



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

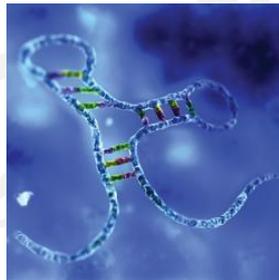
Dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie Mediche Sperimentali ed Applicate

Indirizzo: Pneumologia Sperimentale

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S.)

Med/10

## IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MARCATORI MOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI TUMORI POLMONARI



IL DOTTORE

**ROBERTA SANTAGATA**

IL COORDINATORE

**PROF. C. GIORDANO**

IL TUTOR

**PROF. M. SPATAFORA**

IL REFERENTE DI INDIRIZZO

**PROF. M.R. BONSIGNORE**

CICLO XXV

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

## Indice

### **Introduzione:**

Il cancro del polmone	4
Anatomia patologica	4
Patogenesi	8
Stadiazione	14
La diagnosi	15
Lo screening	16
Il liquido pleurico	18
I miRNA	25
I mirna nel polmone	28

### **Scopo del lavoro 34**

### **Materiali e metodi 36**

Selezione dei pazienti e questionario	36
Raccolta dei campioni e processamento liquido pleurico	37
Estrazione RNA	37
Quantificazione spettrofotometrica	40
Analisi quantitativa dell' RNA totale estratto	41
Retrotrascrizione e amplificazione in Real Time PCR	44
Microarray	46

### **Risultati 50**

Scelta della metodica estrattiva	51
----------------------------------	----

Q RT esplorative	57
Valutazione della stabilità nel versamento pleurico	59
Profili di espressione dei microarray	60
<b>Discussione</b>	<b>67</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>72</b>

## **IL CANCRO DEL POLMONE**

Il cancro del polmone rappresenta la più comune neoplasia maligna del torace; è una delle neoplasie più diffuse ed è quella a maggior incidenza in tutti i paesi occidentali. Esso costituisce la prima causa di morte a livello mondiale ed è responsabile del 17.8% di tutte le morti per cancro (1). Il picco d'incidenza si registra tra la quinta e la sesta decade di vita e diversamente dai tumori di altra origine, si continua ad osservare un aumento della sua incidenza. Inoltre, i tassi di mortalità rispecchiano fedelmente i tassi d'incidenza essendo la letalità del cancro del polmone molto alta, intorno al 90% (2).

Ogni anno si contano nel mondo più di 1.300.000 nuovi casi, di cui circa 1.000.000 si manifestano nel sesso maschile e 300.000 nel sesso femminile. In realtà, negli ultimi decenni si è verificata una lieve e progressiva diminuzione dell'incidenza di questa neoplasia nel sesso maschile, e vi è stato un netto incremento nel sesso femminile, quale conseguenza del diffondersi tra le donne dell'abitudine al fumo. Nel 2010, in Italia, si sono ammalati di tumore del polmone 23.969 uomini e 7.082 donne, per un totale di oltre 31.000 persone, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 10-15% (1s).

### **Anatomia patologica**

I tumori primitivi maligni del polmone vengono classificati secondo la World Health Organization (WHO) in diversi tipi istologici:

- Carcinoma a cellule squamose (epidermoide)
- Carcinoma a piccole cellule (microcitoma, oat cell)
- Adenocarcinoma
- Carcinoma a grandi cellule
- Carcinoide
- Carcinoma con elementi pleomorfi, sarcomatoide
- Carcinoma adenosquamoso
- Carcinoma del tipo ghiandole salivari

Tra questi i più frequenti sono:

1. Carcinoma squamoso (30%-45%);
2. Adenocarcinoma (30%-45%);
3. Carcinoma indifferenziato a piccole cellule (15%-20%);
4. Carcinoma indifferenziato a grandi cellule (5 %-10%).

Il *carcinoma squamoso, spinocellulare o epidermoide* rappresentava fino a qualche anno fa l'istotipo più frequente, oggi superato dall'adenocarcinoma. Questo è più frequente nei soggetti di sesso maschile ed è l'istotipo maggiormente correlato al fumo di sigaretta. Nel corso degli ultimi venti anni, l'incidenza del carcinoma epidermoide è diminuita dal 50% all'attuale 30%-45% circa, di tutti i casi di tumore maligno del polmone e rappresenta il tumore a prognosi migliore. Il carcinoma squamoso insorge prevalentemente come neoformazione endoluminale nei bronchi di grosso calibro provocando atelettasia distale, bronchiectasie e polmoniti ostruttive, presenti nella maggior parte dei pazienti come prima manifestazione clinica; ha per lo più uno sviluppo centrale, ilare o parailare e meno frequentemente origina al centro del parenchima polmonare andando incontro a necrosi centrale. Gli aspetti microscopici sono caratterizzati da forme ben differenziate, in cui si osserva produzione di cheratina, formazione di ponti intercellulari e perle cornee, e forme moderatamente e scarsamente differenziate in cui la cheratinizzazione compare solo raramente o addirittura assente come nel carcinoma spinocellulare anaplastico(3). Ha diffusione loco-regionale endotoracica e tende a metastatizzare tardivamente rispetto agli altri istotipi, colpendo prevalentemente i linfonodi loco-regionali; tuttavia la velocità di crescita, nella sede di origine è di solito più rapida con un tempo di raddoppiamento medio di circa 115 giorni (4). Infine, nell'epitelio bronchiale adiacente alla massa neoplastica è possibile evidenziare aree di metaplasia squamosa o di displasia epiteliale, fino a focolai di carcinoma in situ.

L'*adenocarcinoma* rappresenta il 30-45% di tutte le neoplasie maligne del polmone; la sua incidenza è aumentata significativamente negli ultimi due decenni, parallelamente alla diminuzione dell'incidenza del carcinoma spinocellulare ed è ora la forma più comune di cancro polmonare. Rappresenta la forma più frequente nel sesso femminile e negli uomini di età inferiore ai 50 anni. La lesione è, in genere

periferica, a livello dei bronchi di minore calibro ed insorge spesso in prossimità di aree di cicatrizzazione parenchimale. La diagnosi si basa sull'osservazione di strutture simil-ghiandolari e sulla presenza di cellule produttrici di mucina; in alcuni casi si osservano “cellule ad anello con castone”, caratterizzate dalla presenza di abbondante muco nel citoplasma con nucleo dislocato in periferia. Si possono distinguere i seguenti sottotipi: *acinoso*, *papillare*, *bronchiolo-alveolare* e *solido con produzione di muco*. L'adenocarcinoma cresce più lentamente rispetto al carcinoma squamoso, il tempo di raddoppiamento medio è di circa 220 giorni, ma ha una tendenza più spiccata a dare metastasi a distanza (5).

Il *carcinoma a piccole cellule* o *microcitoma* costituisce circa il 15%-20% delle neoplasie maligne del polmone. Colpisce più frequentemente il sesso maschile, la 6a e la 7a decade di vita ed è strettamente correlato al fumo di sigaretta; infatti, soltanto nell'1% dei casi si manifesta nei non fumatori. Insorge prevalentemente a livello centrale o periferico. Istologicamente è caratterizzato da cellule piccole monomorfe con scarso citoplasma e con nucleo tondeggianti o fusiformi e nucleolo piccolo e scarsamente visibile. Le cellule tumorali derivano dalle cellule di Kulcschitzky del sistema bronchiale, appartenenti al sistema APUD (Amine precursor uptake and decarboxylation). Dal punto di vista istologico si riconoscono tre istotipi: linfocitoide, di tipo intermedio, combinato, caratterizzati tutti, com'è tipico di questa forma tumorale, da un alto grado di malignità per la precocità nel dare metastasi loco-regionali e a distanza, che lo rende quasi sempre incurabile radicalmente già al momento della diagnosi.

Il *carcinoma indifferenziato a grandi cellule* rappresenta circa il 5-10% delle neoplasie polmonari. È associato al fumo di sigaretta nel 50-55% dei casi, quindi in modo meno significativo rispetto al carcinoma a piccole cellule e al carcinoma spinocellulare. Può avere localizzazione centrale o periferica con frequenti aree di necrosi emorragica al suo interno e le cellule che lo costituiscono sono di varie dimensioni, poligonali con grande nucleo, nucleolo prominente ed abbondante citoplasma. È un tumore a crescita rapida con tendenza all'infiltrazione a livello ilare e alla precoce metastatizzazione a distanza.

Per convenzione, distinguiamo i carcinomi non a piccole cellule (**NSCLC**) che costituiscono circa l'80-85% dei casi diagnosticati, dai carcinomi a piccole cellule (**SCLC**). Nel primo gruppo, sono compresi il carcinoma squamoso, l'adenocarcinoma e il carcinoma a grandi cellule; nel secondo il carcinoma indifferenziato a piccole cellule.

La classificazione semplificata che divide i tumori in due gruppi Small Cell Lung Cancer, (SCLC) e Non-Small Cell Lung Cancer, (NSCLC) ha grande importanza clinica ai fini della formulazione della prognosi e della scelta della strategia terapeutica più adeguata.

Lo SCLC ha una prognosi nettamente peggiore rispetto al NSCLC, con una sopravvivenza globale a 5 anni del 3-10% rispetto al 5-80% del NSCLC (6).

Infine, per quanto riguarda l'atteggiamento terapeutico, lo SCLC viene trattato mediante chemioterapia e radioterapia dal momento che non è curabile chirurgicamente, ad eccezione di pochissimi casi. Il NSCLC ha come terapia d'elezione quella chirurgica (negli stadi I-IIIa); radioterapia e chemioterapia talora impiegate a scopo neoadiuvante ed adiuvante della chirurgia.

Rientrano nella categoria delle lesioni di natura maligna, anche i tumori a basso grado di malignità ossia il *carcinoide*, il *carcinoma adenoido-cistico (cilindroma)* e il *carcinoma mucoepidermoide*. Essi hanno un comportamento maligno con uno sviluppo infiltrativo locale e le metastasi linfoghiandolari e a distanza compaiono solo tardivamente.

## **Patogenesi**

I fattori che contribuiscono allo sviluppo del tumore al polmone sono sia endogeni che esogeni. Infatti il carcinoma polmonare è una patologia multifattoriale, risultato di un'interazione fra predisposizione genetica e fattori esogeni.

### ***Fattori endogeni***

Fra i fattori endogeni troviamo sia fattori genetici sia quelli legati a pregresse patologie polmonari.

I **fattori genetici** sono responsabili della variabilità interindividuale nella suscettibilità ai cancerogeni; infatti, a parità di esposizione a fattori esogeni, quali il fumo di tabacco e i cancerogeni professionali, solo alcuni individui sviluppano una neoplasia polmonare. Inoltre, un'anamnesi familiare positiva per cancro del polmone aumenta il rischio di sviluppo di tale malattia, soprattutto tra i non fumatori. Ad oggi, sono stati individuati alcuni fenotipi più sensibili ai carcinogeni ambientali. Gli enzimi interessati sono, fra i tanti: l'aril-idrocarburoidrossilasi e il fenotipo metabolico della debrisoquina idrossilasi (sistema del citocromo P450), responsabili del metabolismo degli idrocarburi aromatici policiclici, e le glutatione-S-transferasi, coinvolte nell'inattivazione di numerose tossine (7). Inoltre lo sviluppo della malattia può anche dipendere da anomalie ereditarie a livello di geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare.

La presenza di pregresse o coesistenti **patologie polmonari**, quali la fibrosi polmonare interstiziale diffusa e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), può concorrere nel determinare una maggior predisposizione allo sviluppo di un tumore polmonare. Nel caso della fibrosi polmonare interstiziale diffusa, idiopatica o secondaria, l'aumento del rischio di sviluppo di tumore del polmone è legato all'elevata attività proliferativa delle aree di metaplasia ed iperplasia focale presenti in associazione con le aree di fibrosi. Invece, nel caso della BPCO la causa dell'incremento di tale rischio è da ricercare non tanto nel fatto che BPCO e cancro del polmone condividano lo stesso fattore eziologico, quanto nello stress ossidativo cronico subito dalle pareti delle vie aeree, in corso di tale patologia(8).

### ***Fattori esogeni***

Tra i fattori esogeni che possono aver un ruolo nello sviluppo del cancro del polmone sono da ricordare, in particolar modo, il fumo di sigaretta, fattore di rischio principale, e le esposizioni ambientali ed occupazionali ad asbesto, metalli pesanti, radiazioni ionizzanti, fumi e polveri.

Si ritiene che essi agiscano promuovendo alterazioni a carico del DNA in grado di determinare proliferazione incontrollata della cellula mutata, con conseguente sviluppo della neoplasia.

In particolar modo il **fumo di sigaretta** è oggi ritenuto il fattore di rischio più importante; basti pensare che l'80-90% di tutti i pazienti affetti da cancro del polmone sono fumatori o ex fumatori e che l'incidenza di cancro del polmone è andata aumentando di pari passo con il diffondersi, a partire dalla fine dell'800, del consumo di tabacco.

Tale rischio risulta proporzionale alla durata dell'abitudine e al numero medio di sigarette fumate al giorno. Infatti, è stato calcolato che un fumatore cronico di 20 sigarette al giorno ha 1 probabilità su 8 di morire di cancro del polmone, con un rapporto di rischio tra fumatori e non fumatori di circa 25 a 1, che può aumentare sino a 60 a 1 se si consumano mediamente 40 sigarette al giorno e si inizia a fumare precocemente. Viceversa, la cessazione dell'abitudine tabagica può comportare una riduzione del rischio di cancro, che tuttavia si mantiene rilevante per 10-15 anni dopo la sospensione del fumo e permane comunque più elevato rispetto ai non fumatori anche dopo 40 anni.

In uno studio multicentrico, l'associazione tra fumo di tabacco e cancro del polmone è stata dimostrata per tutti gli istotipi, ma soprattutto per il microcitoma, seguito dal carcinoma spinocellulare e dall'adenocarcinoma in minor misura (9). Per quanto riguarda l'**esposizione occupazionale** ad agenti cancerogeni, si stima mediamente che le neoplasie polmonari di origine lavorativa costituiscano il 10-15% del totale, ed i principali agenti cancerogeni responsabili di tali neoplasie sono rappresentati da: asbesto, alcuni metalli, gli idrocarburi aromatici policiclici (IAP) e le radiazioni ionizzanti.

L'**asbesto** è un minerale estremamente diffuso in natura, costituito da magnesio e silicato di calcio, di cui si riconoscono quattro tipi di fibre: la crisolite (o asbesto bianco, che costituisce il 90% dell'asbesto utilizzato nell'industria), la crocidolite, l'amosite e l'antofilitite. Numerosi studi in letteratura hanno documentato la correlazione tra esposizione all'asbesto e neoplasia polmonare o mesotelioma pleurico, ed hanno evidenziato come questa sia connessa alla durata dell'esposizione, al tipo di fibra a cui il soggetto è esposto (l'esposizione a

crocidolite si associa ad un rischio di neoplasia polmonare in assoluto più elevato (10).

Tra i **metalli** cancerogeni sono meritevoli di attenzione: l'arsenico nei minatori, nei fonditori e negli addetti alla produzione ed utilizzo dei pesticidi; il nichel (soprattutto se sotto forma di solfato di nichel), usato nella produzione di acciaio inossidabile e di altre leghe metalliche; e il cromo utilizzato nei processi di cromatura e di platinatura, nella concia delle pelli e nella produzione di vernici.

Gli **idrocarburi aromatici policiclici** (IAP), che si formano durante la combustione incompleta di materiale organico, aumentano il rischio di carcinoma polmonare negli esposti da 3 a 7 volte.

Anche per le **radiazioni ionizzanti** assorbite dai soggetti esposti a uranio, radon e loro prodotti di decadimento si è dimostrato un ruolo eziologico nella genesi del cancro del polmone (11). L'**inquinamento atmosferico** ambientale è responsabile di circa l'1-2% delle neoplasie polmonari totali, poiché provoca la liberazione di IAP (3.4-benzopirene) e metalli (nickel, cromo, ossido di arsenico). La difficoltà di calcolare in modo preciso l'esposizione a tali composti inficia gli studi epidemiologici atti a chiarire il rapporto tra inquinamento atmosferico e neoplasia polmonare. Tuttavia, l'incidenza e la mortalità per tumore polmonare, più elevate nelle aree urbane rispetto alle zone rurali, si correlano in modo direttamente proporzionale al tasso di urbanizzazione ed industrializzazione.

La **patogenesi** del carcinoma polmonare è un processo complesso, che si realizza attraverso quattro differenti stadi. Il tempo di latenza tra l'esposizione ad un agente cancerogeno e lo sviluppo clinico della malattia, richiede solitamente alcuni anni, durante i quali si verificano gli eventi patogeni propri del processo di cancerogenesi. Tale processo viene schematicamente suddiviso in quattro fasi:

1. **Iniziazione**: il genoma va incontro a mutazioni in seguito all'esposizione ad agenti cancerogeni. Ciò comporta l'insorgenza, nella cellula interessata, di un cambiamento immediato, irreversibile.
2. **Promozione**: le cellule trasformate, anche in assenza dell'agente cancerogeno responsabile della loro trasformazione, se sottoposte a determinati stimoli, ad esempio se indotta a proliferare, rivelano i caratteri acquisiti durante l'iniziazione.

3. Conversione: la cellula mutata acquista la capacità di migrare nel torrente circolatorio ematico e linfatico, allontanandosi dal tessuto di origine.

4. Progressione: la cellula tumorale colonizza tessuti ed organi lontani da quello di partenza (metastatizzazione), proliferando al loro interno e sovvertendone la struttura in maniera irreversibile.

I geni generalmente coinvolti, come mutati, in questo processo di cancerogenesi sono i responsabili della regolazione della crescita cellulare e sono distinti in tre grandi classi: i proto-oncogeni, che promuovono la proliferazione cellulare; i geni oncosoppressori, che inibiscono la replicazione cellulare e i geni regolatori dell'apoptosi.

Le mutazioni interessanti i proto-oncogeni sono considerate mutazioni "dominanti" poichè è sufficiente che uno solo dei due alleli di quel gene sia mutato affinché la cellula sia stimolata a crescere in maniera incontrollata. Invece, per quanto riguarda i geni oncosoppressori, si parla di mutazioni "recessive" poichè è necessario che entrambi gli alleli di quel gene siano mutati perchè la cellula possa replicarsi in maniera continua. Ovviamente, gli individui che fin dalla nascita presentano una mutazione di uno degli alleli di un gene oncosoppressore, hanno una probabilità più alta rispetto, alla popolazione generale, di sviluppare un tumore.

I geni che regolano l'apoptosi, possono comportarsi sia come i proto-oncogeni sia come gli oncosoppressori. Infine, esiste una quarta categoria di geni coinvolti nel processo di cancerogenesi, ossia i geni che regolano il processo di riparazione del DNA. Essi influenzano indirettamente la proliferazione e la morte cellulare in quanto determinano la capacità dell'organismo di riparare i danni non letali e portare a morte le cellule, con danni irreversibili. I meccanismi responsabili della sintesi di prodotti genici alterati in grado di far proliferare la cellula in modo incontrollato possono essere diversi, ma i più comuni sono le mutazioni puntiformi e le mutazioni di struttura dei cromosomi.

Gli oncogeni dominanti che sono spesso presi in causa nei tumori polmonari sono:

C-Myc che codifica per un attivatore trascrizionale regolante l'espressione di diversi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare; quest'oncogene è stato trovato mutato nel 30% delle linee cellulari di microcitoma (12).

K-RAS codificante per una GTPasi deputata al reclutamento e all'attivazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale di crescita cellulare; mutazioni in corrispondenza dei codoni 12, 13, 61 di p21 RAS causano un'attivazione continua della proteina. Le mutazioni in k RAS sono associate ai forti fumatori in caso di adenocarcinoma nel 30% dei casi. La mutazione puntiforme nel codone 12 di K-RAS ha un valore prognostico negativo nei pazienti con adenocarcinoma(12).

Uno dei sistemi recettoriali più studiato, nei tumori polmonari, è quello governato dall'*EGFR* (epidermal growth factor receptor) presente inoltre l'80% dei casi nei pazienti con NSCLC. L' EGFR può risultare alterato nella cellula neoplastica a livello del dominio tirosin-chinasico, con una frequenza del 30% circa nella popolazione di razza asiatica e del 10% circa in quella di razza caucasica. La frequenza aumenta nei non-fumatori (o ex-fumatori da molti anni), di sesso femminile e con adenocarcinoma. Queste mutazioni sono per lo più localizzate in alcuni esoni del dominio TK, con la delezione dell'esone 19 (56,94% dei casi) e mutazioni puntiformi dell'esone 21(29,17%). La presenza di tali mutazioni caratterizza quindi una forma particolare di tumore polmonare NSCLC differente per diagnosi, terapia e con una migliore prognosi dalle forme cosiddette wild-type. Ad oggi, ci sono due farmaci che sono stati registrati in Europa per il trattamento dei pazienti con mutazione di EGFR, il gefitinib e l'erlotinib. Una terza molecola, afatinib ha dimostrato anch'essa un ruolo positivo in questo tipo di pazienti in due studi di fase III, il Lux-Lung 3 ed il Lux-Lung 6, per i quali è stato a Luglio 2013 registrato in I linea negli USA, mentre in Europa il processo di registrazione è in corso. Tutte e tre queste molecole sono state registrate, dopo avere dimostrato di essere più efficaci e meno tossiche della chemioterapia, nel trattamento di I linea dei pazienti con adenocarcinomi polmonari mutati per EGFR.

Invece, gli oncosoppressori più comunemente deleti o inattivati sono p53 (codificante per un fattore di trascrizione regolante l'espressione di geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA), RB (codificante una proteina che nel suo stato attivo inibisce la crescita cellulare), p16INK4a (codificante per una proteina inibente la replicazione cellulare quando non necessaria) e diversi geni localizzati sul cromosoma 3p (come FHIT, RAS SF1A e altri ancora da identificare). Delle alterazioni genetiche sopra elencate le mutazioni

di p53 sono comuni ai tumori polmonari a piccole cellule e ai tumori polmonari non a piccole cellule. Al contrario, i tumori polmonari a piccole cellule presentano più frequenti alterazioni in C Myc ed RB, mentre i tumori polmonari non a piccole cellule sono associati a mutazioni in KRAS e p16INK4a. Sebbene sia noto che alcune modificazioni genetiche sono precoci (inattivazione di geni soppressori del cromosoma 3p) o tardive (attivazione di RAS), la sequenza temporale non è ancora ben definita. Ancora più importante è il fatto che, alcune modificazioni genetiche, quali la perdita del materiale del cromosoma 3p, possono essere riscontrate nell'epitelio bronchiale normale di pazienti con cancro del polmone nonché nell'epitelio respiratorio di fumatori senza cancro del polmone, suggerendo come l'esposizione a fattori cancerogeni possa comportare la comparsa di mutazioni genetiche alle quali possono sommarsene altre portando, alla fine, allo sviluppo della patologia neoplastica maligna.

Infine, raggruppamenti familiari sporadici hanno suggerito una predisposizione genetica, come il rischio variabile anche tra i forti fumatori. Tra i marcatori di suscettibilità genetica, è stato identificato un ruolo al polimorfismo del gene del citocromo P-450 CPY1A1; infatti, si è visto che soggetti con alcuni alleli CPY1A1 hanno un'aumentata capacità di metabolizzare gli agenti cancerogeni derivanti dal fumo di sigaretta e, concettualmente, hanno un rischio maggiore di sviluppare il cancro del polmone. Analogamente, i soggetti i cui linfociti nel sangue periferico vanno incontro a rotture cromosomiche, in seguito ad esposizione a sostanze cancerogene correlate al fumo (genotipo sensitivo ad agenti mutageni) hanno un rischio doppio di sviluppare il tumore polmonare rispetto ai controlli (3).

Alle diverse fasi della cancerogenesi sopra descritta, prendendo in considerazione esclusivamente le trasformazioni genomiche, corrispondono alterazioni istologiche ben precise, che nel caso del carcinoma squamoso si è ipotizzato siano le seguenti:

Iperplasia: in seguito all'esposizione continua ad un agente cancerogeno, l'epitelio bronchiale va incontro ad un'intensa proliferazione, senza che siano presenti alterazioni genetiche tipiche del tumore.

Metaplasia squamosa: con il tempo ed il perdurare dello stimolo da parte dell'agente cancerogeno l'epitelio bronchiale iperplastico, va incontro a trasformazione reversibile da epitelio cilindrico, ad epitelio pavimentoso pluristratificato.

Carcinoma in situ: le cellule, costituenti l'epitelio bronchiale metaplastico, vanno incontro a displasia (letteralmente crescita disordinata), ossia vedono progressivamente e irreversibilmente persa la loro uniformità e il loro orientamento architettonico; però, tali modificazioni nonostante interessino l'epitelio in tutto il suo spessore non oltrepassano ancora il limite imposto dalla membrana basale.

Carcinoma invasivo: le modificazioni displastiche non interessano più esclusivamente le cellule dell'epitelio bronchiale, ma si estendono anche alle cellule sottostanti la membrana basale.

Invece l'adenocarcinoma polmonare si è ipotizzato origini da un'alterazione preneoplastica denominata iperplasia adenomatosa atipica, caratterizzata da un'intensa proliferazione delle strutture ghiandolari localizzate nel contesto del tessuto polmonare (5) .

## **Stadiazione**

Al fine di definire lo stadio di progressione della malattia, nel NSCLC si utilizza il sistema di classificazione definito **TNM** acronimo di *Tumor nodal involvment metastasis system* ovvero si basa sui **caratteri della massa primitiva (T)**. Nella prima diagnosi si utilizza la cTNM ovvero la stadiazione clinica che si esegue con indagini non o poco invasive; ai successivi controlli questa modalità viene aggiornata rTNM (ristadiazione). Nei pazienti candidati all'intervento chirurgico, la stadiazione può essere arricchita con la pTNM (stadiazione anatomopatologica) che rappresenta il gold standard:

- **T<sub>x</sub>** tumore evidenziato per la presenza di cellule atipiche nell'espettorato, in assenza di lesioni radiologicamente o broncoscopicamente evidenti; **T<sub>0</sub>** nessuna evidenza di tumore primitivo; **T<sub>is</sub>** carcinoma in situ; **T<sub>1</sub>** massa inferiore a 3 centimetri; **T<sub>1a</sub>** tumore inferiore a 2 centimetri; **T<sub>1b</sub>** tumore

inferiore a 3 centimetri ma superiore a 2 centimetri; **T2** massa superiore a 3 centimetri ma inferiore a 7 cm; **T2a** tumore compreso fra 3 e 5 centimetri; **T2b** tumore compreso fra 5 e 7 centimetri; **T3** massa di qualsiasi dimensioni con interessamento della parete toracica, del diaframma o della pleura mediastinica; **T4** massa di qualsiasi dimensioni con interessamento del mediastino o trachea o cuore oppure associato a noduli e o satelliti nello stesso lobo.

Sulle eventuali **metastasi linfonodali (N)**:

- **Nx** mancata disponibilita' di elementi per valutare la presenza di metastasi nei linfonodi; **N0** nessuna evidenza di metastasi nei linfonodi regionali; **N1** metastasi nei linfonodi peribronchiali o ilari omolaterali; **N2** metastasi nei linfonodi mediastinici omolaterali; **N3** metastasi nei linfonodi mediastinici o ilari contro laterali

Sulle eventuali **metastasi extralinfonodali (M)**

- **MX** mancata disponibilita' di elementi per valutare la presenza di metastasi a distanza; **M0** nessuna evidenza di metastasi a distanza; **M1** metastasi a distanza.

## **Diagnosi**

**L'esame radiologico** rappresenta di solito la prima indagine strumentale e consente di definire la localizzazione della massa e l'eventuale presenza di versamento pleurico. Di contro, una radiografia convenzionale, mal si presta alla valutazione di interessamento mediastinico o ricerca di metastasi. A tale scopo si effettua una **tomografia computerizzata (TC)** che oltre a fornire indicazioni sul grado di vascolarizzazione e sulla densita', dà precise dimensioni della massa primitiva e l'eventuale coinvolgimento linfonodale e metastatico. La **tomografia ad emissione di positroni (PET-TC)** è una tecnica diagnostica che combina la tomografia

computerizzata tradizionale, con la tomografia ad emissione di positroni (PET); la PET, infatti, consente di ottenere informazioni di tipo funzionale, permettendo di visualizzare le aree 'metabolicamente attive' e quindi di caratterizzare il tumore primitivo, i linfonodi ed eventuali metastasi. Rispetto alla TC fornisce informazioni più dettagliate e importanti utili a stabilire quale sia il trattamento più indicato.

Per una definizione istopatologica risulta fondamentale **l'esame citologico dell'espettorato**, ripetuta in tre giorni consecutivi.

La **broncoscopia** consente di effettuare un esame diretto e permette di prelevare campioni biotici. L' **agobiopsia polmonare TC-guidata** invece è un esame utilizzato per i tumori che hanno una localizzazione più periferica, e quindi non raggiungibile dal broncoscopio.

Un certo interesse rivestono i **marker tumorali**: fra questi troviamo l'antigene carcinoembrionario (CEA), una proteina oncofetale la cui concentrazione ematica può essere aumentata in diverse neoplasie; l'enolasi neurospecifico (NSE), un marcatore di differenziazione neuroendocrina, più frequentemente aumentata nel microcitoma.

## **Screening**

La prevenzione e la diagnosi precoce, sono essenziali per ridurre la mortalità per cancro del polmone.

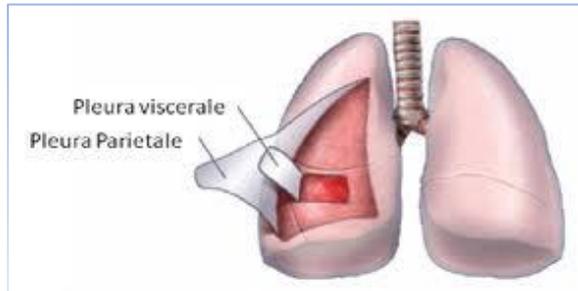
La scarsa prognosi del cancro del polmone è collegata a diversi fattori, tra cui le particolarità dell'anatomia microscopica del polmone, che facilita la crescita locale della neoplasia e l'alta densità di linfatici che ne favoriscono la diffusione sistemica. Il lungo periodo d'assenza di sintomi dal momento dell'insorgenza del tumore fino alla sua manifestazione clinica, riduce in modo considerevole le diagnosi precoci. Ciò vale in modo particolare per l'adenocarcinoma, nel quale i sintomi d'esordio compaiono più spesso in una fase in cui la malattia è già in stadio avanzato.

Nella storia naturale della malattia, lo screening deve porsi come obiettivo quello di eseguire una diagnosi precoce che consenta un intervento terapeutico per modificare il decorso della malattia e quindi ridurre la mortalità. Per il cancro del polmone,

considerando il tempo di raddoppio delle sue dimensioni e la comparsa di metastasi linfonodali, lo screening dovrebbe consentire di identificare la malattia prima della comparsa delle metastasi linfonodali (13-14). Da diversi studi, emerge in modo chiaro che, il radiogramma del torace e la citologia sull'escreato, sono tecniche di screening inappropriate in quanto non incidono sistematicamente sulla mortalità (15). Lo sviluppo tecnologico e il più ampio utilizzo della TC torace ad alta risoluzione (HRTC), hanno consentito un maggior riscontro di piccoli tumori periferici, molti dei quali sono adenocarcinomi (Small peripheral adenocarcinoma SPA).

La TC torace a basse dosi rimane la tecnica di screening del cancro del polmone al momento più promettente, ma i risultati definitivi degli studi randomizzati attualmente in corso (16). Infine, si stanno considerando altre tecniche di screening alternative a quelle di imaging, come lo screening con biomarcatori sull'escreato bronchiale, sul sangue e sul versamento pleurico.

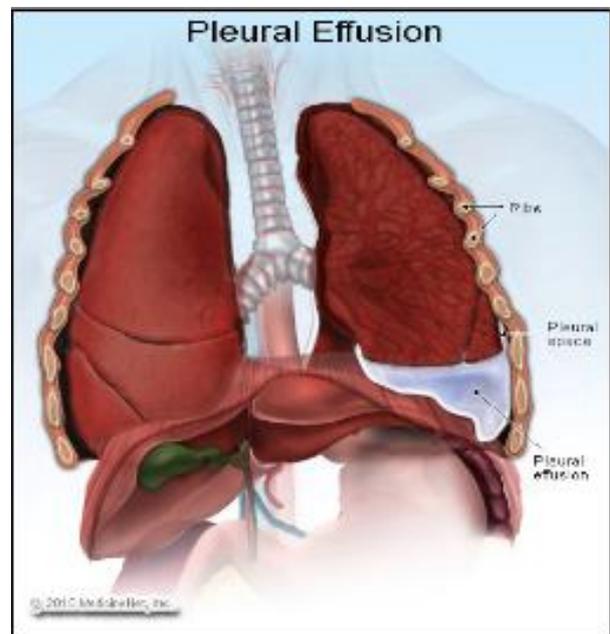
## I versamenti pleurici



Lo spazio interposto fra i due foglietti pleurici, più internamente il viscerale e più esternamente, il parietale, è occupato da pochi millilitri di liquido pleurico che ha lo scopo di lubrificare le pareti, permettendo le normali escursioni ventilatorie del torace. Questo liquido, in condizioni fisiologiche, risulta povero di cellule e proteine e la quantità costante di liquido, è mantenuta attraverso un delicato equilibrio fra i meccanismi di assorbimento e filtrazione, poiché lo spazio pleurico si ritrova al centro di un sistema vascolare costituito dal circolo sistemico, dal circolo polmonare e dai vasi linfatici. La filtrazione ed il riassorbimento di liquido, sono basati sui gradienti di pressione idrostatica e colloid-osmotica tra il compartimento microvascolare e lo spazio pleurico.

Una rottura di questo equilibrio, tra i processi di formazione e riassorbimento, provoca un abnorme accumulo di liquido pleurico tra i due foglietti, che si definisce **versamento pleurico**.

Esistono due tipi di versamenti pleurici che hanno cause diverse l'una dall'altra **gli essudati** e **i trasudati** che si distinguono grossolanamente in base al contenuto proteico.



Il **trasudato** è provocato, o da un aumento della filtrazione o una riduzione dell'assorbimento del liquido, in assenza di alterazioni significative della

permeabilità vascolare dei due foglietti. L'essudato invece, si forma quando la pleura partecipa al processo patologico e la permeabilità vasale è aumentata, oppure l'efficienza della pompa linfatica è, in parte o completamente, assente ed in questo caso si ha un'aumento del contenuto proteico.

Fra le cause dell'insorgenza di un trasudato troviamo:

-L'*iperidratazione* che si verifica per esempio nella sindrome nefrosica o nel caso in cui vengano infusi grandi quantità di liquidi con aumento del volume plasmatico riduzione delle proteine plasmatiche e aumento della pressione vascolare. Questo, provoca un'aumentata filtrazione della pleura; inoltre, un aumento della pressione venosa centrale può ostacolare la pompa linfatica, rallentando il drenaggio del liquido pleurico.

- *L'ipertensione venosa polmonare* è una condizione clinica molto comune sia nell'edema polmonare acuto cardiogeno che in condizioni croniche e si verifica principalmente per due motivi: un aumento della formazione di liquido da parte dei vasi della pleura viscerale i quali drenano nelle vene polmonari, oppure dall'eccesso di acqua extravascolare polmonare interstiziale che si accumula nell'edema polmonare cardiogeno, e che risulta una fondamentale via di drenaggio di liquido interstiziale dell'acqua extravascolare interstiziale.

- *L'ipertensione venosa sistemica* che provoca un'aumentata filtrazione a livello della pleura parietale e ostacola la pompa linfatica.

L' **essudato** presenta una fisiopatologia più eterogenea, poiché un alto contenuto proteico può avere diverse cause quali:

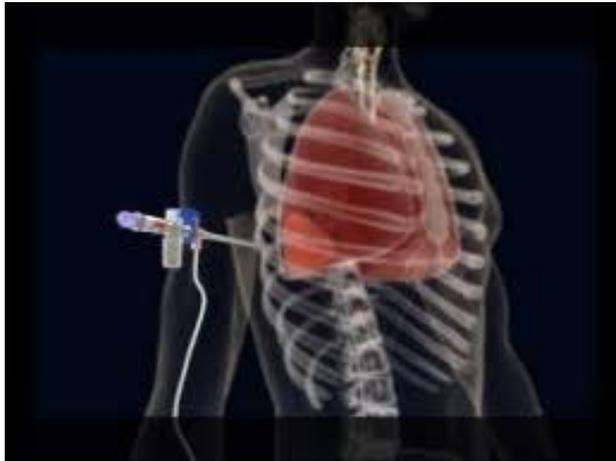
-*processi infiammatori o infettivi*: Durante i processi infettivi si ha un coinvolgimento della pleura viscerale e un aumento della permeabilità microvascolare e, come conseguenza, formazione di un versamento ad alto contenuto proteico.

-*sindrome da sofferenza respiratoria acuta (ARDS)*

**-neoplasie toraciche:** L'invasione neoplastica può provocare un'occlusione dei dotti linfatici toracici, i quali sono l'unica via di eliminazione delle proteine dal cavo pleurico, si crea così un essudato, che spesso risulta ematico e poco sensibile al trattamento. Fra le neoplasie più frequentemente coinvolte nella produzione di essudato troviamo il carcinoma polmonare, mammario e i linfomi.

La presenza di un versamento pleurico può rappresentare l'esordio clinico della neoplasia; il liquido pleurico può risultare sieroso, siero-ematico o francamente emorragico. Oltre ai globuli rossi, nel sedimento si possono trovare linfociti, macrofagi e cellule mesoteliali, e non sempre è possibile trovare la presenza di cellule atipiche. In mancanza di cellule atipiche nel sedimento, la diagnosi di versamento pleurico maligno può essere sospettata ma non confermata dalla presenza di emazie, dalla presenza di emosiderina all'interno dei macrofagi e dalla tendenza rapida alla recidiva.

La **toracentesi** è la metodica che, in presenza di versamento, permette il prelievo di



liquido dal cavo pleurico. Questa consente, da un lato di ottenere campioni da utilizzare a fini diagnostici, con esami chimico-fisici, batteriologici e citologici, e dall'altro esercita una finalità terapeutica perché svuotando il cavo pleurico, si migliora la ventilazione polmonare. Gli studi

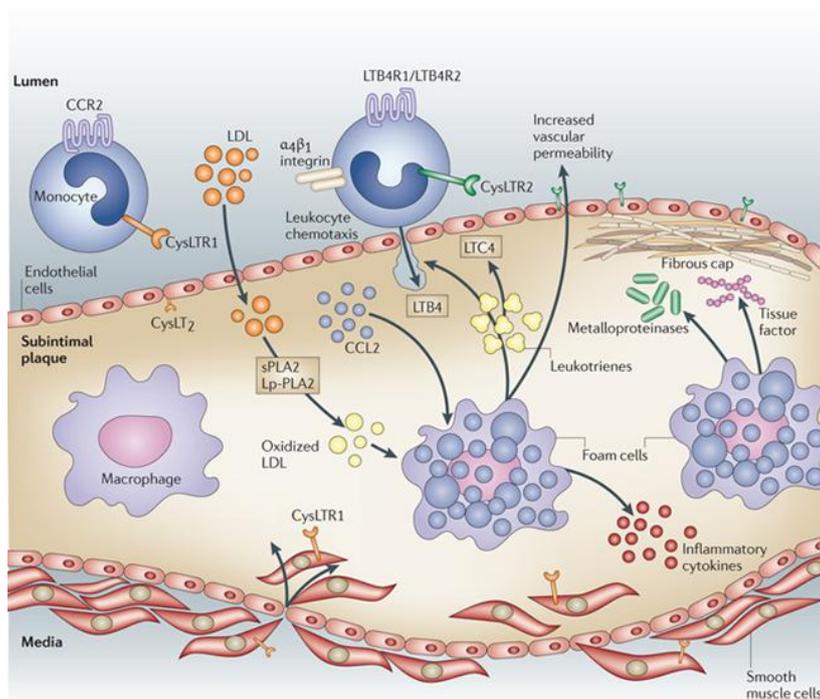
sulla biochimica dei liquidi pleurici sono sempre stati influenzati dalla speranza di trovare delle sostanze che, con la loro presenza, definissero la natura del versamento, fornendo così la diagnosi clinica.

Il primo aspetto da valutare in un versamento pleurico è distinguere l'essudato dal trasudato. Importante a tal proposito è la determinazione del contenuto in proteine e in lattico-deidrogenasi (LDH). La concentrazione di HDL esprime la gravità del processo infiammatorio.

La reazione di Rivalta, un tempo usata per differenziare gli essudati (positivi) dai trasudati (negativi) è stata soppiantata dall'uso dei criteri di Light (17) che offre dei vantaggi di sensibilità e specificità. Un essudato è caratterizzato da uno qualsiasi di questi reperti che vengono definiti **Criteri di Light**: un rapporto superiore a 0,5 fra proteine pleuriche e sieriche; un rapporto superiore a 0,6 fra **LDH** pleurica e sierica; una concentrazione di LDH superiore ai 2/3 nel liquido pleurico rispetto alla concentrazione sierica massima di LDH, in condizioni normali. L'aumento di tale enzima, nei tumori e nelle infiammazioni sembra correlato con i processi di proliferazione cellulare. Alcuni isoenzimi dell'LDH in particolare l'LDH<sub>4</sub> e <sub>5</sub> sono stati trovati aumentati nelle forme infettive batteriche, a causa della ricchezza di questi enzimi nei polimorfonucleati neutrofilici, e nei carcinomi epidermoidi e negli adenocarcinomi(18).

In condizioni fisiologiche, la quantità di **proteine** è di circa 17g/l. Un aumento, soprattutto per quanto riguarda l'albumina, è indice di una maggiore permeabilità capillare. I valori più alti si trovano nelle forme tubercolari, quelli più bassi, nei trasudati. I versamenti neoplastici hanno valori per lo più elevati.

Alcuni studi hanno messo in evidenza nell'elettroforesi proteica dei versamenti, nelle forme neoplastiche, una diminuzione delle alfa-2-gammaglobuline rispetto al sangue dove spesso si assiste ad una iper alfa-2-gammaglobulinemia. Di conseguenza il rapporto versamento /sangue risulta diminuito nei neoplastici. Inoltre alcune glicoproteine come l'alfa-antitripsina, l'aptoglobulina, l'emopessina si sono rivelate



utili per la diagnosi di alcune neoplasie. Un altro marcatore trovato aumentato nei versamenti tubercolari e neoplastici è il **leucotriene eicosanoide B<sub>4</sub>** (LTB<sub>4</sub>), un chemioattraente dei neutrofili, prodotto sia dai mononucleati che dalle cellule epiteliali (19). In condizioni normali, il tasso di **glucosio** nel liquido pleurico risulta simile a quello sierico. Valori inferiori a 60mg/dl sarebbero indicativi di eziologia neoplastica e assume un valore prognostico negativo.

Per quanto riguarda i **marker neoplastici** nel versamento maligno, molti lavori hanno suggerito la possibilità diagnostica dell'incremento dei livelli di marcatori nel liquido pleurico. Tuttavia la ricerca ad oggi risulta infruttuosa (20-21).

Una meta-analisi condotta per markers tumorali convenzionali mostra come negli essudati maligni si possono avere livelli elevati di CEA (Antigene Carcino Embrionario). Quantità superiori a 40ng/ml risulterebbero significative, quantità comprese fra 15 e 40ng/ml di dubbio significato e inferiori a 15 ng/ml indicativi di una patologia benigna. Tuttavia, il riscontro di alte quantità di CEA avviene solo in un terzo delle neoplasie. Oltre al CEA, sono utilizzabili altri markers quali il NSE nel microcitoma, il Ca15.3 e 19-9 e il CYFRA 21-1 che risultano altamente specifici ma non sufficientemente sensibili alla diagnosi, sebbene la combinazione di più markers sembra incrementare la sensibilità (22). Recentemente, c'è un crescente interesse per il VEGF, come biomcatore di essudato maligno (23-24); pur tuttavia, il suo valore diagnostico non è soddisfacente. La mesotelina e la fibulina-3 sono tuttora sotto studio, come possibili nuovi biomarcatori(25-26).

Negli essudati troviamo livelli più alti di **citochine** rispetto ai trasudati. Fra queste troviamo ad esempio IL1a, un attivatore dei linfociti T prodotta in risposta a stimoli infiammatori; il TNF si trova aumentato nei versamenti maligni ed in quelli infettivi; l'IL6 si trova maggiormente aumentata nelle forme infiammatorie rispetto a quelle maligne.

Nei versamenti neoplastici di recente formazione il **pH** è superiore alla norma con una media di 7,49. Alcuni studi mostrano che l'acidità del versamento, al di sotto di 7,28 di pH, si associa ad una minore sopravvivenza e una scarsa risposta alla pleurodesi, possibilmente in relazione ad una maggiore attività metabolica delle

cellule tumorali (27); con la cronicizzazione del versamento, il pH tende invece a diminuire.

L'esame citologico del liquido pleurico svolge un ruolo fondamentale nella diagnostica differenziale delle pleuriti. Purtroppo, molti studi dimostrano una grande variabilità nella sensibilità dell'analisi citologica, con un range che va dal 40% all'87% (28).

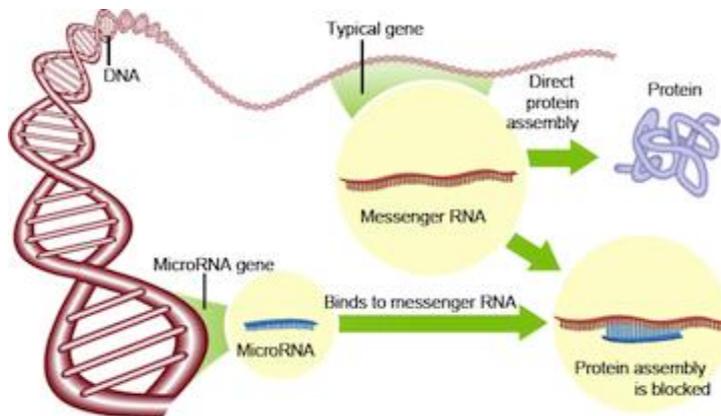
In ogni caso, risulta importante la fase della malattia in cui viene effettuata la toracentesi. Negli essudati di recente insorgenza, indipendentemente dall'eziologia, il citotipo predominante è il polimorfonucleato, negli essudati più vecchi prevalgono fagociti e fagociti mononucleati. I linfociti sono aumentati nella tubercolosi, nei versamenti neoplastici e nelle malattie autoimmuni. Come dato prognostico, un aumento dei macrofagi in un liquido neoplastico, precedentemente linfocitario, indica un'evoluzione della neoplasia. I neutrofili risultano aumentati in versamenti parapneumonici. Le cellule mesoteliali ed istocitarie sono in numero più elevato nei versamenti tumorali.

Il riscontro di elementi cellulari atipici nel sedimento del versamento rappresenta un criterio che consente, con certezza, la diagnosi di pleurite neoplastica. I versamenti neoplastici maligni però possono essere diagnosticati con il solo esame del liquido pleurico nel 60% dei casi (29). In particolare, la distinzione citomorfologica tra le cellule mesoteliali reattive, il mesotelioma e l'adenocarcinoma metastatico, così come tra il linfoma e una linfocitosi reattiva, spesso può essere difficoltosa a causa della sovrapposizione delle caratteristiche citologiche. La difficoltà nella diagnosi è inoltre, data dal fatto che le cellule mesoteliali possono subire delle alterazioni morfologiche notevoli, sia in presenza di un processo infiammatorio sia come conseguenza di una permanenza nel liquido. Quando sono presenti metastasi da adenocarcinoma, l'esame citologico è diagnostico nel 70% dei casi; la citologia è meno efficace in caso di carcinoma squamoso (sensibilità del 20%), linfoma (sensibilità dal 20 al 50%). Se la citologia risulta negativa e si sospetta è un essudato maligno l'indagine successiva è la toracosopia con biopsia. Questa risulta diagnostica nel 90% dei casi ma costituisce un'indagine fortemente invasiva(30). Infine nel 25% dei casi il versamento non consente alcuna diagnosi (31).

Recenti progressi in genetica hanno fornito un quadro per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici, per il versamento pleurico maligno. Tecniche di biologia molecolare, quali analisi del numero di copie di DNA, sequenze geniche, espressione di mRNA, stato di metilazione del DNA ed espressione di proteine hanno identificato nuovi biomarcatori molecolari con un potenziale diagnostico, che potrebbe complementare la citologia.

## I MicroRNA

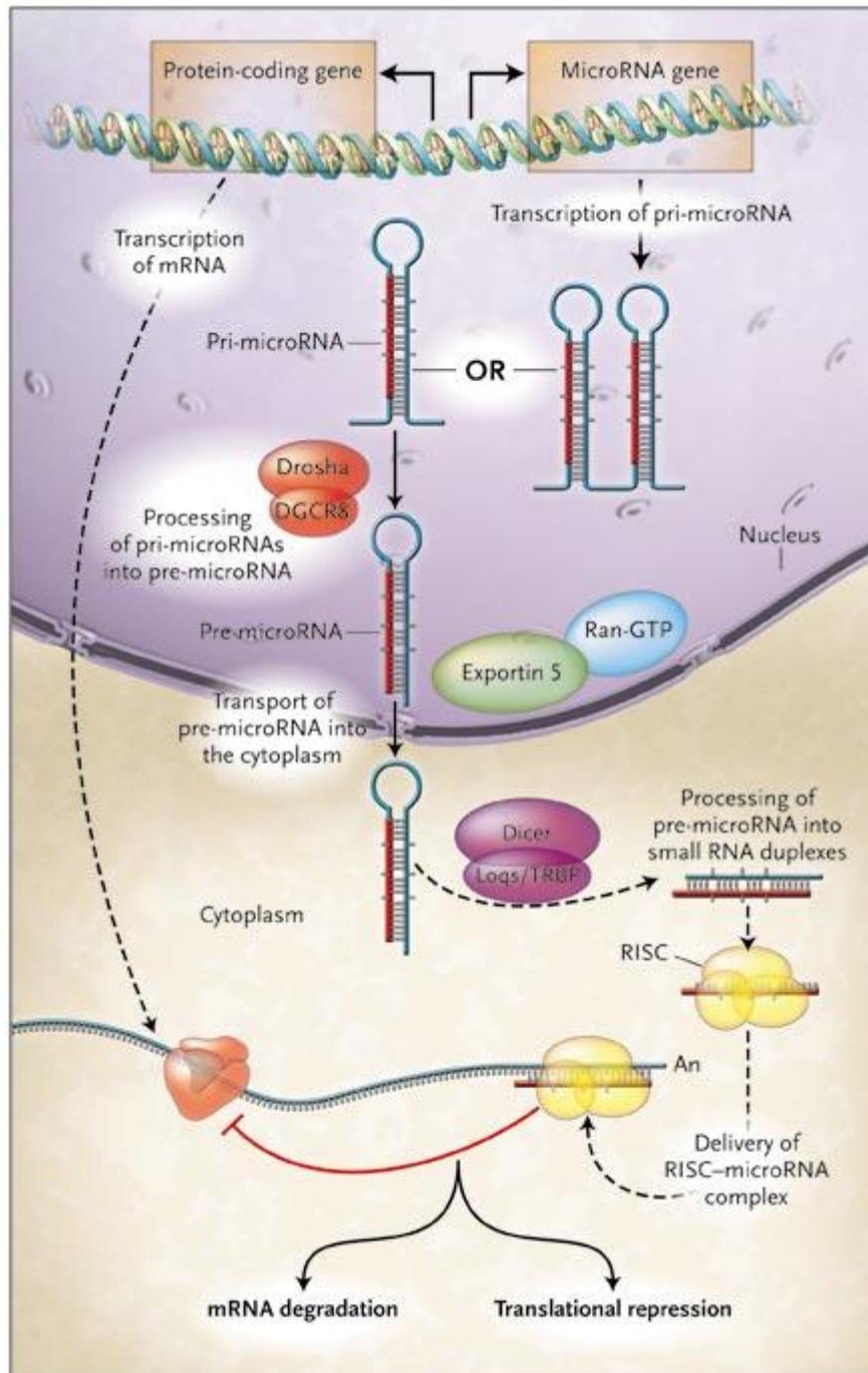
L'importanza del background genetico nel tumore polmonare, è stato più volte sottolineato e, in anni recenti, micro RNA(miRNA o miR) specifici hanno mostrato giocare un ruolo critico nella trasformazione neoplastica. Queste molecole rappresentano una nuova classe di potenziali markers per differenti e significative applicazioni cliniche. I micro RNA sono piccole molecole di RNA endogene non codificanti costituite da 21 a 25 nucleotidi, evolutivamente conservate, che regolano negativamente l'espressione genica a livello post trascrizionale reprimendo la traduzione in proteina o degradando specifici RNA messaggeri ( mRNA).



Ruolo semplificato dei microRNA di inibizione dell'espressione genica

I miRNA sono inizialmente trascritti da geni propri, non codificanti proteine, dalla RNA polimerasi II come lunghi trascritti primari (pri- miRNA) nel nucleo e si ripiegano su se stessi a formare delle strutture a forcina, grazie alle sequenze complementari imperfette dei miRNA. I pri- miRNA vengono processati da DROSHA, una RNAasi III e dal suo cofattore DGCR8, per formare un precursore chiamato pre-miRNA, caratterizzato da una struttura forcina di circa 60-70 nucleotidi. Sebbene il meccanismo mediante il quale DROSHA riesca a discriminare i differenti precursori dei miRNA sia ancora conosciuto, molteplici evidenze descrivono che l'efficienza del processamento dipende dalla grandezza dell'ansa terminale, dalla struttura della forcina e dalle sequenze fiancheggianti il sito di taglio riconosciuto. Ciò è dimostrato anche dal fatto che, mutazioni in queste regioni

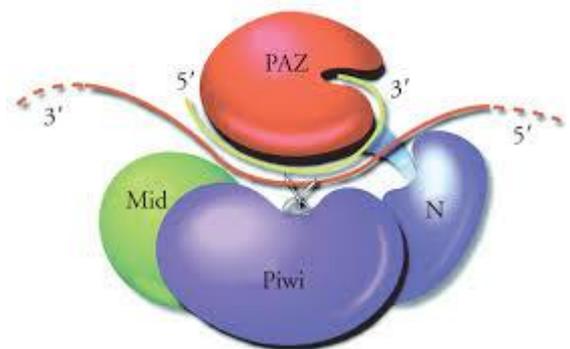
inibiscono in maniera significativa l'attività di DROSHA (32)



Sintesi, maturazione, traslocazione e meccanismi di azione possibili dei miRNA: induzione della degradazione dell' mRNA bersaglio o inibizione della traduzione.

In seguito, il pre-miRNA è trasportato nel citoplasma grazie a un complesso Ran-GTPasi Esportina 5 dove viene trasformato in miRNA attivo tramite l'enzima RNAsi di tipo III DICER, la quale riconosce e taglia gli estremi della forcina per formare un piccolo RNA a doppio filamento imperfetto (duplex miRNA:miRNA\*) di circa 19-22 paia di basi, contenente sia il miRNA maturo che il suo complementare (miRNA\*)(33). I miRNA maturi possono risiedere su entrambi i filamenti dell'RNA duplex, ma solo quello dotato di minore stabilità alla sua estremità 5' viene riconosciuto dal complesso multi proteico RISC (RNA induced- silencing complex), che lo sceglie come miRNA attivo definito così poiché attivo nella regolazione dell'mRNA bersaglio (target).

Il RISC indirizza così il miRNA maturo sul proprio mRNA bersaglio per permetterne la diretta repressione, mentre il filamento complementare miRNA\* viene rapidamente degradato (Figura 1). Sono, dunque, le proprietà termodinamiche del miRNA precursore a determinare l'assemblaggio asimmetrico di RISC e di conseguenza, la specificità dell'mRNA bersaglio durante il meccanismo di inibizione post-trascrizionale (34). Al complesso RISC, appartengono le proteine della famiglia Argonauta. Queste proteine presentano due domini caratteristici conservati: il dominio PAZ, presente anche in DICER, ed il dominio Piwi. Il dominio PAZ, sia in *H. Sapiens* (hAgo2) che in *Drosophila*, contiene un sito di legame per gli acidi nucleici, mentre Piwi, considerata la sua omologia strutturale con la RNasi H, sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio del mRNA bersaglio (35).



Complesso RISC che indirizza il miRNA sull'mRNA maturo

Per il corretto funzionamento della regolazione da parte dei miRNA, risulta fondamentale la sequenza dei primi 6-8 nucleotidi all'estremità 5', definita "seed sequence", che si appaia in maniera perfettamente complementare con il sito di legame sul 3'UTR dell' mRNA bersaglio.

Gli mRNA target sono riconosciuti dai miRNA sottoforma di complessi ribonucleoproteici (miRNPs).

I miRNA possono agire essenzialmente in due modi: inducendo la degradazione dell' mRNA bersaglio o inibendo la sua traduzione. Quale meccanismo venga attuato dipende dal grado di complementarietà fra la sequenza del miRNA e quella del suo target. Infatti, i miRNA che si legano con complementarietà perfetta, determinano la degradazione del mRNA bersaglio; in questo caso è presente un solo sito di appaiamento che generalmente si trova sulla ORF (open reading frame) o sequenza codificante dell' mRNA bersaglio. Questa modalità di azione è omologa a quella dell'RNA interferente ("*RNA interference*") e viene comunemente riscontrata nelle piante (36). Invece, negli animali, generalmente i miRNA si appaiano in maniera imperfetta al 3'UTR del target, bloccando la traduzione o mediante prevenzione dell'associazione del ribosoma con l'mRNA target, o mediante l'inibizione dell' inizio. Quest'ultimo caso include un prematuro distacco del ribosoma, blocco o rallentamento dell' allungamento e degradazione cotraduzionale della proteina.

L' mRNA represso sembra essere presente nel polisomi, ovvero associato con più ribosomi.

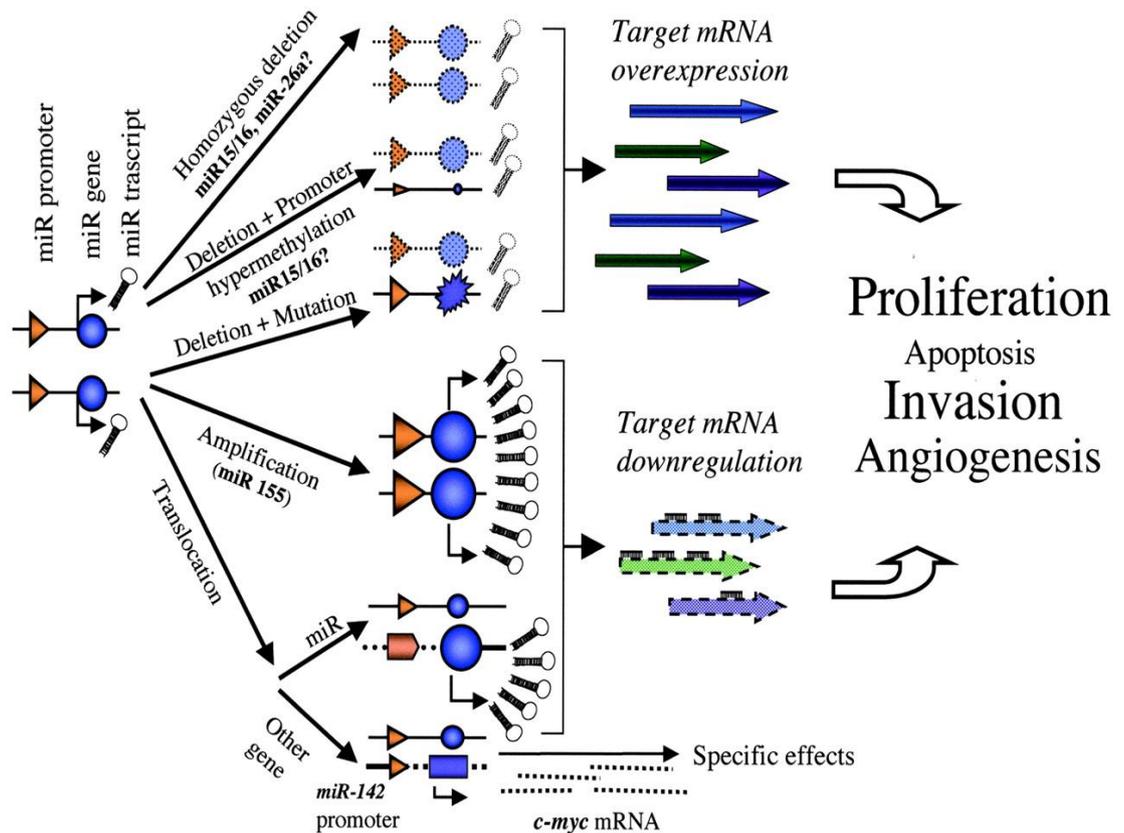
## **I microRNA nei tumori polmonari**

Ad oggi, sono stati identificati nel genoma umano più di 800 miRNA (<http://www.mirbase.org>- Sanger), ognuno dei quali con una potenziale capacità di legare centinaia di trascritti e le cui funzioni biologiche sono oggetto di studio. Centinaia di miRNA sono stati clonati, sequenziati e le ricerche informatiche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le 1000 unità, e che regolino dal 30% al 60% dei geni codificanti proteine di tutto il genoma (37-38).

I miRNA sono coinvolti in un ampio range di processi cellulari come la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi, e in molti processi fisiologici come il metabolismo, l'embriogenesi, e lo sviluppo del sistema nervoso e immunitario (39-40).

Inoltre, è stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione specifici per stadi di sviluppo, tessuti e varie patologie. Ciò comporta che ciascun tessuto è caratterizzato da uno specifico set di miRNA, il cui profilo d'espressione è distintivo di quel tessuto. Inoltre, i miRNA sono stati scoperti indurre silenziamento trascrizionale mediante modificazioni del DNA e/o della cromatina in lievito, piante e animali. Per tali motivi sembra chiaro come una disregolazione nel pathway dei miRNA possa contribuire all'insorgenza di malattie, incluso lo sviluppo del cancro.

Sin dalla loro scoperta, evidenze crescenti indicano un profondo coinvolgimento dei miRNA nella tumorigenesi al polmone poiché agiscono come soppressori di tumore o oncogeni bersagliando in gran parte proteine che sono fattori regolatori-chiave nella proliferazione cellulare e nella sopravvivenza, nel riparo del DNA e nella risposta immune (41).



Le espressioni di specifici miRNA sono sostanzialmente modificate in un numero di tipi di cancro al polmone, paragonati a tessuti polmonari non tumorali e cellule (42-43).

Inoltre, molti miRNA sono localizzati in regioni cromosomiche che sono frequentemente delete o amplificate in numerosi tipi di tumori. Let 7 è stato il primo miRNA che è stato identificato nello sviluppo del cancro al polmone (44). Livelli ridotti di Let7, sono stati trovati sia in studi in vitro che in vivo e la soppressione di tumori mediata da Let7 è associata alla regolazione di HMGA e Ras associati alla divisione cellulare; l'espressione di miR126, in diverse linee cellulari tumorali di polmone, risulta inversamente proporzionale alla sovraregolazione del VEGF, che risulta essere un target diretto del miR126B (45)

Chen e coll. (46) hanno mostrato che l'espressione di miR145 risulta marcatamente ridotta in campioni di tumori NSCLC e in due linee cellulari tumorali umane, A549 e H23, rispetto a cellule non tumorali.

MiR145 agirebbe come molecola anti-oncogena, capace di inibire la proliferazione e la transizione G1/S delle cellule tumorali di polmone interessando i livelli di proteine C-Myc/eIF4E4/CDK4, senza indurre l'apoptosi e avendo come target EGFR e NUDT1W (47).

La disregolazione del miR451 correla con lo sviluppo del NSCLC che aumenta l'apoptosi probabilmente attraverso l'inattivazione del pathway di Akt. In particolare, la downregolazione del miR451 è stata significativamente associata con una forte immunoreattività alla proteina RAB14, un membro della famiglia del oncogene RAS (48).

Sebbene la maggior parte dei miRNA opererebbero come soppressori di tumori nel cancro al polmone, come suggerito dalla loro principale down regolazione, un crescente numero di miRNA con proprietà oncogeniche sono stati identificati (49-50). L'overespressione del miR17-92, il miR31 ed il miR21 aumentano significativamente la proliferazione e la progressione del cancro al polmone inibendo regolatori negativi dei pathways oncogeni(51-52)

Inoltre, il profilo d'espressione dei miRNA correla strettamente con lo sviluppo del tumore e la progressione, anche negli stadi iniziali, migliorando la caratterizzazione molecolare e la classificazione biologica di un'ampia varietà di tipi di cancro, incluso quello polmonare. Per esempio, Yanaihara e coll hanno mostrato che un subset di miRNAs era differenzialmente espresso nell'adenocarcinoma e nel carcinoma a cellule squamose con più alti livelli nell'adenocarcinoma di miR-99b e miR-102 (53). E' stato anche proposto l'uso dei microRNA per la stadiazione, che potrebbe evitare la variabilità osservata con tecniche istopatologiche convenzionali e immunoistochimiche della sottoclassificazione del cancro polmonare, dovuta alla limitazione della qualità/quantità del materiale biotico e degli preparazione delle colorazioni. La definizione della sottoclasse del carcinoma polmonare, legata alla quantificazione dei miRNA è estremamente sensibile e specifica a causa dell'alta stabilità dei miRNA perfino in campioni mal conservati e a causa delle tecnologie avanzate utilizzate per la loro rivelazione come la PCR real time ed i Microarray (54).

Il profilo dei miRNA è stato anche associato alle caratteristiche clinico-patologiche del tumore, e all'outcome dei pazienti malati di cancro al polmone, avendo così un potenziale impatto diagnostico e prognostico (55).

La regolazione negativa del miR125a-3p e del miR125a-5p nel NSCLC indica un'aggressività clinica maggiore tramite la promozione dell'invasione tumorale e delle metastasi linfonodali (56). Bassi livelli di let-7<sup>o</sup>-2, in combinazione con specifici cambiamenti di altri micro RNA, si associano con una bassa sopravvivenza in pazienti con adenocarcinoma (57). L'espressione dei livelli di miR451 era trovati significativamente associata alla differenziazione, allo stadio della malattia, alle metastasi linfonodali e alla più corta sopravvivenza nel NSCLC. Inoltre, alcune linee d'evidenza suggeriscono che, una deregolazione dei microRNA potrebbe anche predire la ricorrenza della malattia e la risposta ai trattamenti anticancro adiuvanti, così come alla chirurgia curativa, nonché la chemioterapia e radioterapia. L'aumentata espressione del microRNA128b, dovuto alla perdita di eterozigosità della regione cromosomica 3p22 in pezzi tumorali, è strettamente associata all'aumento dell'espressione del recettore del fattore di crescita epidermico EGFR con conseguente beneficio sulla sopravvivenza dei pazienti trattati con il gefitinib (58). Alti livelli di miR92a2\* correlano con la chemioresistenza e con una diminuita sopravvivenza in caso di SCLC, mentre un aumento di Let7 potrebbe aumentare la sensibilità all'irradiazione delle cellule cancerose. Inoltre, una ridotta espressione di Let7 in tessuti di NSCLC in pazienti trattati chirurgicamente è associata ad elevato rischio di morte post-operatorio (44). Prese insieme, tutte queste osservazioni suggeriscono che la valutazione dei cambiamenti nell'espressione in appena un subset di miRNA potrebbe avere importanti informazioni nell'uso pratico dei trials clinici, per la gestione dei pazienti oncologici polmonari dato che l'efficacia dei trattamenti terapeutici principalmente dipende da una definizione accurata e precoce del tumore. Infine, il profilo d'espressione dei microRNA sembra avere applicazioni predittive nella diagnosi e prognosi e ciò potrebbe evitare l'uso di strumenti aggressivi nella gestione del paziente.

La presenza di miRNA, stabilmente espressi, quantificabili nel siero umano, che è capace di discriminare tra campioni normali e di cancro, è una nuova eccitante

scoperta che rafforza l'uso di queste piccole molecole regolatrici come nuovi marker del tumore al polmone (59). In particolare il ritrovamento dei miRNA nel siero, potrebbe avere il vantaggio di una diagnosi precoce non invasiva in pazienti selezionati, predicendo lo sviluppo del cancro fino a due anni prima della diagnosi con TAC spirale (60); in ogni caso i risultati ottenuti dai differenti studi suggeriscono che la quantificazione dei miRNA circolanti necessita di un'accurata standardizzazione prima di essere utilizzato come potenziale metodica di screening nella gestione del cancro polmonare (61-62)

In tal senso, un'importante progresso è stato ottenuto da Yu e coll. che hanno sviluppato un pannello di microRNA per l'identificazione precoce dell'adenocarcinoma nell'espettorato altamente sensibile e specifico; in particolare il miR21, il miR486, il miR375 e il miR200b mostrano un'espressione significativamente differente nei pazienti con adenocarcinoma polmonare rispetto ai soggetti normali e i loro valori sono capaci di distinguere individui malati dai sani con una sensibilità dell'80,6% e con una specificità del 91,7%, in popolazioni indipendenti (63-64).

I miRNA presenti sia nel siero in forma circolante, che nei campioni bioptici, sono fortemente stabili poiché la loro stabilità non è alterata dalla modalità di conservazione del campione (quali ad esempio congelamento, trattamento con formalina, paraffina); tale caratteristica giustifica la resistenza all'attività RNAsica. Il rilascio di miRNA nello spazio extracellulare avviene per esocitosi mediata da vescicole, a livello extracellulare i miRNA interagiscono con le cellule target attraverso processi come la fusione diretta, l'internalizzazione e il legame con un recettore.

## Scopo del lavoro

Lo studio svolto rientra nel disegno del dottorato di promuovere la pneumologia sperimentale, orientato allo studio di metodiche diagnostiche basate sulla biologia molecolare, per l'identificazione di nuovi marcatori molecolari atti alla caratterizzazione del carcinoma polmonare, nei versamenti pleurici.

A tale scopo, abbiamo valutato la presenza di miRNA nel versamento pleurico di soggetti affetti da tumori polmonari e di soggetti controllo, il cui versamento pleurico era benigno e secondario ad altre cause.

Il versamento pleurico maligno è una manifestazione clinica comune in pazienti con neoplasie polmonari e non. La presenza di cellule tumorali nel versamento pleurico implica la presenza di uno stadio avanzato di malattia (stadio IV o metastatico) e causa un differente approccio nel trattamento del tumore. Infatti, l'assenza di cellule tumorali può far propendere il clinico verso la resezione chirurgica del tumore o la radioterapia(65).

Ad oggi, la diagnosi di versamento pleurico maligno si basa quasi esclusivamente sull'analisi citologica, e la sua sensibilità è comunque limitata al 70% anche in analisi ripetute(66). Infatti, il versamento pleurico tumorale può essere a citologia positiva (versamento pleurico maligno) o a citologia negativa (versamento paramaligno). In mancanza di cellule atipiche nel sedimento, la diagnosi può essere sospettata sulla base dell'elevato contenuto di eritrociti, della presenza di depositi di emosiderina nei macrofagi e, soprattutto, dalla tendenza alla rapida recidiva del versamento.

I miRNA, al contrario di altri biomarkers, sono per loro natura fortemente stabili, infatti possono essere isolati da campioni di tessuto tumorale perfino dopo passaggi in formalina e paraffina, da campioni di siero e da plasma dopo esser stati mantenuti a temperatura ambiente per 24 ore e dopo cicli di congelamento e scongelamento (67). Inoltre, i miRNA sembrano resistenti alle RNasi presenti nel plasma in gran quantità, probabilmente a causa delle loro piccole dimensioni o della loro struttura molecolare.

Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare marcatori, che possano in futuro, permettere di stabilire la malignità del liquido pleurico, con un grado di sensibilità maggiore rispetto a quello della citologia. Su questa base, si è ipotizzata la possibilità

di individuare un pannello di miRNA deregolati nei versamenti pleurici nel tumore polmonare rispetto ai versamenti da soggetti senza tumore polmonare.

## MATERIALI E METODI

### Selezione dei pazienti e questionario

I pazienti arruolati sono stati quelli ricoverati dal giugno 2012 al settembre 2014, afferenti al reparto di Pneumologia II dell'A.O.R. Villa Sofia-Cervello, con versamento pleurico di natura neoplastica e non, previo consenso informato del paziente.

Il progetto è stato sottoposto all'approvazione da parte del comitato etico dell'A.O.R. Villa Sofia-Cervello.

Ogni paziente ha compilato una scheda di raccolta dati comprendente dati identificativi e anamnestici, l'abitudine al fumo, scheda di comorbidità, familiarità per patologie respiratorie, uso di farmaci respiratori e non, chemioterapia, radioterapia, diagnosi e istotipo tumorale. Sono stati inoltre scaricati tutti i referti afferenti all'anatomia patologica, alla patologia clinica e a tutti i reparti dell'ospedale inerenti i soggetti presi in esame, e i dati sono stati raccolti in un database. I versamenti maligni sono stati confermati dalla diagnosi patologica e clinica, nei soggetti affetti da tumore polmonare o in altra sede, e i campioni sono stati ottenuti prima della chemioterapia. In tutti i versamenti è stata effettuata la ricerca anatomopatologica di cellule tumorali. I versamenti benigni di controllo sono stati diagnosticati sul contesto clinico, e sono risultati sempre negativi per la presenza di cellule cancerose.

	TP	TA	EPB
Numero di casi	14	14	11/12
Età media $\pm$ DS	67 $\pm$ 14	67 $\pm$ 14	74 $\pm$ 14
Uomini	10	2	8
Donne	4	12	3
Presenza di cellule neoplastiche	10	8	/

**Tabella 1:** In tab. sono riassunte le caratteristiche dei pazienti; la sigla TP indica tumore polmonare; TA indica tumore in altra sede; EPB effusione pleurica benigna.

## **Raccolta dei campioni e processamento liquido pleurico**

I campioni di liquido pleurico sono stati raccolti tramite toracentesi, trasferiti in provette con EDTA e trasportati in ghiaccio entro 30 minuti presso il laboratorio di Immunopatologia Polmonare, dove sono stati centrifugati a 4000 rpm per 10 min per la raccolta del supernatante. Ogni campione, è stato poi aliquotato e congelato a -80°C.

Prima di procedere all'estrazione, è stato aggiunto ad ogni campione un mimic miRNA, il miR-26a-5p (Qiagen) ad una concentrazione 20 µM al fine di ottenere una concentrazione 20nM nel campione finale da estrarre. Il mimic liofilizzato a temperatura ambiente viene ricostituito in acqua RNase-free ad una concentrazione finale di 20µM e congelato a -20°C. Questo miRNA di controllo è stato utilizzato per normalizzare i campioni estratti.

I Metodi estrattivi, utilizzati al fine di valutare la migliore resa possibile, sono stati: Trizol, Trizol LS (fenolo e guanidina isotiocianato), Colonnine Qiagen, Fenolo /cloroformio con ammonio acetato.

### **Estrazione con TRIZOL**

L'estrazione dell'RNA mediante TRIZOL (Gibco BRL), si ottiene aggiungendo una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inibire irreversibilmente le ribonucleasi (Simms D. et al., 1993).

La procedura di estrazione prevede l'uso di 250 µl di liquido pleurico scongelato in ghiaccio, miscelato con 1000 µl di TRIZOL ed l'incubazione del campione per 5 min a temperatura ambiente. Si aggiungono quindi 200 µl di cloroformio, si chiude la provetta e la si agita vigorosamente per 15 secondi; il campione è quindi incubato a temperatura ambiente per 2-3 min, centrifugato a 12.000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 15 min. Dopo la centrifugazione il campione appare separato in 3 fasi: una fase inferiore di colore rosso pallido (fenol-cloroformio), un interfase, ed una fase superiore acquosa incolore contenente l'RNA (circa il 60% del volume iniziale di TRIZOL). La fase acquosa incolore viene quindi aspirata badando bene a non toccare l'interfase sottostante, e trasferita in una nuova eppendorf con l'aggiunta

di 500 µl di alcool isopropilico. Segue quindi incubazione per 10 min a temperatura ambiente e centrifugazione a 12.000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 10 min. L'RNA precipitato appare in forma di gel-pellet sul fondo della provetta. Il supernatante viene quindi rimosso per svuotamento, ed il pellet viene sciacquato con 1 ml di alcool al 70% in DEPC-H<sub>2</sub>O (dietil piro carbonato), risospeso, e centrifugato a 12,000 rpm a 4° C per 5 min. Quindi si rimuove l'alcool e si lascia asciugare il pellet di RNA con un concentratore centrifugo (senza seccare il pellet), fino alla risospensione in 15 µl di DEPC-H<sub>2</sub>O. Il campione così ottenuto è quindi scaldato a 55° C per 10 min e caricato su un minigel di agarosio allo 0.8% 1 µl di RNA + 5 µl loading buffer per controllare l'efficacia della estrazione.

### **Estrazione con TRIzol LS**

Il TRIzol LS viene utilizzato per ottenere RNA totale di alta qualità da campioni principalmente liquidi. Il protocollo prevede di prendere 250 µl di liquido pleurico lasciato scongelare in ghiaccio, miscelarlo con 750 µl di TRIzol LS ed incubare il campione, per 5 min a temperatura ambiente. Si aggiungono quindi 200 µl di cloroformio, la provetta viene chiusa bene ed agitata vigorosamente per 15 secondi; quindi segue incubazione a temperatura ambiente per 2-3 min e centrifugazione a 12.000 rpm a 4° C per 15 min. Dopo la centrifugazione il campione apparirà separato in 3 fasi: una fase inferiore di colore rosso pallido (fenol-cloroformio), un interfase, ed una fase superiore acquosa incolore contenente l'RNA (circa il 60% del volume iniziale di TRIzol). La fase acquosa incolore viene quindi aspirata badando bene a non toccare l'interfase sottostante, e trasferita in una nuova eppendorf con l'aggiunta di 10 µl di glicogeno, poi si aggiunge alcool isopropilico 500 µl. Il campione viene quindi incubato per 10 min a temperatura ambiente e centrifugato a 12.000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 10 min. L'RNA precipitato appare in forma di gel-pellet sul fondo della provetta. Il successivo trattamento del campione è uguale a quello descritto nella precedente sezione: Estrazione con TRIzol.

## RNeasy Mini Procedure

### Estrazione con colonnine

Per l'estrazione su colonna è stato utilizzato l'RNeasy mini kit della Qiagen, seguendo le indicazioni del fornitore, con la metodica da tessuti animali considerando di partire da un liquido privo di cellule. L'isolamento dell'RNA è reso possibile dalla guanidina isotiocianato presente nel buffer e la purificazione attraverso una membrana di silice. L'eluizione è avvenuta con 15 µl di DEPC-H<sub>2</sub>O.

### Estrazione con fenolo/cloroformio ed ammonio acetato

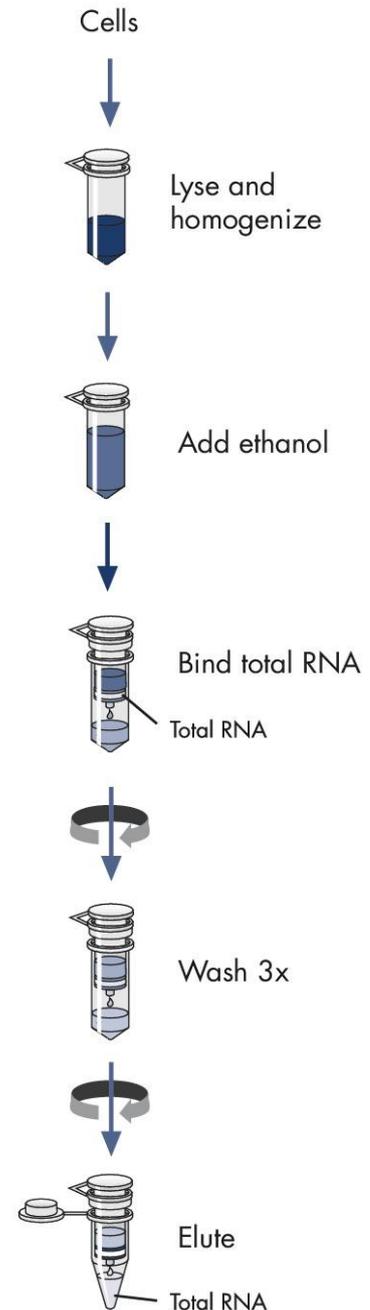
L'estrazione prevede di prendere 250 µl di liquido pleurico lasciato scongelare in ghiaccio, miscelarlo con 250 µl di DEPC-H<sub>2</sub>O e con 500 µl di soluzione definita HIRT buffer (Tris-HCl pH 7,5 10mM; EDTA 10mM; SDS 0,6%); aggiungere proteinasi k (50 µM) ed incubare il campione per 2 ore a 50°C.

Si aggiunge un volume pari di fenolo/cloroformio (1 ml), si chiude bene la provetta, si agita vigorosamente per 15 secondi; segue incubazione a temperatura ambiente per

2-3 min, centrifugazione a 12.000 rpm nella centrifuga da banco a 4°C per 15 min.

Dopo la centrifugazione il campione apparirà separato in 3 fasi: una fase inferiore di colore rosso pallido (fenol-cloroformio), un interfase, ed una fase superiore acquosa incolore.

Si recupera quindi la fase acquosa incolore superiore contenente l'RNA e in una nuova eppendorf aggiungere una quantità 1:1 di isopropanolo, glicogeno (5 µg/ml) e



ammonio acetato (0, 5M) Il campione è quindi incubato per 10 min a temperatura ambiente, e centrifugato a 12.000 rpm nella centrifuga da banco a 4° C per 30 min. Il successivo trattamento del campione è uguale a quello descritto nella precedente sezione: Estrazione con TRIZol.

### Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale



NanoDrop®ND-1000

Al fine di conoscere la concentrazione dell'RNA estratto e verificarne la purezza, ovvero l'assenza di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o fenolo (introdotto con la purificazione), l'RNA viene analizzato mediante il NanoDrop®ND-1000 (Celbio). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm), in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1µl) con accuratezza e riproducibilità elevate, consentendo un notevole risparmio di materiale.

Il sistema brevettato di ritenzione del campione, che sfrutta unicamente la tensione superficiale dei liquidi, permette di eliminare l'uso di cuvette e capillari, riducendo così il tempo necessario per la misura. Inoltre, il cammino ottico molto ridotto (1 mm) permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale, eliminando in questo modo la necessità di diluire i campioni. All'estremità di un cavo a fibre ottiche viene caricato 1 µl di RNA estratto; un secondo cavo viene posto in contatto con la soluzione in modo che il liquido funga da ponte tra le due estremità. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che ha attraversato il campione viene analizzata



da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un software la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/μl. Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di

assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici.

Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- λ= 230 nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;
- λ= 280 nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;
- λ= 320 nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile determinare la concentrazione di RNA (o DNA) mediante la seguente formula:

$$\text{concentrazione [ng/ l]} = (A_{260} - A_{320}) \times f_c \times f_d$$

dove  $f_d$  è il fattore di diluizione e  $f_c$  è il coefficiente di estinzione molare medio, che dipende dalla natura dell'acido nucleico: Acido nucleico  $f_c$  [ng/μl] DNA ds 50, DNA ss 33, RNA ss 40 .

Inoltre, con questi valori è possibile stimare il grado di purezza dell'RNA (o DNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine; buone preparazioni di RNA devono avere i seguenti rapporti

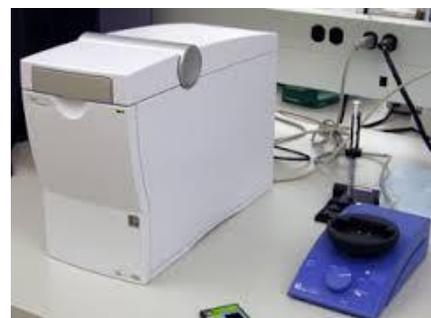
$$A_{260}/A_{280} = 1,8-2$$

$$A_{260}/A_{230} = 1,8-2,2$$

### **Analisi qualitativa dell'RNA totale estratto**

L'RNA estratto è stato sottoposto a controllo qualitativo, mediante elettroforesi capillare su chipRNA 6.000 Nano LabChip con lo strumento Agilent 2.100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies).

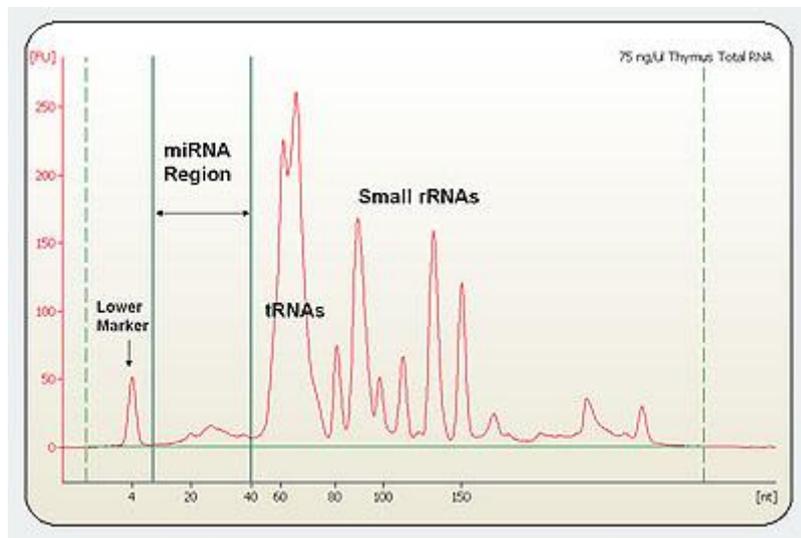
Questa verifica viene fatta allo scopo di evidenziare le varie frazioni di RNA e di controllare l'arricchimento relativo degli



Agilent 2.100 Bioanalyzer

estratti di micro RNA da liquido pleurico al fine di valutare il migliore metodo estrattivo.

Lo strumento è costituito da una piattaforma, in cui vengono alloggiati dei particolari chips, specifici per l'analisi di DNA, RNA, proteine o cellule. Ogni chip contiene 12 microcanali interconnessi, in cui viene inserita una matrice contenente un fluoroforo (Gel Dye Mix). All'interno di ogni canale, i frammenti di acido nucleico vengono separati in base al peso molecolare, come in una normale elettroforesi. Durante la migrazione, le varie specie di RNA legano le molecole di fluoroforo, presenti nella matrice; in questo modo possono essere quantificate passando attraverso un rivelatore di fluorescenza.



I  
È Elettroferogramma che mostra la distribuzione dei vari tipi di RNA in una corsa elettroforetica capillare

La suddetta fluorescenza viene successivamente tradotta in un'immagine simile ad un gel (con bande) e in un elettroferogramma (con picchi).

Il protocollo di corsa di *Bioanalyzer 2100*, prevede la preparazione di un gel di caricamento, ottenuto seguendo le specifiche fornite dalla ditta produttrice, sintetizzate qui di seguito.

La preparazione del gel prevede il caricamento in apposita colonnina di 550  $\mu$ l di RNA Nano gel e la centrifugazione per 10min a 4000 rpm.

A 65  $\mu$ l del gel filtrato viene aggiunto 1  $\mu$ l del fluoroforo fornito dal kit e il gel così ottenuto viene agitato vigorosamente al vortex e centrifugato per 10' a 12000 rpm.

Nel pozzetto del chip dove è presente la lettera G circondata dal cerchio nero, vengono aggiunti 9  $\mu$ l di gel precedentemente preparato. Il gel viene fatto penetrare all'interno del chip grazie alla pressione esercitata da un apposita siringa. I rimanenti pozzetti contrassegnati dalla lettera G sono stati riempiti rispettivamente con 9  $\mu$ l di gel ciascuno. In seguito, ad ogni pozzetto, incluso quello dedicato al marcatore di peso molecolare (*ladder*) sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di Marker.

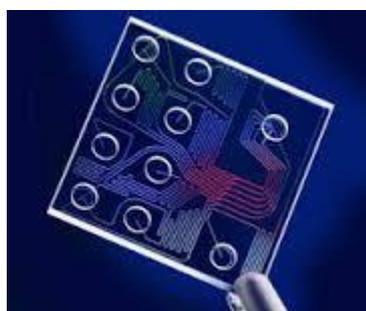


Chip per small RNA

Dai campioni in nostro possesso, sono state effettuate delle diluizioni sulla base della valutazione al nanodrop, in modo da ottenere una quantità di RNA compresa fra i 100 ed i 400 ng (range ottimale per la massima sensibilità dello strumento).

A questo punto i campioni diluiti ed il *ladder* sono stati denaturati mediante incubazione a 70° C per 2min, in modo da favorire la migrazione dell'RNA.

Successivamente 1  $\mu$ l di ciascun campione e del *ladder* sono stati caricati nei pozzetti



corrispondenti. Il chip così ottenuto è stato messo in un apposito vortex, dove è rimasto in agitazione per 1 min. Successivamente il chip è stato inserito nell'opportuno alloggiamento presente nello strumento ed è stata fatta iniziare la corsa, grazie all'utilizzo del software dedicato (*2100 Expert Software, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*).

*Bioanalyzer 2100*, mediante il suo sistema ad elettroforesi capillare, ha reso possibile caratterizzare qualitativamente e quantitativamente il campione. Questo strumento è infatti in grado di restituire un valore, definito come R.I.N. (*RNA Integrity Number*), che permette di attribuire un indice qualitativo all'RNA esaminato. Tale parametro presenta una scala che va da 0, indice di completa degradazione e 10, RNA di ottima qualità. Il R.I.N. viene calcolato sulla base dei picchi delle subunità ribosomiali 18S e 28S; , calcolato dal software sulla base del profilo di migrazione dell'RNA. Solo l'RNA con valori di RIN non inferiori a 8,5 sono stati sottoposti ai successivi esperimenti.

Il report fornito dal software, oltre a riportare il valore di R.I.N., fornisce ulteriori dati relativi alla corsa elettroforetica, quali la concentrazione dell'RNA e l'elettroferogramma.

### **Retrotrascrizione e Real Time PCR**

Dopo avere effettuato le estrazioni con il TRIZOL LS per ogni campione è stata verificata la presenza di alcuni miRNA nell'essudato pleurico utilizzando 2 kit in maniera sequenziale:

- il miScript II RT kit Qiagen per la retrotrascrizione dei miRNA in cDNA
- il miScript SYBR green PCR kit Qiagen con il miScript Primer Assay Qiagen per i primers dei miRNA che sono stati presi per prima in considerazione :

il miR-24\_1 (ACACTCCAGCTGGGTGGCTCAGTTCAGCAG)

il miR-30d\_2 (ACACTCCAGCTGGGTGTAAACATCCCCGAC)

il miR- 26a-5p (ACACTCCAGCTGGGTTCAAGTAATCCAGG)

I miRNA presi in esame sono stati scelti in base a quelli già trovati in letteratura nel liquido pleurico, di soggetti con tumore polmonare.

I primers sono arrivati liofilizzati, a temperatura ambiente, e sono stati ricostituiti aggiungendo 550µl di TE, pH8.0 (1ml di TRIS/HClpH8; 0,2ml di EDTA 0,5M pH8.0 ;98,8 di acqua RNase free.) aliquotati e congelati a -20°C.

I miRNA estratti dal liquido pleurico sono stati retrotrascritti in cDNA usando il kit sopracitato, usando la seguente miscela:

<b>Miscela di reazione</b>	
<b>Componente</b>	<b>Quantità per campione</b>
RNA templato	5 µl
5x mi Script HiSpec Buffer	4µl
10x miScript nucleics Mix	2µl
mi Script Reverse Transcriptase Mix	2 µl
acqua	7 µl
volume totale	<b>20 µl</b>

I campioni sono aggiunti al master mix, brevemente vortexati e messi in ghiaccio. Si incubano per 60 min a 37°C, poi per 5 min a 95°C al fine di inattivare il master mix, e infine in ghiaccio.

Il cDNA risultante viene poi utilizzato come template per la Real Time PCR; i campioni sono stati diluiti 1/10 e si è proceduto alla Real time PCR con la real time della Applied Biosystem 7500 utilizzando il kit sopracitato usando una miscela di reazione come riportato in tabella:

<b>Miscela di reazione</b>		
<b>Componente</b>		<b>Quantità per campione</b>
cDNA template		2 µl
2x QuantiTect Syber Green PCR master mix		12,5µl
10x miScript Universal Primer		2,5µl
10x mi Script Primer assay		2,5µl
acqua		5,5µl
volume totale		25 µl
<b>Step</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Step iniziale di attivazione	15 min	95°C
Denaturazione	15s	94°C
Annealing	30 s	55°C
Estensione	30s	70°C
Numero di cicli	40 cicli	

L'amplificazione e la rilevazione del segnale è stata eseguita mediante lo strumento ABI PRISM 7300 (ABI). I dati ottenuti sono stati poi analizzati con il software

7300system software v1.3.1. E' stata effettuata l'analisi delle curve di melting al fine di verificare la specificità e l'identità dei prodotti di RT-PCR, tramite l'uso dello step di analisi contenuto nel software. L'espressione di ciascun microRNA è stata normalizzata su quella del controllo endogeno nello stesso campione, il mimic 26a-5p. L'analisi statistica comparativa tra i vari campioni è stata condotta utilizzando un'analisi di varianza semplice (one-way ANOVA) Le differenze sono state considerate statisticamente significative per P-value minori di 0.02.

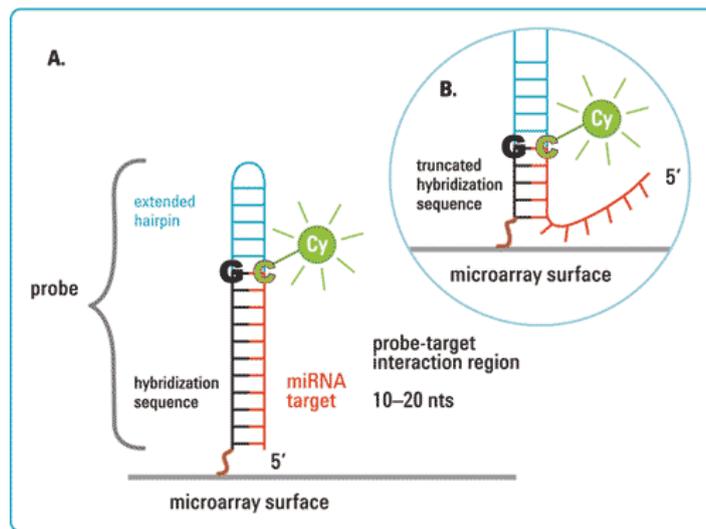
### **Analisi dell'espressione dei miRNA mediante Microarrays**

Lo studio del profilo di espressione dei miRNA nel liquido pleurico è stato eseguito mediante piattaforma microarray della Agilent Technologies. In particolare, la versione di microarray utilizzata è la Human miRNA Microarray Kit (V2), contenente 866 sonde per miRNA umani e 89 per miRNA virali tratti dal Sanger Database del 2008, mentre la marcatura dei campioni è stata eseguita con il sistema monocolor miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit, contenente la cianina 3-pCp, che emette nella lunghezza d'onda del verde.

Sul vetrino sono presenti 8 griglie identiche, sulle quali è possibile ibridare 8 campioni diversi. Le griglie contengono ciascuna 15000 spots, costituiti da sonde relative a miRNA umani e virali, presenti in più repliche.

Il principio su cui si basa la tecnica dei microarrays, anche nel caso di microarrays di miRNA, è quello dell'ibridazione tra molecole complementari di acido nucleico a singolo filamento: la prima, chiamata **probe**, è attaccata covalentemente alla superficie del vetrino ed ha una sequenza nota, appositamente disegnata per potersi legare alla molecola complementare che si vuole studiare nel campione, chiamata **target**. Per amplificare il segnale, e renderlo quindi più facilmente rilevabile in fase di analisi, molte copie della stessa probe vengono posizionate nello stesso punto del vetrino, in modo da formare uno spot. Nel caso di avvenuta ibridazione, essa sarà

rilevata in fase di scansione del vetrino grazie alla fluorescenza emessa dalla molecola target, marcata con un opportuno fluoroforo. Nel caso di microarrays di



miRNA, per aumentare la scarsa specificità di ibridazione dovuta alla brevità delle sequenze in questione, il sistema sviluppato da Agilent prevede l'aggiunta di una Citosina al 3' delle molecole target in fase di marcatura e di una sequenza in grado di

formare una forcina adiacente alla regione target-probe (come visibile in figura).

Alla molecola probe (in nero), specifica per il riconoscimento di una molecola target (in rosso), viene aggiunta prima una guanina (G), in grado di appaiarsi alla citosina (C) inserita al 3' della molecola target in fase di marcatura, quindi una sequenza harpin (in blu) in grado di formare una forcina per rendere più stabile l'ibridazione (a). Per destabilizzare sonde troppo stabili, che potrebbero creare un bias nel vetrino, viene ridotta la regione di appaiamento sonda-target (b).

Il protocollo di analisi dei microarray prevede l'impiego di RNA totale arricchito di miRNA. I campioni precedentemente valutati al *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sono stati diluiti in modo da ottenere delle soluzioni di partenza contenenti ciascuna 300 ng di RNA in 2  $\mu$ l. A ciascun campione è stato aggiunto 1 fmol/ $\mu$ l di ebv-miR-BART1-3p (Qiagen-MSY0003390), come controllo delle reazioni di marcatura e ibridazione.

Il primo passo per il microarray è la marcatura dell'RNA; il metodo di marcatura prevede la ligation della cianina 3-pCp al 3' delle molecole di RNA del campione.

La prima fase della marcatura è la defosforilazione dell'RNA, che avviene per incubazione con l'enzima Cip (Calf



Intestinal Alkaline Phosphatase), 2 µl di Cip per campione, a 37°C per 30 minuti; la Cip master mix si prepara nel seguente modo (per 9 reazioni) :

- 3,6µl di 10x calf intestinal phosphate buffer
- 9,9 µl di mimic (Bart) 1fmole/µl
- 4,5 µl di calf intestinal phosphatase

Poi si procede con la denaturazione termica del campione aggiungendo 2,8 µl di DMSO per campione e si incuba 7 minuti a 100°C; subito dopo i campioni vengono messi in acqua e ghiaccio per impedire il riannealing.

Sistema di assemblamento del vetrino

Segue quindi la fase di ligation della cianina per mezzo dell'enzima T4 RNA ligasi tramite la ligation master mix che si ottiene miscelando assieme:

- il buffer T4RNA ligasi 10x 9 µl (preriscaldato)
- la cyanina 3-pCp 27 µl
- la T4 RNA ligasi 4,5 µl

Si incubano i campioni (entro 15 minuti dalla miscelazione dei componenti ) per 2 ore a 16°C.

A questo punto, il campione viene essiccato in una centrifuga collegata ad una pompa da vuoto a 45- 55°C per 2 ore circa, fino ad ottenere un pellet sul fondo della provetta. Il campione deve essere risospeso in 18 µl di acqua RNase-free e buffer di ibridazione (22,5 µl), e viene aggiunto inoltre il Blocking Agent (4,5 µl), una soluzione che consente di saturare tutti i siti di legame aspecifico. Il Blocking Agent si prepara risospendendo il liofilizzato, in 125 µl di acqua libera da nucleasi per 4-5 min a 37°C.

Dopo un'incubazione a 100°C per 5 minuti e il trasferimento in acqua e ghiaccio per 5 minuti, il campione è pronto per l'ibridazione: questa fase è molto delicata, in quanto su un singolo vetrino vengono caricati fino ad 8 campioni diversi, separati l'uno dall'altro da una griglia chiamata gasket; una volta assemblata la camera di ibridazione, essa viene posta in un forno per 20 ore a 55°C, in rotazione a 20 rpm.

Al termine della fase di ibridazione sono necessari diversi passaggi di lavaggio del vetrino, per rimuovere la fluorescenza aspecifica: per questo si utilizzano delle apposite soluzioni (Gene Expression Wash Buffer Kit) contenenti Triton x-102, un

tensioattivo, e sali a diverse concentrazioni per rendere il lavaggio sempre più stringente (per l'ultimo passaggio si usa inoltre una soluzione preriscaldata a 37°C). A questo punto il vetrino è pronto per la scansione, che viene effettuata sullo Scanner Agilent G2565 (Agilent Technologies): il sistema è in grado di rilevare la fluorescenza emessa dal vetrino dopo l'eccitazione da parte di un laser a determinate lunghezze d'onda (550 nm quella del laser di eccitazione, 570 nm quella di emissione della cianina impiegata in questo studio). Con la scansione, che può essere eseguita a risoluzioni diverse e può arrivare fino a 2 µm, si ottiene un'immagine relativa alla fluorescenza emessa su tutto il vetrino, la quale successivamente viene analizzata con opportuni software per estrarre l'intensità di emissione di ciascuno spot. A questo scopo, si utilizza il Feature Extraction (Agilent Technologies), un programma che permette di estrarre i dati di intensità grezza di ciascuno spot i quali, unitamente ai valori di background, sono raccolti in un file prodotto come output dal software e pronto per l'analisi statistica con GeneSpring Gx v12.5

## **Risultati**

Nel periodo compreso fra giugno 2012 e dicembre 2014 presso il DI.BI.M.I.S. (Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica), Sezione di Pneumologia, sono stati raccolti i versamenti pleurici di 44 pazienti, afferenti al reparto di Pneumologia II, di Cardiologia e di Medicina Interna degli Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello. Sono stati collezionati:

- 14 versamenti provenienti da pazienti con tumore polmonare:
  - 12 con adenocarcinoma polmonare, di cui 9 con presenza di cellule maligne
  - 2 con microcitoma
  
- 14 versamenti provenienti da pazienti con versamento pleurico ma con tumori in altre sedi:
  - 4 linfomi non Hodgkin (di cui 2 con presenza di cellule tumorali)
  - 4 adenocarcinomi dell'ovaio (di cui 2 con presenza di cellule tumorali)
  - 3 carcinomi mammari (di cui 3 con presenza di cellule tumorali)
  - 1 leucemia linfatiche croniche (senza cellule tumorali)
  - 1 carcinoma del colon (senza cellule tumorali)
  - 1 adenocarcinoma dell' endometrio (con presenza di cellule tumorali)
  
- 11 versamenti provenienti da soggetti con versamenti benigni , dovuti a cause diverse dai tumori quali, scompenso cardiaco, polmonite batterica, idrotorace.

Gli esperimenti di biologia molecolare sono stati svolti presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, centro di Oncobiologia Sperimentale di Palermo, il Dipartimento Di.Bi.me.F., Sezione di biologia e genetica.

## Scelta per la metodica estrattiva dei microRNA

Il primo passo intrapreso, per lo studio di questi versamenti, è stata la valutazione del migliore metodo estrattivo dei miRNA, poiché ad oggi, sono pochi gli studi effettuati su questo campione biologico, al contrario dei miRNA extracellulari in altri fluidi biologici, soprattutto da siero e plasma, i quali sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni.

Ad oggi, sono stati sviluppati molti protocolli per l'estrazione di RNA di alta qualità utilizzando diversi kit e reagenti da plasma e da altri campioni biologici, sia commerciali sia sperimentali ("*home-made*"). In generale, le differenti metodiche si basano sull'utilizzo di: reagenti "classici" per l'estrazione degli acidi nucleici, quali soluzioni di guanidina isotiocianato e fenolo (TRIzol o TRI Reagent) oppure colonnine a base di silice (RNeasy mini kit, Qiagen). Questi metodi sono tutti in grado di fornire RNA totale di alta qualità per successivi studi molecolari, ma differiscono nell'efficienza del recupero degli RNA a basso peso molecolare, definiti *smallRNA* (miRNA, piccoli RNA non codificanti, nucleari e nucleolari, tRNA, 5s, 5.8s, etc), per distinguerli dalla popolazione più abbondante degli RNA ad alto peso molecolare (RNA ribosomiali, mRNA etc). Infatti, molti studi dimostrano che il recupero degli *smallRNA* è significativamente influenzato dallo specifico processo di purificazione e che, a parità di RNA totale, si possono ottenere differenti quantità di miRNA, in base al campione di partenza.

Al fine di valutare la migliore tecnica estrattiva da applicare al liquido pleurico sono stati effettuati quattro tipi di estrazione in tre campioni, uno proveniente da un liquido pleurico benigno e due provenienti da un liquido pleurico maligno: Trizol, Trizol LS, Fenolo/cloroformio ed ammonio acetato e colonnine Qiagen.

Prima di ogni estrazione, ad ogni campione è stato aggiunto un mimic miRNA come controllo interno: abbiamo scelto a tale scopo il miR-26a-5p (Qiagen) ad una concentrazione 20  $\mu$ M, per ottenere una concentrazione 20nM nel campione finale.

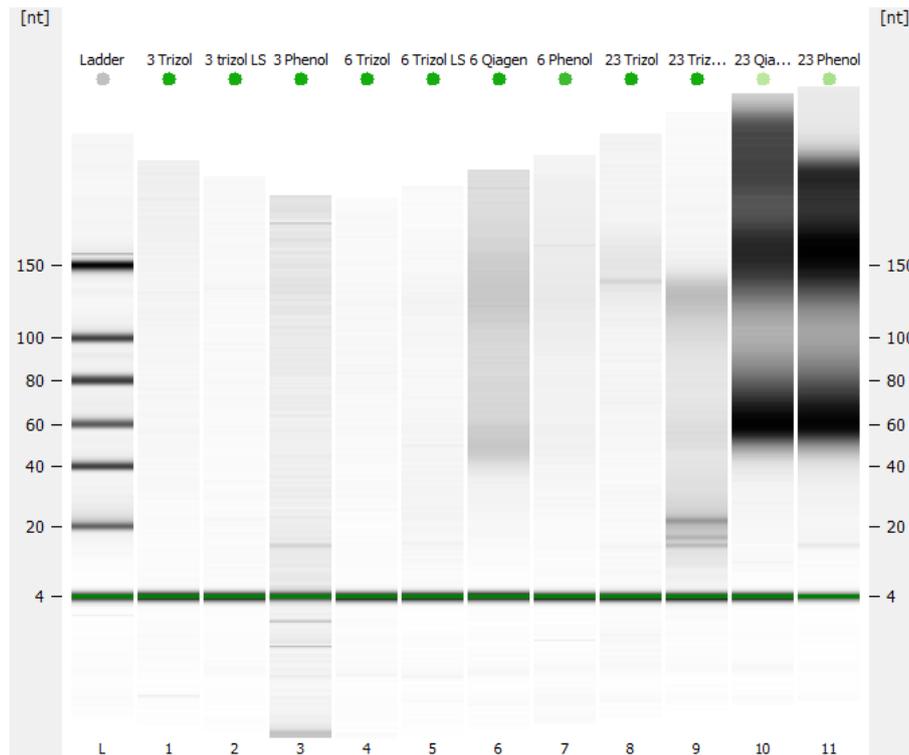
Per verificare la riuscita e paragonare i tipi di estrazione, come prima cosa, è stata effettuata una lettura al NanoDrop ND1000, uno spettrofotometro molto compatto che oltre a fornire le concentrazioni dell'RNA totale, dà un'indicazione di massima sulla purezza del campione.

	Trizol (ng/μl)	TRizol LS (ng/μl)	Clm Q (ng/μl)	Fe/Clf (ng/μl)
Cmp3s	345,40	672,23	245,5	454,43
Cmp 6t	80,76	152,79	55,93	110,22
Cmp23t	273,43	355,49	205,43	345,32

**Tabella 2:** Concentrazioni (ng/μl) dei campioni esaminati in base al tipo di estrazione.

I campioni estratti presentano delle concentrazioni comprese fra 55,93 e 672,23 μg/μl; come si può vedere dai dati in tabella 2 le rese migliori si hanno con l'estrazione in Trizol LS, sebbene anche l'estrazione con il Fenolo/Cloroformio mostri delle buone rese. Inoltre, tutti i campioni estratti con Trizol LS mostrano rapporti A260/A280 compresi fra 1,8-2 e A260/A230 compresi fra 1,8-2,2 a dimostrazione che l'RNA è di buona qualità; mentre nei campioni estratti con il Fenolo presentano rapporti A260/A280 e A260/A230 inferiori a 1,8 a causa di una probabile contaminazione da proteine e da fenolo. Inoltre, la forte presenza di proteine nell'essudato pleurico provoca in alcune estrazioni con Fe /Clf la formazione di aggregati proteici, che non permette di portare avanti l'estrazione. Al contrario, il metodo che si basa su colonnine permette un recupero meno efficiente.

Per discriminare le varie frazioni di RNA presenti nelle nostre estrazioni è stata effettuata una corsa al bioanalyzer Agilent 2100, un analizzatore che sfrutta la tecnologia microfluidica per l'analisi di campioni biologici tramite l'uso di chips specifici e reagenti designati all'analisi di frammenti di small RNA. Ogni chip contiene un set di micro canali interconnessi che è utilizzato per la separazione dei frammenti in base alla taglia.



**Fig 1:** Immagine in cui è possibile visualizzare i diversi campioni estratti tramite corsa elettroforetica. Nelle colonne troviamo rispettivamente da sinistra verso destra il marcatore di pesi molecolari (ladder) ed a seguire i campioni 3, 6 e 23 con le quattro tipologie di estrazione

In figura 1 è possibile vedere come si possono visualizzare i singoli estratti letti al bioanalyzer, come una corsa elettroforetica standard.

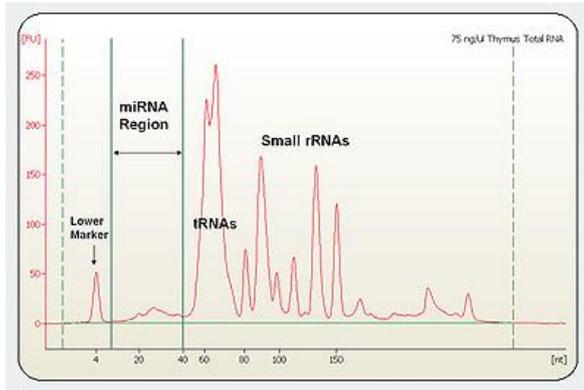
Questo apparecchio inoltre è in grado di effettuare il controllo della qualità dell'RNA con RIN (RNA Integrity Number), lo standard per l'analisi dell'RNA che fornisce dati di RNA totale, mRNA e Small RNA. La concentrazione raccomandata per campioni purificati con  $RNA \leq 150$  nt è di 1-20ng/ $\mu$ l per cui dopo le dovute diluizioni, sulla base della lettura al nanodrop, abbiamo effettuato la corsa al bioanalyzer.

In realtà, l'analisi al bioanalyzer dà vita ad un elettroferogramma per ogni campione nel quale è possibile distinguere dei picchi dove sono presenti i miRNA (tra i 10 e i 40nt) ed avere la percentuale di miRNA presente. Come si può vedere in tabella 3 le percentuali miRNA/Small RNA più alte risultavano (36%, 46%, 58%) con il Trizol LS. Un recupero efficiente dei miRNA è tecnicamente difficile a causa del loro basso peso molecolare e dei loro bassi livelli di espressione in un liquido, come quello da noi studiato. Perciò, l'isolamento e la valutazione dell'arricchimento in miRNA è un

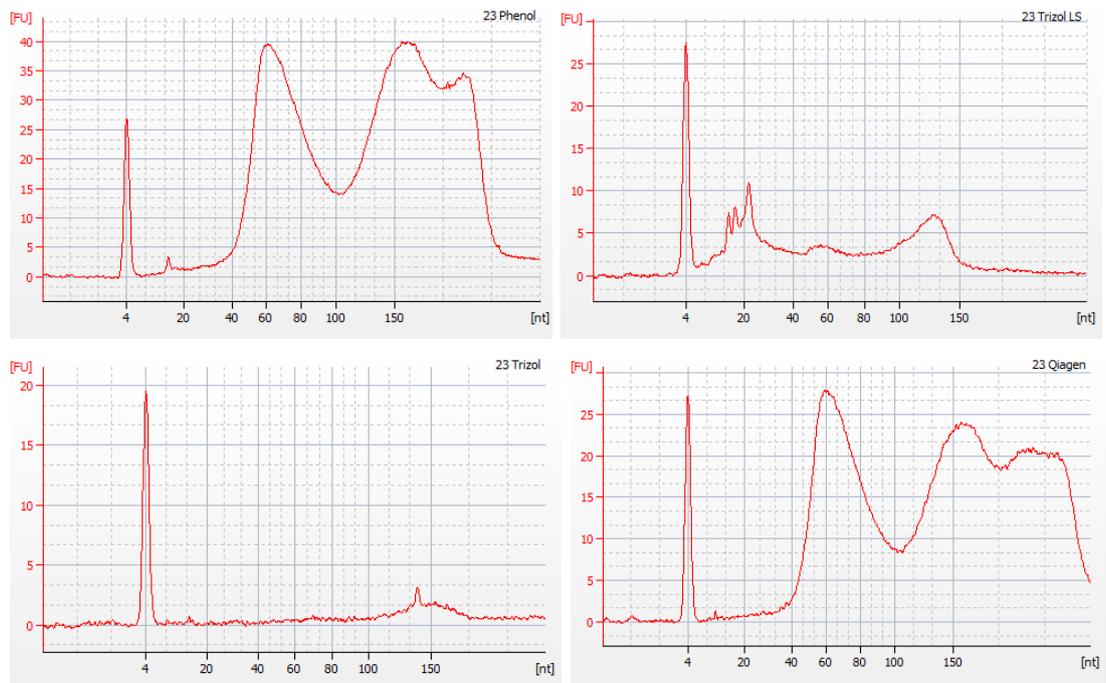
passo molto importante per studiarne l' espressione. A tal fine, i protocolli di estrazione sono stati valutati per il massimo recupero degli smallRNA, e la loro corretta quantificazione diventa estremamente importante quando si confrontano le espressioni dei miRNA tra i diversi metodi estrattivi, in quanto la concentrazione dei miRNA può differire significativamente a causa della differente espressione nei vari campioni presi in esame.

<b>Cmp3s</b>	Trizol	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):411,3 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):82,8 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):20</b>
	Trizol LS	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):453,3 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):164,4 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):36</b>
	Clm Q	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):232,4 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):34,4 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):14</b>
	Fe/CLF	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):651,2 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):197,0 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):30</b>
<b>Cmp6t</b>	Trizol	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):166,4 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):29,2 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):18</b>
	Trizol LS	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l): 669,4 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):307,4 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):46</b>
	Clm Q	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):1825,8 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):250,7 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):14</b>
	Fe/CLF	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):488,2 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):47,7 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):10</b>
<b>Cmp23t</b>	Trizol	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):394,8 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):50,2 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):13</b>
	Trizol LS	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):2674,7 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):1545 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):58</b>
	Clm Q	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):6996,2 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):254,1 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):4</b>
	Fe/CLF	Small RNA conc (pg/ $\mu$ l):10831,1 miRNA conc(pg/ $\mu$ l):574,5 <b>miRNA/Small RNA Ratio(%):5</b>

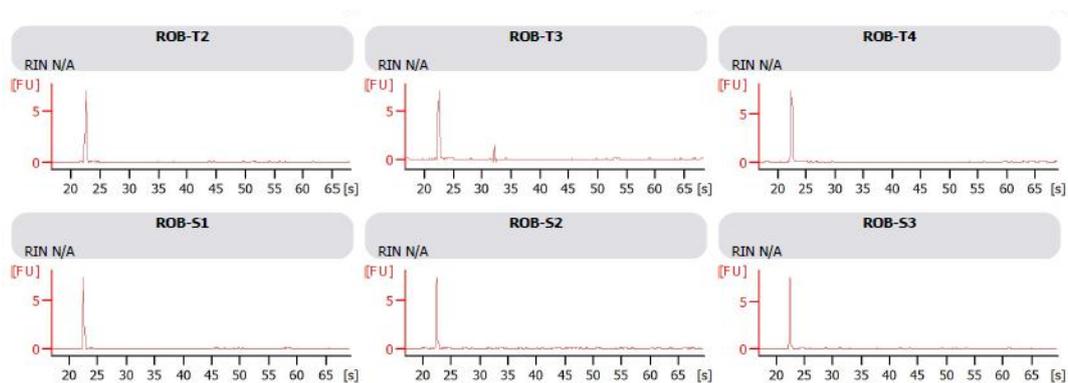
**Tab 3:** Concentrazioni di Small RNA, di miRNA ed il rapporto miRNA/Small RNA per i tre campioni esaminati



**Figura 2. Comparazione del recupero di *smallRNA* che si ottiene con differenti metodi estrattivi.** Sono mostrati profili di RNA estratto da un campione di liquido pleurico, con TRIZol(1), TRIZol LS(2), colonnine Qiagen(3) e con estrazione con Fe/Clf ed ammonio acetato(4). I profili sono ottenuti mediante il software 2100 Expert dello strumento 2100 Bioanalyzer (Agilent), mediante il quale è stata effettuata l'analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA. (FU): unità di fluorescenza; (nt.): nucleotidi



L'uso diretto di RNA totale per profili di espressione di miRNA può limitare la sensibilità, perché l'abbondanza relativa degli *smallRNA* in un campione di RNA totale va dal 0.01 al 24%. Al fine di valutare la presenza nei nostri campioni di RNA ribosomiale, abbiamo caricato tutti i campioni su gel d'agarosio all'1% ed effettuato una corsa elettroforetica ad 80V ed abbiamo verificato l'assenza di RNA ad alto peso molecolare. Inoltre, abbiamo effettuato una corsa al Bioanalyzer con un chip per RNA totale al fine di escludere la presenza di RNA ribosomiale, rRNA 18s e 28s.



**Figura 3:** Corsa al Bioanalyzer con un chip per RNA totale

Queste analisi, ci hanno indotto a scegliere l'utilizzo del Trizol LS come metodo estrattivo.

La nostra scelta è stata inoltre confortata dai dati in letteratura poiché, dai pochi studi effettuati sul liquido pleurico, si evince che una buona percentuale utilizza il Trizol LS (68-69), sebbene in alcuni studi vengano utilizzate delle colonnine di purificazione diverse da quelle da noi utilizzate (Urine Purification kit, Genolution Pharmaceutical In, Seoul, Korea) che sono risultate di difficile reperimento (70).

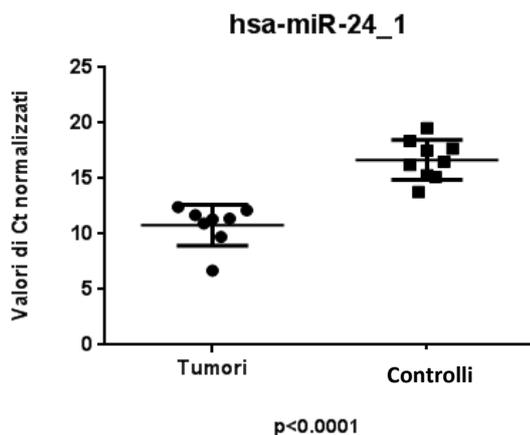
### qRT PCR esplorative

Per verificare l'espressione dei miRNA nei nostri campioni sono stati presi in considerazione due miRNA già riportati in letteratura (73) presenti nell'essudato pleurico ovvero i miR-24 (ACACTCCAGCTGGGTGGCTCAGTTCAGCAG Forward Primer 5' - 3') e il miR-30d (ACACTCCAGCTGGGTGTAAACATCCCCGAC Forward Primer 5' - 3') ed è stata verificata la loro presenza in 9 campioni da versamenti maligni, 8 campioni da versamenti benigni.

Dopo avere aggiunto il controllo interno, il miR-26a-5p (ACACTCCAGCTGGGTTCAGTAATCCAGG) i versamenti pleurici sono stati estratti con il Trizol LS, ed è stata effettuata una reazione di retrotrascrizione ed una Real Time PCR. Per la retrotrascrizione (con il miScript II RT kit Qiagen) dei miRNA in cDNA sono stati presi volumi fissi di estratti, assumendo la provenienza da volumi fissi di essudato ovvero 250µl, diluiti 1:10, come suggerito da protocollo.

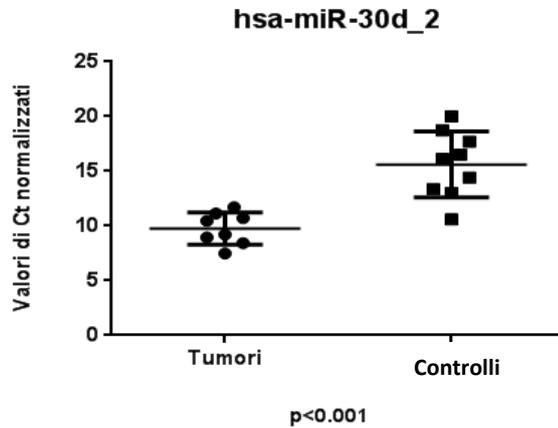
Poi sono state effettuate delle qRT PCR prendendo 2 µl per ogni campione dalla precedente retrotrascrizione (con il miScript SYBR green PCR kit, Qiagen) e sono stati amplificati il miR-24\_1, il miR-30d\_2 e il miR-26a-5p.

Dall'analisi statistica si evince come sia l'espressione del miR-24 che del miR-30d risultano significativamente più alti con un  $p \leq 0,0001$  e con un  $p \leq 0,001$ , nei versamenti pleurici maligni rispetto a quelli benigni (fig. 4 e 5).



**Figura 4:** I Ct normalizzati del miR-24, nei tumori polmonari rispetto ai controlli. I valori di Ct risultano inversamente proporzionali alle concentrazioni di miRNA.

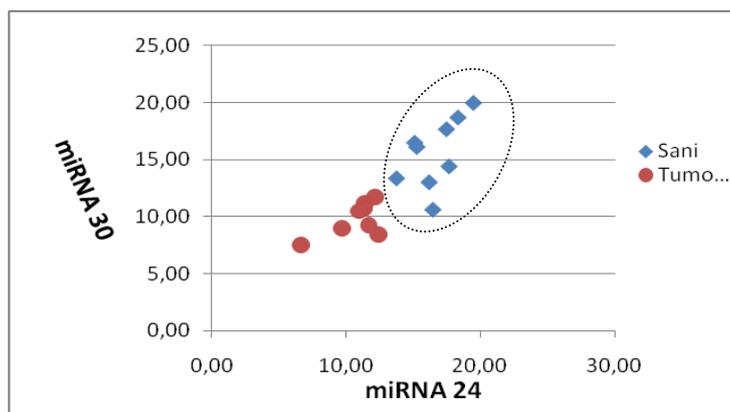
Nelle fig 4 e 5 sono visibili i due grafici dove sono schematizzati i valori di Ct che risultano inversamente proporzionali all'espressione dei campioni presi in esame. I risultati delle Real Time sono stati concordi con i dati noti in letteratura (73).



**Figura 5:** I Ct normalizzati del miR-30, nei tumori polmonari rispetto ai controlli. I valori di Ct risultano inversamente proporzionali alle concentrazioni di miRNA.

Allo scopo di effettuare una clusterizzazione dei campioni sani e tumorali, è stata effettuata una LDA (Linear Discrimination Analysis). Tramite questa analisi, sono stati analizzati i campioni in base a due variabili quantitative, nel nostro caso, il valore di CT dei due miRNA targets normalizzato sul controllo interno miRNA-26a ed è stato osservato come i campioni si distribuiscono.

Come si può osservare in figura 6, i campioni di Controllo e Tumorali si distribuiscono in due classi diverse in base ai valori di espressione dei miRNA analizzati.



**Figura 6:** LDA sui campioni maligni e benigni di versamento pleurico.

## **Valutazione della stabilità dei miRNA nel versamento pleurico**

In letteratura, la presenza dei miRNA, è stata valutata da campioni di tessuto tumorale anche dopo fissazione in formalina e inclusione in paraffina, indicando che questi RNA sono marcatamente stabili (71). Nel 2008, due gruppi indipendenti Michell e coll. e Chen e coll. (67-72) hanno riportato che il siero e il plasma contengono un largo ammontare di miRNA stabili ed entrambi hanno mostrato che questi piccoli RNA sono resistenti a digestione con RNasi ed altre condizioni stringenti come la bollitura, variazioni estreme di pH, conservazione prima dell'estrazione per lungo tempo e cicli di congelamento e scongelamento.

Al fine di valutare la stabilità dei miRNA, nel liquido pleurico, abbiamo preso quattro campioni di pazienti differenti, due da pazienti tumorali e due controlli. Nella prima coppia tumorale/controllo ogni campione di versamento pleurico isolato è stato diviso in 5 parti. 250µl sono stati mantenuti a 4°C per 24 e 48 ore, rispettivamente. Altre due aliquote sono state soggette a 3 e 6 cicli di congelamento e scongelamento. L'ultima aliquota è stata conservata a -20°C ed è servita come controllo.

Nella seconda coppia tumorale/controllo, sempre divisa in 5 aliquote, le prime due aliquote sono state mantenute a 37°C per 24 e 48 ore; due aliquote sono state incubate con 0,01mg/ml e con 1mg/ml di RNaseA (Qiagen, Valencia, CA) e l'ultima aliquota è stata conservata a -20°C ed è servita come controllo.

Dopo i trattamenti sotto le differenti condizioni, tutti i campioni sono stati sottoposti ad estrazione dell' RNA con trizol LS, sono state effettuate retrotrascrizione ed amplificazione in real time come in precedenza. Le real time mostravano che in tutti i campioni amplificati non vi erano differenze significative fra i trattati ed i non trattati.

## Microarray

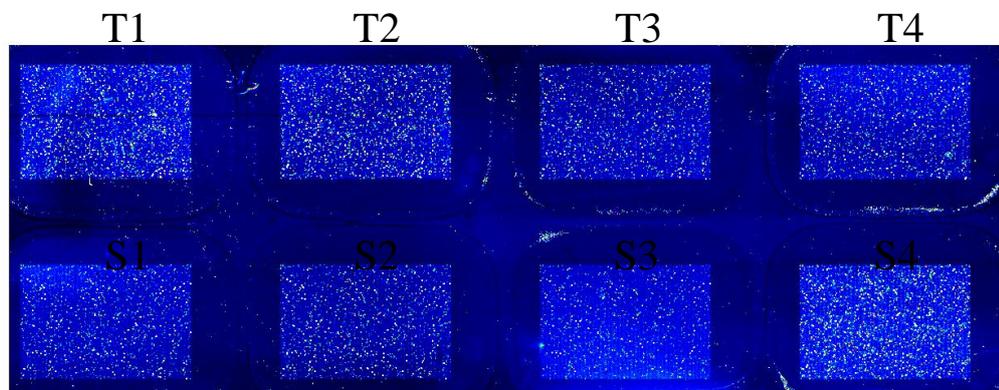
Al fine di valutare i profili di espressione dei miRNA circolanti nei versamenti pleurici e quindi individuare un pannello di miRNA deregolati nei tumori polmonari, abbiamo effettuato un saggio di microarray con lo Human miRNA V3 Microarray kit (Agilent) su otto campioni, quattro provenienti da versamenti maligni e 4 provenienti da versamenti benigni.

I campioni tumorali erano versamenti provenienti, uno da microcitoma, e tre da adenocarcinoma polmonare.

I controlli provenivano da versamenti pleurici benigni, uno da idrotorace, due da scompenso cardiaco e uno da pleurite batterica.

In ogni campione è stata valutata la presenza di 723 sonde per miRNA umani e 76 per miRNA virali tratti dal Sanger Database del 2008, considerando però che in ogni griglia sono presenti circa 15000 spots, costituiti da sonde presenti in più repliche.

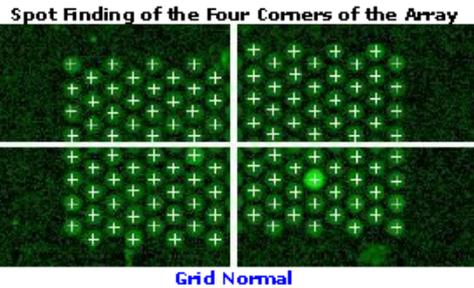
Con la scansione del vetrino abbiamo ottenuto un'immagine relativa alla fluorescenza emessa, la quale è stata analizzata con il software Feature Extraction, per l'estrazione dei dati di intensità grezza di ciascuno spot. Questo programma effettua il gridding, ossia identifica il posizionamento di ogni singolo spot, la segmentazione che definisce i pixel appartenenti o meno al background, e l'estrazione, come media dei singoli pixel, dell'intensità del segnale. Questo software fornisce un resoconto sulla qualità del vetrino. Questa analisi dà vita al cosiddetto QC report, riportato in figura x che, in base ai parametri sopra descritti, stabilisce se un vetrino risulta di buona qualità.



**Figura 7** Immagine del vetrino dopo marcatura

### QC Report - Agilent Technologies : miRNA

Date	Thursday, November 06, 2014 - 15:51	Grid	021827_D_20081121
Image	_252182715338_S01_H [1_3]	BG Method	No Background
Protocol	miRNA-v1_95_May07 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange, LoPass)
User Name	Administrator	Multiplicative Detrend	False
FE Version	9.5.1.1	Additive Error	5
		Saturation Value	65277

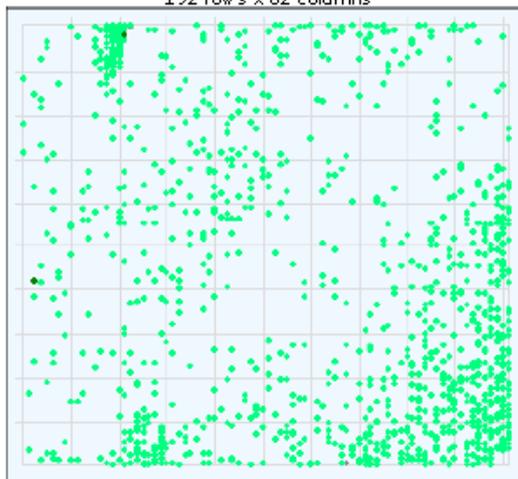


Grid Normal

Feature	Local Background
---------	------------------

Non Uniform	2	8
Population	1059	27

**Spatial Distribution of All Outliers on the Array**  
192 rows x 82 columns



# FeatureNonUnif = 2(0.01%)

# Feature Population Outliers = 1059(6.73%)

● BG NonUniform ● BG Population  
● Green Feature Population ● Green Feature NonUniform

#### Net Signal Statistics

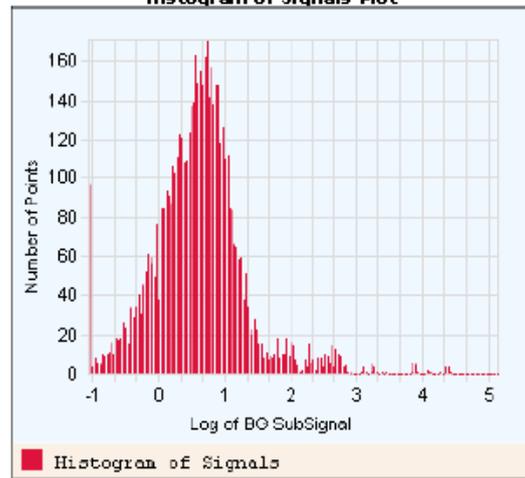
##### Non-Control probes:

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	287
50% of Sig. Distrib.	100
1% of Sig. Distrib.	85

##### Negative Control Stats

Average Net Signals	108.65
StdDev Net Signals	7.19
Average BG Sub Signal	7.09
StdDev BG Sub Signal	4.68

#### Histogram of Signals Plot



# Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 9316 (Green)

**Figura 8** QC report prodotto dal programma Feature Extraction relativo all'array effettuato.



**Figura 9** Tabelle di verifica del QC report prodotto dal programma Feature Extraction relativo all'array

I dati grezzi, unitamente ai valori di background, sono stati raccolti in un file prodotto da Feature Extraction e pronto per l'analisi statistica con un altro software, Genespring.

Nella tabella sottostante, è possibile visualizzare i dati grezzi estrapolati dall'elenco totale dei miRNA ovvero i miRNA risultati espressi nei 4 estratti da campioni tumorali o al minimo in 3 campioni su 4. Nei campioni sani invece, i miRNA espressi, sebbene pochissimi, non erano mai presenti in più di un campione.

I dark corners, segnali di ibridazione dei controlli negativi, sono risultati come atteso spenti, mentre i bright corners, segnali di ibridazione dei controlli positivi, sono risultati tutti accesi (0=spenti, 1=accesi). I controlli interni ebv-miR-Bart1-3p inserito prima del microarray, e il miRNA 26-a aggiunto prima dell'estrazione, sono risultati entrambi presenti.

	T1		T2		T3		T4	
SystematicName	TGS	GD	TGS	GD	TGS	GD	TGS	GD
DarkCorner	731.071	0	0.26281	0	107.615	0	164.731	0
ebv-miR-BART1-3p	5046.99	1	66.749	1	4068.00	1	239.025	1
ebv-miR-BART12	657.455	1	14.832	1	566.753	1	337.781	1
ebv-miR-BART16	827.474	1	188.691	1	637.269	1	418.004	1
hsa-let-7f-1*	128.759	1	128.349	1	117.125	0	144.761	1
hsa-miR-1202	680.981	1	903.216	1	238.001	1	316.617	1
hsa-miR-1207-5p	867.602	1	105.804	1	290.318	1	518.388	1
hsa-miR-1225-5p	1382.84	1	177.49.0	1	457.753	1	730.279	1
hsa-miR-1228	203.812	1	19.178	1	151.397	1	232.479	1
hsa-miR-1228*	299.328	1	0.08272	0	231.684	1	136.927	1
hsa-miR-1238	11.868	1	14.534	1	10.049	0	145.125	1
hsa-miR-1249	27.294	1	181.064	1	121.125	0	367.323	1
hsa-miR-1268	191.972	1	160.547	1	813.791	1	945.703	1
hsa-miR-1275	233.795	1	370.807	1	992.425	1	173.376	1
hsa-miR-1281	202.009	1	264.129	1	155.742	1	260.168	1
hsa-miR-134	124.933	1	491.108	0	165.408	1	395.713	1
hsa-miR-1825	147.964	1	206.857	1	111.667	0	206.865	1
hsa-miR-191*	13.104	1	139.179	1	140.855	1	100.368	0
hsa-miR-1915	174.798	1	32.316	0	102.192	1	585.525	1
hsa-miR-195*	389.379	1	441.331	0	12.968	1	125.821	1
hsa-miR-26a	36513	1	146.153	1	11894.9	1	364.66	1
hsa-miR-32*	115.663	1	411.017	1	798.419	1	686.235	1
hsa-miR-320c	1133.15.0	1	417.435	0	395.313	1	938.201	1
hsa-miR-483-3p	115.775	1	176.132	1	834.985	0	169.064	1
hsa-miR-483-5p	117.983	1	54.436	1	347.726	1	101.364	1
hsa-miR-574-5p	687.29.00	1	218.466	1	441.91	1	397.672	1
hsa-miR-595	674.599	1	178.334	1	570.511	1	342.918	1
hsa-miR-630	750.223	1	0.93321	0	169.552	1	174.511	1
hsa-miR-638	679.71	1	508.452	1	256.819	1	285.269	1
hsa-miR-765	335.272	1	340.861	1	208.624	1	54.571	1
hsa-miR-766	100.372	1	831.832	1	5.636	0	146.102	1
hsa-miR-923	679.046	1	460.455	1	975.517	1	723.22	1
hsa-miR-940	242.877	1	197.848	1	159.794	1	22.144	1
miRNABrightCorner	119.538	1	957.502	1	627.278	1	135.853	1
mr_1	215.392	0	129.071	0	123.459	1	107.185	0

**Tabella 4:** In tabella è possibile visualizzare i dati grezzi generati dal feature extraction i quali sono stati sottoposti all'analisi con il software Genespring; TGS: Total Gene Signal; GD Gene Detected (0= non espresso,1= espresso); T1,T2,T3,T4 sono i quattro campioni tumorali presi in esame.

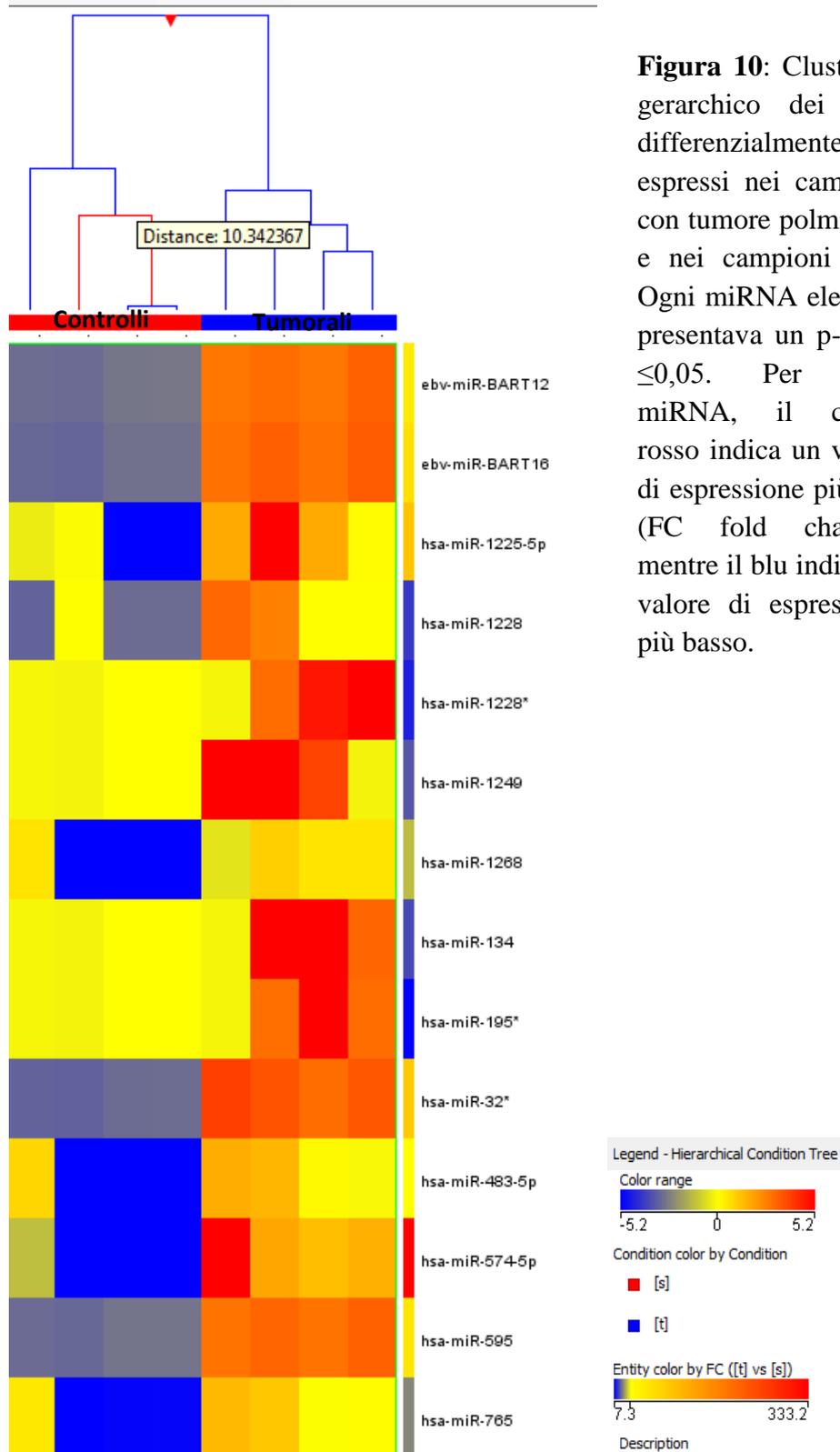
I dati sono stati analizzati con il software GeneSpring GX v 12.5 per la quantificazione dei microRNA differenzialmente espressi. Ad ogni miRNA è stato associato un valore di p-value e di fold-change, per determinare l'importanza statistica della modulazione dei campioni tumorali comparati ai controlli. I miRNA considerati differenzialmente espressi sono stati quelli con un fold-change assoluto  $\geq 3$  volte rispetto ai controlli e un p-value inferiore al 5% ( $p \leq 0,05$ ). E' stata effettuata inoltre, un'analisi di clustering gerarchico che ha confermato una buona separazione fra i campioni tumorali ed i campioni di controllo, come è possibile vedere in figura 10. Per ogni miRNA, il colore rosso indica un valore di espressione più alto (FC fold change), mentre il blu indica un valore di espressione più basso.

Nei campioni tumorali i FC sono risultati molto più alti rispetto ai controlli, talvolta centinaia di volte più espressi, e ciò dimostra una specificità alta di questi miRNA per i campioni di essudato maligno rispetto ai campioni di controllo dove questi miRNA sono praticamente assenti.

Al fine di ridurre il numero dei miRNA da investigare, abbiamo preso in considerazione solo quelli maggiormente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata mediante T-test unpaired, e i miRNA differenzialmente espressi tra soggetti con tumori polmonari e soggetti di controllo, con un p-value  $\leq 0,01$  sono stati i seguenti:

- **hsa-miR-32\*** codificato da un gene presente nel cromosoma 9 (la cui sequenza attiva è AAATATCACACACACCTAAATTG) p-value 0,01
- **hsa-miR-483-3p** codificato da un gene presente nel cromosoma 11 (CTCCCTTCTTTCCTC) p-value 0,01
- **hsa-miR-574-5p** codificato da un gene presente nel cromosoma 4 p-value (ACACACTCACACACACAC) 0,009
- **hsa-miR-765** codificato da un gene presente nel cromosoma 1 (CATCACCTTCCTTCTCCT) p-value 0,01
- **hsa-miR-595** codificato da un gene presente nel cromosoma 7 (AGACACACCACGGCACA) p-value 0,01
- **hsa-miR-1228** codificato da un gene presente nel cromosoma 12 (GGGGGGCGAGG) p-value 0,01

## Clustering Gerarchico



**Figura 10:** Clustering gerarchico dei geni differenzialmente espressi nei campioni con tumore polmonare e nei campioni sani. Ogni miRNA elencato presentava un p-value  $\leq 0,05$ . Per ogni miRNA, il colore rosso indica un valore di espressione più alto (FC fold change), mentre il blu indica un valore di espressione più basso.

### **Validazione dell'analisi microarray tramite qRT PCR**

Allo scopo di validare i risultati ottenuti dall'analisi di microarray e ampliare la casistica abbiamo in programma di effettuare delle qRT PCR a tutti i versamenti collezionati, 15 versamenti con tumori polmonari (10 con positività cellulare e 5 paramaligni), 15 versamenti con tumori extrapolmonari (8 con positività cellulare e 6 paramaligni) e 12 versamenti di soggetti senza tumore polmonare.

Per la validazione dei microarray utilizzeremo i 6 miRNA che risultano significativamente iperespressi nei tumori polmonari rispetto ai controlli.

Poiché le due tecniche hanno una diversa sensibilità, i valori di fold change potranno essere diversi, ma affinché il dato venga confermato sarà necessario che il trend sia lo stesso.

## **Discussione**

I miRNA giocano un ruolo significativo in un'ampia varietà di pathways, regolando l'espressione genica, a livello postrascrizionale. E' oggi ben noto come, almeno la metà di tutti i geni, sono regolati dai miRNA, i quali sono localizzati in regioni genomiche cancro associate o in siti fragili. Emergenti evidenze suggeriscono che i miRNA possono controllare lo sviluppo del cancro al polmone e giocano un ruolo importante nella diagnosi, nella prognosi e possono contribuire a valutare l'efficacia della terapia. Gee e coll (2010), ad esempio, hanno identificato nei campioni di tessuto tumorale un pannello di miRNA che sono tutti downregolati nel mesotelioma rispetto all'adenocarcinoma e che, ad oggi, sono alla base di un test diagnostico, reperibile in commercio, basato su un pattern di espressione di miRNA capace di distinguere i due istotipi (64).

In questo studio abbiamo tentato di individuare dei miRNA deregolati nei versamenti pleurici di soggetti affetti da tumore polmonare, rispetto a soggetti senza tumore polmonare.

La presenza dei miRNA circolanti è stata studiata e dimostrata in diversi campioni biologici come le lacrime, l'urina, il liquido amniotico ed ascitico (72) ma ad oggi sono pochissimi gli studi effettuati sul liquido pleurico.

I miRNA, sono per loro natura fortemente stabili, possono essere isolati da campioni di tessuto tumorale in formalina, da campioni di siero e da plasma dopo esser stati mantenuti a temperatura ambiente per 24 ore e dopo cicli di congelamento e scongelamento (67).

Al fine di valutare la stabilità dei miRNA nel liquido pleurico, abbiamo sottoposto 4 dei nostri campioni (due tumorali e due di controllo) a temperature di 4°C per 24 e 48 ore, a 3 e 6 cicli di congelamento e scongelamento, a temperature di 37°C per 24 e 48 ore e infine ad RNasi. Le real time (qRT PCR) hanno dimostrato l'assenza di sostanziali differenze nei campioni trattati rispetto ai non trattati.

Questi dati rafforzano l'idea che i miRNA circolanti potrebbero rappresentare un buon marcatore anche a livello dei versamenti pleurici, in quanto molecole fortemente stabili e difficilmente degradabili. Infatti, la stabilità è la prima condizione necessaria per un potenziale biomarcatore.

Xie e coll (2010) hanno scelto un pannello di miRNA deregolati nel siero di pazienti con tumore polmonare ed hanno confrontato campioni di versamenti pleurici maligni con quelli benigni tramite qRT-PCR trovando nei primi una più alta espressione di miRNA quali il miR24 e il miR30d. Inoltre, hanno trovato alcuni miRNA in grado di predire, in vitro, la sensibilità ad alcuni chemioterapici utilizzando colture primarie di cellule cancerose isolate dal liquido pleurico (68). Questi due miRNA, il miR24 e il miR30d ci sono serviti per validare i nostri protocolli di estrazione, li abbiamo trovati presenti in tutti i campioni, differenzialmente espressi nei tumorali rispetto ai sani.

A questo punto, una volta verificata la presenza dei miRNA nei nostri campioni, abbiamo potuto procedere alla valutazione dei profili di espressione mediante un saggio di microarray. Dall'analisi statistica con t-test unpaired, per valori di p-value  $\leq 0,01$  e un cut-off di fold change di espressione di 3, i miRNA che sono risultati significativamente sovraespressi nei soggetti con tumori polmonari rispetto ai soggetti non tumorali sono stati il miR-32\* (p-value 0,01), il miR-483-3p (p-value 0,01), il miR-574-5p (p-value 0,009) il miR-765 (p-value 0,01), il miR-595 (p-value 0,02) e infine il miR-1228.

Il passo successivo è stato quello di studiare in letteratura il ruolo di questi miRNA differenzialmente espressi nei nostri campioni e valutare se la loro espressione è già correlata ai tumori polmonari.

Il miRNA hsa-miR-32\* non è stato, ad oggi, quasi per nulla studiato ma sembra, dai pochi dati esistenti in letteratura, che sia stato trovato iperespresso nelle linee cellulari tumorali staminali di colon, SW1116csc (74). In realtà, il fatto che non sia stato trovato come differenzialmente espresso in altri studi, potrebbe essere un vantaggio, risultando potenzialmente un marcatore selettivo di tumore polmonare.

Hsa-miR-483-3p, è invece un microRNA molto studiato, basti pensare che sul sito microRNA.org sono presenti 3225 geni target (75-76). Questo è risultato iperespresso nel carcinoma adrenocorticale, e nel carcinoma epatocellulare (77-78-79). Inoltre, un recente studio su Cancer Research, mostra come questo miRNA possa ricoprire un ruolo nella progressione dell'adenocarcinoma polmonare; sembra che abbia un coinvolgimento, in uno dei processi implicati nella metastatizzazione e precisamente, nella transizione epiteliale-mesenchimale (EMT).

Le metastasi dipendono dalla capacità delle cellule cancerose di acquisire due abilità separate: aumento della motilità ed l'invasività. L'EMT è un processo critico nel quale le cellule epiteliali perdono la loro polarità e si convertono nel fenotipo mesenchimale. Il miR-483-5p è attivato dal pathway WNT/ $\beta$ -catenina e manifesta la sua azione metastatica, sia in vitro che in vivo avendo come target RhoGDP  $\alpha$  inibitore e la molecola di adesione cellulare leucocitaria attivata (ALCAM), due putativi soppressori di metastasi. Gli autori, in questo caso hanno effettuato un microarray su campioni di tessuto tumorali deparaffinati e confermato i dati tramite immunoistochimica (80). Un altro interessante lavoro (81) mostra come questo miRNA possa controllare l'angiogenesi in vitro, avendo come target il fattore di risposta al siero (SRF) legando direttamente il suo mRNA al 3<sup>1</sup>-UTR. Un altro target di questo miRNA sembra essere il Fattore di Crescita 2 Insulino dipendente (IGF2), un gene frequentemente overespresso in alcuni tipi di cancro, soprattutto pediatrico, quali ad esempio il tumore di Wilms. Il legame avviene con la regione 5' non tradotta (UTR) dell' mRNA dell' IGF2 fetale e sembra svolgere, al contrario di come spesso accade, un'azione attivatrice di questo gene (82).

Un'altro miRNA risultato sovraespresso dall'analisi con GeneSpring è il miR-574-5p, il quale è stato proposto da Foss e coll. (83) come biomarcatore nel siero per la diagnosi precoce del NSCLC; gli autori hanno preso in considerazione un set esplorativo (11 soggetti affetti da NSCLC ad uno stadio iniziale e 11 controlli) su cui hanno effettuato i microarray, poi come set di validazione (31 soggetti affetti da NSCLC ad uno stadio iniziale, 22 controlli ed 3 mesoteliomi) hanno amplificato in real time PCR i miRNA candidati trovati differenzialmente espressi nei vari gruppi. I mirna significativamente aumentati sono risultati il miR-1254 e il miR-574-5p. Secondo la ROC (Receiver operator characteristic curve), questi due miRNA sono capaci di discriminare i malati dai sani con una sensibilità dell'82% ed una specificità del 77% rispettivamente.

Uno studio del 2012 (84) mostra come il miR-574-5p sia upregolato nelle cellule tumorali di pazienti con NSCLC via TLR9 (il recettore toll like 9) tramite inibizione del Ches 1 (Checkpoint suppressor1) il quale blocca l'entrata nel ciclo cellulare delle cellule di tumore polmonare sia in vitro che in vivo.

Sempre nell'ambito dei tumori polmonari, questa volta nello SCLC, le concentrazioni dei miR-574-5p e miR-92\* sono state significativamente associate alla chemioresistenza (85), quindi ad una peggiore prognosi per i pazienti.

Sul miR-595 e sul miR-765, altri due miRNA differenzialmente espressi nei nostri campioni tumorali rispetto ai controlli sani esistono pochissimi dati in letteratura, il secondo è stato studiato come inibitore della crescita, migrazione e invasione nel cancro alla prostata (86).

Il miR-1228 è stato studiato in diversi tipi di cancro, fra cui il carcinoma epatocellulare come marcatore nel siero, il cancro colon rettale e nel cancro gastrico(87), dove sembra giocare un ruolo chiave nella soppressione della transizione epiteliale mesenchimale (EMT), propria della metastatizzazione(88-89).

## CONCLUSIONI

Molti studi hanno dimostrato che i miRNA hanno un profilo unico di espressione in differenti tipi di tessuto. Tra i biomarcatori di tumore polmonare, i miRNA sono risultati i più promettenti, in quanto marcatamente stabili, specifici per tipo di cancro e presenti in diversi fluidi corporei, compreso il versamento pleurico. La relazione tra i differenti profili nei fluidi corporei e la progressione tumorale, la presenza di metastasi e di conseguenza la prognosi, indirizzano alla possibilità di utilizzare queste molecole come biomarkers. Comunque, l'identificazione di specifici miRNA, inequivocabilmente associati a caratteristiche clinico patologiche del tumore polmonare, è ancora sotto studio. Il nostro è stato un primo passo nella valutazione dei profili di espressione dei miRNA nei tumori polmonari attraverso i microarray, in un fluido corporeo ancora poco studiato sotto il profilo biomolecolare dei miRNA, il liquido pleurico. I miRNA che abbiamo trovato iperespressi nei tumori polmonari, potrebbero costituire un'indicazione più specifica e sensibile per il clinico circa la malignità del versamento.

Molte sfide però devono essere affrontate, prima di incorporare questi test molecolari nella routine della clinica diagnostica, inclusi la validazione in ben disegnati studi prospettici e comparativi, con un'analisi dei costi-benefici.

## Bibliografia

1. Alberg A, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). Chest 2007; 132:29S–55S.
2. Alberts MW, Diagnosis and Management of Lung Cancer Executive Summary ACCP Evidence Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition) CHEST 2007; 132:1S–19S.
3. Robbins SL, Cotran RS. Le basi patologiche delle malattie VII ed. Elsevier e Masson, 2006. Vol. 2.
4. Spratt JS, Spratt JA. The prognostic value measuring the gross linear radial growth of pulmonary metastases and primary pulmonary cancers. J Thorac Cardiovasc Surg 1976;71:274-278.
5. Mariuzzi GM,. Anatomia patologica e correlazioni anatomo-cliniche. Piccin, 2006.
6. Califano R, Abidin AZ, Peck R, et al. Management of small cell lung cancer: recent developments for optimal care. Drugs 2012;72:471-490)
7. Fraser RS, Muller NL, Pare PD, et al. Malattie del torace, , Elsevier Milano2006 pg 363-456.
8. Spiro, SG. Il carcinoma polmonare. European respiratory Monograph. 1997, Vol. 1
9. Agudo A, Ahrens W, Benhamou E et al. Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in Europe. Int J Cancer 2000;88:820-827
10. Fraser RS, Muller NL, Parè PD, et al. Malattie del torace, Elsevier Milano 2006, pg 360-454.
11. Picciocchi A, Granone P,. Epidemiologia. Il cancro del polmone. 1999;2:29-44
12. Bonsignore G, Bellia V Malattie dell'apparato respiratorio, Mc Graw Hill 1999
13. James L Mulshine, Frank Cuttitta, Melvyn S Tockman, Luigi M De Luca Lung cancer evolutionto preinvasive management Clinic chest Med 2003 23, 37-48
14. Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, et al. Screening for lung cancer: a review of the current literature. Chest 2003; 123(suppl):72S–82S
15. Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer,1973–1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst 1999; 91:675–690

16. Peter B. Bach, MD, FCCP; Gerard A. Silvestri, MD, FCCP; Morgan Hanger, BA; and James R. Jett, MD, FCCP Screening for Lung Cancer\* ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition) CHEST 2007; 132:69S–77S
17. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med.* 1972 Oct;77(4):507-13
18. Cobben NA, van Belle AF, Pennings HJ, Mulder PG, van Dieijen-Visser MP, Wouters EF, Drent M. Diagnostic value of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in pleural effusions. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997 Jul;35(7):523-8.
19. Pace E, Profita M., Melis M, Bonanno A, Paterno A, Mody C, Spatafora M, Ferraro M, Siena L., Vignola AM, Bonsignore G., Gjomarkaj M. LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space. *Clin Exp Immunol.* Mar 2004; 135(3): 519–527.
20. Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, Liang XD, Jiang J, Yang HB. Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Thorax.* 2008;63:35
21. Shi HZ, Liang QL, Jiang J, Qin XJ, Yang HB. Diagnostic value of carcinoembryonic antigen in malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Respirology.* 2008;13:518–527.
22. Hae-Seong Nam Malignant Pleural Effusion: Medical Approaches for Diagnosis and Management *Tuberc Respir Dis (Seoul).* May 2014; 76(5): 211–217.
23. Shen YC, Liu MQ, Wan C, Chen L, Wang T, Wen FQ. Diagnostic accuracy of vascular endothelial growth factor for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2012;3:1072–1076.
24. Ishimoto O, Saijo Y, Narumi K, Kimura Y, Ebina M, Matsubara N, et al. High level of vascular endothelial growth factor in hemorrhagic pleural effusion of cancer. *Oncology.* 2002;63:70–75.
25. Davies HE, Sadler RS, Bielsa S, Maskell NA, Rahman NM, Davies RJ, et al. Clinical impact and reliability of pleural fluid mesothelin in undiagnosed pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:437–444.

26. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med.* 2012;367:1417–1427.
27. Heffner JE, Nietert PJ, et al Pleural fluid pH as a predictor of survival for patient with malignant pleural effusion. *Chest* 117:79-86,2000
28. Light RW. *Pleural diseases.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013
29. Maskell NA, Butland RJ, Pleural Diseases Group, Standards of Care Committee, British Thoracic Society. BTS guidelines for the investigation of a unilateral pleural effusion in adults. *Thorax* 2003;58(suppl 2):8-17
30. Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J, et al. Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 2001;18:402-19.
31. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. *N Engl J Med* 2002;346:1971-7
32. Zeng Y. and Cullen BR. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA* 2003, 9:175-79.
33. Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon JL. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001, 409:363-366  
31
34. He L. and Hannon G.J. MicroRNAs, small RNAs with a big role in generegulation. *Nat Rev. Genet.* 2004, 5: 522-531
35. Song JJ., Smith SK., Hannon GJ., Joshua-Tor. Crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004, 305:1434-1437
36. Hake S. MicroRNAs: a role in plant development. *Curr. Biol.* 2003, 13:851-52.
37. Bartel D.P. MicroRNAs, genomics biogenesis mechanism and function. *Cell* 2004, 116: 281-297
38. Bentwich I., Avniel A., Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005, 37(7):766-70.
39. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004, 431:350-355
40. Kloosterman W.P. and Plasterk R.H.A. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell*, 2006, 11, 441-450.

41. B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson, "MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors," *Developmental Biology*, vol. 302, no. 1, pp. 1–12, 2007.
42. N. Yanaihara, N. Caplen, E. Bowman et al., "UniquemicroRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 189–198, 2006.
43. H. Osada and T. Takahashi, "let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development," *Cancer Science*, vol. 102, no. 1, pp. 9–17, 2011.
44. J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa et al., "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival," *Cancer Research*, vol. 64, no. 11, pp. 3753–3756, 2004
45. Liu, X. C. Peng, X. L. Zheng, J. Wang, and Y. W. Qin, "MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo," *Lung Cancer*, vol. 66, no. 2, pp. 169–175, 2009.
46. Z. Chen, H. Zeng, Y. Guo et al., "miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 29, no. 1, pp. 151–160, 2010.
47. Cho, A. Chow, and J. Au, "MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1," *RNA Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 125–131, 2011.
48. R. Wang, Z. X. Wang, J. S. Yang, X. Pan, W. De, and L. B. Chen, "MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14)," *Oncogene*, vol. 30, no. 23, pp. 2644–2658, 2011.
49. Y. Hayashita, H. Osada, Y. Tatematsu et al., "A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation," *Cancer Research*, vol. 65, no. 21, pp. 9628–9632, 2005.
50. Y. T. Chou, H. H. Lin, Y. C. Lien et al., "EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF," *Cancer Research*, vol. 70, no. 21, pp. 8822–8831, 2010.
51. M. E. Hatley, D. M. Patrick, M. R. Garcia et al., "Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 282–293, 2010.

52. X. Liu, L. F. Sempere, H. Ouyang et al., "MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 4, pp. 1298–1309, 2010.
53. N. Yanaihara, N. Caplen, E. Bowman et al., "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 189–198, 2006.
54. J. A. Bishop, H. Benjamin, H. Cholkh, A. Chajut, D. P. Clark, and W. H. Westra, "Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 2, pp. 610–619, 2010.
55. S. L. Yu, H. Y. Chen, G. C. Chang et al., "MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 48–57, 2008.
56. W. Gao, Y. Yu, H. Cao et al., "Deregulated expression miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 64, no. 6, pp. 399–408, 2010.
57. A. Navarro, T. Diaz, E. Gallardo et al., "Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 103, no. 5, pp. 411–415, 2011.
58. G. J. Weiss, L. T. Bemis, E. Nakajima et al., "EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines," *Annals of Oncology*, vol. 19, no. 6, pp. 1053–1059, 2008.
59. M. Boeri, C. Verri, D. Conte et al., "MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 9, pp. 3713–3718, 2011.
60. Z. Hu, X. Chen, Y. Zhao et al., "Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 10, pp. 1721–1726, 2010.

61. J. Shen, N. W. Todd, H. Zhang et al., "Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer," *Laboratory Investigation*, vol. 91, no. 4, pp. 579–587, 2011.
62. W. Gao, L. Liu, X. Lu, and Y. Shu, "Circulating microRNAs: possible prediction biomarkers for personalized therapy of non-small-cell lung carcinoma," *Clinical Lung Cancer*, vol. 12, no. 1, pp. 14–17, 2011.
63. L. Yu, N. W. Todd, L. Xing et al., "Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 12, pp. 2870–2878, 2010.
64. Gee V., Koestler C., Christensen C., Sugarbaker J., Ugolini D. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma *Int. J. Cancer*: 127, 2859–2869 (2010)
65. Tsim S, O'Dowd CA, Milroy R, Davidson S. Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Respir Med*. 2010 Dec;104(12):1767-74
66. Nance KV, Shermer RW, Askin FB. Diagnostic efficacy of pleural biopsy as compared with that of pleural fluid examination. *Mod Pathol*. 1991 May;4(3):320-4.
67. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:10513-8.
68. Li Xie, Xi Chen, Lifeng Wang, Xiaoping Qian, Tingting Wang, Jia Wei, Lixia Yu, Yitao Ding, Chenyu Zhang, Baorui Liu Cell-free miRNAs may indicate diagnosis and docetaxel sensitivity of tumor cells in malignant effusions *BMC Cancer* 2010, 10:591
69. Wang T, Lv M, Shen S, Zhou S, Wang P, Chen Y, Liu B, Yu L, Hou Y, Cell-Free MicroRNA Expression Profiles in Malignant Effusion Associated with Patient Survival in Non-Small Cell Lung Cancer *PLoS One*. 2017(8):e432682.
70. Han HS, Yun J, Lim SN, Han JH, Lee KH, Kim ST, Kang MH, Son SM, Lee YM, Choi SY, Yun SJ, Kim WJ, Lee OJ. Downregulation of cell-free miR-198 as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion. *Int J Cancer*. 2013 Aug 1;133(3):645-52
71. Yan LX1, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with

- advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008 Nov;14(11):2348-60
72. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006.
  73. Xie L., Wang T., Yu S., Chen X., Wang L. Quian X., Yu l., Ding Y, Zhang C., Liu B. Cell-free miR-24 and miR-30-d, potential diagnostic biomarkers in malignant effusions *Clinical biochemistry* 2011 (44) : 216-220.
  74. Yu XF1, Zou J, Bao ZJ, Dong J..miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 14;17(42):4711-7
  75. Duregon E, Rapa I, Votta A, Giorcelli J, Daffara F, Terzolo M, Scagliotti GV, Volante M, Papotti M. MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. *Hum Pathol*. 2014 Aug;45(8):1555-62.
  76. Szabó DR, Luconi M, Szabó PM, Tóth M, Szücs N, Horányi J, Nagy Z, Mannelli M, Patócs A, Rácz K, Igaz P. Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab Invest*. 2014 Mar;94(3):331-9.
  77. Patel D, Boufraquech M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E.MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*. 2013 Dec;154(6):1224-8;.
  78. Shen J, Wang A, Wang Q, Gurvich I, Siegel AB, Remotti H, Santella RM.Exploration of genome-wide circulating microRNA in hepatocellular carcinoma: MiR-483-5p as a potential biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Dec;22(12):2364-73.
  79. Wang W, Zhao LJ, Yang Y, Wang RY, Ren H, Zhao P, Zhou WP, Qi ZT.Retinoic acid induced 16 enhances tumorigenesis and serves as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2012 Dec;33(12):2578-85.
  80. Song Q, Xu Y, Yang C, Chen Z, Jia C, Chen J, Zhang Y, Lai P, Fan X, Zhou X, Lin J, Li M, Ma W, Luo S, Bai X.miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung

- adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res.* 2014 Jun 1;74(11):3031-42
81. Qiao Y, Ma N, Wang X, Hui Y, Li F, Xiang Y, Zhou J, Zou C, Jin J, Lv G, Jin H, Gao X. MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett.* 2011 Oct 3;585(19):3095-100.
  82. Liu M, Roth A, Yu M, Morris R, Bersani F, Rivera MN, Lu J, Shioda T, Vasudevan S, Ramaswamy S, Maheswaran S, Diederichs S, Haber DA. The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev.* 2013 Dec 1;27(23):2543-8
  83. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. J miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *Thorac Oncol.* 2011 Mar;6(3):482-8.
  84. Li Q, Li X, Guo Z, Xu F, Xia J, Liu Z, Ren T. MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumor progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer. *PLoS One.* 2012;7(11):e48278.
  85. Ranade AR1, Cherba D, Sridhar S, Richardson P, Webb C, Paripati A, Bowles B, Weiss GJ. MicroRNA 92a-2\*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer *J Thorac Oncol.* 2010 Aug;5(8):1273-8.
  86. Leung YK, Chan QK, Ng CF, Ma FM, Tse HM, To KF, Maranchie J, Ho SM, Lau KM. Hsa-miRNA-765 as a key mediator for inhibiting growth, migration and invasion in fulvestrant-treated prostate cancer. *PLoS One.* 2014 May 16;9(5).
  87. Jia L, Wu J, Zhang L, Chen J, Zhong D, Xu S, Xie C, Cai J. Restoration of miR-1228\* expression suppresses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *PLoS One.* 2013;8(3):e58637.
  88. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, Zhou X, Gan J. A Serum MicroRNA Panel as Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma Related with Hepatitis B Virus. *PLoS One.* 2014 Sep 19;9(9):e107986.
  89. Gopalan V, Pillai S, Ebrahimi F, Salajegheh A, Lam TC, Le TK, Langsford N, Ho YH, Smith RA, Lam AK. Regulation of microRNA-1288 in colorectal cancer: altered expression and its clinicopathological significance. *Mol Carcinog.* 2014 Feb;53 Suppl 1:E36-44.

