

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

*Ricerca di Base su marker tumorali precoci (Micro-RNAs) in lavoratori delle aree Industriali  
della Sardegna*

ARNAS G. BROTZU

NP/2022/2763 del 01/04/2022 ore 07,35

Mittente : SC Chirurgia Toracica (B)

Assegnatario : DIREZIONE GENERALE



Referente del progetto di ricerca:

**Dott. Roberto Cherchi**

Struttura Complessa di Chirurgia Toracica, Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", Cagliari

Contatti: tel. +39 3921990052 previo mess. WA

e-mail: cherchiroberto@yahoo.it

*Versione sinossi aggiornata al 28/11/2021*

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

*Ricerca di Base su marker tumorali precoci (Micro-RNAs) in lavoratori delle aree Industriali  
della Sardegna*

Referente del progetto di ricerca:

**Dott. Roberto Cherchi**

Struttura Complessa di Chirurgia Toracica, Azienda Ospedaliera “G. Brotzu”, Cagliari

Contatti: tel. +39 3921990052 previo mess. WA

e-mail: [cherchiroberto@yahoo.it](mailto:cherchiroberto@yahoo.it)

*Versione sinossi aggiornata al 28/11/2021*

## 1. Background

L'incidenza del tumore del polmone non a Piccole Cellule (NSCLC) è in costante aumento e rappresenta la seconda tipologia istologica per frequenza ed è tra la principale causa di mortalità neoplastica [1-3]. Allo stesso modo, benché si tratti di una neoplasia rara, anche l'incidenza del mesotelioma pleurico maligno (MM) risulta in progressivo aumento in conseguenza della pregressa diffusione dell'esposizione ad asbesto, con lungo periodo di latenza, che precede la sua comparsa [4]. Approssimativamente, l'80% dei pazienti affetti da MM ha una storia certa 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, hanno mostrato 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]. La ricerca di alterazioni nel profiling epigenetico potrebbe favorire nuove importanti intuizioni a proposito dell'eziologia e della storia naturale del cancro. Poiché le alterazioni istologiche sono precedute da molteplici cambiamenti epigenetici, questi ultimi potrebbero essere utili come biomarcatori per la diagnosi e la definizione del rischio neoplastico in fase asintomatica. Infatti, numerose neoplasie progrediscono in completa asintomaticità fino al raggiungimento di stadi avanzati. La storia del tumore del polmone è caratterizzata da altissime percentuali di neoplasia avanzata ( III° stadio B e IV° stadio) sin dal suo esordio sintomatologico. 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 tessutali, metodica invasiva, costosa e caratterizzata da frequenti complicanze. Il ricorso alla individuazione di biomarcatori tumorali nei fluidi biologici, definiti come "*biopsie liquide*", potrebbe costituire una alternativa fonte diagnostica in fase più precoce e non invasiva [11]. Nei tumori solidi, i biomarcatori circolanti possono essere riversati nel torrente ematico attraverso vari eventi, quali 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 l'opportunità di identificare target dinamici e reversibili per le terapie antitumorali. Alterazioni dovute a sovra-espressione, mutazione o riarrangiamento sono sempre più frequentemente ritrovate in geni che controllano l'epigenoma.

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

### **1.1 *Epigenetica nel tumore del polmone.***

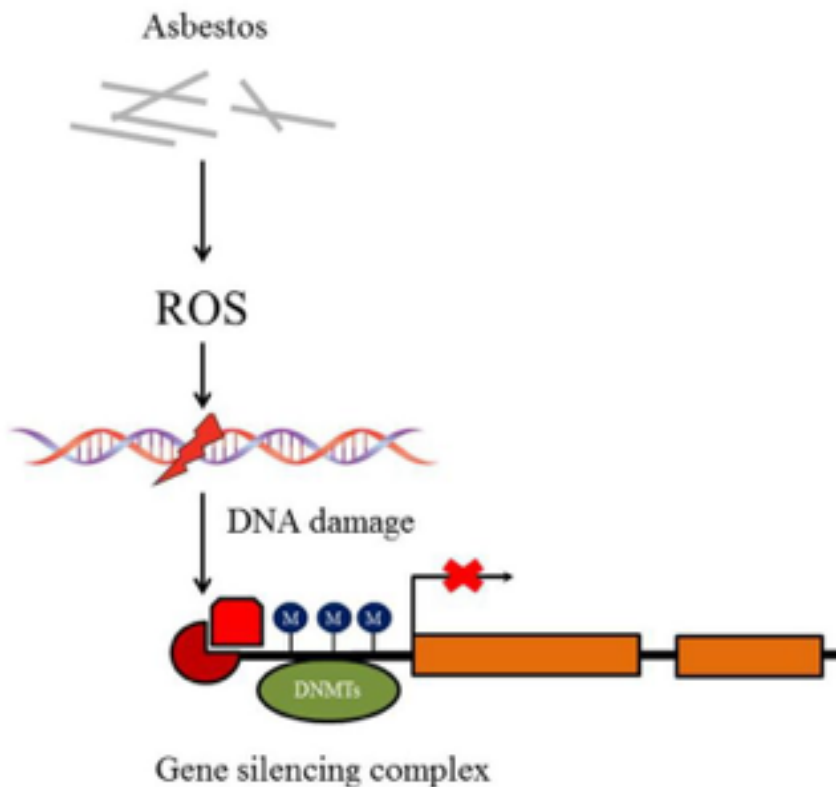
Il tumore del polmone coinvolge una sequenza di eventi genetici ed epigenetici che si accumulano nell'epitelio [12]. L'inattivazione dei geni oncosoppressori attraverso la metilazione del promoter, spesso definita come ipermetilazione, è un segno distintivo del cancro del polmone ed è un evento precoce nel processo cancerogenetico [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. Tuttavia, esistono evidenze che suggeriscono che, in determinati loci genici, la inattivazione di un solo allele sia sufficiente a determinare un impatto negativo sulla cellula e contribuire al processo cancerogenetico [14]. Vari fattori tossici/stress possono modificare le cellule dei mammiferi, dando luogo alla trasformazione epigenetica del fenotipo senza modifiche alla sequenza di informazioni del DNA cellulare; questi includono radiazioni ionizzanti, 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 il 13-28% del totale dei casi di NSCLC si manifesta in non fumatori [15]. Anche l'esposizione ad arsenico, radon e asbesto è coinvolta nella cancerogenesi polmonare [16-19]. Questi cancerogeni 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. La Figura 1 mostra il meccanismo di 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]. Nello stesso modo, 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 invece correlati allo stadio avanzato di NSCLC [26-28], suggerendo che questi cambiamenti possano verificarsi in fasi tardive del processo cancerogenetico.

**Figura 1:** *Danno ossidativo sul DNA e modifiche epigenetiche. La formazione di ROS indotti dall'asbesto promuove il danno del DNA (rottture, ossidazione delle basi). La metilazione del promoter CpG induce il silenziamento genico [7].*

Figure 1



I fattori epigenetici possono essere responsabili delle aberrazioni dello spettro completo dei micro RNA circolanti (miRNA) caratteristici di uno specifico genoma osservate in presenza di un tumore, definito come miRNoma. 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, può colpire direttamente gli effettori del meccanismo epigenetico, come le DNA metiltransferasi, le istone delectasi e i geni repressivi policombinanti 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, nel quale miR18b, miR-374a, miR-2-1, Let-7d, Let-7e, miR-199b-5p, miR-331-3p e miR-96 sono risultati sovra-espressi, mentre miR-939, miR-671-5p, miR-605, miR-122-5p e miR-202 sono risultati sotto-espressi [30].

L'asbesto è un agente mutageno riconosciuto come tale, benché debole, [31-32], ed alcuni lavori hanno indagato la metilazione dei geni oncosoppressori nel MM [33, 34]. Al pari di altri tumori, la genesi del MM è associata con mutazioni genomiche che, alla pari degli errori epigenetici, 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. Nel MM è stata osservata una prevalenza della metilazione di RASSF1 pari al 33%, ed è stato anche evidenziato che la metilazione di RASSF1 è significativamente associata alla conta di corpuscoli di asbesto, così come la 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 (NF) 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.

### **1.2 Geni regolati epigeneticamente: possibili biomarcatori.**

Nonostante i recenti progressi della ricerca nel NSCLC e l'utilizzo di nuovi agenti terapeutici, il tasso di sopravvivenza a 5 anni rimane insoddisfacente (circa 15%) [3]. Al momento, il riscontro diagnostico della maggior parte dei tumori polmonari avviene in uno stadio avanzato, nel quale i trattamenti hanno efficacia limitata ed 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 motivo, la diagnosi precoce rappresenta uno degli approcci più promettenti. Le nuove tecnologie molecolari che possono riflettere e modificare 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 biomarcatori predittivi in termini di sopravvivenza e di risposta terapeutica 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 pertanto 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 (Esalato?). Le cellule tumorali rilasciano frammenti di DNA in circolo, che possono essere ritrovati nelle frazioni ematiche 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]. I miRNAs sono inoltre coinvolti nella comunicazione intercellulare. 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 vescicle-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 biomarcatori di malattia.

In questo contesto, i biomarcatori 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].

### ***1.3 Biomarcatori 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 di NSCLC, la metilazione del promoter SOX17 nel DNA plasmatico avrebbe una influenza significativa sulla sopravvivenza dei pazienti [58].

Recentemente, modelli di espressione di miRNA sono stati usati per la rilevazione di tumori del polmone o predire la prognosi in questi pazienti. Metanalisi della espressione di miRNA nei tessuti tumorali polmonari hanno identificato presenza di sette miRNA sovra regolati (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 sovra regolato nel carcinoma squamo cellulare (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].

Non tutti i miRNAs deregolati nei campioni di tessuto sono stati ritrovati nei campioni di siero; ciò rafforza l'ipotesi di un'elevata specificità tissutale dei miRNAs e suggerisce un ruolo predittivo dei miRNAs circolanti indipendente dai processi a livello tissutale [65]. Analizzando i miRNAs nel siero di 400 casi di NSCLC e 220 controlli, è stato studiato il 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]. Nei tessuti di pazienti con tumore del polmone sono stati rilevati livelli aumentati di miR-221, miR-222, miR-223, miR-199a-5p, miR-20a, miR-25 e miR-24 [67]. Allo stesso modo, nel tessuto tumorale e nel siero dei pazienti con NSCLC è risultata sovra-espressa la famiglia miR-183 (miR-96, miR-182 e miR-183), un gruppo di oncomiRs, [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 motivo, sono stati proposti molteplici pannelli di miRNAs circolanti con obiettivi come la diagnosi precoce, la prognosi e il monitoraggio della terapia del tumore del polmone [65, 66, 69]. Boeri et al., hanno sviluppato un metodo, applicabile clinicamente nella predizione, diagnosi e prognosi del tumore del polmone, con impiego di algoritmi basati sul rapporto tra 24-miRNA. Tale metodo si è rivelato in grado di ridurre l'incidenza di falsi positivi nella TC a basso dosaggio, aumentando quindi il valore predittivo delle procedure di screening [69].

Il valore del *circulating tumor DNA* (ctDNA) come biomcatore 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, sulla base dell'identificazione di 2 varianti nucleotidiche singole (SNVs), ha riportato una sensibilità del 48% in 8 pazienti stadio I-III. La sensibilità ha mostrato una variazione ampia, estesa dal 15% per gli adenocarcinomi stadio I al 100% per il tumore 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 biomarcatori in tale contesto. Recentemente, uno studio per la rilevazione degli stadi precoci tumorali ha combinato l'analisi NGS di ctDNA nel sangue con un vasto pannello di biomarcatori 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 biomarcatori circolanti nel tumore del polmone sono riassunti nella Tabella 1.

#### **1.4 Biomarcatori cell-free circolanti nel mesotelioma maligno.**

Nel MM è stata documentata l'ipermetilazione del gene promotore di APC, CCND2, CDKN2A, CDKN2B, HPPBP1 e RASSF1 [35]. L'utilizzo di DNA circolante metilato tumore-specifico ha generato 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]. Nei tessuti tumorali, una bassa o assente espressione della TM sarebbe indicativa di prognosi infausta [72]. In concordanza con l'ipotesi che la metilazione del promotore TM sia responsabile del silenziamento della sua espressione nei tessuti mesoteliomatosi, nei pazienti affetti da MM sono state rilevate in circolo sequenze di DNA aberrante metilato originate dal promotore TM. Tali livelli non risultavano alterati dall'istotipo né dall'eventuale asportazione del tumore [73].

**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 [7]

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

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 del 95% (95% CI: 89-1.00), specificità del 93% (95% CI: 87-99) ed una accuratezza globale del 94% (95% CI: 88-100) [74]. Tra i vari miRNAs presenti nel tessuto di MM, ne sono stati identificati in circolo alcuni sovra-regolati (*miR-101*, *miR-25*, *miR-26b*, *miR-335*, *miR-223*) ed altri sotto-regolati (*miR-29* and *miR-516*), poi proposti come biomarcatori clinici [77].

Dallo screening di un profilo miRNA e conseguente validazione, il miR-625-3p è stato rinvenuto francamente sovra-regolato nei pazienti con MM. Questo miRNA discriminerebbe i pazienti affetti da MM da quelli sani con una sensibilità del 73%, specificità del 79% ed accuratezza globale dell'82% [78]. La significativa sotto-espressione di miR-126 e miR-103 è stata riportata rispettivamente nel siero e nella frazione cellulare di pazienti con MM quando paragonati a pazienti sani esposti ad asbesto ed a pazienti sani non esposti [40, 79, 80]. I biomarcatori circolanti nel MM sono riassunti nella Tabella 1. Pertanto, la sotto-regolazione di miR-126 potrebbe essere un indicatore precoce di patologia tumorale; mediante analisi ROC (Receiver-Operating Characteristic) è stato osservato che, da solo, miR-126 può predire la presenza di MM con una discreta sensibilità (75%) ma con scarsa specificità (54%), e che il risultato avrebbe comunque valore prognostico [40, 73]. Per aumentarne specificità, i livelli di miR-126 sierici sono stati valutati in combinazione con quelli di peptidi mesotelina-relati (SMRPs), i marker sierici più studiati e utilizzati nel MM. I livelli di SMRP sono capaci di distinguere i pazienti con MM dai controlli sani con una sensibilità del 60-70% ed una specificità del 90-100% [40], con una migliore capacità di discriminazione dei pazienti sani da quelli con MM epitelioide avanzato o bifasico rispetto a quelli con MM sarcomatoide o in stadio iniziale [81, 73]. In ogni caso, uno studio di meta-analisi ha dimostrato che nei soggetti sintomatici o ad alto rischio, la negatività per SMRPs di un test sul siero non escluderebbe il MM neppure ad una soglia elevata (1-1.5 nmol/l) [81]. Uno dei fattori limitanti nell'utilizzo di SMRPs come strumento di screening di popolazione sarebbe lo stato di metilazione del gene deputato all'espressione della mesotelina (MSLN) nel DNA tumorale, che causerebbe una sotto-regolazione di SMRP [82]. MSLN è normalmente metilato nelle cellule del tessuto pleurico, e questa metilazione è perduta nella maggior parte dei tumori [82]. Infatti, i casi di MM nei quali è stata evidenziata una metilazione di MSLN mostrerebbero bassi livelli di SMRPs, seppure, in un sottogruppo di tumori, la metilazione sarebbe conservata, il che potrebbe spiegare la scarsa sensibilità del dosaggio di SMRP. Sono state svolte molteplici tentativi di aumentare la sensibilità del dosaggio di SMRPs combinandolo con quello di altre molecole proteiche, ma nessuna delle combinazioni testate ha migliorato sufficientemente il valore predittivo di questo biomarker. La discreta sensibilità di miR-126 aumenta le performance di SMRPs in un modello predittivo di MM [40]. Anche il miR-103a-3p circolante aumenterebbe la performance diagnostica di SMRPs mostrando un AUC (Area Under the ROC Curve) score di 0.93, con una sensibilità del 95% ed una

specificità del 81% [83]. In questo caso, è importante notare che miR-103a-3p non è stato isolato dal plasma ma dalla frazione cellulare del sangue, e che, pertanto, le sue modificazioni possano essere il risultato di un effetto indiretto, come, ad esempio, una risposta del sistema immunitario nei confronti del tumore.

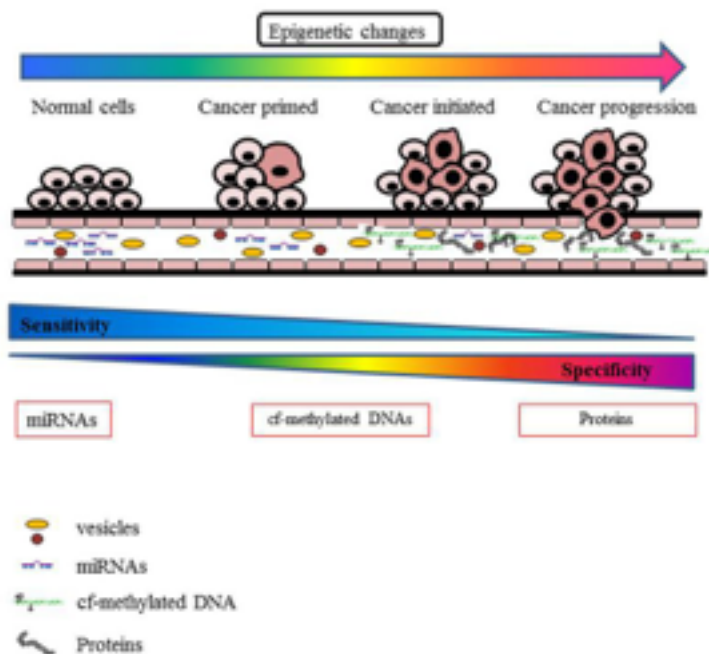
Di recente è stato riscontrato che il DNA metilato circolante della TM discrimina significativamente i pazienti affetti da MM dai controlli con una elevata specificità (82%) ma ridotta sensibilità (60%). L'alta specificità del DNA metilato circolante completa in modo significativo le performance di miR-126 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 fornire risultati più promettenti rispetto alla combinazione di biomarcatori appartenenti alla stessa classe molecolare. Ciò potrebbe essere dovuto a differenze tra i meccanismi di immissione in circolo degli stessi biomarcatori. Generalmente, le proteine vengono rilasciate durante regolari processi di secrezione, che possono essere alterati dai processi neoplastici. Al contrario, DNA e RNA sono rilasciati in circolo soprattutto durante l'apoptosi, la necrosi ed altri processi degenerativi. Pertanto, l'effetto complementare tra biomarcatori di diverse classi molecolari potrebbe portare con ogni probabilità ad una migliore discriminazione tra casi di malattia e controlli (Figura 2).

### ***1.5 Nuove tecnologie: ricerca di biomarcatori nel respiro esalato.***

Esistono prove crescenti a sostegno dell'uso del respiro esalato (EB), incluso il condensato del respiro esalato (EBC) per il rilevamento precoce di patologia neoplastica. L'EBC, che include cellule e frammenti di DNA, può anche contribuire a rilevare 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]. In diagnostica, è stato utilizzato un sensore nano-array e la classificazione attraverso l'intelligenza artificiale di 17 diverse malattie da campioni di respiro di 1404 soggetti, con un'accuratezza dell'86% [91]. Alcuni studi suggeriscono che questo sensore possa discriminare i noduli polmonari benigni da quelli maligni [92], o prevedere la risposta alla terapia e la recidiva [93]. Potrebbe anche distinguere il tipo istologico [94] o prevedere i risultati dell'analisi molecolare [95]. È interessante notare che sarebbe anche possibile discriminare tra diversi tipi di cancro (polmone, seno, colon-retto e prostata) [96].

**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 ematico possono essere rilevati come biomarcatori circolanti per il rilevamento precoce e la progressione del cancro [7].

Figure 2



## 1.6 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 e può quindi essere valutata per monitorare il processo di sviluppo tumorale. Per questo, il rilevamento di DNA/RNA privo di cellule nei pazienti affetti da tumori maligni, ed in particolare da cancro del polmone, appare un promettente metodo di diagnosi precoce tumorale, eseguibile con prelievi non invasivi.

Più recentemente, una varietà di tecniche digitali genomiche è stata sviluppata allo scopo di migliorare la capacità di identificare modifiche degli 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 sua relazione con il carico tumorale e la risposta al trattamento.

I biomarcatori proteici sono convenzionalmente utilizzati per la diagnosi precoce e la prognosi nel cancro del polmone e nel mesotelioma maligno ma, sfortunatamente, la specificità e l'affidabilità di questi biomarcatori non è soddisfacente. La combinazione tra i biomarcatori di diverse classi molecolari, tra cui DNA/RNA cell-free e ctDNA, al fine di migliorare le prestazioni complessive potrebbe costituire un metodo percorribile. Inoltre, i recenti progressi nel riscontro di nuovi miRNA mimetici/inibitori offrono ulteriori opportunità diagnostiche e terapeutiche di queste patologie. Si ritiene che la ricerca in quest'area fornirà risultati più che utili per una maggiore precisione nella diagnosi precoce di queste neoplasie maligne di difficile gestione, specialmente in una coorte di soggetti ad alto rischio quali gli ex esposti ad amianto.

## Bibliografia

- [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. Alhayani, A. Miller, P.A. Russell, Ferlin W, et al., IL-6 transsignaling promotes KRAS-driven lung carcinogenesis, *Cancer Res.* 76/4 (2016) 866-876.
- [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.
- [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. Jenk, Is Lung Cancer Incidence Increasing in Never-Smokers?, *J. Natl. Cancer Inst.* 108 (2015). djv418
- [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.* 47/3 (2016) 947-953.
- [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, ESR1, 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.* 50/1 (2005) 43-49.
- [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 Sriramareddy, 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.



- [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. Caroccia, 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, C.Y. 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.* 107/4 (2016) 385-90.
- [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 methylation 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. Cherdynitseva, 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. Georgoulis, et al., SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 54/8 (2016) 1385-1393.
- [59] U. Vösa, T. Voeder, 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. Methodol.* 4 (2014) 59-72.
- [69] G. Sozzi, M. Boeri, M. Rossi, C. Verri, P. Suatoni, F. Bravi, et al., Clinical utility of a plasma-based 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 mesothelin (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* 12/7 (2017) 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. *Oncimmunology.* 7/5. (2018) e1424675.
- [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.* 36/16 (2018) 1631-1641.
- [87] Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 545/7655 (2017) 446-451.
- [88] Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* (80-). 359/6379 (2018) 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.* 13/8 (2018) 1213–1216.

- [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.* 12/5 (2015) 752–757.
- [91] Nakhleh MK, Amal H, Jeries R, et al. Diagnosis and Classification of 17 Diseases from 1404 Subjects via Pattern Analysis of Exhaled Molecules. *ACS Nano.* 11/1 (2017) 112–125.
- [92] Peled N, Hakim M, Bunn PA, et al. Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules. *J Thorac Oncol.* 7/10 (2012) 1528–1533.
- [93] 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.* 11/6 (2016) 827–837.
- [94] Hakim M, Broza YY, Barash O, et al. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem Rev.* 112/11 (2012) 5949–5966.
- [95] Peled N, Barash O, Tisch U, et al. Volatile fingerprints of cancer specific genetic mutations. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 9/6 (2013) 758–766.
- [96] 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.* 103/4 (2010) 542–551.

## 2. Ipotesi dello studio

Il rischio individuale di andare incontro a tumore polmonare, mesotelioma pleurico e interstiziopatia asbestosica, nella popolazione generale ed ancora più negli ex-esposti ad amianto necessita di essere ridefinito ed i criteri di screening modificati, in modo da ottenere un favorevole impatto sulla sopravvivenza e sulla qualità della vita dei pazienti che ne sono colpiti. Tuttavia, nonostante la numerosità dei biomarcatori candidati e delle metodologie esistenti, nessuno di questi trova applicazione nella pratica clinica corrente del cancro del polmone, del mesotelioma pleurico e delle interstiziopatie polmonari. La convalida clinica e le fasi procedurali sono fondamentali ma molto impegnative, necessitando di risorse e tempo, rispetto alla scoperta iniziale ed alla convalida retrospettiva. Pertanto, le esigenze cliniche rimangono tuttora non soddisfatte.

Emerge pertanto la necessità di disporre 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, una convalida meno complessa e più conveniente appare possibile attraverso l'impostazione di definiti programmi di screening del cancro del polmone e della pleura.

Il progetto qui descritto propone di integrare biomarcatori promettenti, compresi quelli molecolari e i loro accoppiamenti, con la ricerca di nuovi indicatori rilevabili con metodiche non invasive sul respiro esalato condensato e con l'uso di tecnologie di intelligenza artificiale per aiutare nella selezione delle combinazioni più appropriate e nel confronto diretto dei biomarcatori all'interno di scenari clinici specifici. L'estrazione dei dati forniti dagli sforzi di screening in corso, e la loro elaborazione con nuovi modelli matematici e computazionali basati sull'apprendimento automatico, potrà essere di sicuro ausilio.

### 3. Obiettivi dello studio

Gli obiettivi generali che ispirano il progetto sono i seguenti:

OG1: validazione di tecniche di esame non invasive (biopsia liquida e respiro esalato condensato) per l'individuazione di nuovi e specifici miRNAs, ctDNA, Metiloma e Genoma, quali biomarcatori precoci di patologia neoplastica pleuro-polmonare e interstiziopatia, in soggetti con documentata esposizione alle fibre di asbesto.

OG2: discovery e validazione di biomarkers precoci su biopsia liquida e respiro esalato condensato atti ad 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.

OG3: verifica dell'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:

*OS1: Arruolamento dei partecipanti allo studio:* sarà arruolata una coorte di 200 ex-lavoratori con accertata pregressa esposizione ad amianto secondo i limiti di allarme definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, identificati attraverso gli elenchi delle domande per i benefici previdenziali previsti dalla Legge 257/92, accolte dalle sedi INPS ed INAIL regionali, e nei registri di iscrizione all'Associazione Italiana ex-Esposti ad Amianto, sezione Sardegna, e l'archivio del Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica – Sezione di Medicina del Lavoro dell'Università di Cagliari (gruppo 1); una coorte di controllo di analoghe dimensioni, costituita da volontari reclutati dall'Associazione Italiana degli Ex-esposti ad Amianto tra la popolazione generale, in numero di uno per ciascun ex-esposto partecipante, dello stesso genere ed età del partecipante indice, su sua indicazione e/o sulla base di avviso pubblico (gruppo 2); e tre gruppi aggiuntivi, per un totale di 50 soggetti complessivamente, per la convalida dei biomarcatori, selezionati presso le Strutture Sanitarie del Sistema Sanitario Regionale e in particolare della Struttura Complessa di Chirurgia Toracica dell'ARNAS "G. Brotzu" di Cagliari tra pazienti con diagnosi di tumore del polmone (NSCLC) (gruppo 3, N = 25), con diagnosi di mesotelioma pleurico (MM) (gruppo 4, N = 10), e con nuova diagnosi di malattia polmonare interstiziale (gruppo 5, N = 15), di numerosità proporzionale all'incidenza di ciascuna patologia specifica, con possibilità di incremento di questa coorte sino a 100 candidati tra pazienti con diagnosi di tumore del polmone (NSCLC) (gruppo 3, N = 100), 60 candidati con nuova diagnosi

di malattia polmonare interstiziale (gruppo 5, N = 60) e 40 candidati con nuova diagnosi di mesotelioma pleurico (gruppo 4, N = 40).

*OS2: Raccolta dei campioni biologici:* i campioni biologici, pseudonimizzati, saranno raccolti inizialmente in fase di arruolamento e, successivamente, ogni 6 mesi, nel corso dello svolgimento del progetto, per ulteriori cinque prelievi. Nei gruppi 1 e 2 i campioni di plasma ed EBC per l'identificazione dei biomarcatori con Next Generation Sequencing (NGS) saranno raccolti e processati ogni 6 mesi fino alla fine dello studio, così come descritto in precedenza. Negli altri gruppi sarà effettuata la raccolta di un singolo campione per evitare possibili *bias* legati agli eventuali trattamenti medici in ragione della diagnosi (Figura 3).

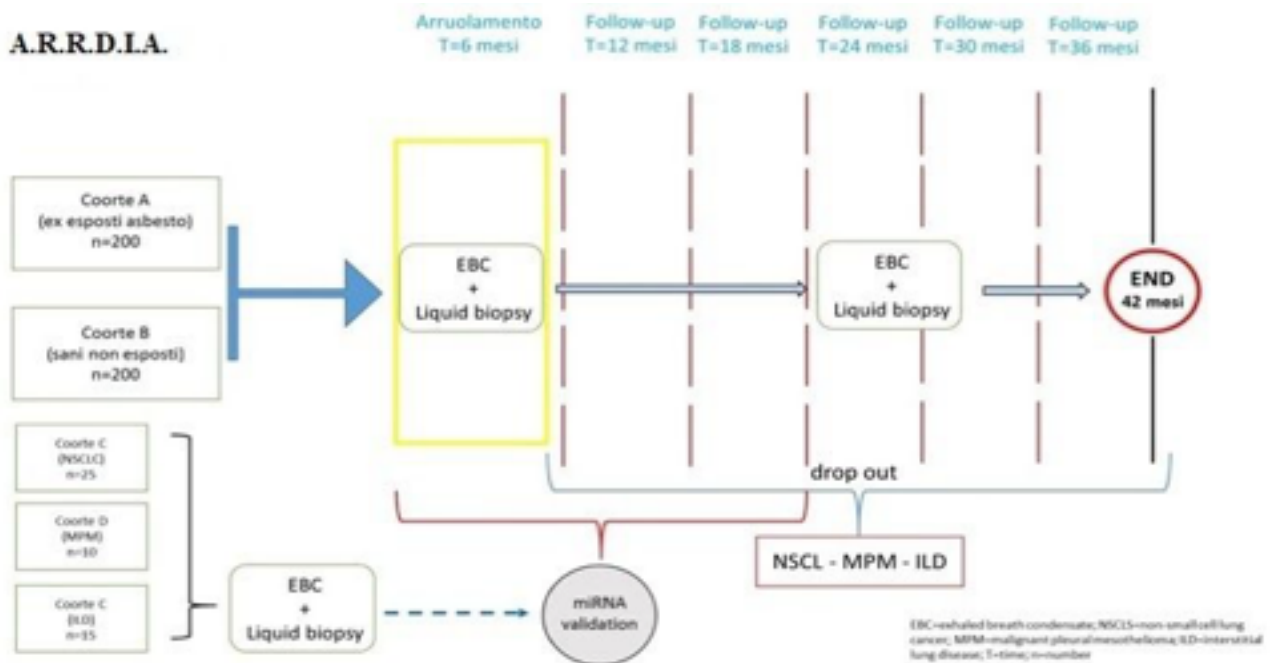
*OS3: Sequenziamento ed analisi dei dati:* in seguito ad estrazione degli acidi nucleici ed alla preparazione delle librerie, i campioni saranno sequenziati con tecnologia NGS presso i laboratori del CRS4 per quanto attiene ai MiRNA e ctDNA. I dati saranno quindi analizzati con metodologie bioinformatiche a cura del personale di CRS4.

*OS4: Validazione dei risultati:* i biomarcatori risultati significativamente caratterizzanti saranno sottoposti a validazione sperimentale su un numero elevato di campioni e con l'ausilio di una seconda metodica analitica, a cura del laboratorio di CRS4.

*OS5.* I risultati saranno infine trasferiti mediante "*web application*" e collegati automaticamente ai dati da questionario ai fini delle analisi statistico-epidemiologiche, che saranno condotte dal personale dell'Università mediante analisi delle curve ROC, al fine di identificare potenziali biomarcatori predittivi di patologia amianto-correlata.



Figura 3. Sequenza delle fasi dello studio ARRDIA.



#### 4. Disegno dello studio

Studio epidemiologico prospettico in quattro fasi.

*La Popolazione dello studio:* 450 soggetti selezionati sulla base dei criteri di inclusione ed esclusione illustrati al punto OS1 partecipanti alla fase 1. I partecipanti dei gruppi 1 e 2 saranno osservati in altre cinque fasi successive, ogni sei mesi.

I partecipanti ai gruppi 3-5 verranno valutati con prelievi effettuati nel corso del loro arruolamento

#### 5. Procedura dello studio

##### 5.1 Reclutamento dei partecipanti allo studio

A ciascun candidato, identificato in ambito regionale attraverso pubblica manifestazione di interesse o/e attraverso gli elenchi delle domande per i benefici previdenziali previsti dalla Legge 257/92, accolte dalle sedi INPS ed INAIL regionali, con senza sentenza della Magistratura del Lavoro in merito a ricorso previdenziale e nei registri di iscrizione all'Associazione Italiana ex-Esposti ad Amianto, sezione Sardegna, e l'archivio del Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica – Sezione di Medicina del Lavoro dell'Università di Cagliari (gruppo 1), sarà inviata da

parte di AIEA e del coordinatore dello studio, una lettera di invito alla partecipazione, inviata via email, cui seguirà un contatto telefonico. All'atto del contatto telefonico saranno illustrati brevemente gli scopi dello studio e sarà definita l'accettazione alla partecipazione e la data ed il luogo nel quale presentarsi per l'esecuzione del protocollo previsto dallo studio. Il soggetto sarà invitato a presentarsi solo se in possesso di certificato vaccinale anti-COVID-19 o di attestato di negatività a test molecolare o antigenico eseguito non più di due giorni prima e se privo di sintomatologia indicativa di malattia infettiva in atto, che verrà verificata nella sede del prelievo.

### ***5.2 Raccolta e gestione dei dati***

I partecipanti saranno accolti nella sede di esecuzione del protocollo dello studio, uno per volta ad intervalli di 40 minuti tra loro, onde prevenire assembramenti, ed eseguiranno il triage per l'accertamento dello stato vaccinale o della negatività nei confronti dell'infezione da SARS-Co-V2, il controllo della temperatura e l'accertamento delle condizioni di salute attuali e di eventuali contatti recenti con pazienti affetti da COVID-19. Stabilita l'assenza di infezione da SARS-Co-V2 in atto, e quindi l'idoneità alla partecipazione, ciascun soggetto firmerà il modulo per il consenso informato (Allegato 1) che gli è stato consegnato in sede di primo contatto e mail, per il quale troverà la possibilità di chiedere qualunque tipo di delucidazione, con un medico, al fine di comprendere in senso compiuto il contenuto del documento da firmare e conservare. Quindi riceverà una cartella con un codice anonimo ed auto-compilerà un questionario online (Allegato 2) su un tablet nel quale sarà caricata un'applicazione specifica per lo studio, indicando esclusivamente il codice anonimo e nessun dato identificativo personale. Gli sarà assegnata una casella di posta elettronica che corrisponderà al suo codice di pseudonimizzazione e per la quale provvederà personalmente ad attivare il suo account. Una unità di personale sarà presente per assistere i partecipanti alla compilazione del questionario, a verificarne la completezza e, se necessario, ad integrarlo spiegando le domande non chiare al partecipante. Ciascun partecipante si sottoporrà quindi ad un prelievo ematico eseguito da parte di personale infermieristico esperto. Saranno prelevati circa 10 ml di sangue suddivisi in due provette Vacutainer per plasma con EDTA (tappo lilla). Ciascuna provetta sarà etichettata con codice pseudonimizzato che corrisponde a quello consegnato con la cartella ricevuta all'arrivo. Ogni provetta presenterà il codice identificativo pseudonimizzato. Le provette saranno immediatamente surgelate a -80 °C , con ghiaccio secco.

di siero saranno centrifugate in loco ed il plasma sarà estratto ed aliquotato per il trasporto in 2-4 provette Eppendorf all'interno di contenitori refrigerati. Anche tutte le provette Eppendorf saranno etichettate con il codice a barre pseudonimizzati.

Per la raccolta del respiro esalato condensato (EBC), il partecipante allo studio dovrà respirare a volume corrente, con una frequenza normale, attraverso un boccaglio monouso collegato ad una valvola di non ritorno a due vie, per separare l'aria inspiratoria da quella espiratoria e filtrare la saliva, indossando uno stringinaso, per 15 minuti (100 L. di volume espirato), collegato ad un condensatore Turbo DECCS (Medivac, Parma) trasportabile, a temperatura regolata a 5°C. Il condensatore rispetta tutti gli standard ed i principi per prevenire la contaminazione dei campioni di EBC pubblicati dalla American Thoracic Society e dalla European Respiratory Society (ATS/ERS). L'esalato condensato, 1-3 ml, sarà raccolto e surgelato sotto forma di ghiaccio a -80°C, previo trasferimento in provette RNAprotect Tissue Tubes® (Qiagen Italia, Milano) per preservare l'RNA, pure etichettate con codice a barre, quindi trasportato in contenitore refrigerato al laboratorio preposto, dell'Università di Cagliari. In laboratorio, analogamente ai campioni ematici, si procederà alla registrazione dei campioni pervenuti, all'estrazione dei microRNA mediante miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen Italia, Milano) del DNA circolante mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit, alla preparazione di aliquote di 250 µl ed alla loro successiva conservazione a -80°C. L'analisi mediante NGS sarà eseguita entro 3-6 mesi dalla raccolta. Per escludere una possibile contaminazione salivare, nell'esalato condensato è stata analizzata l'attività dell'amilasi.

Se non è stato praticato on line, un team di psicologi si alternerà per effettuare un colloquio con il partecipante e somministrare il questionario Coping Orientations to Problem Experienced (COPE) (Carver, Scheier e Weintraub, 1989), che prende in considerazione diverse modalità di coping, tradotte in 5 punteggi riferiti a:

- Sostegno sociale
- Strategie di evitamento
- Attitudine positiva
- Orientamento al problema
- Orientamento trascendente.

L'accesso ai locali del laboratorio, nei quali saranno conservati i campioni biologici raccolti nel corso dello studio, è consentito ai soli addetti e controllato da incaricati della vigilanza. Le persone



ammesse a qualunque titolo dopo l'orario di chiusura sono identificate e registrate. La conservazione, l'utilizzo ed il trasporto dei campioni biologici saranno posti in essere con le modalità ed i tempi descritti, in modo da garantirne la qualità, l'integrità, la disponibilità e la tracciabilità, attraverso un apposito programma informatico che ne traccia il percorso anche presso i differenti laboratori convenzionati con lo studio. Percorsi che possono essere monitorati dal personale preposto.

### **5.3 Percorsi Informatici**

I dati pseudonimizzati, raccolti mediante questionario online ed i risultati dell'elaborazione bioinformatica delle analisi genetiche NGS, saranno trasferiti in formato elettronico direttamente ad un server apposito, mediante "*web application*", e salvati su files separati, per ciascuno dei quali sarà previsto accesso riservato con doppia chiave di sicurezza. Ai fini delle analisi statistico-epidemiologiche, gli operatori potranno collegare i dati da questionario e quelli genetici solo attraverso il codice individuale. Attraverso il server saranno curati i seguenti aspetti:

- Gestione della sicurezza e privacy, mediante accesso riservato ad operatori e supervisor con doppia chiave di accesso (password e OTP via telefono cellulare) previa registrazione;
- Gestione Utenti (Supervisor e Operatori);
- Assemblaggio in database preventivamente standardizzato delle informazioni da questionario e dei risultati delle analisi biomolecolari;
- Interazione fra i dati (allerte - analisi predittive mediante algoritmi automatici con procedimenti di Intelligenza Artificiale (AI));
- Sincronizzazione dati con la Sala Controllo;
- Invio di messaggi di allerta agli operatori e loro gestione.

Gli operatori saranno preventivamente informati e formati sul protocollo della ricerca e saranno gli unici autorizzati all'inserimento, lettura ed analisi dei dati. I dati anagrafici saranno limitati ad età all'atto della partecipazione, genere e luogo di nascita, ed associati al codice individuale in possesso del partecipante, in modo da ridurre al minimo i rischi di conoscenza accidentale e di accesso abusivo o non autorizzato.

Il partecipante che richieda di essere reso partecipe dei risultati degli esami eseguiti potrà accedere all'applicazione direttamente, attraverso il proprio codice individuale in un'area riservata. Saranno posti in essere i necessari accorgimenti per la verifica dell'identità digitale del server che eroga il

servizio e della postazione client da cui si effettua l'accesso ai dati, ricorrendo a certificati digitali emessi in conformità alla legge da un'autorità di certificazione.

#### 5.4 Tipologia di dati raccolti:

- Codice anonimo, gruppo di appartenenza (1 = Ex-esposto ad amianto; 2 = controllo; 3A = Tumore polmonare; 3B = Mesotelioma pleurico; 3C = Interstiziopatia polmonare), luogo di nascita ed età compiuta al momento dell'accesso.
- Genere.
- Luogo di nascita.
- Scolarità: Elementare – Media – Superiore – Laurea.
- Peso ed altezza.
- Storia lavorativa completa con dettagli sulle mansioni comportanti esposizione diretta o indiretta ad amianto.
- Anamnesi familiare, con particolare riguardo a precedenti familiari per patologia respiratoria e neoplastica.
- Fumo di sigaretta.
- Abitudini individuali (caffè, bevande alcoliche).
- condizione di portatore di G6PD carenza.
- Emogruppo.
- Anamnesi patologica (check list per diabete, cardiopatie, coagulopatie, patologie muscolo-scheletriche, neoplasie, patologie dell'apparato respiratorio, malattie autoimmuni, malattie dell'apparato digerente, malattie dell'apparato genito-urinario), farmaci assunti, pregressi esami di diagnostica strumentale (TAC, endoscopie, biopsie), pregressi interventi chirurgici
- Dati raccolti dal team degli psicologi:
- Data somministrazione
- Punteggi del questionario COPE.
- Relazione psicologica finale sui risultati, considerando tutti gli indicatori del questionario COPE (Allegato 3)

## 6. Problematiche Etiche

### 6.1 Custodia e sicurezza dei dati

Per la custodia e la sicurezza dei dati genetici e dei campioni biologici saranno rispettate le prescrizioni di cui al Provvedimento n. 146 del 5 giugno 2019 del Garante della Protezione dei dati personali “*Provvedimento recante le prescrizioni relative al trattamento di categorie particolari di dati, ai sensi dell’art. 21, comma 1 del d.lgs. 10 agosto 2018, n. 101*”, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale Serie Generale N. 176 del 29 Luglio 2019. In particolare, sono adottate le seguenti misure cautelative:

- a) L’accesso ai locali del laboratorio dell’Università di Cagliari e del laboratorio del Centro di ricerca, sviluppo e studi superiori in Sardegna (CRS4) dedicato al sequenziamento dei miRNA e del DNA circolante sarà consentito esclusivamente al personale addetto. Eventuali altri accessi potranno essere autorizzati dal responsabile dello studio e dovranno prevedere l’identificazione delle persone, e la firma con orario d’ingresso e di uscita. Non saranno consentiti accessi dopo l’orario di chiusura, se non al personale addetto per interventi di emergenza, debitamente registrato.
- b) Le modalità di conservazione, utilizzo e trasporto dei campioni biologici avverranno secondo un protocollo atto a garantirne la qualità, l’integrità, la disponibilità e la tracciabilità, con appositi programmi di anonimizzazione e tracciamento di campioni biologici.
- c) Il trasferimento dei dati genetici avverrà attraverso canali di trasmissione protetti, con accesso periferico al server mediante applicazione web dedicata, creata appositamente nell’ambito di questo progetto, con modalità che garantiscano, previa verifica, l’identità digitale del server che eroga il servizio e della postazione client da cui si effettua l’accesso ai dati. L’operatore potrà accedere mediante doppia chiave di sicurezza (password e codice OTP inviato al telefono cellulare dell’operatore autorizzato). I dati pseudonimizzati saranno scaricabili in files protetti con chiave crittografica per la loro apertura, che sarà trasmessa all’operatore tramite canali di comunicazione differenti da quelli utilizzati per la trasmissione dei dati. In nessun caso sarà consentita la trasmissione via e-mail dei files contenenti i dati genetici, in modo da prevenire l’illecita o fortuita acquisizione dei dati da parte di terzi.
- d) La consultazione dei dati genetici è consentita previa adozione di sistemi di autenticazione a doppia chiave, come descritto al punto precedente.

e) I dati genetici sono pseudonimizzati e codificati in maniera inintelligibile anche da chi è autorizzato ad accedervi, in modo da ridurre al minimo i rischi di conoscenza accidentale e di accesso abusivo o non autorizzato. In caso di richiesta esplicita da parte dell'interessato, questo potrà accedere ai propri risultati direttamente attraverso l'applicazione, utilizzando il proprio codice individuale, scelto all'atto della partecipazione alla prima fase dello studio.

f) I dati da questionario, contenenti informazioni sulla storia lavorativa, sullo stile di vita e sullo stato di salute degli interessati, sono conservati su files separati, che ne consentono il trattamento disgiunto dai dati genetici. In nessuno dei due files saranno presenti elementi atti ad identificare direttamente le persone interessate.

### ***6.2 Informazioni agli interessati***

Le informazioni da rendere ai candidati alla partecipazione ai sensi degli artt. 13 e 14 Regolamento (UE) 2016/679 e anche ai sensi degli artt. 77 e 78 del Codice per il medico di medicina generale, e riportate sul modulo per il consenso informato, evidenziano, altresì:

a) i risultati conseguibili anche in relazione alle notizie inattese che possono essere conosciute per effetto del trattamento dei dati genetici;

b) la facoltà o meno, per l'interessato, di limitare l'ambito di comunicazione dei dati genetici e il trasferimento dei campioni biologici, nonché l'eventuale utilizzo di tali dati per ulteriori scopi.

Le informazioni sul trattamento di dati personali sono fornite all'interessato anche ai fini dell'acquisizione di una nuova manifestazione del consenso (con. 38, 58, e artt. 5 e 8 Regolamento (UE) 2016/679 e artt. 82, comma 4, del Codice).

### ***6.3 Approvazione Autorità Regolatorie***

Questo studio sarà condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e previa approvazione del Comitato Etico dell'Agenzia per la Tutela della Salute in Sardegna, che dovrà analizzare ed approvare il presente protocollo di studio. Se durante lo studio si dovesse rendere necessario apportare degli emendamenti al protocollo o ad altri documenti, il Responsabile del progetto dovrà accertarsi che il Comitato Etico abbia approvato gli emendamenti prima di istituire le modificazioni al protocollo.

#### **6.4. Consenso Informato**

Ai sensi del Regolamento europeo in materia di Protezione dei Dati Personali (GDPR 2016/679), articolo 5 (Principi applicabili al trattamento di dati personali), 6 (liceità del trattamento) e 9 (trattamento di categorie particolari di dati personali) paragrafo 2 lettera j, il modulo per il consenso informato contiene

- a.** l'assicurazione che i dati raccolti saranno utilizzati esclusivamente per scopi di ricerca scientifica;
- b.** la conferma che tutte le informazioni raccolte saranno conservate in modo sicuro e ne sarà impedita la visione da parte di estranei;
- c.** le dichiarazioni che qualsiasi informazione che possa identificare i partecipanti sarà rimossa per garantirne l'anonimato; che il materiale sarà custodito dal responsabile dello studio; che i risultati della ricerca, trattati mediante strumenti elettronici, saranno diffusi solo in forma rigorosamente anonima, attraverso pubblicazioni scientifiche e convegni scientifici previamente autorizzati dal CRP dell'Assessorato alla Programmazione della Regione Autonoma della Sardegna;
- d.** la precisazione che la partecipazione allo studio implica che, in conformità alla normativa, il personale addetto allo studio, il comitato etico e le autorità sanitarie italiane e straniere, possano conoscere i dati che riguardano i soggetti della popolazione oggetto dello studio, con modalità tali da garantire la riservatezza della loro identità;
- e.** l'informazione che, in ottemperanza alle disposizioni legislative vigenti relative alla tutela delle persone rispetto al trattamento dei dati personali, il soggetto ha il diritto di accedere ai dati, chiederne la rettifica, la modifica anche parziale o la cancellazione;
- f.** l'assicurazione che la partecipazione allo studio non comporta metodiche diagnostiche invasive e quelle che saranno praticate sono del tutto analoghe a quanto normalmente eseguito in occasione di visite ed accertamenti ai fini della sorveglianza sanitaria dei lavoratori (D.Lgs 81/2008), con la possibilità di integrazione con nuove metodiche che contemplino gli stessi criteri di non invasività. Non essendo prevista alcuna manovra strumentale invasiva né somministrazione di farmaci e non sussistendo il pericolo che i dati di raccolti possano essere in alcun modo impiegati per finalità discriminative o potenzialmente lesive della privacy dei soggetti partecipanti, non è prevista alcuna copertura assicurativa;

- g. la dichiarazione della assenza di benefici clinici o di natura economica per chi partecipa allo studio;
- h. l'indicazione delle strutture e del personale coinvolto;
- e. l'indicazione del nominativo del responsabile dello studio e di un recapito telefonico ed e-mail cui rivolgersi, nelle ore e giorni indicati, per informazioni e segnalazioni;

#### **6.5 Doveri del responsabile dello studio (medico sperimentatore)**

Il responsabile dello studio dovrà assicurarsi che tutto il personale coinvolto nello studio sia qualificato e adeguatamente istruito circa le procedure dello studio medesimo.

#### **6.6 Registrazione dei dati**

Il responsabile dello studio si assicurerà che tutti i dati riportati nel database corrispondano fedelmente al profilo del soggetto ed a tutte le notizie specificamente richieste dal protocollo.

#### **6.7 Protezione dei dati**

L'accesso ai dati sarà sottoposto ad un severo controllo. Non saranno conservati dati identificativi dati personali. I dati sensibili dei soggetti in studio saranno archiviati direttamente nel server dedicato esclusivamente allo studio in forma anonimizzata e codificata. Il database anonimo, costituito dai dati relativi agli ID selezionati, è conforme con le leggi vigenti (Regolamento europeo in materia di Protezione dei Dati Personali GDPR 2016/679). Al database si accede tramite ID e password e codice OPT trasmesso al telefono cellulare dell'operatore.

Il responsabile della gestione del database è il Dottor Roberto Cherchi, responsabile della Struttura Complessa di Chirurgia Toracica dell'ARNAS "G. Brotzu" di Cagliari.

### **7. Proprietà intellettuale e Pubblicazione dei dati**

Tutte le informazioni scientifiche desunte dalla presente ricerca saranno oggetto di pubblicazione su riviste internazionali dotate di sistema di *peer-review* e la proprietà intellettuale dei dati sarà condivisa dal Responsabile scientifico Dott. Roberto Cherchi e dalla Regione Autonoma della Sardegna – Centro Regionale di Programmazione, come anche ogni brevetto o qualsiasi altro diritto

di proprietà industriale e/o intellettuale avente ad oggetto soluzioni innovative scaturenti dalla presente attività di ricerca.

I singoli sperimentatori che saranno liberi di pubblicare i dati, presentarli a Congressi e diffonderli nelle sedi scientifiche e pubbliche ritenute più utili per la diffusione delle conoscenze acquisite, solo successivamente alla predisposizione di un protocollo che preveda la tipologia delle riviste scientifiche indicate, posizione dei nominativi dei ricercatori presenti nella pubblicazione e programma di partecipazione a convegni e ogni attività di pubblica informazione dei dati e metodologie utilizzate nello studio, previo consenso del P.I. e autorizzazione del CRP o indicazione di un protocollo che abbia seguito lo stesso iter amministrativo.

Il responsabile scientifico

Dott. Roberto Cherchi