



**LEGA ITALIANA PER LA LOTTA CONTRO I TUMORI – ENTE PUBBLICO
SEZIONE PROVINCIALE DI CATANIA**

Indirizzo: Hospice - Cure Palliative "Giovanni Paolo II" Nuovo Ospedale Garibaldi – Nesima
Via Palermo, 632 – 95122 CATANIA Tel./Fax: 0957598457 - C.F.: 03994720872
email: legatumoricatania@gmail.com

**Alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori
Via Alessandro Torlonia, 15
00161 – Roma**

Piano di lavoro progettuale

Il sottoscritto **Dr. Romano Carlo**, in qualità di Presidente della Sezione Provinciale di Catania con sede legale a Catania Via Palermo, 632, C.F. 03994720872, intende richiedere alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sede Centrale – un finanziamento nell'ambito del "programma 5 per mille anno 2012" tramite il predisposto "piano di lavoro progettuale".

Titolo del Progetto: **Analisi di microRNA circolanti nella diagnosi precoce del cancro della vescica**

Area tematica di ricerca (come individuate nel bando)
Area Tematica B: Prevenzione secondaria: implementazione di nuove tecnologie nella diagnosi precoce e nella terapia dei tumori.

Durata: Annuale Biennale

Costo finanziato con fondi oggetto del bando di ricerca sanitaria 2014 LILT: € 150.000	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € --
-----------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------

Responsabile del Progetto con indicazione espressa dell'indirizzo di posta elettronica:
Prof. Massimo Libra, email: mlibra@unict.it

Sinossi del Progetto / Premesse e razionalità

Il tumore della vescica rappresenta circa il 7% di tutti i tumori e, in urologia, è secondo solo al tumore della prostata. È più comune tra i 60 e i 70 anni, ed è tre volte più frequente negli uomini che nelle donne. Alla diagnosi, il tumore della vescica è superficiale nell'85% dei casi, infiltrante nel 15%. Secondo i dati del Registro Tumori, in Italia nel 2012 sono stati diagnosticati circa 24.500 casi di tumore vescicale, considerando sia le forme infiltranti sia quelle superficiali.

I fattori di rischio per il tumore della vescica, fino ad ora individuati, sono: il fumo di sigaretta (che costituisce il principale fattore di rischio), l'esposizione cronica alle amine aromatiche e nitrosamine (frequente nei lavoratori dell'industria tessile, dei coloranti, della gomma e del cuoio). Anche la dieta gioca un ruolo importante: frittture e grassi consumati in grande quantità sono infatti associati a un aumentato rischio di ammalarsi di tumore della vescica.

La diagnosi precoce può consentire la guarigione nella maggior parte dei pazienti. Sfortunatamente ad oggi non sono stati identificati marcatori specifici per questo tumore. Sebbene il tumore della vescica presenti una bassa mortalità, la percentuale di recidive rimane elevata e i pazienti dovranno essere sottoposti a ripetute indagini diagnostiche durante il periodo di follow-up (Sylvester RJ et al, 2006; Bueth DD et al, 2011). La cistoscopia è la tecnica diagnostica più diffusa e accurata nel follow-up del cancro della vescica, tuttavia si tratta di una tecnica invasiva, costosa e poco tollerata dai pazienti (Botteman MF et al, 2003; Yabroff KR et al, 2011). L'esame citologico delle urine rappresenta un metodo di monitoraggio non invasivo spesso utilizzato nel follow-up del cancro della vescica, tuttavia appare essere poco sensibile soprattutto per i tumori di basso grado (Lokeshwar VB et al, 2005).

La ricerca di nuovi marcatori per la diagnosi precoce e/o per l'individuazione di pazienti ad alto rischio di recidiva è di fondamentale importanza per ridurre il numero di esami cistoscopici soprattutto nei soggetti definiti a basso rischio. Attualmente la ricerca punta alla scoperta di nuovi marcatori dotati di alta specificità e sensibilità che permettano di identificare lesioni precoci attraverso lo studio di pathway di aggressività tumorale. Una delle indicazioni più precoci dell'aggressività tumorale è la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), un evento cruciale nella progressione della malignità (Contreras HR et al, 2009). La comprensione di questo fenomeno permette di chiarire i meccanismi che controllano la progressione tumorale. In questo contesto, di grande rilevanza sono i marcatori rilasciati nel sangue, che eviterebbero l'uso di metodiche invasive per il paziente. Tra questi, i microRNAs (miRNA) circolanti giocano un ruolo di rilievo nello sviluppo del cancro. Essi sono costituiti da piccole molecole di RNA non codificanti, che regolano l'espressione genica inibendo la traduzione dell'mRNA o facilitando il clivaggio dell'mRNA target. Essi possono essere determinati nel plasma perché rilasciati in circolo dalle cellule tumorali circolanti (CTCs) (Tormoen GW et al, 2012). Queste sono cellule che vengono rilasciate dal tumore primario e circolano nel sangue. Esse costituiscono quindi "i semi" per il successivo sviluppo di metastasi a distanza. E' noto che gli stili di vita, l'esposizione ambientale e le abitudini alimentari si associano a cambiamenti molecolari che alterano il segnale cellulare. Questi comprendono le variazioni di espressione dei miRNA.

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca si è impegnato a studiare il ruolo dei microRNAs (miRNA) in diversi tumori umani (Leonardi et al, 2012; Bagnoli et al, 2011). I miRNAs possono essere isolati dagli exosomi, piccole vescicole rilasciate da diversi tipi di cellule, comprese quelle tumorali (Valadi H et al, 2007; Khan S et al, 2014). Queste vescicole conferiscono stabilità ai miRNA e, trasportandoli in cellule riceventi, ne modificano l'espressione genica. Inoltre agiscono come regolatori del microambiente tumorale che è

implicato nella progressione del tumore (Redis RS et al, 2012). Gli exosomi possono essere facilmente purificati da colture cellulari e da liquidi biologici quali plasma/siero, saliva ed urina (Muller L et al, 2014). Sulla base di queste premesse, è nato l'interesse di studiare il ruolo dei miRNAs nello sviluppo del cancro della vescica.

In particolare, gli obiettivi del presente progetto sono:

- a) individuare i microRNA circolanti coinvolti nello sviluppo del tumore alla vescica per utilizzarli come biomarcatori di diagnosi precoce e come essi variano rispetto ai controlli;
- b) analisi della variazione dei livelli di espressione dei miRNAs plasmatici associati agli stili di vita, abitudini alimentari ed esposizione ambientale;
- c) identificazione di miRNAs e loro variazione rispetto agli stadi della malattia

Il presente progetto si avvarrà di uno studio caso-controllo multicentrico sul cancro della vescica, condotto nelle provincie di Pordenone, Napoli/Caserta e Catania e già iniziato nel 2009 che si concluderà nel 2015. Lo studio fino ad oggi ha arruolato 340 pazienti con cancro incidente della vescica e altrettanti controlli ricoverati per patologie non oncologiche e non cronico-degenerative.

Piano di lavoro progettuale (articolazione del progetto e tempi di realizzazione, non superiori a 24 mesi dalla data di approvazione del progetto)

Il progetto sarà suddiviso nelle seguenti tasks:

Task 1: Completamento del reclutamento e interviste a casi e controlli (mesi 1-12):

Pazienti: I pazienti saranno reclutati presso le unità di urologia degli ospedali di Catania, Pordenone-Aviano, Napoli-Caserta. Tutti i pazienti dovranno avere diagnosi incidente di cancro della vescica con età compresa tra i 40 e 80 anni.

Controlli: Saranno rappresentati da soggetti ospedalizzati presso gli stessi ospedali dove sono stati reclutati i casi e verranno accoppiati per quinquenni di età. La causa del ricovero deve essere diversa da patologie neoplastiche o malattie cronico-degenerative.

Intervista: A tutti i casi e controlli verrà somministrato un questionario validato per valutare le abitudini alimentari, esposizione ambientale e lavorativa, abitudini al fumo e all'alcool.

Consenso informato e Comitato etico: Ai pazienti e ai controlli sarà letto e consegnato un foglio di consenso informato dove sono spiegati dettagliatamente gli scopi dello studio e se accetteranno di partecipare dovranno firmare lo stesso foglio. Il protocollo dello studio e il foglio di consenso informato saranno sottoposti al Comitato Etico di ciascun Ente partecipante per l'approvazione.

Raccolta dei campioni biologici: Ai pazienti e ai controlli che avranno firmato il consenso informato per partecipare allo studio verrà programmato un prelievo di 10 ml di sangue periferico che sarà eseguito da un medico o un infermiere di reparto durante la routine dei prelievi. Il sangue raccolto da ciascun centro, dopo averlo suddiviso in due provette di cui una con anticoagulante, sarà centrifugato (3100rpm x 10') per recuperare il siero e il plasma che verranno aliquotati e conservati in un congelatore a -80°C fino all'analisi. Successivamente i campioni di materiale biologico saranno trasferiti, a intervalli di tempo regolari, al Centro Coordinatore (Catania) che provvederà al loro utilizzo.

I laboratori dove verrà svolta l'analisi dei miRNA sono allocati presso i locali del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università di Catania. Tali laboratori sono propri della LILT e regolati da una convenzione tra la Sezione Provinciale della LILT di Catania e l'Università di Catania (vedi allegato).

Task 2: Analisi di miRNAs circolanti (Mesi 1-12):

Questa task verrà organizzata in due fasi per valutare i diversi profili di miRNAs nei casi e controlli

Task 2a: Nella prima fase verranno selezionati in maniera casuale 48 campioni di plasma (24 casi e 24 controlli) per l'analisi che verrà effettuata mediante lo Human Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array (Qiagen). Ciò permetterà di identificare i profili di espressione di 84 miRNAs nei due gruppi (casi e controlli)

Task 2b: Nella seconda fase la verifica dell'espressione di tali miRNAs sarà estesa a tutti i campioni di plasma, compresi i 48 campioni precedentemente studiati, mediante RT-qPCR indipendenti.

Task 3 - Purificazione degli exo-RNA e analisi dei microRNAs esosomiali circolanti (Mesi 13-18):

Il contenuto degli esosomi varia a seconda della cellula di origine, quindi per poter meglio comprendere la loro rilevanza funzionale e il loro contenuto è necessario effettuare un adeguato isolamento ed un efficace purificazione.

Tale task comprende 5 sub-tasks:

Task 3a - Purificazione degli exo-RNA circolanti: Per isolare in maniera efficace l'RNA dagli esosomi provenienti dai 48 campioni selezionati nella Task 2 verrà utilizzato il kit della Qiagen "ExoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit".

Task 3b - Analisi dei microRNAs esosomiali circolanti: I miRNAs identificati nella Task 2 verranno analizzati sull'RNA esosomiale isolato nella Task 3a.

Task 3c - Validazione dei pattern di espressione dei miRNAs nei campioni tumorali (solo casi): I microRNAs verranno estratti da una frazione di campioni tumorali archiviali per confermare che i miRNAs circolanti identificati nella task 3b abbiano origine dal tumore primitivo.

Task 3d - Pattern di espressione di miRNAs che identificano un gruppo specifico di geni associato al cancro della vescica rispetto ai controlli: Per poter predire quali geni possono essere target dei miRNAs già identificati nelle tasks 2 e 3b, verranno utilizzati dei software bioinformatici. Tramite analisi eseguite col "gene set enrichment analysis" (GSEA), verranno identificati i pathway associati ai geni di interesse.

Task 3e - miRNA e transizione epitelio-mesenchimale (EMT): Saranno utilizzati datasets pubblici disponibili on line per identificare i pathway coinvolti nella transizione epitelio-mesenchimale. Sarà effettuata un'analisi comparativa dell'espressione dei master gens regolatori di EMT. Tali geni saranno quindi valutati mediante qRT-PCR e IHC sulla serie selezionata archiviale tumorale per valutare il loro valore prognostico in base alle caratteristiche cliniche e stili di vita. I miRNAs validati nella task 3c saranno analizzati con approcci in silico (Miranda, miRBase, TargetScan) per valutare se i geni di EMT sono compresi tra i geni bersaglio presunti. I miRNA qui identificati e i loro geni bersaglio saranno analizzati nel tessuto tumorale, positivo per marcatori mesenchimali canonici, come Vimentina e N-caderina. La valutazione di markers di transizione epitelio-mesenchimale sarà effettuata con IHC seguita da laser micro-dissezione.

Task 4 - Valutazione del rischio di sviluppo di tumore della vescica in base all'espressione di miRNAs circolanti (mesi 19-24):

Il rischio sarà valutato con metodi statistici appropriati, in base all'espressione dei miRNAs unitamente all'analisi di altri fattori presi in considerazione nel questionario e a parametri

clinici (tipo di tumore, stadiazione, ecc.). Saranno calcolati l'Odds ratio e gli intervalli di confidenza al 95% tramite dei modelli di regressione logistica, tenendo conto del sesso, dell'età, dell'uso di sigarette ed altri fattori di rischio noti come descritto precedentemente (Polesel J et al, 2014).

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza agli approcci con elevato livello di trasferibilità sociale, in particolare all'interno del SSN

I risultati del progetto potranno avere importanti implicazioni sulla prevenzione secondaria del tumore della vescica individuando marcatori precoci e specifici, nonché marcatori di rischio evolutivo verso forme ad elevata aggressività. Recentemente, la scoperta di miRNAs extracellulari relativamente stabili nel siero e nel plasma ha generato un notevole interesse, in quanto variazioni nei loro livelli di espressione possono essere utilizzati come biomarcatori non invasivi per diversi tipi di malattie. Inoltre la disponibilità di biomarcatori validati, meno invasivi e più economici rispetto ad altri metodi diagnostici, potrebbe assumere una notevole importanza per il miglioramento della salute pubblica, rendendo i pazienti più favorevoli a sottoporsi al follow-up riducendo i costi della spesa sanitaria. Infine l'identificazione dei geni bersaglio a cui si legano i miRNAs selezionati potrebbe fornire ulteriori indicazioni riguardo i meccanismi di progressione della patologia tumorale. I risultati pertanto avranno un forte ricaduta per il SSN sia in termini di risparmio di risorse sia in termini di aumento dell'efficacia delle procedure diagnostico-terapeutiche per il cancro della vescica.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza riguardo lo sviluppo di reti collaborative fra le Sezioni LILT e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca

La divulgazione dei risultati delle nostre ricerche sarà valutata criticamente e seguita con professionalità, con l'obiettivo finale di portare un reale contributo al controllo del cancro e del suo impatto sulla salute della nostra popolazione. A questo proposito, è prevista un'interazione stretta con l'attività divulgativa e di prevenzione svolta dalla sezione provinciale della Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori di Catania e con quella operata dal territorio.

Specificatamente, i risultati del presente studio implementeranno lo sviluppo di reti collaborative sia tra le Sezioni della LILT che con altri enti quali le strutture sanitarie territoriali, gli enti di ricerca, nonché le strutture oncologiche. Infatti, uno degli obiettivi della nostra sede è quello di proporre ed estendere, nel prossimo futuro, la ricerca di questi marcatori a tutti i soggetti che si avvicinano allo screening nonché a coloro che hanno già diagnosi di cancro della vescica per il monitoraggio della recidiva. La rete collaborativa posta in essere tra sezioni LILT ed enti di ricerca accreditati favorirà l'acquisizione di nuove e corrette conoscenze da parte del personale dei volontari delle sezioni della LILT e attraverso le sinergie di competenze diverse favorirà la corretta diffusione delle informazioni alla popolazione anche attraverso l'attivazione di dibattiti e conferenze nelle scuole e nei luoghi di lavoro. Sarà cura del Presidente della sezione della LILT di Catania prendere contatti con le unità di screening e con gli altri enti per la trasferibilità dei nostri dati.

Sezioni LILT

Sezione provinciale della LILT di Catania
Sezione provinciale della LILT di Caserta
Sezione provinciale della LILT di Napoli

Altre Strutture

Università di Catania
Azienda Sanitaria Provinciale Catania
Istituto Nazionale Tumori Pascale di Napoli
Centro di Riferimento Oncologico di Aviano

Enti (partner) coinvolti nel progetto (specificando ruolo ente e relativo responsabile - esempio Mario Bianchi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, unità operativa):

- Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche – Sezione di Patologia generale e clinica e Oncologia: **Prof. Massimo Libra**, Prof. Associato e responsabile del laboratorio di ricerca della LILT di Catania
- Azienda Sanitaria Provinciale Catania: **Dr. Aurora Scalisi**, Direttore Unità di Malattie Oncologiche
- Istituto Nazionale Tumori Pascale: **Dr. Gaetano Facchini**, Dirigente medico SOC di Oncologia Medica Uro-Ginecologica
- Centro di Riferimento Oncologico di Aviano: **Dr. Jerry Polesel**, Dirigente statistico SOC di Epidemiologia e biostatistica

Estremi per ricevere il finanziamento:

Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori Sezione Provinciale di Catania
Banca BNL Agenzia 2 di Catania; IBAN: IT10P0100516902000000009952

Costo complessivo del Progetto articolato per voci di spesa

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
N. 3 Borsisti (Biologi/medici/statistici)	Euro 45.000	Euro 45.000
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	-	-
Materiale d'uso destinato alla ricerca (reagenti di biologica molecolare e consumabili)	Euro 75.000	Euro 75.000
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	Euro 15.000	Euro 15.000
Elaborazione dati	Euro 5.000	Euro 5.000
Spese amministrative	-	-
Altro (Spese di pubblicazione e stampa opuscoli)	Euro 10.000	Euro 10.000
TOTALE	Euro 150.000	Euro 150.000

Alla presente proposta si allega:

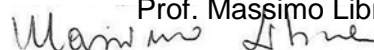
- Il curriculum vitae del Responsabile del progetto di ricerca e dei Responsabili di eventuali enti partecipanti al medesimo;
- La convenzione tra la LILT di Catania e l'Università di Catania.

In fede,

Il Presidente della Sezione Provinciale di Catania
Dr. Carlo Romano



Il Responsabile del progetto
Prof. Massimo Libra



Catania, 25 novembre 2014