules. *ACS Nano*. 2017;11(1):112–125. [PubMed: 28000444].

[91] Peled N, Hakim M, Bunn PA, et al. Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules. *J Thorac Oncol*. 2012;7(10):1528–1533. [PubMed: 22929969].

[92] Nardi-Agmon I, Abud-Hawa M, Liran O, et al. Exhaled breath analysis for monitoring response to treatment in advanced lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(6):827–837. [PubMed: 26968885].

[93] Hakim M, Broza YY, Barash O, et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem Rev*. 2012;112(11):5949–5966. [PubMed: 22991938].

[94] Peled N, Barash O, Tisch U, et al. Volatile fingerprints of cancer specific genetic mutations. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2013;9(6):758–766.

[95] Peng G, Hakim M, Broza YY, et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br J Cancer*. 2010;103(4):542–551. [PubMed: 20648015].

Roberto Quintero

11 - Articolazione del progetto e tempi di realizzazione

Il piano di lavoro del progetto è articolato su 42 mesi e può essere suddiviso in 6 obiettivi operativi:

- OR1 – Gestione del progetto
- OR2 - Definizione specifiche di progetto
- OR3 – Acquisizione apparecchiature e installazione
- OR4 – Produzione dati di sequenziamento e analisi
- OR5 – Analisi, interpretazione e validazione
- OR6 – Disseminazione e sfruttamento dei risultati

Ciascun obiettivo operativo è strutturato come una serie coerente di attività ben definite e il piano di lavoro complessivo è chiaro rispetto alle dipendenze tra le varie attività e tra i diversi obiettivi realizzativi tenendo conto che per la particolarità del progetto (Produzioni dati immunologici-epigenetici di 450 individui studiati) ci si deve attenere ai criteri di **compartimentazione** delle attività in rapporto all'applicazione dei criteri inerenti GRPD del 2018 (D.LGS 196-2003 MODIFICATO DAL D.LGS101-2018), che regola a livello europeo la tutela dei dati dei cittadini. Questo aspetto sarà il filoguida delle attività che dovranno contemplare i criteri di **pseudonimizzazione dei dati**, la **compartimentazione delle attività** tra i vari partners, la **protezioni dei dati** in toto, la **formazione del personale** coinvolto.



OBIETTIVI OPERATIVI

Il progetto si articola su una durata di 42 mesi ed ha una struttura formata da 4 work package dedicati ad attività di ricerca e sviluppo specifiche ed 2 work package per la gestione del progetto e la disseminazione dei risultati. Per quanto riguarda le attività relative al **primo anno di attività** tra quelle indicate nelle tabelle seguenti si rimanda al diagramma GANNT del progetto, in questa stessa sezione. Operativamente bisogna valutare che, a causa della pandemia COVID-19, il progetto ha avuto un ritardo di 18 mesi, sui quali è stata chiesta una proroga al CRP-Assessorato alla Programmazione, che è stata concessa. Per tale ragione si deve valutare il 2022 come prima annualità, comprensiva del primo semestre operativo nella fase organizzativa del progetto.

In definitiva si stanno completando le attività specifiche del primo semestre e iniziando le attività del secondo semestre del primo anno associate a quelle tipiche del secondo anno (1° semestre secondo anno).

Nello specifico si:

1. si sono definite le collaborazioni per attivare i prelievi in ambienti protetti a Nuoro, Oristano, Iglesias e Olbia e utilizzo della centrifuga refrigerata per rispondere alle esigenze del nuovo protocollo Quiagen per l'estrazione degli acidi nucleici da plasma ed esalato. Richieste inviate a rispettivi Direttori Generali.
2. Si sono definite le differenti fasi di lavoro:
 - Fase 1 . Individuazione dei candidati volontari per i differenti gruppi. Raccolta del campione di sangue ed esalato e predisposizione delle provette per l'estrazione degli acidi nucleici. Compilazione del registro di carico e scarico secondo i criteri della Tutela della Privacy.
 - Fase 2 . Carico delle provette nella Biobanca del Laboratorio secondo i criteri della Tutela della Privacy. Elaborazione ed estrazione degli acidi nucleici. Predisposizione delle provette per il sequenziamento NGS (MiRNA) e per la conservazione delle altre in Biobanca.
 - Fase 3 . Invio a CRS4 dei campioni per procedere al sequenziamento NGS. Elaborazione. Attività di pulizia dei dati su acidi nucleici sequenziati, da parte del bioinformatico. Invio dei dati allo specialista statistico, da parte del bioinformatico secondo i criteri della Tutela della Privacy.

- Fase 4 . Analisi Statistico-Epidemiologica con valutazione di tutte le correlazioni indicate negli obiettivi.
- 3. Si sono individuati gli apparecchi che si sono resi necessari dopo aver applicato il nuovo protocollo della Quiagen per l'estrazione degli acidi nucleici: etichettatrice elettronica e centrifuga refrigerata a due rotori per 3500 rpm e 16.000 rpm
- 4. Si stanno definendo i Criteri per la collaborazione con Fondazione Vil-lamar (Centro studi per la persona), per il trasferimento delle compe-tenze amministrative dall'AIEA (gestione dei contratti del personale e spese correnti)
- 5. Si sta completando l'iter amministrativo per la strutturazione della col-laborazione con il Laboratorio dell'ARNAS BROTZU per l'estrazione degli acidi nucleici.
- 6. Si sta avviando la fase operativa dei prelievi, partendo dal centro Sarde-gna . Il 03-11-22 si sono iniziati i prelievi ad Oristano, con la collabora-zione dell'associazione AREAS (Pres. sig. Lilliu).La sensibilizzazione e informazione della popolazione, avverrà ad Ottana il 03-12-22, con la collaborazione di AIEA, per l'organizzazione di un convegno.
- 7. Gli Obiettivi Realizzativi, il diagramma di Gantt, i principali milestones , il ruolo di ciascuna unità operativa rimangono quelli definiti nel for-mulario della prima annualità . Verranno fissati e comunicati al CRP in funzione delle diverse variazioni operative(nei tempi) intercorse per la pandemia COVID - 19.
- 8. Lista dei principali milestones

L'evoluzione del progetto sarà continuamente monitorata dai responsabili di progetto e di WP. Le milestone più importanti relativamente al **primo anno** di progetto (mesi 1-12) sono definite secondo la seguente tabella. Su fondo grigio sono indicate le attività previste per i mesi 13 - 42 di progetto

9.Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e re-lative modalità di integrazione e collaborazione

Si elencheranno in una tabella che ha lo scopo di indicare le attività asse-gnate a ciascuna unità operativa. Sono state evidenziate, con riferimento alle attività descritte nelle schede degli OR, le attività che verranno svolte

nel primo anno di progetto (mesi 1-12) saranno specificata per unità operativa

13 - Risultati attesi dalla ricerca, il loro interesse per l'avanzamento della conoscenza e le eventuali potenzialità applicative.

Nonostante il vasto potenziale dei biomarkers candidati e delle metodologie esistenti, nessun biomarcatore molecolare del cancro del polmone o del mesotelioma pleurico maligno viene attualmente utilizzato nella pratica clinica di routine né nelle attività di screening. La convalida clinica e le fasi procedurali sono fondamentali ma molto impegnative, necessitando di risorse e tempo rispetto alla scoperta iniziale e alla convalida retrospettiva. Nonostante ciò, le esigenze cliniche rimangono tuttora non soddisfatte. Il rischio individuale necessita di essere ridefinito e i criteri di screening modificati, in modo da ottenere un impatto sulla mortalità correlata al cancro del polmone o sul mesotelioma pleurico.

Le sole immagini radiologiche di noduli solitari del polmone, ad esempio, sarebbero di per sé un successo completo allorquando fosse possibile differenziare il benigno dal maligno con avendo a disposizione un valido biomarcatore. Esiste anche una chiara esigenza di marcatori clinici e molecolari prognostici per i pazienti inclusi in programmi di screening per tumori in fase iniziale. Sebbene alcuni ritengano che testare un nuovo biomarcatore risulti uno sforzo gigantesco, riteniamo che una convalida meno complessa e più conveniente sia possibile nell'impostazione di definiti programmi di screening del cancro del polmone e della pleura.

Vi sono ampi margini di miglioramento. Dobbiamo promuovere studi che integrino biomarcatori promettenti, compresi quelli molecolari e i loro accoppiamenti, e l'uso di tecnologie di intelligenza artificiale per aiutare nella selezione delle combinazioni più appropriate. Sarebbe gradito anche il confronto diretto dei biomarcatori all'interno di scenari clinici specifici. L'estrazione approfondita dei dati forniti dagli sforzi di screening in corso, con nuovi modelli matematici e computazionali basati sull'apprendimento

automatico, sarà di sicuro ausilio. Ciò richiede ovviamente una raccolta sistematica di campioni di pazienti nel contesto dello studio.

Infine, nell'elenco delle sfide che dobbiamo affrontare per lo sviluppo di biomarcatori molecolari nello screening e nel monitoraggio, è necessario considerare i modi per dimostrare la convenienza economica dei nuovi test e per superare i potenziali ostacoli al fine di ottenere l'approvazione da parte delle agenzie di regolamentazione. Sebbene la logistica e il costo di un tale sforzo possano sembrare inizialmente scoraggianti, riteniamo che il risultato a lungo termine possa rivelarsi altamente efficiente in termini di risparmio sanitario globale .

14 - Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti

La tabella seguente sintetizza gli elementi e i criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti al termine del **primo anno di attività** del progetto (mese 12).

Caratteristica

Risultato atteso

Indicatori misurabili

Gestione del progetto

Controllo e coordinamento del progetto

Rapporto sui risultati conseguiti nel corso del I anno di progetto.

Disseminazione

Ampia diffusione dei risultati di progetto nella comunità scientifica

Almeno una pubblicazione su rivista o in convegno di settore

Comunicazione

Comunicazione dei principali messaggi

Almeno un workshop illustrativo del progetto. Almeno una brochure illustrativa. Almeno un meeting informativo con soggetti ex esposti ad amianto.

Definizione specifiche

Definizione dei protocolli per la raccolta, la gestione e il processamento dei campioni, e l'infrastruttura e le specifiche tecniche

Roberto Cenci

Report che descrive i protocolli per la raccolta, la gestione e il processamento dei campioni, e l'infrastruttura e le specifiche tecniche che verranno adottate dal progetto. Approvazione degli studi da parte del Comitato Etico.

Acquisizione e installazione di strumentazione

Acquisizione e installazione delle strumentazioni necessarie per lo sviluppo del progetto.

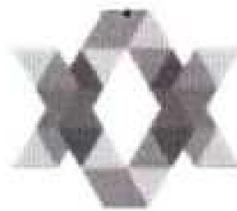
Dotazioni strumentali e infrastrutture informatiche di progetto installate e funzionanti.

Raccolta campioni e sequenziamento

Raccolta dei campioni e produzione dati di sequenziamento

Arruolamento coorte pazienti completato. Raccolta esalato e prelievi di sangue in almeno 450 pazienti. Produzione dati di sequenziamento.

Roberto Cleuti



ARRDIA

Asbestos Related Respiratory Diseases in Industrial Area

Principali Investigator Dott. Roberto Cherchi

Costo complessivo del progetto ARRDIA articolato per voci (Seconda annualità-importo in €)

Come della spesa	CRS4	AIEA	UNICA	TOTALE
Materiale inventariabile	104.300	21.600		125.900
Strumentazioni, attrezzature e prodotti software		73.800		73.800
Materiale di consumo	277.500	2.400		279.900
Spese di calcolo ed elaborazione dati			36.000	36.000
Spese di personale	60.000	64.000	12.000	136.000
Personale attivato ad hoc		80.000		80.000
Servizi esterni		68.000		68.000
Missioni		9.300		9.300
Pubblicazioni		2.500		2.500
Partecipazione/Organizzazione convegni		7.000		7.000
Altro				0
Spese genarali (60%spese di) personale	36.000	38.400	7.200	81.600
TOTALE	477.800	367.000	55.200	900.000

Roberto Cherchi