



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari
Sezione di Patologia Sperimentale e del Lavoro

Corso di Dottorato di Ricerca
in “Salute dell’Uomo” – XV Ciclo

**RUOLO DEI microRNA NELLA PATOGENESI DEL MESOTELIOMA
MALIGNO: UN APPROCCIO BASATO SULLE “EVIDENZE
SCIENTIFICHE” E SULL’ANALISI COMPUTAZIONALE**

Dottoranda: *Dott.ssa Luigina Micolucci*

Tutor: *Prof.ssa Fabiola Olivieri*

Supervisore: *Prof. Antonio Domenico Procopio*

Coordinatore: *Prof. Saverio Cinti*

Triennio 2013 - 2016

INDICE

SOMMARIO	2
ABSTRACT	5
Lista delle pubblicazioni.....	6
1. Introduzione Generale.....	8
1.1. L'esposizione ad amianto e i rischi per la salute	8
1.2.1. Mesotelioma maligno (MM): eziopatogenesi e caratteristiche cliniche	10
1.2. I microRNA	12
1.2.1. Biogenesi e funzione dei miRNA	13
1.2.2. Potenzialità dei microRNA nella pratica clinica	15
1.2.3. microRNAs e tumori	16
1.3. MicroRNA e mesotelioma maligno.....	19
1.4. Principi dell'analisi secondaria della letteratura.....	20
1.4.1. Differenze tra rassegne sistematiche, meta-analisi e rassegne narrative della ricerca.....	20
1.4.2. Progettazione di una Revisione sistematica.....	24
1.5. Elementi di analisi bioinformatica applicata ai microrna	25
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA	28
3. MATERIALI E METODI	31
3.1. Conduzione della revisione sistematica della letteratura e meta-analisi dei dati.....	31
3.1.1. Ricerca della letteratura primaria e screening delle fonti	31
3.1.2. Valutazione dei potenziali rischi di bias nel processo di revisione	33
3.1.3. Estrazione e ranking dei dati.....	33
3.1.4. Valutazione dei miRNA tramite "Vote-counting".....	35
3.1.4.1. Dettagli sulla strategia di conteggio dei voti appositamente ideata per l'analisi dei miRNAs in assenza di raw data.	35
3.2. Valutazione dell'accuratezza diagnostica dei miRNA nel MM	38
3.3. Analisi del potenziale valore diagnostico dei miRNA e valutazione funzionale.....	39
3.4. strumenti per l'analisi bioinformatica di target, pathways e network modulati dai MIRNA	40
3.5. Analisi sperimentale	41
3.5.1. Campioni analizzati	41
• Preparati istologici.....	41
• Campioni tissutali freschi e allestimento delle colture cellulari primarie.....	43
• Condizioni di crescita	44
3.5.2. Estrazione dei MicroRNA	44

3.5.3.	Analisi del profilo di espressione dei miRNA tramite <i>microarray</i>	45
3.5.4.	Validazione dei dati in <i>Real-Time PCR</i>	46
3.5.5.	Analisi statistiche.....	48
4.	RISULTATI.....	51
4.1.	rassegna sistematica della letteratura.....	51
4.1.1.	I miRNA associati al MM: stato dell'arte.....	51
4.1.2.	Identificazione dei miRNA caratteristici del MM e dell'esposizione ad amianto.....	57
4.1.2.1.	Ricerca dei microRNAs strettamente correlati al MM	59
4.1.2.2.	Valutazione del potenziale diagnostico dei miRNA tissutali e circolanti associati al MM	66
4.1.2.3.	Functional and statistical evaluation of the most significant circulating mm miRNAs	75
4.2.	Analisi dei target dei microRNA più significativi identificati dalla rassegna sistematica	78
4.3.	analisi sperimentale dei mirna nel mm	81
4.3.1.	Analisi del profilo di espressione dei miRNA nel MM:	82
5.	DISCUSSIONE	89
5.1.	La signature dei microRNAs associati a MM in campioni tissutali	90
5.2.	Circulating miRNAs as biomarkers in MM and asbestos-exposed patients.....	94
5.3.	MM-MIRNA E POSSIBILI APPLICAZIONI CLINICHE	98
5.4.	DISCUSSIONE DEI DATI SPERIMENTALI	102
6.	CONCLUSIONI ed implicazioni future	105
7.	BIBLIOGRAFIA	106
8.	MATERIALI SUPPLEMENTARI.....	127

SOMMARIO

I MicroRNA (miRNAs) sono dei piccoli RNA non codificanti in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Essi hanno un ruolo fondamentale nei più svariati processi cellulari. L'espressione aberrante dei miRNA è stata correlata alla patogenesi di numerose neoplasie compreso il Mesotelioma Maligno (MM), un tumore letale correlato all'esposizione ad amianto, resistente alle terapie ad oggi disponibili. In questo studio sono state condotte una rassegna sistematica della letteratura ed una meta-analisi qualitativa per cercare di identificare i miRNA rilevanti nella diagnosi precoce del MM. E' stato identificato un gruppo di miRNA MM-associati caratterizzati da una potenziale rilevanza clinica. Essi sono stati definiti "mesomiRs" e comprendono i miR-126-3p, miR-103a-3p, miR-625-3p, circolanti ed i miR-16-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-652-3p, tissutali. I mesomiRs sono stati sottoposti ad analisi bioinformatica e funzionale per individuare sia il loro ruolo giocato nella deregolazione delle vie di trasduzione del segnale alla base della patogenesi del MM, sia il loro potenziale diagnostico.

In una seconda fase del lavoro, lo studio si è focalizzato sull'allestimento di un metodo sperimentale per analizzare i miRNA differenzialmente espressi tra campioni di MM tissutali e cellulari, e controlli sani. Il miR-214 si è rivelato come il più down-regolato nei campioni patologici rispetto ai controlli. L'analisi in silico di predizione dei target, corroborata dal confronto dei dati sperimentali in letteratura, ha portato all'identificazione della proteina EZH2 come target verosimile del miR-214. Questi sono la base per ulteriori studi sulle specifiche interazioni miRNA-target e i dati forniscono nuove evidenze per lo sviluppo di futuri agenti terapeutici.

Questo lavoro dimostra inoltre che un approccio di data-mining ben progettato, affiancato dall'analisi bioinformatica, può svelare informazioni interessanti sui meccanismi alla base della patogenesi del MM e delle patologie dovute all'esposizione all'amianto.

ABSTRACT

A Knowledge-Based Approach And Bioinformatic Analysis To Highlight The Role Of MicroRNAs In The Pathogenesis Of Malignant Mesothelioma

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, non-coding, small RNAs able to modulate gene expression at post-transcriptional level with a fundamental role in multiple cellular processes and regulatory pathways. Aberrantly expressed miRNAs have been correlated to the pathogenesis of numerous cancers including Malignant mesothelioma (MM). MM is an asbestos-related lethal cancer, poorly responsive to current treatments. In this study, a systematic review and a qualitative meta-analysis has been performed to identify miRNA with potential clinical relevance as early biomarkers. Notably, a group of high-confidence MM-associated miRNAs has been identified and called mesomiRs, namely circulating miR-126-3p, miR-103a-3p, and miR-625-3p, and tissue miR-16-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, and miR-652-3p. Subsequently, they were then subjected to bioinformatic analysis to predict their role in the disruption of key pathways involved in the pathogenesis of MM, and functional investigation confirmed their early diagnostic value. In a second step of analysis, this study focused on the establishment of an experimental method for determining differentially expressed miRNAs between MM samples and controls. MiR-214 has been highlighted as the most downregulated miRNA in MM specimens in comparison to the control group. Finally, the combination of in silico target prediction analysis and empirical target data, has allowed the identification of EZH2, among others, as a key target gene involved in malignant transformation. These findings provide new evidence-based knowledge for cancer drug discovery. Further studies are necessary to investigate the role of miRNA-target interactions in the disruption of key signaling pathways identified. Here we demonstrated that a well settled data mining approach and bioinformatic analysis might disclose the most reliable microRNA-gene target interactions having key role in the pathogenesis of MM.

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

Pubblcazioni incluse nella tesi:

- **Diagnostic value of microRNAs in asbestos exposure and malignant mesothelioma: systematic review and qualitative meta-analysis.** Micolucci L, Akhtar MM, Olivieri F, Rippo MR, Procopio AD. *Oncotarget*. 2016 Jun 1. doi: 10.18632/oncotarget.9686. [Epub ahead of print] Review.
- **Bioinformatic tools for microRNA dissection.** Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 8;44(1):24-44. doi: 10.1093/nar/gkv1221. Review.

Lavori correlati alla tesi ma non inclusi:

- **Invited commentary on diagnostic value of miRNAs in asbestos exposure.** Micolucci L, Procopio AD. *BioScience Trend Journal* – In preparazione.

Pubblcazioni non strettamente correlate alla tesi:

- **Leukocyte telomere length and mortality risk in patients with type 2 diabetes.** Bonfigli AR, Spazzafumo L, Prattichizzo F, Bonafè M, Mensà E, Micolucci L, Giuliani A, Fabbietti P, Testa R, Boemi M, Lattanzio F, Olivieri F. *Oncotarget*. 2016 Jul 15. doi: 10.18632/oncotarget.10615. [Epub ahead of print]
- **MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications.** Olivieri F, Spazzafumo L, Bonafè M, Recchioni R, Prattichizzo F, Marcheselli F, Micolucci L, Mensà E, Giuliani A, Santini G, Gobbi M, Lazzarini R, Boemi M, Testa R, Antonicelli R, Procopio AD, Bonfigli AR. *Oncotarget*. 2015 Nov 3;6(34):35372-82. doi: 10.18632/oncotarget.6164.
- **Crosstalk between NF-kB and responsive miRNAs: role in inflammaging and age-related diseases.** Micolucci L, Marsico A, Procopio AD, Olivieri F. – In preparazione.

1. INTRODUZIONE GENERALE

1.1 L'ESPOSIZIONE AD AMIANTO E I RISCHI PER LA SALUTE

“L’amianto” (o asbesto) è un termine generico per indicare un gruppo di silicati cristallini naturali che sono stati classificati dall’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come “cancerogeni per l’uomo (gruppo 1)” [IARC, 2012]. Questi minerali caratterizzati da costi di produzione particolarmente economici, sono stati utilizzati in quantità straordinarie per decenni in una varietà di applicazioni industriali di piccole e grandi dimensioni in tutto il mondo [LaDou J, 2004; Frank AL and Joshi TK, 2014]. L’esposizione professionale ad amianto è stata a lungo considerata la causa che conduce al più alto rischio di sviluppare malattie amianto-correlate, qui di seguito indicate con l’acronimo ARDS (*Asbestos-Related Diseases*). Gli ARDS sono caratterizzati da una progressione lenta ed insidiosa e la loro continua insorgenza indica che il divieto di produzione di amianto ed uso di amianto e suoi derivati e l’adozione negli ultimi decenni di programmi di abbattimento dell’amianto non hanno ancora eliminato il rischio di sviluppare ARDS [Frank AL and Joshi TK, 2014; Nishikawa K *et al.*, 2008]. Inoltre, poiché non esiste un livello di esposizione sicuro, anche solo vivere vicino a centrali che producono ed utilizzano l’amianto, comporta un rischio elevato per la salute [Frank AL and Joshi TK, 2014; Frank AL and Joshi TK, 2014; Marinaccio A *et al.*, 2015]. Attualmente lavori di riparazione, restauro e demolizione di edifici contenenti amianto rappresentano una importante minaccia per la contaminazione del suolo, l’inquinamento ambientale e soprattutto per gli operatori a seguito dell’esposizione alle polveri [Marinaccio A *et al.*, 2015; Gwinn MR *et al.*, 2010]. I lavoratori stessi possono poi contaminare le loro case ed automobili, aumentando il rischio di esposizione per familiari e conviventi [Frank AL and Joshi TK, 2014]. Le fibre aerodisperse e le attività ricreative come la corsa, l’equitazione e l’uso di veicoli fuoristrada che smuovo gli strati superficiali del suolo inquinato sono ulteriori fonti di rischio per la salute [Frank AL and Joshi TK, 2014; Gwinn MR *et al.*, 2010]. Sebbene i regolamenti vigenti riguardano solo sei

fibre minerali commercializzate, tra cui l'actinolite, l'amosite, l'antofillite, il crisotilo, la crocidolite e la tremolite [Baumann F *et al.*, 2013], diverse altre fibre minerali presenti nell'ambiente sono coinvolti nello sviluppo ARD. Un esempio è l'erionite, appartenente al gruppo delle zeoliti, la cui attività cancerogena è ancora maggiore rispetto a quella del crisotilo e dell' amianto crocidolite [Baumann F *et al.*, 2013; Carbone M *et al.*, 2011].

L'esposizione all'amianto fa sì che le fibre minerali aerodisperse vengano inalate ed in seguito al loro accumulo nei polmoni, causano una serie di effetti avversi che includono la produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), danni cromosomici, danni a livello dei meccanismi mitotici, mutazioni genetiche, alterazioni del *signaling* dei fattori di crescita, difetti nel meccanismo apoptotico, la deregolazione dello stato di metilazione, infiammazione cronica, fagocitosi ed infine l'espressione di microRNA (miRNA, miR) aberranti [Gwinn MR *et al.*, 2010; Benedetti S *et al.*, 2015]. Nel parenchima polmonare, l'amianto può causare diverse malattie infiammatorie croniche non tumorali. Queste condizioni patologiche possono essere caratterizzate da fibrosi e definite col termine "asbestosi", oppure l'accumulo delle fibre di amianto può portare alla formazione dei cosiddetti "corpi di amianto" o più frequentemente indicati con il termine inglese "*asbestos bodies*". Queste strutture nascono dalla deposizione attorno alle fibre di proteine che trasportano ferro e mucopolisaccaridi e si tratta di un tentativo da parte dei macrofagi polmonari di isolare i corpi estranei [Benedetti S *et al.*, 2015; Yusa T *et al.*, 2015]. Inoltre le fibre inglobate nel parenchima possono causare anomali versamenti e la formazione di placche pleuriche, ossia ispessimenti focali asintomatici che rappresentano il segno inequivocabile di esposizione ad amianto [Elshazley M *et al.*, 2011], mentre le fibre intrappolate tra gli strati della pleura e la parete della cavità toracica hanno la capacità di indurre stress ossidativo e infiammazione cronica, favorendo in tal modo la cancerogenesi [Benedetti S *et al.*, 2015]. Inoltre, evidenze molto recenti indicano che l'amianto provoca il rilascio del *High Mobility Group Box Protein-1* (HMGB1), in grado di guidare il processo infiammatorio cronico che porta alla fibrosi e alla cancerogenesi [Napolitano A *et al.*, 2016].

L'esposizione ad amianto può infine condurre a patologie di tipo tumorale tra cui mesotelioma

pleurico, mesotelioma peritoneale e, seppur raramente, mesotelioma delle altre superfici mesoteliali e carcinoma broncogeno [Benedetti S *et al.*, 2015; Yusa T *et al.*, 2015; de Assis LVM *et al.*, 2014; Norbert C *et al.*, 2015]. E' stato stimato che un'esposizione cumulativa di circa 25 fibre/anno può raddoppiare il rischio di insorgenza di cancro al polmone [Consensus Report 1997]. Tuttavia, è estremamente difficile determinare il livello di esposizione amianto in questi termini. Gli attuali programmi di sorveglianza sono infatti basati sia sulla valutazione dell'esposizione cumulativa, stimata grazie all'utilizzo di appositi questionari lavoro-specifici, sia sulla rilevazione radiografica di placche e/o asbestosi a livello pleurico [Yusa T *et al.*, 2015; Cullen MR *et al.*, 2005; Pass HI *et al.*, 2005].

1.2.1 Mesotelioma maligno (MM): eziopatogenesi e caratteristiche cliniche

Il mesotelioma maligno (MM) è un tumore aggressivo e letale che deriva dalla trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali della pleura (80-90%), del peritoneo (10-15%) e, seppur molto raramente, della cavità pericardica (<5%) [Delgermaa V *et al.*, 2011]. La sua lunga latenza ($\geq 30-60$ anni) [Yang H *et al.*, 2008] e i sintomi non specifici conducono spesso ad una diagnosi tardiva che cela una limitata sopravvivenza [Ahmed I *et al.*, 2013]. Il MM è compreso tra i pochi tumori che sono stati causalmente correlati all'esposizione ad amianto, erionite [Baumann F *et al.*, 2013; Carbone M *et al.*, 2011], radiazioni ionizzanti [Gwinn MR *et al.*, 2010] e al Simian Virus 40 (SV40), detto anche "virus vacuolizzante della scimmia". Quest'ultimo è un virus a DNA appartenente ai polyomavirus ritrovato sia nella scimmia che nell'uomo e sembra essere un agente co-cancerogeno in seguito ad esposizione all'amianto [Carbone M, 200; Carbone M, 1999; Gazdar AF *et al.*, 2003; Bocchetta M *et al.*, 2008; Carbone M *et al.*, 2008]. Il MM è stato relativamente poco comune fino alla seconda metà del 20 ° secolo [Yang H *et al.*, 2008; Stahel RA *et al.*, 2010]. In seguito la sua incidenza ha cominciato a salire in molti paesi industrializzati [Porpodis K *et al.*, 2013] e si prevede un picco tra il 2015 e il 2025 [Ahmed I *et al.*, 2013]. Tuttavia, dato l'uso intenso e diffuso di amianto in tutto il mondo, il

rischio per la salute legato all'esposizione potrebbe essere attualmente sottovalutato [Bianchi C *et al.*, 2014]. A livello globale, si crede che un caso di MM ogni quattro/cinque potrebbe essere non dichiarato portando ad una sottostima dell'incidenza [Park EK *et al.*, 2011]. Una recente valutazione ha attribuito circa il 25% di tutti i casi di MM all'esposizione di tipo professionale, il 25% ad esposizione familiare e il 50% ad esposizione ambientale [Mensi C *et al.*, 2015]. Generalmente i pazienti con una storia di esposizione di tipo professionale hanno un'età media di 74 anni sono per lo più uomini, mentre la distribuzione dei casi appartenenti ad un'età media inferiore (<40 anni) è simile per entrambi i sessi ed è probabilmente legata ad una esposizione di tipo ambientale [Baumann F *et al.*, 2015]. In questi ultimi soggetti, il MM, il melanoma uveale e altri tumori sono stati legati anche a fattori genetici predisponenti come mutazioni a carico della linea germinale nel gene che codifica per BRCA1 associated protein-1 (BAP1) [Testa JR *et al.*, 2015]. Inoltre, una crescente quantità di evidenze scientifiche sta evidenziando la correlazione tra l'insorgenza di MM e lo sviluppo urbano nelle zone rurali della Cappadocia, North Dakota, Nevada e la Nuova Caledonia in seguito a contaminazione da amianto ed erionite [Baumann F *et al.*, 2013].

La diagnosi definitiva di tumore maligno della pleura richiede indagini estremamente invasive e si basa essenzialmente sull'analisi istologica ed immunohistochimica di biopsie pleuriche. La diagnosi differenziale per distinguere il MM da proliferazioni benigne e da altre proliferazioni di tipo tumorale è molto complessa, così come la caratterizzazione istologica nei diversi sottotipi: epitelioide (50-60% dei casi), sarcomatoide (10-20%), bifasico (25-35%), ed altri meno comuni [Rippo MR *et al.*, 2004]. La gestione del paziente affetto da MM è controversa ed attualmente non riserva alcuna cura se non esclusivamente terapie palliative. La morbilità e la mortalità possono essere ridotte intraprendendo protocolli terapeutici multimodali, ad oggi disponibili solo presso alcuni centri specializzati, che implicano pleurectomia/decorticazione e pneumonectomia extrapleurica, idealmente seguiti da trattamento con antifolato pemetrexed e cisplatino, o radioterapia adiuvante [Opitz I, 2014]. Il successo e la fattibilità di tali approcci dipendono dallo stadio del tumore, dallo status del paziente e dalle sue co-morbilità; tuttavia, la sopravvivenza a lungo termine è rara e la qualità della vita

particolarmente povera. Uno stadio della patologia di tipo avanzato, un istotipo con scarsa differenziazione cellulare, co-morbidità, età avanzata, l'impossibilità di poter affrontare una resezione chirurgica e infine il sesso maschile, sono tutti fattori associati ad una prognosi sfavorevole [Opitz I, 2014].

Un quadro clinico così complesso lascia facilmente intuire l'enorme importanza che potrebbe rivestire l'identificazione di specifici biomarcatori. Infatti l'identificazione di molecole facili da recuperare ed analizzare potrebbe essere di grande aiuto per consentire di eseguire in modo non-invasivo sia la diagnosi che la prognosi e, non ultimo, il monitoraggio della risposta alle terapie. Inoltre una diagnosi accurata e precoce è fondamentale in una patologia caratterizzata da una lunga latenza come il MM poiché consentirebbe la gestione e la cura su misura per il paziente.

La ricerca di proteine che possano servire come biomarcatori per il MM è in corso da più di 20 anni. Due proteine altamente specifiche, osteopontina e le proteine solubili correlate alla mesotelina o "soluble mesothelin-related protein" (SMRPs), mancano di sensibilità quando utilizzate singolarmente, ma potrebbero essere affiancate ad altri biomarcatori nella costruzione di pannelli diagnostici multimarker [Panou V *et al.*, 2015]. Secondo risultati sperimentali ottenuti negli ultimi decenni, i miRNA, una classe di brevi RNA non codificanti, differenzialmente espressi durante lo sviluppo e la progressione di molte malattie tra cui i tumori, potrebbero avere un importante ruolo in ambito clinico come biomarcatori tumorali [Porpodis *et al.*, 2013].

1.2. I microRNA

Una delle scoperte biologiche più eccitanti degli ultimi dieci anni è stata quella degli RNA non codificanti. I miRNA sono molecole di RNA non codificante a singolo filamento, lunghi circa 22 nucleotidi, in grado di regolare l'espressione genica [Lee RC *et al.*, 1993; Reinhart BJ *et al.*, 2000]. Essi infatti comprendono un sottoinsieme di RNA non codificanti che giocano un ruolo chiave nella

regolazione genica [Bartel DP, 2004]. Nei mammiferi la maggior parte dei miRNA sono codificati dalla RNA polimerasi II [Lee Y *et al.*, 2004]. I miRNA si possono trovare in diverse regioni genomiche tra cui introni di geni codificanti proteine, esoni ed introni di geni non codificanti [Rodriguez A *et al.*, 2004], ed anche nelle regioni non tradotte al 3' di geni codificanti proteine (3' UTR) [Cai X *et al.*, 2004]. Nei mammiferi, circa un terzo dei miRNA sono incorporati nei filamenti intronici di geni codificanti proteine e ne conservano lo stesso schema di trascrizione [Rodriguez A *et al.*, 2004]. Nel corso degli ultimi anni, la loro biogenesi è stata ampiamente esplorata [Bartel DP, 2004; Kim VN, 2005; Bartel B, 2005; Yates LA *et al.*, 2013]. Sulla base di analisi di predizione di tipo computazionale, è stato stimato che circa il 60% dei geni umani codificanti proteine sono target diretti dei miRNA attraverso l'appaiamento complementare delle basi tra il 3' UTR del RNA messaggero e la regione 5' del miRNA, chiamata "seed region" [Friedman RC *et al.*, 2009]. L'appaiamento provoca l'inibizione della traduzione e/o la degradazione del mRNA bersaglio [Bartel DP, 2004; Bartel B, 2005].

1.2.1. Biogenesi e funzione dei miRNA

Come illustrato nella Figura 1, la biogenesi dei miRNA inizia nel nucleo dove viene trascritto un filamento di RNA primario, chiamato pri-miRNA, grazie all'opera delle RNA polimerasi II e III [Lee Y *et al.*, 2004; Borchert GM *et al.*, 2006]. Questa trascrizione produce lunghi trascritti con una struttura ripiegata. In seguito il pri-miRNA viene tagliato in un miRNA precursore, chiamato pre-miRNA, dal complesso microprocessore nucleare formato dall'enzima RNase III Drosha e dal suo cofattore Pasha noto anche come "*Di George Syndrome Critical Region 8*" [Bartel DP, 2004]. Il pre-miRNA ha a questo punto una struttura a forcina e viene esportato dal nucleo al citoplasma da un complesso formato dalla Esportina 5 e dal Ran-GTP [Zeng Y *et al.*, 2004, Bohnsack MT *et al.*, 2004]. Nel citoplasma, un complesso costituito dall'enzima RNase III Dicer e dal TAR RNA-binding protein (TRBP) catalizza il taglio del pre-miRNA alla lunghezza di circa 21 nucleotidi e dando luogo ad un

duplex miRNA: miRNA* [Hutvagner G *et al.*, 2001]. Il duplex viene poi separato e il miRNA maturo viene caricato in associazione alle proteine Argonaute (Ago 2) sul RNA-induced silencing complex (RISC) [Bartel DP, 2004, Winter J *et al.*, 2009]. Una volta che il miRISC è assemblato, il miRNA conduce il complesso al silenziamento del mRNA target tramite la scissione del messaggero, la repressione della traduzione o la deadenilazione [Winter J *et al.*, 2009].

Biogenesis and clinical implications of microRNAs (miRNAs).

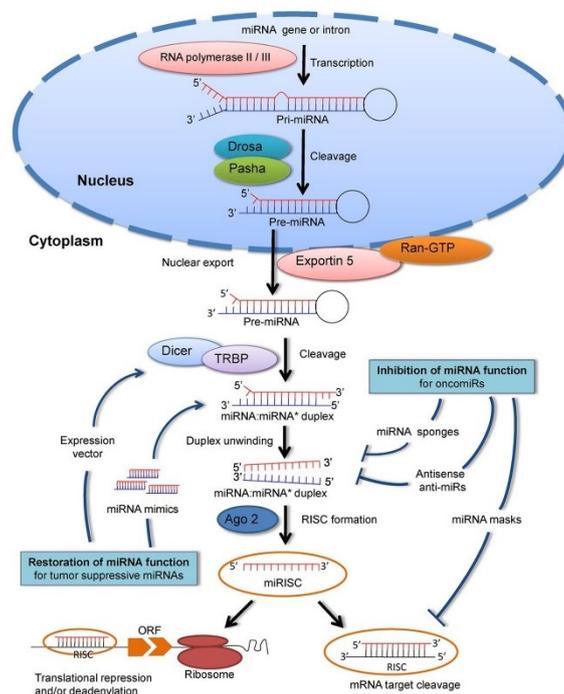


Figura 1. Biogenesi e implicazioni cliniche di microRNA (miRNA). I miRNA sono tipicamente trascritti dalla RNA polimerasi II e III e producono un miRNA primario (pri-miRNA). Successivamente il pri-miRNA viene processato in un miRNA precursore a forcina (pre-miRNA) nel nucleo dal complesso Drosha/Pasha e trasportato nel citoplasma dalla Esportina 5. Il pre-miRNA viene ulteriormente tagliato da Dicer-TRBP (TAR RNA binding protein) in un miRNA: miRNA* duplex. Dopo la separazione dei due filamenti, il miRNA maturo viene caricato nelle proteine Argonaute (Ago 2) all'interno del RISC (RNA-induced silencing complex). Una volta che il miRISC è assemblato, il miRNA guida il silenziamento del mRNA target tramite clivaggio, repressione della traduzione o deadenilazione. Attualmente due strategie sono utilizzate per lo studio di terapie basate sui miRNA per la gestione dei tumori: (i) l'inibizione della funzione di miRNA per quanto riguarda gli oncomiRs e comprende l'uso di miRNA sponge, anti-miRs antisenso e miRNA masks, (ii) il ripristino della funzione miRNA per quanto riguarda i tumor-suppressive miRNA e comprende l'uso di miRNA mimic e vettori di espressione [Akhtar *et al.*, 2016].

I miRNA possono avere un effetto regolatore negativo o positivo [Ambros V, 2001]. Negli esseri umani, di solito si legano con complementarità parziale ad elementi regolatori del mRNA chiamati “seed sequence” collocati al 3’UTR, o ad elementi specifici del mRNA chiamati “miRNA response elements” (MREs) causando la repressione della traduzione [Ambros V, 2004]. Un importante meccanismo di silenziamento dei miRNA negli animali è rappresentato dalla destabilizzazione dei messaggeri target attraverso un processo indipendente dal taglio, che influisce sui livelli di trascrizione [Lim LP *et al.*, 2005; Pillai RS, 2005]. Un piccolo numero di miRNA mostra capacità di legame direttamente verso alcune classi di proteine come le RNA-binding proteins, inibendo l’interazione con i loro RNA bersaglio [Eiring AM *et al.*, 2010]. In alcuni casi i miRNA regolano anche l’espressione genica a livello trascrizionale legandosi direttamente agli elementi regolatori del DNA [Kim DH *et al.*, 2008]. Infine si è visto che in alcuni tipi di cellule i miRNA possono avere un effetto regolatore positivo poiché sono in grado di aumentare la traduzione [Vasudevan S *et al.*, 2007].

La regolazione post-trascrizionale attuata dai miRNA interessa quasi tutti i tipi di pathways cellulari dallo sviluppo all’oncogenesi [Zhang B *et al.*, 2006]. Chiaramente l’attuale ricerca sui miRNA non si limita allo studio della loro biogenesi e funzione. Le loro implicazioni cliniche sono ormai un argomento di ricerca di grande attualità, poiché è stato dimostrato che i miRNA hanno le caratteristiche per poter essere valutati come importanti biomarcatori diagnostici e prognostici, ma anche come bersagli terapeutici per le diverse malattie umane tra cui il cancro [Cho W 2010; Nana-Sinkam SP and Croce CM, 2013].

1.2.2. Potenzialità dei microRNA nella pratica clinica

Come descritto nel paragrafo precedente, i miRNA interagiscono con i messaggeri bersaglio in maniera sequenza-specifica e forniscono un ulteriore livello di modulazione post-trascrizionale. Essi svolgono un ruolo importante in molti processi fisiologici e patologici, quali la crescita cellulare, la

differenziazione, la proliferazione e il metabolismo, l'angiogenesi, la risposta allo stress, il rimodellamento dei tessuti, le malattie compresi i tumori [Suàrez T *et al.*, 2009; Olivieri F *et al.*, 2013].

MiRNA di alta qualità si possono estrarre dai tessuti, da cellule e fluidi corporei. Un importantissimo avanzamento dal punto di vista clinico è stata la scoperta di miRNA extracellulari presenti nel siero umano in forma stabile [Lawrie CH W *et al.*, 2008], che ha suggerito la possibilità di utilizzare i miRNA come biomarcatori in molteplici condizioni fisio-patologiche [Cheng H *et al.*, 2011; Zheng H *et al.*, 2013; Zhao Y *et al.*, 2014]. Questa caratteristica rende i miRNA dei potenziali biomarcatori, pratici da analizzare e soprattutto facilmente recuperabili in modo non invasivo. La stabilità dei miRNA in ambiente extracellulare (*cell-free* miRNA) è assicurata da specifici *carrier*. Le vescicole extracellulari (EV), ad esempio esosomi e microvescicole, sono attivamente secrete dalle cellule maligne nei circostanti fluidi corporei e possono svolgere un ruolo di “communication shuttles” [Zhao L *et al.*, 2015]. La scoperta che i cell-free miRNA possono essere associati alle proteine Argonauta (Ago 2) e sono per lo più liberi da vescicole extracellulari, ha fatto ipotizzare che i complessi extracellulari Ago2-miRNA potessero essere residui di cellule morte [Turchinovich A *et al.*, 2011]. E' stata anche formulata l'ipotesi secondo la quale le cellule possono rilasciare un miRNA-induced silencing complex attivo e funzionale nella circolazione sanguigna [Arroyo JD *et al.*, 2011]. Inoltre, le capacità di condurre un targeting funzionale è stata dimostrata anche per le lipoproteine ad alta densità (HDL) che trasportano miRNA endogeni verso le cellule riceventi [Vickers KC *et al.*, 2011]. Tali vettori sono una fonte unica di specifici miRNA aventi la potenzialità di essere utilizzati come biomarcatori.

1.2.3. microRNAs e tumori

I miRNA sono spesso deregolati in una vasta gamma di malattie umane [Gong H *et al.*, 2005; Santamaria X *et al.*, 2014; Condorelli G *et al.*, 2014; Guay C *et al.*, 2011; Garzon R *et al.*, 2010], ma

il loro coinvolgimento nei tumori è particolarmente interessante. Numerosi studi hanno esaminato la loro funzione nella patogenesi tumorale, nella diagnosi, nella prognosi e durante il trattamento [Jacobsen A *et al.*, 2013; Li Z *et al.*, 2014]. E' stato rivelato in alcuni tumori che la sovra-espressione o la mancanza di espressione di particolari miRNA correlano con fenotipi clinicamente aggressivi o metastatici [Ma L *et al.*, 2007; Tavazoie SF *et al.*, 2008]. Fisiologicamente i miRNA possono avere una funzione di tipo "tumore-soppressiva" (*tumour-suppressive* miRNAs) oppure oncogeno (*oncomiRs*), a seconda dell'influenza che esercitano sul controllo della proliferazione delle cellule tumorali [Zhang B *et al.*, 2007], e persino la stessa specie di miRNA può essere oncogenica o tumore-soppressiva in tessuti diversi [Li H *et al.*, 2013]. Il legame tra tumori e miRNA è stato documentato per la prima volta nella leucemia linfocitica cronica, dove il miR-15 e il miR-16 sono down-regolati o soppressi [Calin GA *et al.*, 2002]. L'ipo-espressione del miRNA let-7 è risultato significativamente associato a una sopravvivenza postoperatoria più breve nel carcinoma polmonare umano indipendentemente dallo stadio della malattia [Takamizawa J *et al.*, 2004]. La sovra espressione dei miRNA può promuovere l'oncogenesi, ad esempio il miR-21 è uno dei miRNA che sono più comunemente *up*-regolati nelle cellule tumorali, promuovendo così la proliferazione cellulare, l'invasione e la migrazione delle popolazioni cellulari tumorali [Pan X *et al.*, 2010; Echevarria-Vargas IR *et al.*, 2014]. È interessante notare che il miR-221 agisce come tumor-suppressor silenziando l'oncogene KIT nella leucemia eritroblastica [Felli N *et al.*, 2005], ma è sovra-espresso nei tumori epatici dove promuove l'oncogenesi bersagliando l'oncosoppressore PTEN [Pineau P *et al.*, 2010]. Successivamente è stato dimostrato che specifici profili di espressione dei miRNA sono associati a diversi tipi di cancro [Lu J *et al.*, 2015], e che circa il 50% dei geni dei miRNA umani noti si trovano in zone del genoma associate ad una certa suscettibilità al cancro [Calin GA *et al.*, 2004]. Alcune particolari *signature* di miRNA sono state applicate con successo nello screening, la diagnosi e il follow-up del cancro del polmone, e la modulazione di alcuni miRNA sono sensibili agli effetti dell'inquinamento [Vrijens K *et al.*, 2015]. Una migliore comprensione delle funzioni di miRNA sta consentendo di approfondire la conoscenza delle basi molecolari dei tumori e parallelamente continua

ad ispirare la ricerca riguardo al loro uso come nuovi *biomarker* utilizzabili nella diagnosi, prognosi e follow-up.

Inoltre la constatazione che i miRNA hanno come bersaglio molteplici geni codificanti proteine e che la loro aberrante espressione in diversi tipi di cancro è miRNA-dipendente, rende questi piccoli RNA non codificanti dei promettenti bersagli terapeutici. Forse, l'obiettivo più affascinante è quello di utilizzarli direttamente per sviluppare strategie terapeutiche per molteplici malattie. Attualmente infatti, numerosi progetti di ricerca in corso si stanno concentrando sullo sviluppo di terapie a base di miRNA per il trattamento di una vasta gamma di malattie umane (Figura 1). Il fatto che le sequenze dei miRNA maturi siano piccoli e spesso conservati tra più specie di vertebrati, li rende dei bersagli terapeutici "attraenti" e, per lo meno dal punto di vista teorico, relativamente facili da controllare [Van Rooij E and Kauppinen S 2014]. Due diversi approcci vengono utilizzati per modulare l'attività dei miRNA: (i) il ripristino della loro funzione come tumor-suppressor ripristinando il miRNA perso con duplex di RNA sintetici chiamati miRNA-mimic o con miRNA codificati da vettori di espressione [Garzon R *et al.*, 2010; Thum T, 2012; Bader AG *et al.*, 2011]; e (ii) l'inibizione della funzione miRNA attraverso oligonucleotidi antimiR chimicamente modificati. Dal momento che i miRNA correlati al cancro (*oncomiRs*) sono spesso over-espresi in varie neoplasie, la loro inibizione potrebbe ripristinare la funzione dei propri geni bersaglio deputati alla soppressione della progressione tumorale. In studi preclinici e clinici sono già stati testati diversi agenti inibitori dei miRNA; essi includono antimiR (oligonucleotidi antisenso) [Garzon R *et al.*, 2010], antimiRs costituiti da acidi nucleici bloccati [Vester B and Wengel J, 2004], miRNA-*sponge* [Ebert MS *et al.*, 2007], miRNA-mask [Choi WY *et al.*, 2007] e piccole molecole capaci di inibire la funzione dei miRNA [Gumireddy K *et al.*, 2008].

1.3. MICRORNA E MESOTELIOMA MALIGNO

La letteratura scientifica da circa 10 anni a questa parte, ha fornito un numero sempre crescente di evidenze riguardo significative alterazioni dell'espressione dei microRNA nei pazienti affetti da MM. Mentre microRNA sporadici sembrano essere overespressi, uno sguardo d'insieme rivela una generalizzata soppressione dell'espressione di questi piccoli RNA non codificanti, quest'ultima caratteristica è apparsa col tempo comune anche ad altri tipi di tumore. I primi studi, atti ad analizzare il profilo d'espressione globale dei microRNA (in termini tecnici "*profiling*") nel MM rispetto ad una controparte sana, hanno identificato molteplici cambiamenti dei livelli di espressione dei miRNA tali da poter incidere su una varietà di fenotipi caratteristici del tumore, tra cui la ridotta risposta ai segnali apoptotici, l'aumento del metabolismo cellulare, gli elevati tassi di proliferazione, il miglioramento della migrazione e della capacità invasiva delle cellule ed infine la resistenza a chemioterapia e radioterapia [Guled M *et al.*, 2009]. In seguito è stato rivelato che molti microRNA hanno funzioni importanti nella biologia del MM. Recenti studi confermano l'importante ruolo dei miRNA nella tumorigenesi del mesotelioma maligno ed hanno messo in luce caratteristiche differenze dei profili di espressione tra campioni normali e quelli tumorali. La scoperta dei miRNA aventi un ruolo chiave nel mesotelioma potrebbe modificare il processo di diagnosi molecolare, rendendo possibile lo screening dei soggetti a rischio, la diagnosi precoce e conseguentemente anche la valutazione della prognosi e la risposta alle terapie. La differente espressione dei microRNA in questa patologia ha inoltre lo scopo di identificare le molecole chiave utili per lo sviluppo di una idonea strategia terapeutica anti-tumorale. Diversi marcatori proteici sono stati proposti nella diagnostica del MM nella pratica clinica, ma purtroppo l'elevata variabilità istologica e citologica con cui si presenta questo tumore rendono molto difficile la diagnosi differenziale rispetto alle altre patologie della pleura. Inoltre la maggior parte dei marcatori oggi impiegati per la diagnosi di MM ha una localizzazione tissutale ed eventuali marcatori circolanti non sono stati ancora studiati in maniera

sistematica oppure, come nel caso della mesotelina, sono caratterizzati da scarsa sensibilità [Panou V *et al.*, 2015]. Ne consegue la necessità di trovare marcatori sensibili, specifici e soprattutto di facile campionamento, come potrebbero essere i miRNA circolanti, tali da poter essere utilizzati nella routine clinica.

1.4. PRINCIPI DELL'ANALISI SECONDARIA DELLA LETTERATURA

La continua produzione di nuove evidenze scientifiche permette di avvicinarsi sempre di più alla comprensione di fenomeni complessi, che altrimenti non potrebbero essere spiegati da un singolo studio [Cooper H, 2010]. Contemporaneamente il numero sempre maggiore degli studi che cercano di rispondere alla stessa domanda di ricerca ha reso necessario trovare delle metodologie adeguate per integrare la crescente mole di conoscenza disponibile nei vari ambiti e arrivare conclusioni avvalorate dalle evidenze empiriche. Le rassegne sistematiche, sintesi della ricerca e meta-analisi si sono affermate come il “*gold standard*” per sintetizzare la letteratura disponibile in un determinato contesto. Ci sono diversi termini che possono essere usati per presentare una rassegna della letteratura: rassegna (*review*), rassegna narrativa (*narrative review*), rassegna sistematica (*systematic review*), sintesi della ricerca (*research synthesis*), meta-analisi (*meta-analysis*) [Crocetti E, 2015]. Questi termini vengo spesso considerati sinonimi ed utilizzati come se fossero termini intercambiabili, tuttavia è così solo in alcuni casi, in altri l'appropriata terminologia indica le specificità delle diverse forme di rassegna.

1.4.1 Differenze tra rassegne sistematiche, meta-analisi e rassegne narrative della ricerca

Per definizione una rassegna sistematica è finalizzata a rispondere a una precisa domanda di ricerca cercando di raccogliere tutte le evidenze sperimentali disponibili in letteratura. Come riportato in

seguito, in questo tipo di rassegna si usano metodi sistematici ed espliciti per la conduzione della ricerca e la valutazione dei risultati. L'espressione "rassegna sistematica" è usata in molti ambiti di ricerca e trova le sue applicazioni principali nell'ambito medico. Negli anni Novanta si sono costituite due organizzazioni internazionali, la Cochrane Collaboration e la Campbell Collaboration, la cui missione consiste nella continua realizzazione di rassegne sistematiche. Cochrane Collaboration (<http://www.cochrane.org/>) ha come obiettivo fornire conoscenze evidence-based nell'ambito medico e raccoglie la sfida del medico inglese Archibald Cochrane da cui deve il nome, di "garantire che le decisioni in ambito sanitario, relative sia alle terapie sia alle future linee di ricerca, si basino su una sintesi accurata e su una valutazione critica di tutte le prove ed evidenze disponibili in letteratura"; mentre la Campbell Collaboration (<http://www.campbellcollaboration.org/>) si focalizza sugli effetti degli interventi sociali. Entrambe le organizzazioni si prefiggono di rendere tutti, non solo gli addetti ai lavori, in grado di poter fare scelte accurate e sostenute dalla migliore evidenza disponibile. Il motto della Cochrane Collaboration è "*Trusted evidence. Informed decisions. Better health*" concettualmente analogo a quello della Campbell Collaboration: "*What helps? What harms? Based on what evidence?*" [Crocetti E, 2015]. Entrambe le Organizzazioni pertanto, contribuiscono a rendere fruibile l'enorme mole di conoscenza che si accumula nei vari settori e contribuiscono alla produzione delle sintesi evidenze sperimentali che saranno poi il riferimento per indirizzare le scelte in ambito clinico, nella gestione sanitaria e, non ultima, nell'ideazione di nuovi progetti di ricerca sperimentale.

Spesso l'espressione "rassegna sistematica" è usata in combinazione con il termine "meta-analisi". Il termine "meta-analisi", nella sua accezione più ristretta, viene usato per indicare l'uso di metodi statistici per sintetizzare i risultati derivanti da più studi sperimentali, analizzare il grado di eterogeneità di tali risultati e spiegare le differenze riscontrate tra gli studi [Higgins JPT and Green S, 2011]. Affidandoci a questa definizione, la meta-analisi può essere inclusa o meno all'interno di una rassegna sistematica per sintetizzare statisticamente i risultati degli studi primari, ma si possono realizzare rassegne sistematiche senza includere una meta-analisi nel caso in cui non sia possibile

applicare un metodo statistico ai dati sperimentali ottenuti dai diversi studi inclusi nella revisione. In alternativa, il termine “meta-analisi” può essere usato con un significato più ampio, andando quindi ad indicare una “rassegna sistematica con meta-analisi”. In questo caso si usa il termine “meta-analisi” per indicare l’intero processo che va dalla definizione del problema fino alla sintesi statistica delle evidenze disponibili [Lipsey M and Wilson G, 2001]. Il primo lavoro scientifico definito col termine “meta-analisi” è stato pubblicato nel 1977 a seguito del desiderio da parte dell’autore di trovare un nuovo metodo per sintetizzare la letteratura che andasse oltre le distorsioni presenti nelle rassegne tradizionali dove il punto di vista dell’autore e la sola attenzione ai risultati dei test di significatività statistica, rischiavano troppo spesso di generare conclusioni fuorvianti [Crocetti E, 2015]. L’articolo in questione è considerato uno dei lavori che ha cambiato la storia della ricerca scientifica e medica. In seguito ha infatti ispirato generazioni di studiosi che hanno applicato il metodo nei più disparati ambiti di ricerca e ha catalizzato lo sviluppo di metodi statistici sempre più raffinati per la sintesi dei dati presentati negli studi primari.

Anche le rassegne narrative presentano una sintesi della letteratura ma, a differenza delle rassegne sistematiche e della meta-analisi, tale processo non viene condotto e documentato mediante metodi sistematici ed espliciti. In una rassegna narrativa non viene svolta una ricerca sistematica della letteratura, non viene riportato il numero di studi controllati e selezionati, specificando le motivazioni delle esclusioni, così come non è trasparente il processo che porta ad assegnare un peso ai vari studi e a formulare le conclusioni finali [Crocetti E, 2015]. Nella meta-analisi, al contrario, tale peso viene assegnato su base statistica, evitando così di incorrere in varie distorsioni, definiti *bias*, come: dare più peso agli studi condotti da alcuni gruppi di ricerca o pubblicati in alcune riviste ritenute di maggior prestigio. In sostanza, la differenza principale tra le rassegne narrative e le rassegne sistematiche (e meta-analisi) sta nella replicabilità del processo: una rassegna narrativa non è una ricerca oggettiva e riproducibile mancando di sistematicità e trasparenza. Al contrario, le rassegne sistematiche vengono condotte e pubblicate in modo tale che qualsiasi ricercatore volesse effettuare nuovamente lo stesso studio, sia in grado di ripetere lo stesso procedimento e giungere alle stesse conclusioni. Inoltre

all'aumentare degli studi disponibili in letteratura, le rassegne narrative diventano sempre più inadeguate per gestire l'enorme volume di evidenze sperimentali prodotte mentre le meta-analisi rappresentano il "gold standard" per gestirle nel miglior modo possibile [Crocetti E, 2015]. Nella Figura 2 è riportata la Piramide delle Evidenze che mostra come le rassegne sistematiche e le meta-analisi rappresentano la migliore evidenza disponibile rispetto alle altre tipologie di pubblicazioni scientifiche.

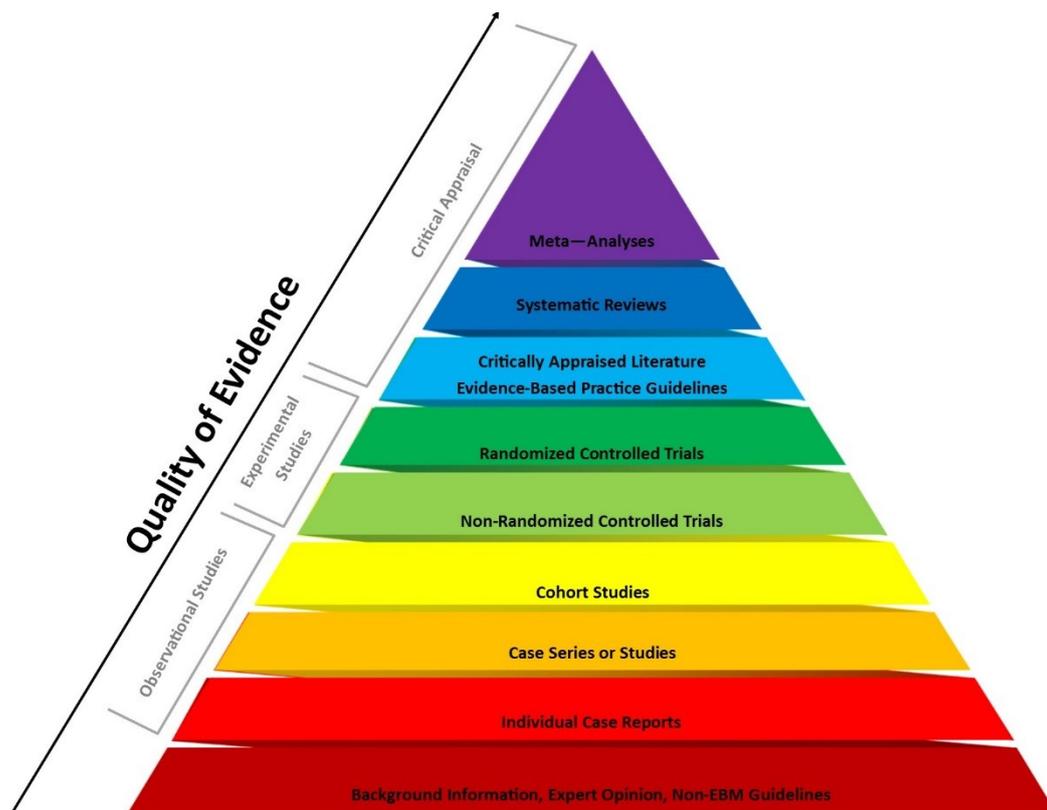


Figura 2. La Piramide delle Evidenze mostra come le rassegne sistematiche e le meta-analisi rappresentano la migliore evidenza disponibile rispetto alle alter tipologie di pubblicazioni scientifiche. [Evidence-Based Medicine for the College of Medicine: EBM Pyramid - <http://libguides.cmich.edu/cmed/ebm>].

Le revisioni sistematiche e le meta-analisi hanno importanti ricadute pratiche: possono orientare le scelte in ambito sanitario, sono utilizzate per sviluppare le linee guida a livello nazionale ed internazionale, forniscono ai ricercatori e ai medici le migliori evidenze disponibili per permettere la scelta delle cure più appropriate per i pazienti, per indirizzare le scelte degli interventi sanitari e della

ricerca. Sempre più medici e ricercatori concordano sulla necessità di affidarsi ad esse per operare, in ambito clinico, scelte consapevoli, basate sulle prove di efficacia.

1.4.2. Progettazione di una Revisione sistematica

Le revisioni sistematiche dei sono veri e propri progetti di ricerca che sintetizzano e valutano criticamente gli esiti di tutti gli studi sperimentali condotti riguardo ad un determinato e ben definito quesito clinico. Per ridurre al minimo i rischi di distorsione i revisori si avvalgono, in ogni fase del processo di elaborazione, di una metodologia scientifica standardizzata [Sala V *et al.*, 2006].

Le principali tappe di questo processo sono:

1. Formulazione di un chiaro quesito clinico.
2. Ricerca esaustiva e riproducibile di tutte le informazioni rilevanti (studi pubblicati e non) riguardanti la problematica in analisi.
3. Selezione degli studi eleggibili in base a criteri di inclusione ed esclusione definiti *a priori*.
4. Analisi della qualità metodologica degli studi inclusi.
5. Sintesi quantitativa o qualitativa delle informazioni, a seconda delle caratteristiche dei dati a disposizione.
6. Discussione delle ragioni di concordanza e discordanza tra i risultati dei diversi studi.

Il Forest Plot è la modalità grafica che permette di presentare i risultati di una meta-analisi. Esso facilita la comprensione dei risultati fornendo molteplici dettagli riguardo i singoli studi inclusi nella valutazione. La sua caratteristica peculiare è «permettere di visualizzare la “foresta” dell’evidenza senza perdere di vista gli “alberi” dei singoli studi» [Sala V *et al.*, 2006].

1.5. ELEMENTI DI ANALISI BIOINFORMATICA APPLICATA AI MICRORNA

Il coinvolgimento dei miRNA nella regolazione genica, sia nei processi fisiologici sia in quelli patologici, ha portato ad un aumento della produzione di studi sperimentali incentrati sul loro studio e di conseguenza abbiamo assistito alla pubblicazione di un'enorme mole di pubblicazioni scientifiche. Inoltre, i recenti progressi tecnologici, in particolare i metodi di sequenziamento ad alto rendimento (*Next Generation Sequencing technology* - NGS), hanno portato ad una crescita esponenziale nella produzione di nuovi dati correlati ai miRNA. Di conseguenza sono stati creati numerosi database per la raccolta dei dati e sono stati studiati altrettanti strumenti bioinformatici per gestire la crescente mole di dati (Figura 3).

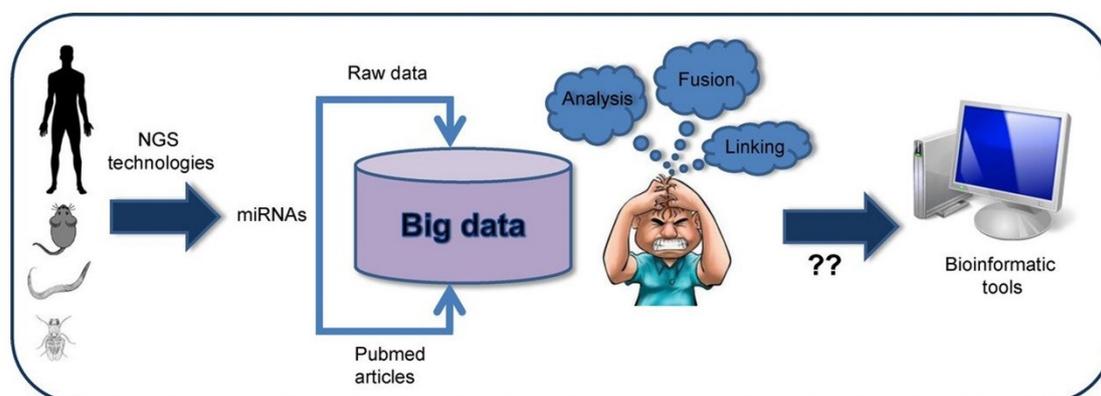


Figura 3. La Figura illustra la complessità di grandi insiemi di dati e la necessità di strumenti bioinformatici per la gestione [Akhtar et al., 2016].

Attualmente sono disponibili una vasta gamma di strumenti informatici che possano facilitare la classificazione e l'analisi dei dati sperimentali inerenti i miRNA. La maggior parte di questi strumenti sono accessibili attraverso un'interfaccia grafica on-line e permettono a ricercatori da ogni parte del

mondo di utilizzare database e metodi di analisi all'avanguardia, e persino laboratory con infrastrutture per l'analisi computazionale di tipo non avanzato possono contribuire alla ricerca grazie ad applicazioni gratuitamente fruibili in rete.

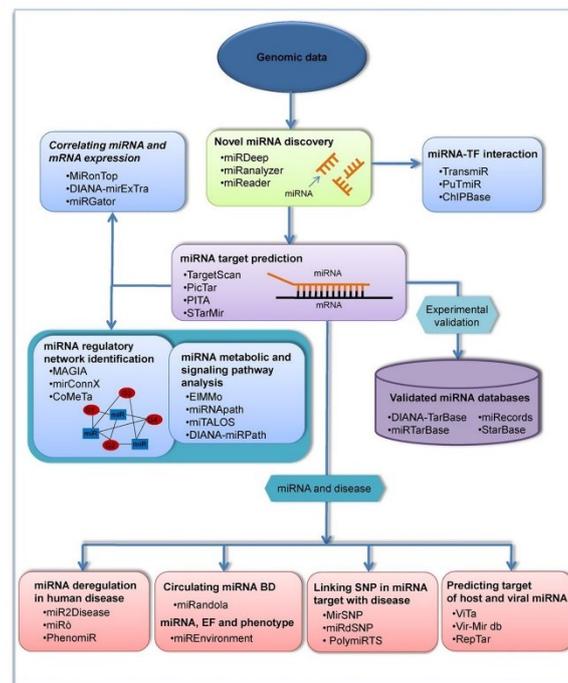


Figura 4. Panoramica sugli strumenti bioinformatici attualmente disponibili e classificati secondo lo scopo principale per cui sono utilizzati. Alcuni “tools” sono presentati in ciascuna categoria a scopo indicativo [Akhtar et al., 2016].

Innanzitutto i miRNA sono raccolti in un database di riferimento chiamato miRBase, si tratta del principale archivio online contenente annotazioni e sequenze di miRNA e pre-miRNA ad oggi conosciuti. L'attuale versione miRBase (<http://www.mirbase.org>) contiene 24.521 loci da 206 specie (30.424 miRNA maturi), tra cui 1.872 precursori di miRNA umani che producono 2.578 miRNA maturi [Akhtar et al., 2016]. MiRBase è un database estremamente importante per lo studio dei miRNA perché permette di identificare in maniera univoca sia i pre-miRNA (indicati nel database “mir-”) sia i miRNA maturi (indicati con “miR-”), nonostante l'aggiunta continua di nuove sequenze e i continui aggiornamenti della nomenclatura [Akhtar et al., 2016].

Di recente, ed in contemporanea agli studi intrapresi per questa tesi, abbiamo analizzato 129 strumenti informatici gratuiti per l'analisi dei miRNA in diversi ambiti di ricerca con l'obiettivo di aiutare i

ricercatori nella scelta degli strumenti più idonei per le loro esigenze di studio [Akhtar et al., 2016]. Dal momento che la maggior parte dei tools analizzati contengono informazioni eterogenee, è stato particolarmente difficile identificare un metodo per classificarli, ma in definitiva abbiamo scelto di suddividerli a seconda dello scopo principale per cui sono utilizzati, ad esempio: identificazione di nuovi miRNA, predizione dei target, scoperta dei target validati, analisi di espressione dei miRNA, identificazione delle network dei miRNA, analisi vie di segnalazione, ricerca delle interazioni dei miRNA con i fattori di trascrizione (TF), e la ricerca dell'associazione dei miRNA alle malattie (Figura 4) [Akhtar et al., 2016]. Alcuni degli strumenti analizzati e riportati nella rassegna di cui sopra, saranno descritti nei successivi paragrafi poichè sono utilizzati per l'analisi dei dati prodotti in questo studio.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il mesotelioma maligno è un tumore molto aggressivo, clinicamente difficile da gestire e caratterizzato da una prognosi infausta. La diagnosi differenziale di mesotelioma da casi di adenocarcinoma della pleura o da proliferazioni infiammatorie benigne è difficoltosa, spesso si ottiene tardivamente quando lo stato della progressione tumorale è molto avanzato e, ad oggi, richiede un'indagine invasiva. Identificare nuovi marcatori tumorali in grado di migliorare la diagnosi precoce, la gestione clinica della malattia e migliorare le prospettive dei pazienti, costituirebbe indubbiamente un risultato di grande interesse scientifico e con immediate ricadute in campo clinico. I marcatori molecolari identificati finora non sono sufficientemente accurati e sensibili per essere utilizzati di routine nella diagnosi di MM.

La scoperta del ruolo di tipo regolatorio giocato dai miRNA in una varietà di processi fisio-patologici, compreso lo sviluppo delle patologie neoplastiche, ha avuto un enorme impatto sulla ricerca biomedica e ha fatto prospettare un loro potenziale impiego in campo diagnostico, prognostico e terapeutico. Inoltre, un numero sempre crescente di studi avvalorano l'ipotesi che i miRNA differenzialmente espressi in pazienti malati vs sani possano avere sensibilità, specificità e tutte le caratteristiche tali da poter essere utilizzati nella pratica clinica, in particolare per lo screening dei soggetti ad alto rischio. Tuttavia, la ricerca dei miRNA con rilevanza diagnostica e/o prognostica per il MM è stata finora inconcludente e resta tuttora una problematica aperta.

Quindi il *focus* principale di questo studio è di analizzare i dati presenti nella letteratura scientifica riguardo l'analisi dei miRNA associati al mesotelioma maligno e all'esposizione ad amianto, al fine di individuare quelli differenzialmente espressi con potenziale valenza diagnostica. Per perseguire ciò è stato adottato un approccio metodologico proprio delle rassegne sistematiche che consentisse di ottenere lo "stato dell'arte" sulla problematica in questione.

In dettaglio nella prima parte del presente studio verranno perseguiti i seguenti obiettivi:

1. Conduzione di una revisione sistematica della letteratura riguardo i miRNA associati al mesotelioma;
2. Conduzione di una meta-analisi per la valutazione dell'accuratezza diagnostica dei miRNA nella diagnosi differenziale di MM;
3. Analisi del potenziale valore diagnostico dei miRNA precedentemente individuati e loro valutazione funzionale.

Inoltre, nonostante il gran numero di studi condotti fino ad oggi, la nostra comprensione dei meccanismi di regolazione dei miRNA su ampia scala è ancora limitata. Recenti evidenze suggeriscono che la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base dell'espressione aberrante dei microRNA nelle varie patologie, non solo potrebbe aiutarci a migliorare la comprensione della malattia, ma anche portare all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Il secondo obiettivo principale di questo studio, è quindi quello di focalizzare l'attenzione alla definizione del ruolo svolto dai microRNA nel processo patogenetico che, a partire dall'esposizione all'amianto, culmina con lo sviluppo tumorale. Inoltre, poiché le attuali conoscenze bioinformatiche forniscono gli strumenti necessari alla predizione degli RNA messaggeri target di specifici miRNAs e alla loro analisi funzionale, questa parte della ricerca sarà affrontata grazie all'uso dell'analisi *in-silico* seguita da un approccio sperimentale.

In dettaglio nella seconda parte del presente studio verranno perseguiti i seguenti obiettivi:

1. i principali miRNA, identificati grazie alla revisione sistematica della letteratura, saranno analizzati per identificare il loro ruolo potenziale nel meccanismo patogenetico del MM. Nello specifico saranno effettuate analisi di:
 - a. predizione dei target molecolari ed identificazione dei target validati dei miRNA in esame;
 - b. "functional enrichment analysis" per l'analisi di pathways e network coinvolti.

2. Si procederà con un'analisi sperimentale per identificare i microRNA associati al MM grazie all'uso di campioni biologici di diversa origine, quali (i) tessuti di MM e di pleura normale inclusi in paraffina, ottenuti mediante micro dissezione laser del preparato in toto, al fine di ridurre l'eterogeneità cellulare dei campioni, e (ii) colture cellulari primarie di MM e mesotelio normale. Nello specifico si procederà con:
 - a. analisi del profilo di espressione dei miRNA a partire da campioni tissutali e cellulari utilizzando la tecnologia dei microarray; individuazione dei miRNA differenzialmente espressi nel MM vs la controparte sana e validazione dei singoli miRNA in real-time PCR (qRT-PCR).
3. In seguito all'identificazione dei microRNA deregolati nei campioni precedentemente analizzati, si procederà con:
 - a. l'identificazione dei bersagli molecolari più probabili tramite strumenti di analisi computazionale specifici;
 - b. l'analisi funzionale su colture cellulari per la verifica sperimentale dei dati ottenuti *in-silico* e la validazione empirica dei target predetti.

Il raggiungimento di tali obiettivi consentirebbe in futuro di spingere gli avanzamenti della ricerca su due filoni principali: (i) approfondire la conoscenza dei meccanismi patogenetici regolati da molteplici microRNA in seguito all'esposizione ad amianto, e (ii) valutare su ampia scala le potenzialità diagnostiche di questi piccoli RNA non codificanti per trasferire i risultati della ricerca “dal bancone” alla clinica.

3. MATERIALI E METODI

3.1. CONDUZIONE DELLA REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA E META-ANALISI DEI DATI

3.1.1. Ricerca della letteratura primaria e screening delle fonti

I termini “microRNA”, “mesothelioma”, “asbestos”, “asbestosis”, e tutte le combinazioni possibili dei loro sinonimi sono stati utilizzati per effettuare la ricerca delle fonti sui database PubMed, GEODataSet e EMBL-EBI ArrayExpress. L’ultimo accesso è stato effettuato il 29 settembre 2015. I criteri di inclusione ed esclusione sono stati stabiliti *a priori* e sono elencati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Metodologia di ricerca e criteri di inclusione ed esclusione.

Key words and Mesh terms used in PubMed, GEO DataSet and EBI ArrayExpress queries	Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
microRNA, microRNAs, miRNA, miRNAs, miR, miRs, malignant mesothelioma, asbestos, asbestos exposure	Papers reporting miRNA profiling in MM and all types of asbestos exposure; papers reporting deregulation of single or multiple miRNAs in subjects with MM and asbestos exposure.	Papers not in English, duplicates, reviews. Paper describing only functional assays were considered in the systematic review but excluded from the qualitative meta-analysis.

Come mostrato nel diagramma di flusso PRISMA in **Figura 5**, la ricerca ha dato modo di recuperare 80 pubblicazioni e 39 set di dati. L’applicazione dei criteri di inclusione ed esclusione ha condotto alla selezione di 39 articoli riguardo i miRNA deregolati nel MM. Nove di questi si basano essenzialmente su test funzionali e sono stati esaminati per ragioni di completezza; gli altri 30 studi sono stati sottoposti ad una meta-analisi qualitativa, 4 studi sono stati inclusi nella meta-analisi per la valutazione dei test diagnostici.

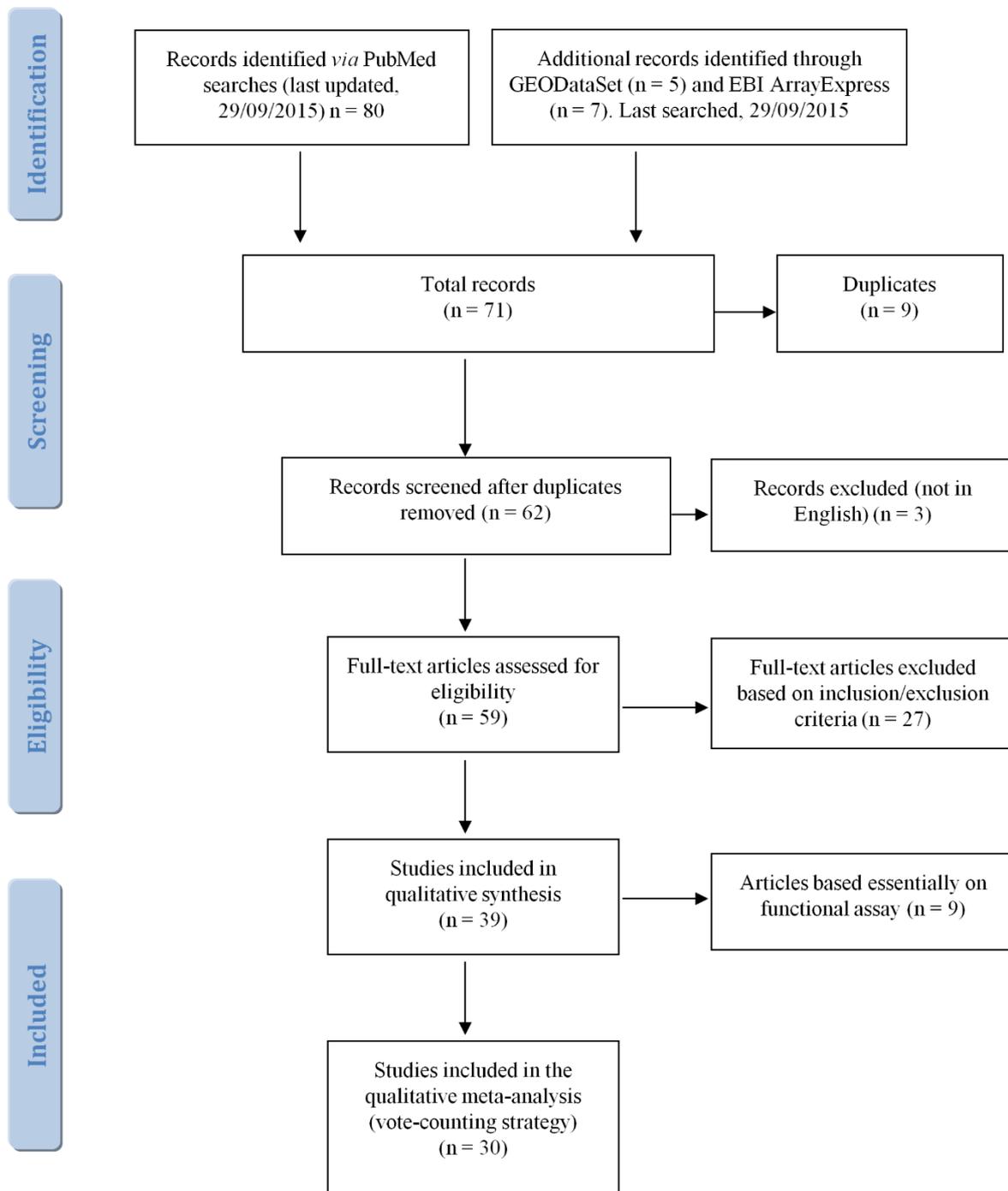


Figura 5. Il diagramma di flusso PRISMA mostra il processo di selezione delle fonti per la revisione sistematica e la meta-analisi qualitativa. [Micolucci L et al., 2016]

3.1.2. Valutazione dei potenziali rischi di bias nel processo di revisione

Lo studio è stato condotto in conformità alla PRISMA Checklist [Moher D *et al.*, 2009], un sistema che migliora la chiarezza e la trasparenza dell'approccio metodologico per condurre la revisione sistematica. La PRISMA Checklist è stata sviluppata per studi randomizzati [Liberati A *et al.*, 2009], ma può anche essere utile come strumento di base per la revisione sistematica di altri tipi di articoli di ricerca. Per valutare la qualità metodologica delle revisioni sistematiche, mi sono affidata allo strumento AMSTAR costituito da una checklist di 11-item [Shea BJ *et al.*, 2007]. Le checklist PRISMA ed AMSTAR sono riportate rispettivamente nelle **Tabelle Supplementari 1 e 2**. Nonostante queste precauzioni, la possibilità di essere in presenza di *bias* rimane; ad esempio i manoscritti che vengono giudicati idonei ai fini della pubblicazione sulle riviste scientifiche hanno maggiori probabilità di riportare dati statisticamente significativi, ciò comporta che i dati non statisticamente significativi (ma non per questo meno importanti) rimangano non pubblicati causando la “distorsione” dei risultati delle revisioni sistematiche [Dickersin K *et al.*, 1993; Dwan K *et al.*, 2013; Stern *et al.*, 1997]. A causa delle piccole dimensioni degli studi che hanno valutato il valore diagnostico dei miRNA circolanti nel MM, non abbiamo valutato i bias di pubblicazione usando il classico diagramma ad imbuto.

3.1.3. Estrazione e ranking dei dati

Per ciascun lavoro incluso nella ricerca sono stati analizzati il testo completo e i materiali supplementari per effettuare l'estrazione dei dati. Per ciascuno studio sono stati estratti: l'autore, l'anno di pubblicazione, il disegno dello studio, il numero di campioni analizzato, la percentuale di tessuto tumorale e l'istotipo, l'approccio metodologico, il codice identificativo dei dataset nel database GEO e, infine, i risultati principali. Tutte queste caratteristiche e i relativi dati sono elencati nella **Tabella Supplementare 3**. Gli studi descrivono essenzialmente 4 categorie di comparazione: (a) campioni tissutali di MM vs. tessuti normali o non tumorali; (b) campioni tissutali di MM vs. campioni tissutali di altri tumori; (c) i campioni di sangue da pazienti affetti da MM vs. campioni di

sangue da individui sani; e (d) linee cellulari di MM vs. linee cellulari normali.

Dagli studi analizzati sono stati estratti un totale di 213 miRNA che risultano differenzialmente espressi in campioni provenienti di MM e soggetti esposti all'amianto rispetto ai campioni di controllo. Questi 213 miRNA, riportati in **Tabella Supplementare 4**, sono stati suddivisi in base alle categorie di comparazione ed in base al loro andamento di deregolazione.

In seguito, nel tentativo di restringere il *pool* dei miRNA in analisi mantenendo quelli più attendibili, sono stati identificati i miRNA che negli studi primari erano stati validati tramite qRT-PCR e, contestualmente, sono stati esclusi:

- dati ottenuti dalle categorie di comparazione (b) e (d), relative al confronto del MM con altri tipi di cancro (b), i dati ottenuti dal confronto delle linee cellulari (d);
- dati ottenuti dal confronto di diversi istotipi di MM;
- dati provenienti da studi che non riportavano chiaramente il trend dei miRNA.

Questi criteri hanno permesso di selezionare i 41 miRNA, validati tramite qRT-PCR, che erano stati ottenuti confrontando (a) di campioni tissutali di MM vs. campioni tissutali normali o non-tumorali e (c) i campioni ematici da pazienti affetti da MM vs. campioni ematici da individui sani. Tali miRNA sono riportati nella **Tabella 5** con il loro identificatore univoco (ID) e l'accession number. I nomi di ogni miR sono stati standardizzati secondo l'ultima versione di miRBase (miRBase V21, giugno 2014 disponibile all'indirizzo <http://www.mirbase.org/>) [Ambros V, 2003; Kozomara A *et al.*, 2014]. Le ambiguità riguardo l'identità di ciascun miRNA, dal passaggio dalla vecchia alla nuova nomenclatura, sono state risolte grazie all'uso del software on-line miRBase Tracker [Van Peer G *et al.*, 2014]. Inoltre, per ogni miRNA sono stati indicati la famiglia genica, i miRNA in cluster e le posizioni citogenetiche.

I due *pool* di microRNA, quello più ampio costituito da 213 miRs e quest'ultimo costituito da 41 miRs, sono stati analizzati con il metodo del “conteggio dei voti” in due passaggi consecutivi.

3.1.4. Valutazione dei miRNA tramite “Vote-counting”

I dati, relativi ai miRNA recuperati dalla letteratura, sono stati analizzati con un approccio a due fasi. Nella prima fase, un vote-counting di tipo tradizionale è stato applicato al pool di tutti i 213 miRNA come riportato nella (Tabella 4 e Tabella supplementare 4). Questo metodo ha permesso di identificare i miRNA riportati più frequentemente e quelli riportati nel maggior numero di studi e di categorie di comparazione (a, b, c, d).

Nella seconda fase, un più spinto strategia conteggio dei voti, è stato appositamente ideato metodo di vote-counting più rigoroso ed è stato applicato al pool dei 41 miRNA validati da qRT-PCR riportati in Tabella 5. Informazioni dettagliate su questa strategia sono riportate nel sottoparagrafo seguente. I risultati sono riportati in un diagramma “degli estremi e dei quartili” (chiamato anche “*box and whiskers plot*” oppure “*box-plot*”) in cui ogni punto rappresenta un miRNA (Figura 13). I miRNA appartenenti a gruppi Q3 e Max sono stati considerati come i più significativi. Il ranking dei miRNA in quartili ed il *box and whiskers plot* sono stati ottenuti utilizzando Microsoft Excel e Plotly disponibile all’indirizzo <https://plot.ly/>.

3.1.4.1. *Dettagli sulla strategia di conteggio dei voti appositamente ideata per l’analisi dei miRNAs in assenza di raw data.*

Il metodo considera la direzione di deregolazione di ogni miRNA, nonché le seguenti 4 caratteristiche: il numero di studi che riportano ogni miRNA come deregolato; il numero totale di campioni di MM; il numero totale di campioni normali; e il numero di serie di qRT-PCR condotte per valutare ogni miRNA. Quest’ultima caratteristica è stata presa in considerazione in quanto alcuni autori hanno effettuato la validazione in qRT-PCR in diverse coorti di campioni (ad esempio nel “discovery set”, successivamente nel “Training set” ed infine nel “Validation set” [Kirschner MB *et al.*, 2015], (si veda il disegno dello studio in Tabella supplementare 3) e quindi arrivando all’esecuzione di più di una serie di qRT-PCR per valutare l’espressione di un miRNA nell’ambito dello stesso studio. Quindi è stato attribuito un valore a ciascun miRNA assegnando un punteggio a

ciascuna delle 4 caratteristiche. Abbiamo adottato poi la suddivisione in quartili, che permette di dividere una serie ordinata di dati in quattro parti uguali, per settare una scala di valori a cinque punti per assegnare un punteggio al numero di campioni utilizzati per la controparte sana e malata. In breve, ad ogni caratteristica è stato dato un punteggio in base a quale quartile della distribuzione occupava: 0, per il valore più basso (Min); 1, per il quartile inferiore (Q1); 2, per il quartile indicante la mediana (Q2); 3, per il quartile superiore (Q3); e 4, per il valore più alto (Max). Tuttavia, poiché i quartili sono tipicamente calcolati per liste con un minimo di 20 elementi, ranking in quartili è stato utilizzato solo per assegnare uno score al numero di campioni di MM o di campioni normali utilizzati per l'analisi di ogni miRNA. Per assegnare un punteggio al numero di saggi qRT-PCR eseguiti è stata utilizzata una scala 0-4, assegnando il valore 0 ad 1 saggio di qRT-PCR; il valore 1 a 2 saggi di qRT-PCR; il valore 2 a 4 saggi di qRT-PCR; il valore 3 a 5 saggi di qRT-PCR; ed il valore 4 a 6 saggi di qRT-PCR. Infine, per considerare il numero di studi che avevano riportato lo stesso miRNA, è stato assegnato 1 punto se il miRNA era stato riportato come differenzialmente espresso in un solo lavoro, e 2 punti se era stato riportato da due lavori. I punteggi ottenuti nella valutazione delle quattro caratteristiche sono stati sommati per ottenere il valore finale di ogni miRNA ed in seguito è stata nuovamente calcolata la suddivisione in quartili della distribuzione dei valori ottenuti. Le seguenti tabelle (**Tabella 2 e 3**) mostrano il metodo di scoring appena illustrato rispettivamente per i miRNA tissutali e miRNA circolanti. I risultati sono riportati in un diagramma box and whiskers plot, in cui ogni punto rappresenta un miRNA (**Figura 13**). I miRNA appartenenti a gruppi Q3 e Max sono stati considerati come i più significativi. Le caratteristiche del metodo sono state stabilite *a priori* da tre ricercatori.

Tabella 2. “Scoring table” dei miRNA da campioni tissutali ottenuti da qRT-PCR.

Accession number	miRBase ID	miRNAs	No. of qRT-PCR	qRT-PCR score	MM	MM score	H	H score	Ref	Ref score	miRNA Vote
MIMAT0000416	hsa-miR-1-3p	miR-1	1	0	25	1	6	0	[75]	1	2
MIMAT0000099	hsa-miR-101-3p	miR-101	1	0	n.a.	0	n.a.	0	[93]	1	1
MIMAT0000445	hsa-miR-126-3p	miR-126	5	3	59	3	51	3	[85], [77]	2	11
MIMAT0000435	hsa-miR-143-3p	miR-143	4	2	32	2	24	3	[77]	1	8
MIMAT0000437	hsa-miR-145-5p	miR-145	6	4	74	3	74	3	[76], [77]	2	12
MIMAT0004658	hsa-miR-155-3p	miR-155*	1	0	25	1	6	0	[75]	1	2
MIMAT0000068	hsa-miR-15a-5p	miR-15a-5p	1	0	60	3	23	2	[94]	1	6
MIMAT0000417	hsa-miR-15b-5p	miR-15b-5p	1	0	60	3	23	2	[94]	1	6
MIMAT0000069	hsa-miR-16-5p	miR-16 / miR-16-5p	2	1	78	3	30	3	[90], [94]	2	9
MIMAT0000070	hsa-miR-17-5p	miR-17-5p	1	0	32	2	24	3	[83]	1	6
MIMAT0007890	miR-1914-3p	miR-1914-3p	1	0	18	1	7	0	[90]	1	2
MIMAT0000222	hsa-miR-192-5p	miR-192	2	1	120	4	23	2	[99]	1	8
MIMAT0000459	hsa-miR-193a-3p	miR-193a-3p	2	1	120	4	23	2	[99]	1	8
MIMAT0000461	hsa-miR-195-5p	miR-195-5p	1	0	60	3	23	2	[94]	1	6
MIMAT0001080	hsa-miR-196b-5p	miR-196b	1	0	18	1	7	0	[90]	1	2
MIMAT0000318	hsa-miR-200b-3p	miR-200b	2	1	120	4	23	2	[99]	1	8
MIMAT0000264	hsa-miR-203a-3p	miR-203	2	1	120	4	23	2	[99]	1	8
MIMAT0000462	hsa-miR-206	miR-206	1	0	25	1	6	0	[75]	1	2
MIMAT0000278	hsa-miR-221-3p	miR-221	1	0	32	2	24	3	[83]	1	6
MIMAT0000280	hsa-miR-223-3p	miR-223	2	1	17	1	6	0	[98]	1	3
MIMAT0000082	hsa-miR-26a-5p	miR-26a	1	0	n.a.	0	n.a.	0	[93]	1	1
MIMAT0004681	hsa-miR-26a-2-3p	miR-26a-2-3p	1	0	18	1	7	0	[90]	1	2
MIMAT0004673	hsa-miR-29c-5p	miR-29c*	1	0	18	1	7	0	[90]	1	2
MIMAT0000089	hsa-miR-31-5p	miR-31	1	0	25	1	20	2	[97]	1	4
MIMAT0000090	hsa-miR-32-5p	miR-32	1	0	27	2	27	3	[85]	1	6
MIMAT0000765	hsa-miR-335-5p	miR-335	1	0	27	2	27	3	[85]	1	6
MIMAT0000255	hsa-miR-34a-5p	miR-34a	1	0	47	2	10	2	[101]	1	5
MIMAT0004676/ MIMAT0000685	hsa-miR-34b-3p / hsa-miR-34b-5p	miR-34b	1	0	47	2	10	2	[101]	1	5
MIMAT0000686	hsa-miR-34c-5p	miR-34c	1	0	47	2	10	2	[101]	1	5
MIMAT0004761	hsa-miR-483-5p	miR-483-5p	1	0	25	1	6	0	[75]	1	2
MIMAT0004808	hsa-miR-625-3p	miR-625-3p	1	0	18	1	7	0	[90]	1	2
MIMAT0003322	hsa-miR-652-3p	miR-652	4	2	32	2	24	3	[77]	1	8

Note: I miRNA sono stati valutati in base al numero totale dei campioni, sani e tumorali, impiegati nell’analisi tramite qRT-PCR, in base al numero di saggi di qRT-PCR effettuati ed, in fine, in base al numero di articoli che riportavano lo stesso miRNA. Però ogni miRNA sono riportati l’Accession Number e l’identificativo unico (ID) in accord all’ultima release di miRBase (miRBase v21).

No. of qRT-PCR: numero totale delle analisi di qRT-PCR descritte negli studi e lo score corrispondente (**qRT-PCR score**); **MM:** numero dei campioni di MM usati nell’analisi di qRT-PCR e lo score corrispondente (**MM score**); **H:** numero dei campioni sani usati nell’analisi di qRT-PCR e lo score corrispondente (**H score**); **Ref:** numero del riferimento bibliografico degli articoli che fanno menzione dello stesso miRNA e lo score corrispondente (**Ref score**), I riferimenti bibliografici in parentesi sono numerate come nell’articolo originale da poco pubblicato [Micolucci L. et al., 2016]; **miRNA Vote:** score finale ottenuto per ogni miRNA aggiungendo I punteggi ottenuti valutando le caratteristiche sopra descritte [Micolucci L et al., 2016].

Tabella 3. “Scoring table” dei miRNA da campioni ematici ottenuti da qRT-PCR.

Accession number	miRBase ID	miRNAs	No. of qRT-PCR	qRT-PCR score	MM	MM score	H	H score	Ref	Ref score	miRNA Vote
MIMAT0000099	hsa-miR-101-3p	miR-101	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0000101	hsa-miR-103a-3p	miR-103 / miR-103a-3p	2	1	66	3	77	3	[88], [89]	2	9
MIMAT0000445	hsa-miR-126-3p	miR-126	2	1	89	3	106	4	[85], [86]	2	10
MIMAT0000440	hsa-miR-191-5p	miR-191	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0000075	hsa-miR-20a-5p	miR-20a	1	0	23	1	25	3	[88]	1	5
MIMAT0000280	hsa-miR-223-3p	miR-223	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0000081	hsa-miR-25-3p	miR-25	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0000083	hsa-miR-26b-5p	miR-26b	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0000086	hsa-miR-29a-3p	miR-29a	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0004673	hsa-miR-29c-5p	miR-29c*	1	0	45	2	24	3	[90]	1	6
MIMAT0000765	hsa-miR-335-5p	miR-335	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0001627	hsa-miR-433-3p	miR-433	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0006778	hsa-miR-516a-3p (unclear)	miR-516	1	0	14	0	10	2	[91]	1	3
MIMAT0004808	hsa-miR-625-3p	miR-625-3p	2	1	45	2	24	3	[90]	1	7
MIMAT0000092	hsa-miR-92a-3p	miR-92a	1	0	45	2	24	3	[90]	1	6

Note: I miRNA sono stati valutati in base al numero totale dei campioni, sani e tumorali, impiegati nell’analisi tramite qRT-PCR, in base al numero di saggi di qRT-PCR effettuati ed, in fine, in base al numero di articoli che riportavano lo stesso miRNA. Pero ogni miRNA sono riportati l’Accession Number e l’identificativo unico (ID) in accord all’ultima release di miRBase (miRBase v21).

No. of qRT-PCR: numero totale delle analisi di qRT-PCR descritte negli studi e lo score corrispondente (**qRT-PCR score**); **MM:** numero dei campioni di MM usati nell’analisi di qRT-PCR e lo score corrispondente (**MM score**); **H:** numero dei campioni sani usati nell’analisi di qRT-PCR e lo score corrispondente (**H score**); **Ref:** numero del riferimento bibliografico degli articoli che fanno menzione dello stesso miRNA e lo score corrispondente (**Ref score**), I riferimenti bibliografici in parentesi sono numerate come nell’articolo originale da poco pubblicato [Micolucci L. et al., 2016]; **miRNA Vote:** score finale ottenuto per ogni miRNA addizionando I punteggi ottenuti valutando le caratteristiche sopra descritte [Micolucci L et al., 2016].

3.2. VALUTAZIONE DELL’ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DEI MIRNA NEL MM

L’analisi statistica dei miRNA circolanti più significativi è stata realizzata utilizzando il software Meta-DiSc 1.4 [Zamora J et al., 2006]. La valutazione dell’accuratezza diagnostica è stata effettuata adottando il modello di meta-analisi di tipo bivariato per il calcolo della stima complessiva di sensibilità e specificità, e per generare la caratteristica curva SROC (summary receiver operator

characteristic) con i corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (95% IC). A causa della forte eterogeneità del set di dati, le stime complessive di sensibilità, specificità, *Diagnostic Odds Ratio* (DOR), *Positive Likelihood Ratio* (PLR) e *Negative Likelihood Ratio* (NLR) sono state effettuate in sottogruppi omogenei definiti *a priori* [Zamora J *et al.*, 2006; Walter LD *et al.*, 2002]. *Cochran's Q test* e l'*Inconsistency Index test* (I^2) sono stati impiegati per identificare le potenziali fonti di eterogeneità tra gli studi. Un valore di $P < 0,01$ per il *Cochran's Q test* oppure un valore di $I^2 > 50\%$, indicano l'esistenza di una significativa eterogeneità [Higgins JP *et al.*, 2003]. Al verificarsi di questa condizione per i valori di sensibilità e specificità, viene utilizzato il modello statistico a “*random effect*”.

3.3. ANALISI DEL POTENZIALE VALORE DIAGNOSTICO DEI MIRNA E VALUTAZIONE FUNZIONALE

I 41 miRNAs validati tramite qRT-PCR (**Tabella 5**) sono stati confrontati con i miRNA precedentemente descritte come biomarcatori e/o potenziali biomarcatori in diverse condizioni fisiopatologiche e l'inquinamento ambientale. L'incrocio dei dataset è stato effettuato utilizzando jvenn, un visualizzatore interattivo di diagrammi di Venn [Bardou P *et al.*, 2014]. In questo confronto non è stata utilizzata la nomenclatura più aggiornata dei miRNA in quanto la maggior parte dei dataset era basata su una nomenclatura che faceva riferimento alle precedenti *releases* di miRBase, al contrario è stata utilizzata una nomenclatura recente in tutti i casi in cui la “sovrapposizione” di alcuni identificativi non univoci avrebbe potuto creare confusione.

Per confermare ulteriormente il loro ruolo e il loro potenziale diagnostico, i miRNA circolanti individuati grazie alla meta-analisi, sono stati esaminati alla luce delle informazioni sperimentali presenti nel database Mirandola, che offre un'ampia classificazione dei diversi RNA non codificanti

extracellulari e circolanti manualmente curata [Russo F *et al.*, 2012, 2014].

3.4. STRUMENTI PER L'ANALISI BIOINFORMATICA DI *TARGET, PATHWAYS E NETWORK* MODULATI DAI miRNA

Per la realizzazione delle analisi computazionali, relative alla seconda parte del presente studio, sono stati utilizzati una serie di strumenti bioinformatici, introdotti qui di seguito, che consentono di eseguire: la predizione dei target molecolari dei miRNA, l'identificazione dei target validati e la predizione dei pathways e delle network tramite "functional enrichment analysis".

- **miRTarBase** è un database interattivo in cui sono stati collezionati più di 50.000 interazioni tra miRNA e proteine target (MTI) da 18 specie. I dati sono catalogati manualmente dopo screening della letteratura e data mining dei testi, per filtrare gli articoli di ricerca relativi allo studio funzionale dei miRNA. Le MTI sono validate sperimentalmente tramite reporter assay, western blotting, microarray ed esperimenti in Next-Generation Sequencing (NGS). miRTarBase fornisce un database particolarmente aggiornato rispetto ad altre piattaforme simili [Hsu SD *et al.*, 2010, 2014; Chou CH *et al.*, 2016].
- **miRNet** è uno strumento in grado di offrire un supporto completo per l'analisi statistica e l'interpretazione funzionale di dati generati negli studi sui miRNA. miRNet integra i dati provenienti da 11 diversi database - TarBase, miRTarBase, miRecords, Miranda, miR2Disease, HMDD, PhenomiR, SM2miR, PharmacomiR, EpimiR e starBase. Attualmente supporta nove organismi (Human, Mouse, Rat, Cattle, Chicken, Zebra fish, Fruit fly, *C. elegans* e *S. mansoni*).

Le sue caratteristiche peculiari sono la versatilità e la quantità delle analisi che consente di eseguire: analisi statistica (con metodi limma, Edger e HTqPCR) dei dati ottenuti da

microarray, RNA-Seq e qRT-PCR; analisi differenziale; “enrichment analysis” mediante il metodo ipergeometrico standard e l’innovativo “unbiased random sampling test”; annotazione funzionale; creazione di reti di interazione dei miRNA-target a diversi livelli di confidenza che possono essere ulteriormente ottimizzati utilizzando diversi algoritmi per migliorarne la visualizzazione e la comprensione. In particolare, miRNet offre cinque tipi di network: “miRNA-gene”, “miRNA-disease”, “miRNA-small molecule”, “miRNA-lncRNA” e “miRNA-epigenetic modifier” [Fan Y et al., 2016].

- **DIANA-microT-CDS** è l’ultima versione di Diana-microT [Maragkakis M *et al.*, 2009], un algoritmo che incorpora un approccio di apprendimento automatico per l’identificazione delle caratteristiche più rilevanti estratte dai dati ottenuti con tecnologia “photoactivatable-ribonucleoside-enhanced cross-linking immunoprecipitation” (PAR-CLIP). Questo approccio consente all’algoritmo di apprendere le caratteristiche associate ai miRNA il cui sito di legame è noto sia in sequenze codificanti (CD) che nelle sequenze 3’UTR. Per la predizione dei target, l’algoritmo considera fondamentali alcune caratteristiche come il peso, la distanza dall’estremità più vicina delle regioni (CDS o 3’UTR) o da un sito di legame adiacente, l’energia libera del duplex, il tasso di conservazione ed il contenuto in basi AU.

3.5. ANALISI SPERIMENTALE

3.5.1. Campioni analizzati

- **Preparati istologici**

Dal Dipartimento di Anatomia Patologica di Alessandria sono stati ottenuti 7 campioni di mesotelioma pleurico di tipo epitelioide e 6 campioni di tessuti mesoteliali sani prelevati da pazienti senza storia clinica di patologia tumorale. I campioni sono stati fissati in formalina, inclusi in

paraffina e sottoposti alla microdissezione con cattura laser o LCM (*Laser Capture Microdissection*). I tessuti di tipo mesoteliale, selezionati per costituire il *pool* di campioni per il controllo normale, erano costituiti da 2 campioni di pleure autoptiche, 2 campioni di pleure microdisseccate, 1 campione di pericardio e 1 campione di peritoneo. Il microdissecatore laser è uno strumento di precisione utilizzato in istopatologia per effettuare l'estrazione delle cellule di interesse da una sezione istologica montata su vetrino, in modo da consentire di ottenere un campione estremamente omogeneo. È costituito da un microscopio associato ad un dispositivo laser deputato al taglio del tessuto, basato su un fascio di radiazioni di tipo UV A che non influenzano la qualità delle componenti cellulari. Un esempio di apparecchiatura per LCM e dei passaggi per ottenere il taglio del campione sono riportati in **Figura 6** e **7**. Il taglio e il recupero della porzione di interesse dai preparati istologici, avviene senza la necessità di manipolare il campione di partenza, permettendo quindi di evitare contaminazione.

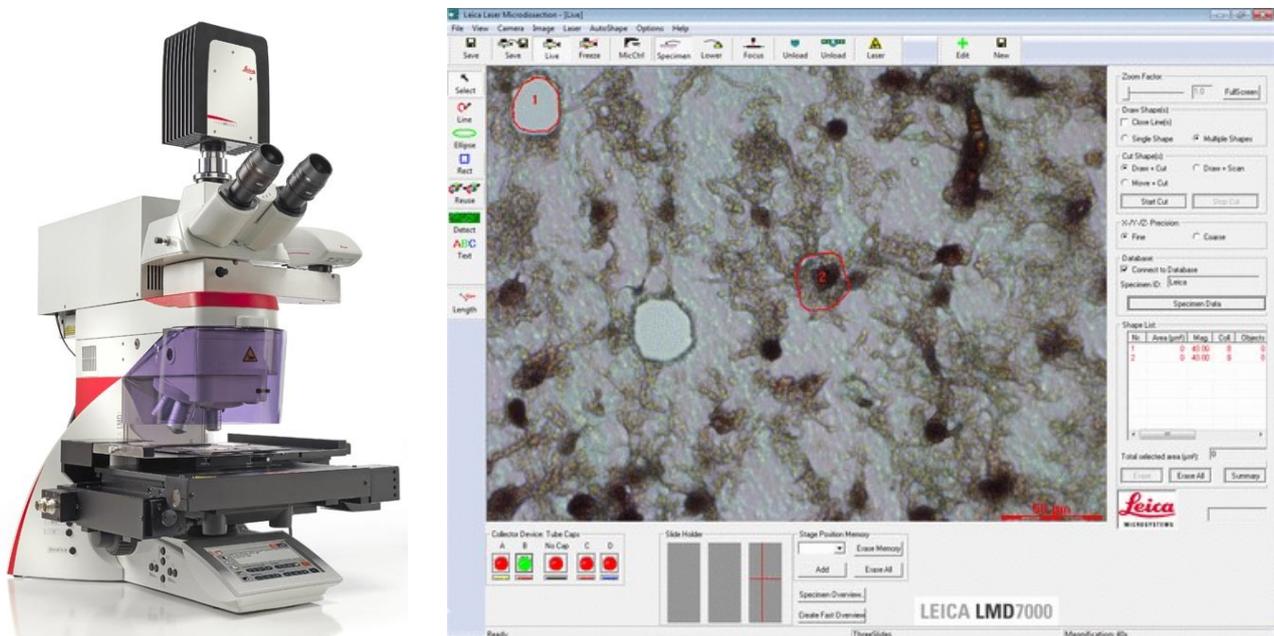


Figura 6. Apparecchiatura e software per microdissezione laser (<http://www.leica-microsystems.com/>).

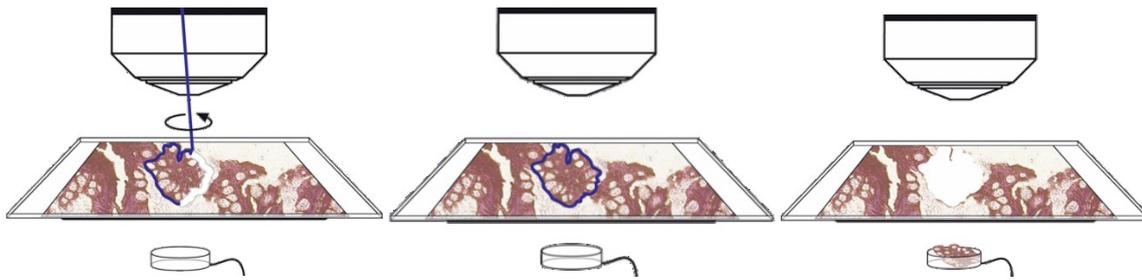


Figura 7. Rappresentazione schematica della precisione di taglio ottenuta grazie alla tecnica LCM (<http://www.leica-microsystems.com/>).

- **Campioni tissutali freschi e allestimento delle colture cellulari primarie**

Sono state allestite colture cellulari primarie a partire da 3 biopsie di mesotelioma pleurico della variante istologica epitelioide, e per la controparte sana, 3 colture cellulari primarie ottenute a partire da frammenti tissutali di sacche erniarie recuperate in seguito ad ablazione chirurgica. Quest'ultime, non appena prelevate, sono state poste in soluzione fisiologica (HBBS Gibco) utile al mantenimento dei tessuti in condizioni di vitalità e sterilità, e mantenuti a 4°C per il tempo intercorso tra il prelievo del tessuto e l'isolamento delle cellule mesoteliali.

La sacca posta in capsula Petri è stata aperta per visualizzare lo strato più interno e con una lama da bisturi sterile è stato effettuato un lieve raschiamento (“*scraping*”) allo scopo di staccare le cellule dello strato più superficiale. La lama con le cellule rimosse è stata poi lavata con terreno di coltura adatto alla crescita delle cellule mesoteliali (HAMS F-12 SIERO 10%) e la sospensione cellulare così ottenuta è stata posta in fiasche da coltura T25 (Cornig). Le fiasche sono state mantenute in incubatore (Hereus) in condizioni standard di temperatura (37°C), umidità (>98%) e concentrazione di CO₂ (5%). Dopo 12 ore le fiasche sono state esaminate per controllare l'adesione e la proliferazione cellulare, e procedere alla tipizzazione della coltura. Tutte quelle risultate idonee sono state lasciate in coltura per circa una settimana fino ad arrivare alla confluenza all'interno delle fiasche. A questo punto le cellule sono state staccate dal supporto tramite tripsina e riseminate per l'espansione della coltura. La coltura è stata lasciata espandere per un numero massimo di 8 cicli, per poi procedere con la raccolta e l'estrazione dell'RNA. Dopo tale periodo le colture non utilizzate sono state distrutte.

Tutte le procedure descritte sono state eseguite in condizioni di sterilità, operando sotto cappa sterile a flusso laminare con doppia barriera *biohazard* (B3).

- **Condizioni di crescita**

Le colture cellulari primarie di MM sono state coltivate in terreno di coltura RPMI ricostituito con 1% di glutammina, 1% di penicillina/streptomicina con l'aggiunta del 10% di siero bovino fetale (FBS). Mentre la coltura primaria di cellule mesoteliali è stata messa in coltura in HAM'S /F10 con l'aggiunta del 15% di FBS, 1% L-glutammina, 1% di penicillina/streptomicina. Entrambe le colture sono state lasciate ad incubare a 37°C con il 5% di CO₂.

Per definizione, si definisce coltura primaria quella ottenuta dalla dissoluzione di un tessuto e valutata entro il ventesimo passaggio. Dal ventesimo passaggio in poi, una coltura viene considerata linea tumorale.

3.5.2. Estrazione dei MicroRNA

L'RNA totale è stato estratto a partire dai campioni cellulari e tissutali grazie all'uso del kit mirVana Isolation Kit (AMBION, Thermo Fisher Scientific) che, seguendo le istruzioni del produttore,



Figura 8. *mirVana Isolation Kit (AMBION, Thermo Fisher Scientific - www.thermofisher.com) e procedura di purificazione degli RNA totali.*

consente l'isolamento di tutte le specie di RNA inclusi i microRNA. Il kit utilizzato si basa sull'estrazione e purificazione del RNA mediante tecnica cromatografica, grazie all'utilizzo di particolari colonnine da centrifuga (*spin columns*) che contengono un filtro resinato in grado di intrappolare l'acido nucleico in maniera rapida e specifica. Durante i vari passaggi di estrazione, la membrana viene lavata con soluzioni saline che facilitano l'eliminazione di tutti i componenti cellulari e lasciare adesi alla resina esclusivamente gli acidi nucleici che alla fine vengono eluiti con l'uso di un tampone acquoso (**Figura 8**).

Per quanto riguarda l'estrazione dei microRNA a partire dai tessuti inclusi in paraffina, è stata utilizzata la metodica di deparaffinazione come indicato dalla casa produttrice del kit utilizzato. Le cellule invece sono state semplicemente staccate dal supporto e centrifugate per ottenere il "pellet" cellulare da cui procedere all'estrazione degli RNA totali.

In seguito all'estrazione è possibile effettuare sia la quantizzazione dell'RNA che la valutazione critica della sua qualità per verificare che sia adatto alle successive analisi. La quantificazione dell'RNA estratto è stata fatta con spettrofotometro Nanodrop (Nano-Drop ND-1000) ($260/280=1.8-2.0$).

3.5.3. Analisi del profilo di espressione dei miRNA tramite *microarray*

L'analisi del profilo di espressione dei miRNA è stata effettuata mediante tecnologia "*taqman human microRNA array A*" (Applied Biosystems). L'Array A consente di analizzare l'espressione di 377 miRNA umani, i più frequentemente studiati, e di quattro controlli (tre positivi ed uno negativo). I tre controlli positivi sono costituiti da due piccoli RNA nucleolari (RNU44, RNU48), generalmente espressi a livelli alti e costanti in numerosi tessuti umani, e da un rRNA (MammU6). Il controllo negativo è costituito da un miRNA non umano (ath-miRNA-159a). Per l'analisi si procede con la retrotrascrizione di 3 μ l della soluzione di RNA utilizzando una miscela di *primer* specifici

(Megaplex™ RT Primers, Human Pool A, Applied Biosystems) secondo le istruzioni del produttore. Questa fase permette di ottenere copie di cDNA stabili a partire dal RNA. Dopo la retrotrascrizione è stata effettuata la preamplificazione del cDNA utilizzando l'apposito *kit* (Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A, Applied Biosystem). In fine, 9 µl del cDNA preamplificato è stato utilizzato per l'analisi con il TaqMan® Human MicroRNA A Array v2.0 (Applied Biosystem). Uno schema delle varie fasi del processamento dei campioni, a partire dall'estrazione fino all'analisi del profilo di espressione, è riportato in **Figura 9**.

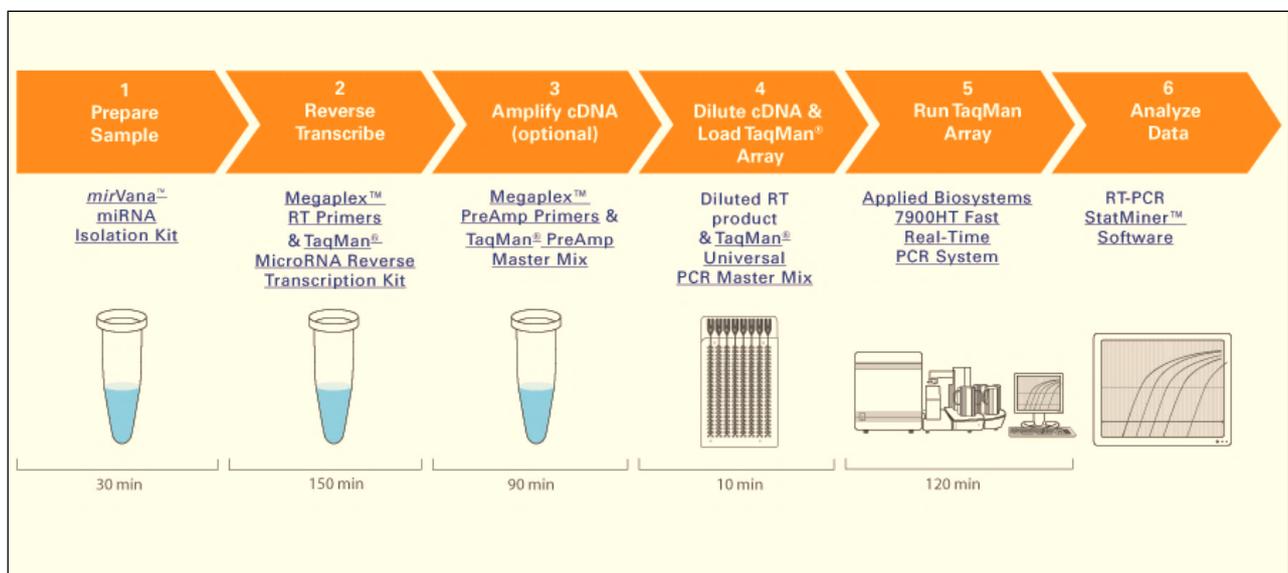


Figura 9. *processamento dei campioni a partire dall'estrazione fino all'analisi del profilo di espressione (Applied Biosystems).*

3.5.4. Validazione dei dati in *Real-Time PCR*

I miRNA che dal *profiling* sono risultati essere differenzialmente espressi nei due gruppi di campioni analizzati sono stati quantificati mediante saggio singolo in qRT-PCR (TaqMan® MicroRNA Assay, Applied Biosystem).

Per valutare il livello di espressione dei microRNA si procedere, anche in questo caso, con una retrotrascrizione grazie all'impiego di una DNA polimerasi RNA dipendente. La retrotrascrizione (RT) è stata effettuata mediante TaqMan® MicroRNA RT kit, utilizzando 5 µl di miscela di

retrotrascrizione contenente 1 μl di primer specifico per il miRNA di interesse e 1,67 μl di RNA. La miscela è stata incubata a 16°C per 30', a 42 °C per 30' e a 85°C per 5'.

Si è proceduto infine con la qRT-PCR che permette di quantizzare in tempo reale l'amplificazione durante la fase esponenziale della PCR, momento in cui l'efficienza della reazione è massima. Nello specifico si utilizzano due *primers* e una sonda di tipo TaqMan[®], complementare al sito da amplificare, che rilascia un segnale fluorescente durante l'attività della DNA polimerasi grazie alla liberazione del fluoroforo dal *quencher* inibitore. La fluorescenza che viene captata dallo strumento è proporzionale al prodotto di PCR e che fornisce una quantificazione precisa. Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione in cui è fondamentale stabilire il Ct (ciclo soglia), momento in cui la fluorescenza diventa rilevabile dallo strumento. Per la messa a punto della Qrt-PCR sono stati utilizzati 1 μl di 20x Taqman MicroRNA Assay nel quale sono presenti i *primers* specifici per la qRT-PCR e le sonde (5'-FAM), 10 μl di 2x TaqMan Universal Master mix, no UNG (Applied Biosystems) e i 5 μl dell'RT, per un volume di reazione totale di 20 μl . La reazione è stata prima incubata a 95°C per 2' seguiti da 40 cicli di 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. I dati sono stati analizzati mediante il software "Real Time PCR OpticonMonitor version 2" (MJ Research), con settaggio automatico del Ct. Uno schema delle varie fasi del processamento dei campioni, a partire dall'estrazione fino all'analisi tramite qRT-PCR, è riportato in **Figura 10**.

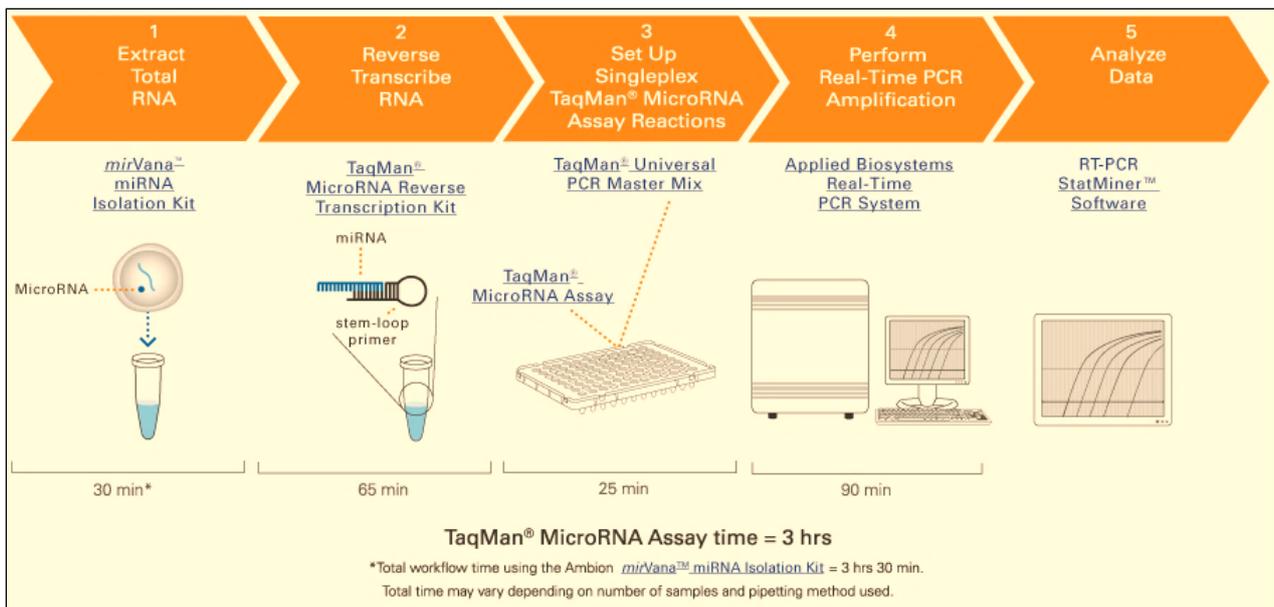


Figura 10. *Processamento dei campioni a partire dall'estrazione fino all'analisi mediate RT-PCR (Applied Biosystems).*

3.5.5. Analisi statistiche

I miRNA espressi a livelli rilevabili nel *profiling*, in almeno l'85% dei campioni analizzati, sono stati inclusi nell'analisi finale dei dati. Per ridurre eventuali errori causati dalla scelta arbitraria di un miRNA come fattore di normalizzazione, i valori dei miRNA sono stati normalizzati usando il metodo della normalizzazione *Quantile* nei settaggi del *software* miRNet. Questo metodo ha lo scopo di rendere identiche le distribuzioni empiriche dei *microarray*. Le **Figure 11** e **12** mostrano tramite box-plot la distribuzione dell'espressione dei miRNA, rispettivamente nei campioni tissutali e cellulari, prima e dopo normalizzazione.

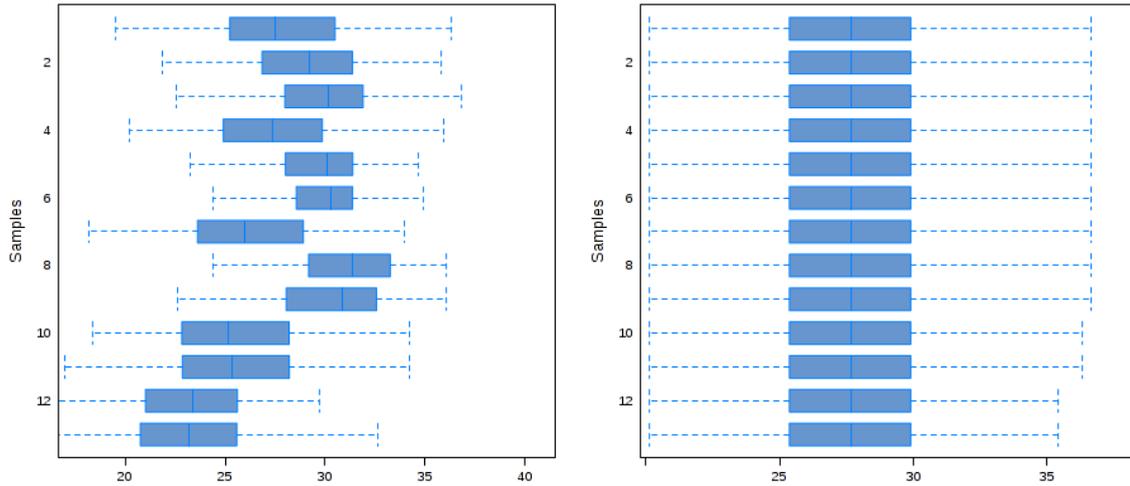


Figura 11. Distribuzione dell'espressione dei miRNA nei campioni tissutali, prima e dopo normalizzazione Quantile.

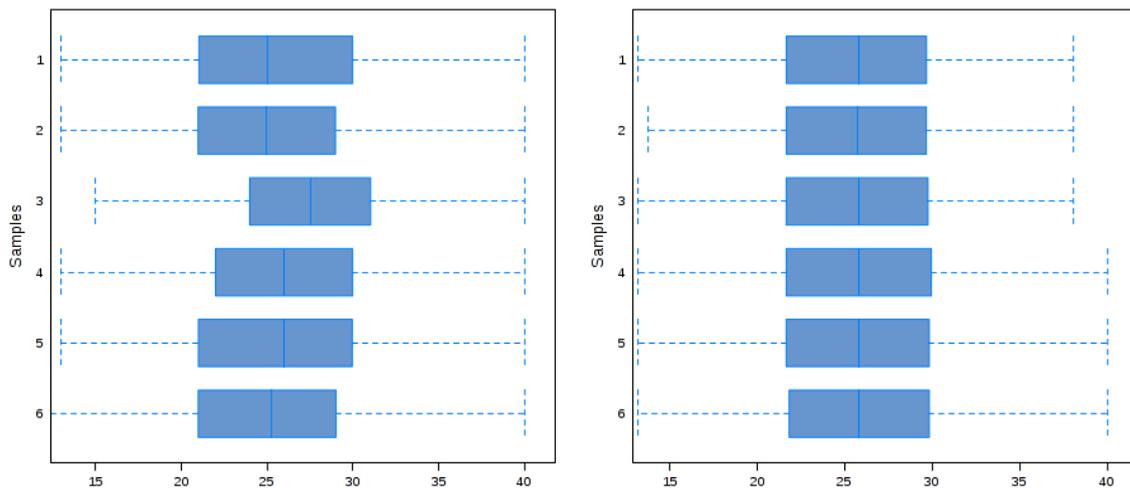


Figura 12. Distribuzione dell'espressione dei miRNA nei campioni cellulari, prima e dopo normalizzazione Quantile.

Per la discriminazione dei miRNA *up*- e *down*-regolati è stato scelto il metodo Limma che risulta particolarmente appropriato per gli *array*, in quanto le successive valutazioni statistiche sono applicate sui dati trasformati in \log_2 . Il metodo restituisce i valori di “ $\text{Log}_2(\text{FC})$ ” come indicazione del trend di deregolazione. Sono stati considerati significativamente *up*- o *down*-regolati quei miRNA i cui valori di $\text{Log}_2(\text{FC})$ erano significativi per $p < 0,05$.

Il T-test per variabili indipendenti è stato invece utilizzato per determinare la significatività della differenza di espressione dei miRNA validati in qRT-PCR. I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati

significativi. I dati di espressione sono stati normalizzati utilizzando snoRNA U44 e snoRNA U48 come controlli interni.

4. RISULTATI

4.1. RASSEGNA SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

4.1.1. I miRNA associati al MM: stato dell'arte

La varietà di approcci e tecniche adottati nei 39 studi inclusi nella rassegna sistematica, da un lato rende difficile una loro classificazione e dall'altro rende faticoso il tentativo di riassumerne i risultati in modo conciso. Tuttavia, considerando il disegno di studio adottato in ogni lavoro, si possono suddividere gli studi in: 19 lavori incentrati prevalentemente sull'analisi del profilo di espressione di molteplici miRNA grazie alla tecnica del “*profiling*”; 11 basati sull'analisi dell'espressione di singoli miRNA; ed infine 9 basati sulla valutazione dell'attività dei miRNA esclusivamente mediante saggi funzionali. Come indicato nel paragrafo dei Materiali e Metodi, quest'ultimo gruppo di lavori è stato preso in considerazione solamente per il suo contributo qualitativo. Inoltre, dei 39 studi esaminati 6 erano focalizzati sulle modificazioni epigenetiche dei miRNA, ed uno solo sulla deregolazione dei miRNA in tumori polmonari legati all'esposizione ad amianto ma diversi dal mesotelioma, tra cui l'adenocarcinoma, il carcinoma adenosquamoso ed i tumori del polmone a piccole e grandi cellule [Nymark P *et al.*, 2011]. Poiché non è stato individuato nessuno studio che prendesse in considerazione l'analisi dei miRNA nel mesotelioma peritoneale e pericardico, nella presente rassegna tutti i miRNA che saranno riportati come “MM-associati” faranno riferimento esclusivamente al mesotelioma pleurico.

Studi basati sul “profiling” dei miRNA

Dal momento che le funzioni dei miRNA sono esplicate nell'ambito di complesse reti di regolazione che agiscono sulla modulazione dell'espressione genica, abbiamo considerato lo studio del profilo di espressione dei miRNA (*profiling*) come l'approccio di screening più efficace in quanto consente l'analisi contemporanea di centinaia di miRNA.

- Profiling dei miRNA in campioni tissutali di mesotelioma. Guled e collaboratori sono stati i primi a documentare la deregolazione di una moltitudine di miRNA confrontando sia campioni tissutali di MM rispetto al tessuto normale (pericardio da soggetti sani), che dal confronto diretto tra i vari istotipi (epitelioide, sarcomatoide e bifasico) [Guled *et al.*, 2009]. In seguito numerosi studi hanno cercato di individuare i miRNA in grado di distinguere il MM da altri tipi di tumore. Per primi sono stati identificati 7 miRNA specifici per il MM, tra cui miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429, e potenzialmente utili per la diagnosi differenziale da adenocarcinoma, ma non per la distinzione dei diversi sottotipi istologici [Gee GV *et al.*, 2010]. Successivamente è stata dimostrata l'espressione differenziale di miR-193-3p, miR-192 e miR-200c nei tessuti di MM rispetto ai carcinomi [Benjamin H *et al.*, 2010], mentre il miR-29c * (miR-29c-5P secondo la nomenclatura aggiornata) è stato proposto come un probabile biomarcatore prognostico [Pass HI *et al.*, 2010]. L'analisi combinata dei modelli di espressione dei miRNA e di test funzionali ha messo in evidenza che il miR-1 è ipoespresso nel MM rispetto al mesotelio normale, e che il ripristino della sua espressione è in grado di inibire la proliferazione cellulare e l'apoptosi [Xu I *et al.*, 2013]. Con un approccio simile, è stato visto che la mancata espressione del miR-145 permette di distinguere i campioni tissutali di MM da campioni tissutali di mesotelio normale [Ciocie M *et al.*, 2013]. Il gruppo di Andersen ha identificato quattro miRNA che potrebbero essere utilizzati come "classificatori diagnostici" capaci di essere utilizzati per discriminare con elevata precisione i MM da campioni non tumorali, dimostrando inoltre che il trattamento chemioterapico riduce la loro espressione differenziale [Andersen M *et al.*, 2014]. I due studi più recenti nel settore hanno rivelato che 19 miRNA sono differenzialmente espressi nel MM, nell'infiammazione pleurica cronica e nell'iperplasia mesoteliale rispetto ai controlli di tipo non-tumorale e/o non-infiammatorio [Ramírez-Salazar EG *et al.*, 2014], e che l'espressione di 6 miRNA potrebbe fornire un'indicazione sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da MM [Kirschner MB *et al.*, 2015]. Undici miRNA significativamente iperespressi sono stati identificati anche dal

confronto di campioni di versamento pleurico prelevati da pazienti affetti da MM rispetto alla stessa tipologia di campione prelevato da pazienti affetti da proliferazioni benigne in seguito ad esposizione ad amianto [Ak G *et al.*, 2015]. Infine, uno studio che ha integrato i dati provenienti dall'analisi dei miRNA, dei messaggeri e delle alterazioni del numero di specifiche regioni cromosomiche, ha identificato ulteriori 13 miRNA e i loro geni target che sembrerebbero significativamente modulati in campioni di tessuto da pazienti affetti da tumore del polmone in seguito ad esposizione ad amianto confrontati con gli stessi istotipi ottenuti da pazienti senza una pregressa storia di esposizione [Nymark P *et al.*, 2011].

- *Profiling dei miRNA in cellule di MM.* L'utilizzo di linee cellulari di MM consente di ovviare facilmente al problema della raccolta di numeri adeguati di campioni tissutali. I primi due studi pubblicati, esplorano i profili di espressione dei miRNA delle linee cellulari di MM comparandoli con quelli delle cellule mesoteliali [Busacca S *et al.*, 2010; Balatti V *et al.*, 2011], ma poco più tardi i dati ottenuti sono stati messi in discussione da un lavoro che descrive un andamento opposto per alcuni miRNA quando analizzati in campioni tissutali [Andersen M *et al.*, 2012]. Ivanov e collaboratori hanno suggerito che miR-31 potrebbe servire come fattore prognostico poiché *in vitro* la sua mancata espressione ha un effetto pro-oncogeno sulle linee cellulari di MM [Ivanov SV *et al.*, 2010]. I primi studi, che hanno spostato il focus della ricerca dai miRNA cellulari/tissutali a quelli presenti nella circolazione sanguigna, sono stati condotti da Santarelli *et al.* [Santarelli L *et al.*, 2011] e Tomasetti *et al.* [Tomasetti M *et al.*, 2012]. Mentre il primo lavoro ha esaminato il profilo di espressione dei miRNA nei tessuti e ha in seguito validato il significato clinico del miR-126 nei sieri di pazienti affetti da MM, il secondo studio ha suggerito che il miR-126 circolante è un marcatore di malattia sensibile ma che dovrebbe comunque essere utilizzato in combinazione con altri biomarcatori, come la mesotelina, per aumentare i livelli di specificità [Tomasetti M *et al.*, 2012].
- *Profiling dei miRNA circolanti nei pazienti affetti da MM.* I miRNA circolanti sono dei

candidati particolarmente promettenti per lo sviluppo di tecniche non invasive di diagnosi precoce. Un nuovo approccio, basato sulla conoscenza che i tumori generano una caratteristica “impronta digitale” costituita dai miRNA della frazione cellulare del sangue periferico [Häusler SFM *et al.*, 2010], ha dimostrato che i livelli del miR-103 sono in grado di discriminare i pazienti affetti da MM dai controlli sani e dai soggetti esposti all’amianto [Weber DG *et al.*, 2012]. La combinazione del miR-103 (miR-103a-3p secondo la nomenclatura aggiornata) con la mesotelina ha migliorato le prestazioni di questo nuovo approccio diagnostico [Weber DG *et al.*, 2014]. Il primo studio di *profiling* dei miRNA nel plasma e nel siero è stato condotto da Kirschner *et al.*, che sono stati in grado di mostrare che i livelli del miR-625-3p sembrano avere elevati livelli di specificità, sensibilità e precisione nel differenziare pazienti affetti da MM dai pazienti affetti da asbestosi [Kirschner MB *et al.*, 2012]. Infine, lo studio più recente ha identificato nel siero due differenti “signature” di miRNA correlate rispettivamente con il sottotipo istologico del MM e con l’esito clinico dei pazienti [Lamberti M *et al.*, 2015].

Analisi di espressione e analisi funzionale di singoli microRNA

In diverse ricerche è stato affrontato lo studio di singoli miRNA anziché di un gruppo di essi. Fassina e colleghi hanno studiato la modulazione della transizione epitelio-mesenchimale scoprendo che l’ipoespressione del miR-205 correla con il fenotipo mesenchimale e con una malattia più aggressiva [Fassina A *et al.*, 2012]. Uno studio condotto su linee cellulari di MM, che ha preso in esame la sovraespressione del gene EZH2, che codifica per componenti fondamentali del “Polycomb Repressor Complex-2” (PRC-2) coinvolto nella patogenesi di diversi tipi di cancro, ha trovato una bassa espressione dei miRNA (miR-101 e miR-26) responsabili della regolazione del suo RNA messaggero [Kemp CD *et al.*, 2012]. L’analisi combinata dell’espressione di miR-15 e miR-16 ha permesso di documentare che la loro significativa ipo-espressione nel MM rispetto al mesotelio

normale, è correlata ad una funzione di tipo *tumor-suppressor*; inoltre, il ripristino dei loro livelli di espressione sembra essere correlato all'inibizione della proliferazione [Reid G *et al.*, 2013]. E' stato anche documentato che la modulazione dei miR-23a e miR-27a nel MM inducono il silenziamento di ZIC1, un potenziale gene *tumor-suppressor* coinvolto nella regolazione dell'apoptosi [Cheng YY *et al.*, 2013]. PVT1 è un altro oncogene noto che agisce alla stregua di un RNA non codificante, attraverso la produzione di diverse isoforme a partire dallo splicing alternativo. Il locus di PVT1 è frequentemente interessato da un aumento del numero di copie nelle linee cellulari di MM che, in combinazione con la deplezione del miR-1204 codificato dallo stesso locus, promuove la sovra-espressione di geni anti-apoptotici e faorisce lo sviluppo di un fenotipo maligno [Riquelme E *et al.*, 2014]. Anche per il miR-31 è stata riportata una significativa riduzione dell'espressione nel MM rispetto alle proliferazioni mesoteliali reattive, mentre sembra che la sua aumentata espressione sia significativamente associata ad una prognosi sfavorevole nei pazienti con MM di tipo sarcomatoide [Matsumoto S *et al.*, 2014]. Altri dati mostrano che il miR-223 è responsabile della modulazione di STMN1, che ha un ruolo importante nel rimodellamento dei microtubuli; entrambi sono coinvolti nella via di trasduzione del segnale di JNK [Birnie KA *et al.*, 2015]. L'espressione differenziale della famiglia dei miRNA miR-192, miR-193a-3p e miR-200, nella pleura normale e in campioni di MM ha evidenziato una significativa riduzione di miR-192 e miR-193a-3p nei campioni di MM. Infine, il ripristino dei livelli di espressione di miR-193a-3p inibisce la crescita delle cellule di MM e delle cellule tumorali xenotrapiantate *in vivo* [Williams M *et al.*, 2015].

Mirnas and epigenetic modifications

Similmente ai geni codificanti proteine, i geni che codificano per i miRNA sono interessati da mutazioni epigenetiche. Lo stato di metilazione del DNA è comunemente alterato nelle cellule tumorali, e le significative alterazioni epigenetiche rilevabili nel mesotelioma sono state associate all'esposizione ad agenti cancerogeni come il tabacco, il nichel e l'amianto [Crispi S *et al.*, 2010]. Uno stato di metilazione aberrante e il conseguente silenziamento del miR-34b e del miR-34c è stato

descritto anche in diversi campioni di MM [Kubo T *et al.*, 2011]. Una vasta indagine funzionale dell'attività dei miR-34b / c ha suggerito che la deregolazione dei membri della famiglia del miR-34 induce le cellule mesoteliali umane alla proliferazione e all'invasione, svolgendo così un ruolo importante nella cancerogenesi [Tanaka M *et al.*, 2013]. La valutazione preclinica terapia genica basata sui miR-34b / c veicolati da adenovirus, ha mostrato risultati promettenti nel trattamento del mesotelioma pleurico [Ueno T *et al.*, 2014]. L'approccio terapeutico basato sui membri della famiglia dei miR-34 promuove l'apoptosi in seguito ad induzione con radiazioni [Maki T *et al.*, 2012] anche in cellule di MM di tipo epiteliale [Ghawanmeh T *et al.*, 2011]. Un nuovo test denominato “digital real-time methylation-specific PCR”, per la quantificazione in tempo reale della metilazione dei miRNA circolanti, è stato sviluppato dal gruppo di Muraoka e potrebbe essere la base per lo sviluppo di un nuovo sistema di rilevazione delle mutazioni epigenetiche dei miRNA [Muraoka T *et al.*, 2013].

Studi di analisi funzionale di specifici microRNAs condotti in assenza di analisi di espressione

Gli studi che non forniscono una quantificazione diretta dei miRNA possono comunque avere una potenziale importanza traslazionale e sono stati inclusi nella presente rassegna per fornire un quadro più esaustivo. Il trattamento di linee cellulari di MM con Ranpirnase (Onconase^(R)), un agente chemioterapico che induce l'iper-espressione del miR-17* e l'ipo-espressione del miR-30c, indica che questi miRNA hanno attività anti-tumorale, confermata dall'inibizione dell'espressione di specifici target tra cui di NF-kB [Goparaju CM *et al.*, 2011; Nasu M *et al.*, 2011]. L'espressione della famiglia dei let-7 sembra essere indotta dall'attivazione di EphrinA1, il ligando del recettore Ephrin type-A, che sopprime la crescita delle cellule di MM bersagliando il proto-oncogene RAS [Khodayari N *et al.*, 2011]. Un recente lavoro ha confermato l'ipotesi secondo la quale il miR-126 influenza il metabolismo energetico mitocondriale, e la sua iper-espressione induce la soppressione delle cellule tumorali di MM attraverso lo stress ossidativo [Tomasetti M *et al.*, 2014]. Infine, la valutazione dei profili di espressione dei miRNA in un pannello di linee cellulari di MM farmaco-sensibili e farmaco-

resistenti, al fine di esplorare nuove possibilità terapeutiche, ha suggerito recentemente una correlazione tra la modulazione del cluster dei miR-379/411 e la resistenza ai farmaci. I miR-379 e miR-411 sono stati implicati nella promozione dell'invasione e della resistenza ai farmaci grazie al legame diretto con il loro target IL-18 in linee cellulari di MM [Yamamoto K *et al.*, 2014].

4.1.2. Identificazione dei miRNA caratteristici del MM e dell'esposizione ad amianto

La breve panoramica, riportata nel paragrafo precedente, documenta l'identificazione di un gran numero di miRNA differenzialmente espressi nei campioni provenienti da pazienti affetti da MM, da soggetti con una storia di esposizione ad amianto e da soggetti sani. Sebbene l'identificazione di specifiche molecole con rilevanza clinica richiede una rigida validazione sperimentale, è molto probabile che singoli miRNA, significativamente correlati all'esposizione all'amianto e all'insorgenza del MM, siano individuati in diversi studi.

Un approccio logico per distinguere i miRNA rilevanti da quelli spuri è quello di concentrarsi su quelli descritti con maggior frequenza. Di conseguenza, abbiamo applicato il tradizionale metodo di "conteggio dei voti" a tutti i miRNA che sono stati indicate come deregolati dai 30 studi selezionati ed inclusi nella rassegna sistematica della letteratura. Questo metodo ci ha permesso di scoprire che i miRNA più frequentemente riportati in letteratura, sono stati descritti in almeno 4/5 pubblicazioni scientifiche come mostrato dalla **Tabella 4**. La **Tabella Supplementare 4** mostra invece tutti i 213 miRNA identificati, compresi quelli riportati in 3, 2, 1 in un singolo di studio. In entrambe le tabelle, il trend di deregolazione dei miRNA è indicato grazie all'aiuto di frecce che puntano in alto per i miRNA iper-espressi o up-regolati ed in basso per i miRNA ipo-espressi o down-regolati mentre per i miRNA per i quali non è stato descritto un chiaro trend di deregolazione (ad esempio quelli modulati

nei diversi istotipi di MM e quelli per i quali non sono state fornite informazioni sufficienti) sono accompagnati da una freccia orizzontale e definiti semplicemente “deregolati”. Non è stato possibile classificare i miRNA a seconda del numero di campioni in cui erano stati analizzati o in base ad altri parametri più oggettivi, perché la maggior parte degli studi non hanno fornito tali informazioni.

Tabella 4. MiRNA associati al mesotelioma e all’esposizione ad amianto identificati grazie ad un metodo di “vote-counting” tradizionale.

Number of common comparison categories	miRNAs	MM vs normal tissues / benign proliferations	MM vs other cancers or different histotypes	MM blood samples vs blood healthy samples	MM cells vs Normal cells
MiRNAs deregulated in all comparison categories	miR-17-5p	↓	→	↓	↑
	miR-20a / miR-20a-5p	↑	→	↓	↑
	miR-21 / miR-21-5p	↑	→	↓	→
	miR-29c* / miR-29c-5p	↓	→	↑	↓
	miR-30c	↓	→	↓	↑
	miR-92 / miR-92a / miR-92a-3p	→ ↑	→	↑ ↓	↑

Note: I miRNA riportati come differenzialmente espresso sono stati estratti dagli articoli sperimentali e classificati in base a 4 categorie di comparazione: a) MM tissue vs. normal or non-cancer tissue; b) MM tissue vs. other cancer tissues; c) MM blood samples vs. normal blood samples; and d) MM cell lines vs. normal cell lines. I miRNAs sono stati indicate come iper-espressi, ipo-espressi o semplicemente deregolati sulla base delle informazioni presenti negli articoli sperimentali di riferimento.

↑: miRNA up-regolati, ↓: miRNA down-regolati, →: miRNA deregolati. Per questi ultimi non è stato descritto un chiaro trend di deregolazione ed identifican, ad esempi, quelli modulati nei diversi istotipi di MM e quelli per i quali non sono state fornite informazioni sufficient. La nomenclatura è stata aggiornata in tutti quei casi in cui una sovrapposizione di identificativi avrebbe potuto generare confusione.

Nella maggior parte dei casi, miRNA analizzati nella stessa tipologia di campioni rivelano la stessa direzione di deregolazione; in particolare, i miR-101-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-192 e miR-195-5p appaiono costantemente down-regolati in tutti i tipi di campioni. Al contrario, altri miRNA mostrano un’espressione differente nei diversi campioni, forse in relazione alle diverse tipologie di analisi, metodi di conservazione o di raccolta dei campioni; ad esempio i campioni tissutali micro dissecati con tecnologia LCM mostrano un diverso profilo di espressione dei miRNA rispetto ad una biopsia convenzionale a causa della minore interferenza da parte del tessuto normale circostante.

Inoltre, anche se alcuni lavori hanno esaminato il ruolo potenziale di alcuni miRNA per differenziare gli istotipi di MM e per distinguere il MM dal carcinoma polmonare, i dati si sono rivelati troppo scarsi per effettuare qualsiasi tipo di analisi statistica.

L'approccio tradizionale di *vote-counting* ha evidenziato enormi discrepanze di espressione dei miRNA tra i vari campioni, fallendo nell'identificazione dei miRNA che potrebbero essere utili per distinguere i campioni di MM o i soggetti con una storia di esposizione ad amianto da quelli sani. L'elevata variabilità dei campioni analizzati e dei metodi adottati dai vari studi è sicuramente un fattore che ha contribuito notevolmente ad accrescere la complessità dei dati. Il sospetto che alcuni dei miRNA deregolati individuati attraverso il *vote-counting* possano essere dei falsi positivi, ci ha spinto a cercare di identificare esclusivamente quelli che potessero giocare un ruolo chiave nella patogenesi del MM e nelle neoplasie correlate all'esposizione ad amianto.

4.1.2.1. Ricerca dei microRNAs strettamente correlati al MM

Per ridurre il “rumore di fondo” e identificare un gruppo di miRNA che possa avere un ruolo nella diagnosi precoce, abbiamo scelto di includere nelle successive analisi solo i miRNA validati tramite qRT-PCR ed ottenuti dal confronto di (a) campioni tissutali di MM vs. campioni tissutali normali o non-tumorali, e di (c) campioni di sangue da pazienti affetti da MM vs. campioni di sangue da soggetti sani.

In seguito alla selezione di queste due categorie di comparazione, è stata condotta una meta-analisi qualitativa nel tentativo di rifinire i risultati ottenuti in precedenza. Per ogni miRNA è stato calcolato un valore ed è stato utilizzato un *box-plot* per rappresentare la suddivisione in quartili e la distribuzione dei miRNA deregolati nei tessuti e nei campioni di sangue (**Figura 13**). I miRNA compresi nell'intervallo della distribuzione tra Max e Q3 sono stati considerati i più utili per distinguere i pazienti affetti da MM rispetto ai soggetti sani o esposti ad amianto.

Il metodo ha permesso di individuare i 9 miRNA con valenza diagnostica a livello tissutale, vale a

dire i miR-145-5p, miR-126-3p, miR-16-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, miR-203-3p, miR-143-3p e miR-652-3p (**Figura 13**). Tutti e nove sono down-regolati nel MM rispetto ai soggetti sani (**Tabella 5**) e questo trend di deregolazione nei campioni tissutali di MM è stato confermato da più di una serie di qRT-PCR, come descritto nei Metodi. Inoltre, i miR-145, miR-126 e miR-16-5p sono stati riportati da due studi indipendenti mentre i miR-192, miR-193a-3p, miR-200b, e miR-203 sono il risultato dell'analisi del pool più numeroso di campioni di MM (> 100) analizzato fino ad oggi (**Tabella 5**). Una “signature” che comprendesse questi 9 miRNA potrebbe quindi avere una rilevanza clinica per i pazienti affetti da MM.

Tabella 5. *MiRNA associati al MM ottenuti dall'analisi tramite qRT-PCR ed inclusi nella meta-analisi qualitativa.*

MM vs non-cancer tissues													MM blood samples vs blood healthy samples			
Accession number	miRBase ID	miRNAs	N°qRT-PCR	MM	H	D	N°qRT-PCR	MM	H	D	Gene family	Cluste Clustered miRNAs red miRNAs	Cytogenetic location			
MIMAT0000416	hsa-miR-1-3p	miR-1	1	25	6	↓					mir-1	hsa-mir-1-2, hsa-mir-133a-1	20q13.33, 18q11.2			
MIMAT0000099	hsa-miR-101-3p	miR-101	1	n.a.	n.a.	↓	1	14	10	↑	mir-101	hsa-mir-101-1, hsa-mir-3671	1p31.3, 9p24.1			
MIMAT0000101	hsa-miR-103a-3p	miR-103 / miR-103a-3p					2	66	77	↓	mir-103	hsa-mir-103a-2, hsa-mir-103b-2, hsa-mir-103b-1, hsa-mir-103a-1	20p13, 5q34			
MIMAT0000445	hsa-miR-126-3p	miR-126	5	59	51	↓	2	89	106	↓	mir-126	/	9q34.3			
MIMAT0000435	hsa-miR-143-3p	miR-143	4	32	24	↓					mir-143	hsa-mir-145, hsa-mir-143	5q32			
MIMAT0000437	hsa-miR-145-5p	miR-145	6	74	74	↓					mir-145	hsa-mir-143, hsa-mir-145	5q32			
MIMAT0004658	hsa-miR-155-3p	miR-155*	1	25	6	↑					mir-155	/	21q21.3			
MIMAT0000068	hsa-miR-15a-5p	miR-15a-5p	1	60	23	↓					mir-15	hsa-mir-15a, hsa-mir-16-1	13q14.2			
MIMAT0000417	hsa-miR-15b-5p	miR-15b-5p	1	60	23	↓					mir-15	hsa-mir-15b, hsa-mir-16-2	3q25.33			
MIMAT0000069	hsa-miR-16-5p	miR-16 / miR-16-5p	2	78	30	↓					mir-15	hsa-mir-15a, hsa-mir-16-1, hsa-mir-15b, hsa-mir-16-2	13q14.2, 3q25.33			
MIMAT0000070	hsa-miR-17-5p	miR-17-5p	1	32	24	↓					mir-17	hsa-mir-17, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a, hsa-mir-20a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-92a-1	13q31.3			
MIMAT0000440	hsa-miR-191-5p	miR-191					1	14	10	↓	mir-191	hsa-mir-191, hsa-mir-425	3p21.31			

MIMAT0007890	miR-1914-3p	miR-1914-3p	1	18	7	↓					mir-1914	hsa-mir-647, hsa-mir-1914	20q13.33	
MIMAT0000222	hsa-miR-192-5p	miR-192	2	120	23	↓					mir-192	hsa-mir-6750, hsa-mir-194-2, hsa-mir-192	11q13.1	
MIMAT0000459	hsa-miR-193a-3p	miR-193a-3p	2	120	23	↓					mir-193	/	17q11.2	
MIMAT0000461	hsa-miR-195-5p	miR-195-5p	1	60	23	↓					mir-15	hsa-mir-497, hsa-mir-195	17p13.1	
MIMAT0001080	hsa-miR-196b-5p	miR-196b	1	18	7	↓					mir-196	/	7p15.2	
MIMAT0000318	hsa-miR-200b-3p	miR-200b	2	120	23	↓					mir-8	hsa-mir-200a, hsa-mir-200b, hsa-mir-429	1p36.33	
MIMAT0000264	hsa-miR-203a-3p	miR-203	2	120	23	↓					mir-203	hsa-mir-203a, hsa-mir-203b	14q32.33	
MIMAT0000462	hsa-miR-206	miR-206	1	25	6	↓					mir-1	hsa-mir-206, hsa-mir-133b	6p12.2	
MIMAT0000075	hsa-miR-20a-5p	miR-20a						1	23	25	↓	mir-17	hsa-mir-17, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a, hsa-mir-20a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-92a-1	13q31.3
MIMAT0000278	hsa-miR-221-3p	miR-221	1	32	24	↑					mir-221	hsa-mir-222, hsa-mir-221	Xp11.3	
MIMAT0000280	hsa-miR-223-3p	miR-223	2	17	6	↓	1	14	10	↓	mir-223	/	Xq12	
MIMAT0000081														

hsa-miR-25-3p	miR-25					1	14	10	↑	mir-25	hsa-mir-25, hsa-mir-93, hsa-mir-106b	7q22.1	
MIMAT0000082	hsa-miR-26a-5p	miR-26a	1	n.a.	n.a.	↓					mir-26	/	3p22.2, 12q14.1
MIMAT0004681	hsa-miR-26a-2-3p	miR-26a-2-3p	1	18	7	↓					mir-26	/	12q14.1
MIMAT0000083	hsa-miR-26b-5p	miR-26b					1	14	10	↑	mir-26	/	2q35
MIMAT0000086	hsa-miR-29a-3p	miR-29a					1	14	10	↑	mir-29	hsa-mir-29a, hsa-mir-29b-1	7q32.3
MIMAT0004673	hsa-miR-29c-5p	miR-29c*	1	18	7	↓	1	45	24	↑	mir-29	hsa-mir-29b-2, hsa-mir-29c	1q32.2
MIMAT0000089													
	hsa-miR-31-5p	miR-31	1	25	20	↓					mir-31	/	9p21.3
MIMAT0000090	hsa-miR-32-5p	miR-32	1	27	27	↓					mir-32	/	9q31.3
MIMAT0000765	hsa-miR-335-5p	miR-335	1	27	27	↓	1	14	10	↑	mir-335	/	7q32.2
MIMAT0000255	hsa-miR-34a-5p	miR-34a	1	47	10	↓					mir-34	/	1p36.22, 1p36.22
MIMAT0004676/MIMAT0000685	hsa-miR-34b-3p / hsa-miR-34b-5p	miR-34b	1	47	10	↓					mir-34	hsa-mir-34b, hsa-mir-34c	11q23.1

MIMAT0000686	hsa-miR-34c-5p	miR-34c	1	47	10	↓					mir-34	hsa-mir-34b, hsa-mir-34c	11q23.1
MIMAT0001627	hsa-miR-433-3p	miR-433					1	14	10	↑	mir-433	hsa-mir-337, hsa-mir-665, hsa-mir-431, hsa-mir-433, hsa-mir-127, hsa-mir-432, hsa-mir-136	14q32.2
MIMAT0004761	hsa-miR-483-5p	miR-483-5p	1	25	6	↓					mir-483	/	11p15.5
MIMAT0006778	hsa-miR-516a-3p (?)	miR-516					1	14	10	↑	mir-515	hsa-mir-522, hsa-mir-519a-1, hsa-mir-527, hsa-mir-516a-1, hsa-mir-1283-2, hsa-mir-516a-2, hsa-mir-519a-2, hsa-mir-521-1, hsa-mir-519a-2	19q13.42
MIMAT0004808	hsa-miR-625-3p	miR-625-3p	1	18	7	↑	2	45	24	↑	mir-625	/	14q23.3
MIMAT0003322	hsa-miR-652-3p	miR-652	4	32	24	↓					mir-652	/	Xq23
MIMAT0000092	hsa-miR-92a-3p	miR-92a					1	45	24	↑	mir-25	hsa-mir-17, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a, hsa-mir-20a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-106a, hsa-mir-18b, hsa-mir-20b, hsa-mir-19b-2, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-363	13q31.3, Xq26.2
MIMAT0004808	hsa-miR-625-3p	miR-625-3p	1	18	7	↑	2	45	24	↑	mir-625	/	14q23.3
MIMAT0003322	hsa-miR-652-3p	miR-652	4	32	24	↓					mir-652	/	Xq23
MIMAT0000092	hsa-miR-92a-3p	miR-92a					1	45	24	↑	mir-25	hsa-mir-17, hsa-mir-18a, hsa-mir-19a, hsa-mir-20a, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-106a, hsa-mir-18b, hsa-mir-20b, hsa-mir-19b-2, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-363	13q31.3, Xq26.2

Note: Qualitative meta-analysis involved exclusively miRNAs analyzed by RT-PCR in tissue and blood samples. MiRNAs were ranked based on the total number of tumor and healthy samples involved and on the number of qRT-PCR assays performed. Accession number, miRNA unique identifier (ID), gene family, clustered miRNAs, and cytogenetic location are reported for each miRNA according to the last miRBase release (miRBase v21).

No. of qRT-PCR: total number of additional qRT-PCR assays described in the same paper and/or in different papers (e.g. qRT-PCR in screening set and qRT-PCR in validation set); MM: number of MM samples used in qRT-PCR analyses; H: number of non-cancer controls samples used in qRT-PCR analyses; D: miRNA deregulation trend in MM specimens compared with control samples (↑: up-regulated miRNAs and ↓: down-regulated miRNAs). Ref: references in parentheses are numbered according to the reference list. Adattata da [Micolucci et al., 2016].

Nonostante il piccolo numero di studi che ha valutato il potenziale diagnostico dei miRNA circolanti, il gran numero di campioni analizzati ed il gran numero di serie di qRT-PCR effettuate, ha fatto sì che diversi miRNA circolanti siano stati trovati nell'intervallo Max e Q3 (Figura 13). Nello specifico, il miR-126-3p è stato descritto in due studi consecutivi su plasma e siero da pazienti affetti da MM [Santarelli L *et al.*, 2011; Tomasetti M *et al.*, 2012] mentre il miR-103a-3p è stato identificato nella cellulare frazione di sangue di pazienti affetti da MPM [Weber DG *et al.*, 2012, 2014]. Inoltre, l'up-regolazione del miR-625-3p è stata confermata in analisi multiple effettuate su plasma e siero in cui era stato precedentemente riscontrato un basso livello di emolisi [Kirschner MB *et al.*, 2012].

I miRNA più significativi a livello tissutale e circolante qui identificati potrebbero avere rilevanza clinica e potrebbero essere specificamente coinvolti nel processo patogenetico innescato dall'esposizione all'amianto.

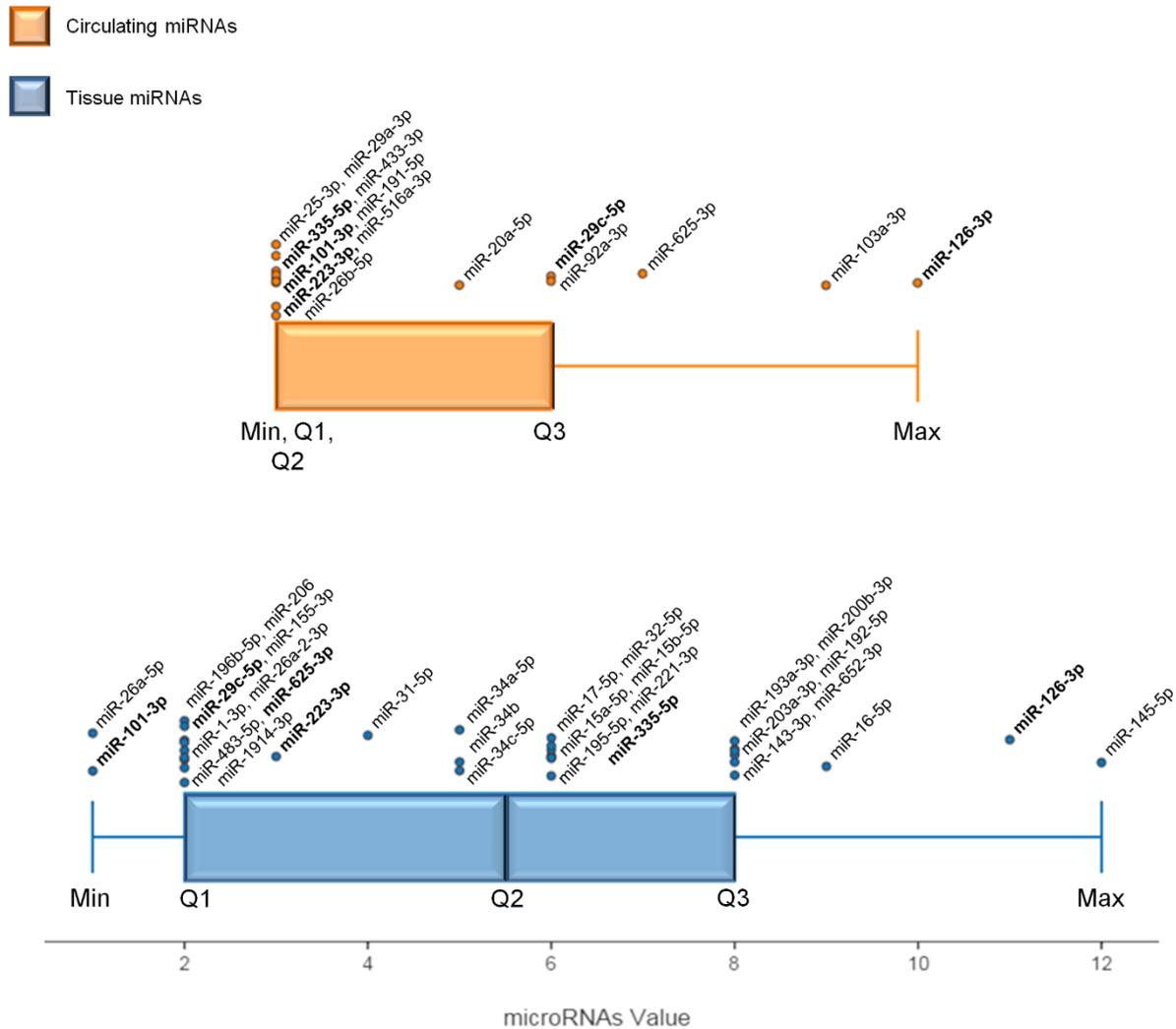


Figura 13. Box and whisker plot displaying MM-miRNA value distributions in tissue and the circulation. The value of each miRNA is the sum of multiple features scored in the specially designed vote-counting method. Max and Q3 values identify the most significant miRNAs in blood and tissue. Each dot overlying the total distribution represents a miRNA and respective names are reported. MiRNAs in bold are described both in blood and tissue. The black bar represents the median of each distribution (Q2). Min: lowest value, Q1: lower quartile, Q2: median quartile, Q3: upper quartile, Max: highest value [Micolucci L et al., 2016].

4.1.2.2. Valutazione del potenziale diagnostico dei miRNA tissutali e circolanti associati al MM

Dal momento che i miRNA sono espressi in modo anomalo in diversi tipi di neoplasie e condizioni fisiopatologiche, è utile stabilire se i miRNA precedentemente identificati sono MM-specifici o si ritrovano in maniera ubiquitaria anche nelle altre condizioni. Il pool dei 41 miRNA validati con qRT-

PCR, composto da 26 miRNA validati nei tessuti, 9 nel sangue e 6 in entrambi i tipi di campioni (**Tabella 5**), sono stati quindi confrontati con quelli più frequentemente segnalati in letteratura come biomarcatori in altri tipi di tumore e in soggetti esposti ad inquinamento ambientale.

In primo luogo, abbiamo confrontato i miRNA tissutali con quelli riportati nello studio di Nymark et al., l'unico studio recuperato dalla nostra ricerca, basato sul profiling dei miRNA che ha confrontato campioni tissutali di cancro del polmone e i tessuti normali adiacenti entrambi prelevati da soggetti con una storia di elevata esposizione all'amianto *vs.* campioni di tessuto polmonare non-neoplastici prelevati da pazienti non esposti [Nymark P *et al.*, 2011]. Gli autori hanno trovato 13 nuovi miRNA differenziali e li hanno classificati in 3 gruppi: "miRNA specifici del tumore del polmone", "miRNA specifici del tumore del polmone causato dall'amianto" e "miRNA correlati agli stadi iniziali della carcinogenesi". Il confronto di questi miRNA con i miRNA associati al MM (diagramma di Venn in **Figura 14**) ha evidenziato alcuni miRNA condivisi dai quattro gruppi. Tuttavia, tenendo conto del trend di deregolamentazione, solo 3 miRNA sono condivisi tra i "miRNA correlati al tumore del polmone" e "miRNA correlati al tumore del polmone causato dall'amianto" (miR-202 e miR-605, down-regolato, e miR-96, up-regolati); 3 miRNA down-regolati sono condivisi dai "miRNA associati al MM" e i "miRNA correlati agli stadi iniziali della carcinogenesi" (miR-15b, miR-195 e miR-223); e in fine il miR-145 down-regolato sia tra i "miRNA associati al MM" sia tra i "miRNA correlati al tumore del polmone".

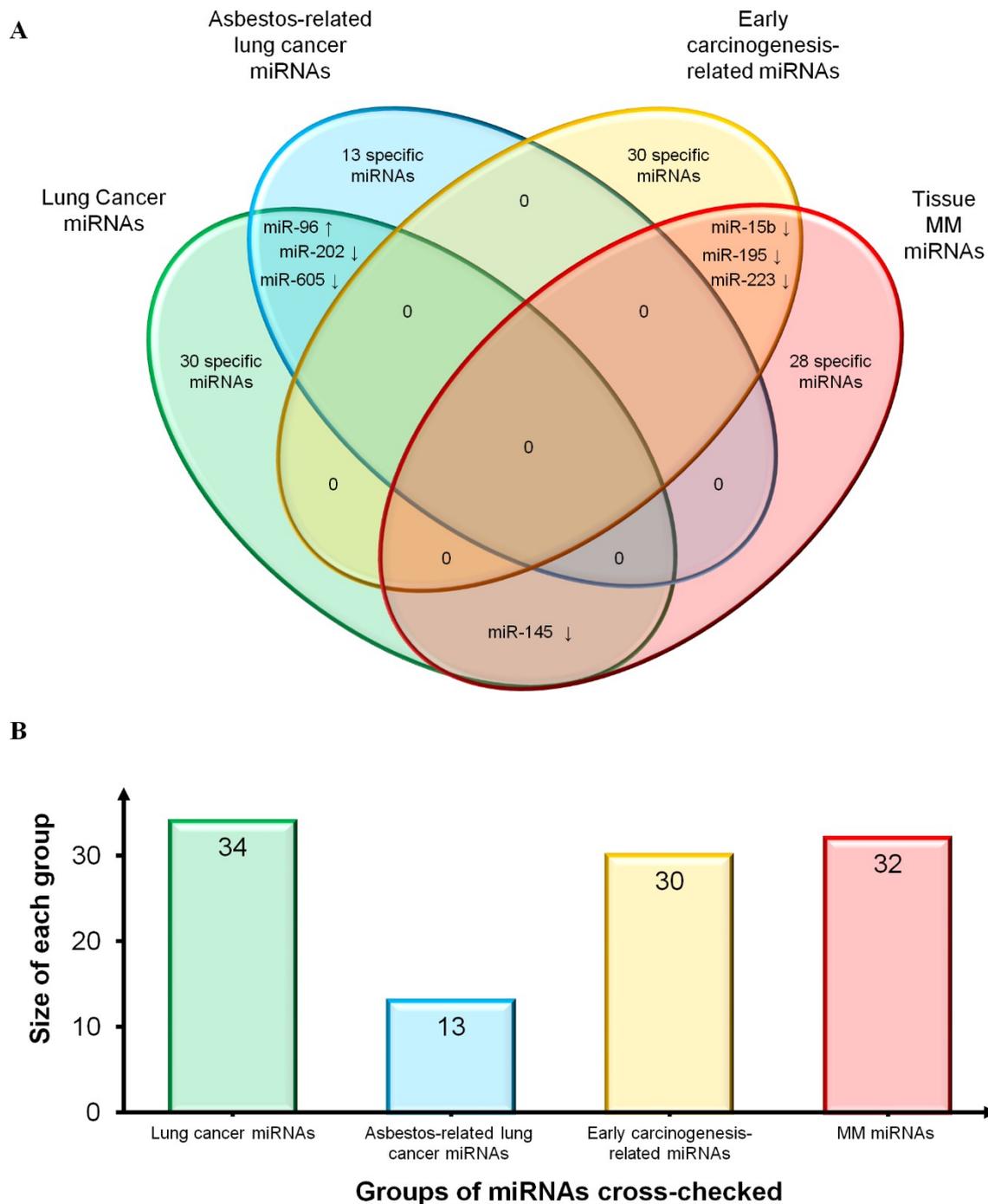


Figure 14. Comparison of MM miRNAs and those reported in asbestos-exposed subjects and asbestos-related lung cancers. A. Venn diagram comparing tissue MM miRNAs and three pools of miRNAs identified by Nymark et al. [70]: 13 novel “lung cancer miRNAs”, “asbestos-related lung cancer miRNAs”, and “early carcinogenesis-related miRNAs”. Shared miRNAs are reported at intersections. MiRNAs were identified by comparing not only miRNA identifiers, but also deregulation trends, depicted by arrows (↑: up-regulated miRNAs and ↓ down-regulated miRNAs). B. Histogram displays groups of miRNAs cross-checked and size of each group [Micolucci L et al., 2016].

Gli stessi miRNA associati al MM sono stati poi confrontati con quelli più frequentemente descritti nei campioni tissutali di tumori del polmone [Xue Z *et al.*, 2014; Del Vescovo V *et al.*, 2014; Lan H *et al.*, 2015] e nei campioni tissutali di altri tipi di neoplasie, tra cui: glioblastoma, neoplasie di testa e collo, seno, fegato, dello stomaco, del pancreas, del collo dell'utero, dell'ovaio, della prostata, del colon-retto (CRC) e della vescica [Lan *et al.*, 2015]. Il diagramma di Venn riportato in **Figura 15** mostra down-regolazione dei miR-126, miR-145 e miR-195 comune ai tre gruppi, confermando così il loro coinvolgimento nel fenotipo tumorale indipendentemente dal sito di origine della neoplasia. La down-regolazione del miR-126 è stata infatti riscontrata nel tumore gastrico e nel cancro della prostata; il miR-145 nel cancro del seno e della vescica; e il miR-195, nel cancro della vescica. Inoltre, i miR-143 e miR-32 sono down-regolati sia nel cancro del polmone e che nel MM. I microRNA comuni tra MM e altri tumori includono i: miR-31 (carcinoma gastrico, della prostata, della vescica, della testa e del collo, CRC); miR-34b (cancro al seno), miR-193a-3p (CRC), miR-200b (carcinoma ovarico), e miR-203 (del pancreas, del collo dell'utero e della prostata); tutti down-regolati. Il miR-221 (nel tumore gastrico, del collo dell'utero e della prostata e nel glioblastoma) è l'unico miRNA up-regolato condiviso. Dal momento che molti altri miRNA, candidati come biomarcatori, sono comuni alle neoplasie polmonari e ad altri tumori mostrando la stessa tendenza, si può ipotizzare che svolgano tutti un ruolo chiave nelle vie molecolari proprie della patogenesi tumorale. Inoltre, dati i diversi siti di insorgenza delle varie neoplasie in esame, il controllo incrociato ha suggerito che la maggior parte dei miRNA potesse mantenere lo status di potenziali biomarcatori per ognuna di esse (**Figura 15**).

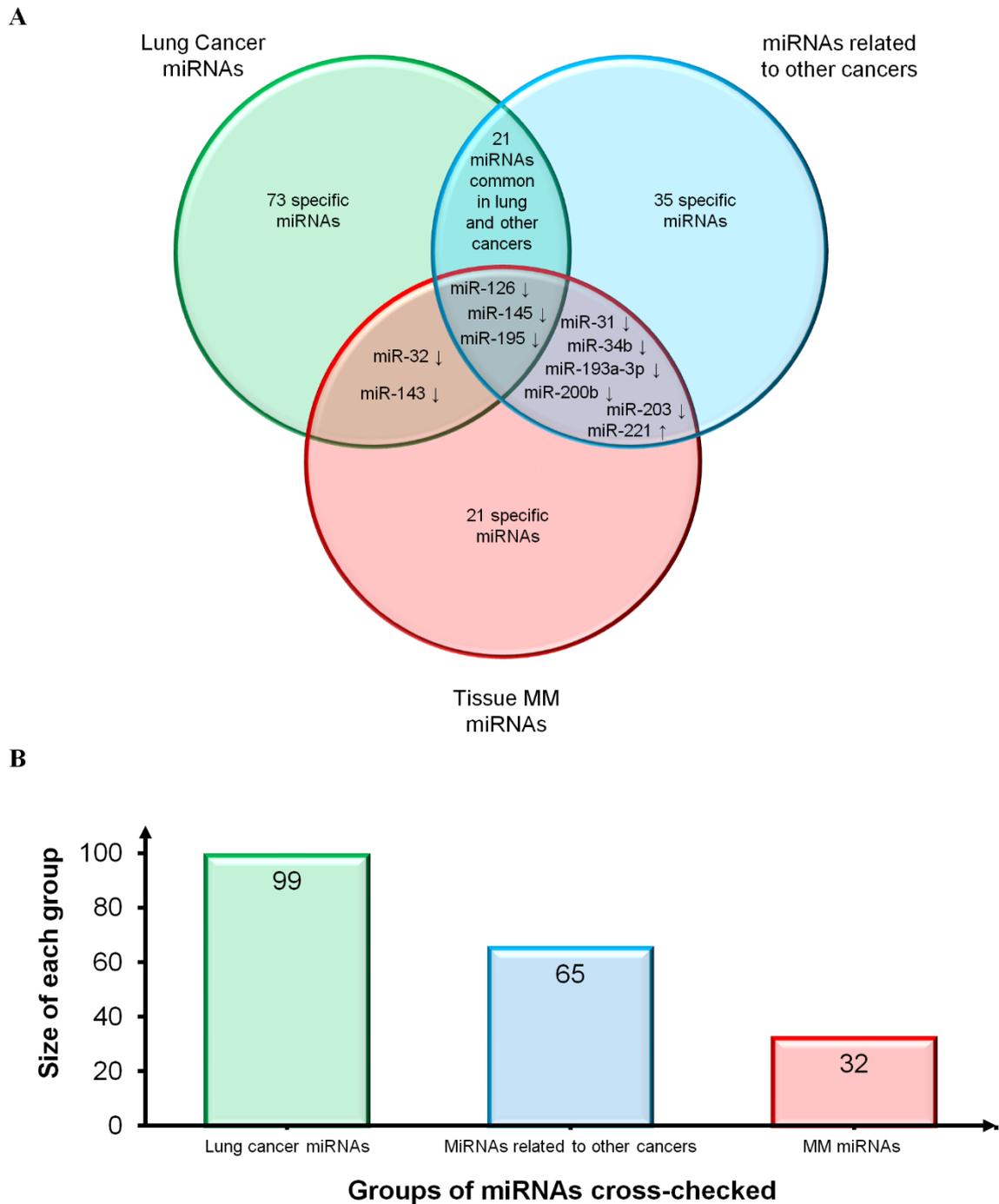


Figure 15. Assessment of diagnostic potential of tissue MM miRNAs. A. Venn diagram comparing tissue MM miRNAs and the miRNAs most frequently reported in lung cancer tissues and in a range of tissues from other cancers. Shared miRNAs are reported at intersections. MiRNAs were identified by comparing not only miRNA identifiers, but also deregulation trends, depicted by arrows (\uparrow : up-regulated miRNAs and \downarrow down-regulated miRNAs). B. Histogram displays groups of miRNAs cross-checked and size of each group [Micolucci L et al., 2016].

In secondo luogo, per stabilire il potenziale diagnostico e la specificità dei miRNA circolanti, questi

sono stati confrontati con *i*) i miRNA circolanti più frequentemente riportati in una varietà di condizioni, tra cui un pool di diversi tipi di neoplasie particolarmente arricchito in miRNA specifici per il cancro del polmone [Del Vescovo V *et al.*, 2015; Lan H *et al.*, 2014; Reid G *et al.*, 2011], e *ii*) i miRNA circolanti associati all'esposizione personale o ambientale a stimoli nocivi, tra cui il fumo di sigaretta, i prodotti chimici e l'inquinamento ambientale [Vrijens K *et al.*, 2015]. I risultati di questo confronto, riportato in **Figura 16**, dimostrano che relativamente pochi miRNA possono essere considerati come in comune a MM, inquinamento e tumori. In base al trend di deregolazione, solo i miR-126 e miR-223 sono condivisi tra tutti i set. Il miR-126 è stato descritto come un marker diagnostico nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) [Del Vescovo V *et al.*, 2014] e, sorprendentemente è down-regolato nei leucociti esposti a particolato, carbonio nero, carbonio organico e ioni solfato (SO_4^{2-}) [Vrijens K *et al.*, 2015]. Bassi livelli del miR-223 si ritrovano in soggetti esposti al fumo di tabacco e in quelli con leucemia mieloide acuta (AML) [Vrijens K *et al.*, 2015], sepsi [Reid G *et al.*, 2011], tumore alla prostata e leucemia [Lan H *et al.*, 2014]. I miR-103 e miR-191 sono entrambi down-regolati e comuni nel MM e nel siero di pazienti con NSCLC *vs.* fumatori sani, mentre il miR-20a è down-regolato nel plasma di pazienti sottoposti a chirurgia del cancro del polmone *vs.* controlli sani [Del Vescovo V *et al.*, 2014]. Il miR-25 è up-regolato nelle neoplasie del seno, fegato, vescica [Lan H *et al.*, 2014] e del polmone [Reid G *et al.*, 2011]; il miR-29a nel CRC, nei tumori dell'ovaio [Lan H *et al.*, 2014; Reid G *et al.*, 2011], del seno [Lan H *et al.*, 2014] e NSCLC [Del Vescovo V *et al.*, 2014]; e il miR-92a nel CRC, e nei tumori dell'ovaio, della prostata e del fegato [Lan H *et al.*, 2014; Reid G *et al.*, 2011]. Il miR-26b è up-regolato nel MM e in un gruppo di miRNA associati all'inquinamento ambientale, e mostra un'espressione differenziale nel sangue prelevato da cordone ombelicale in seguito all'esposizione ad arsenico [Vrijens K *et al.*, 2015].

Figure 4

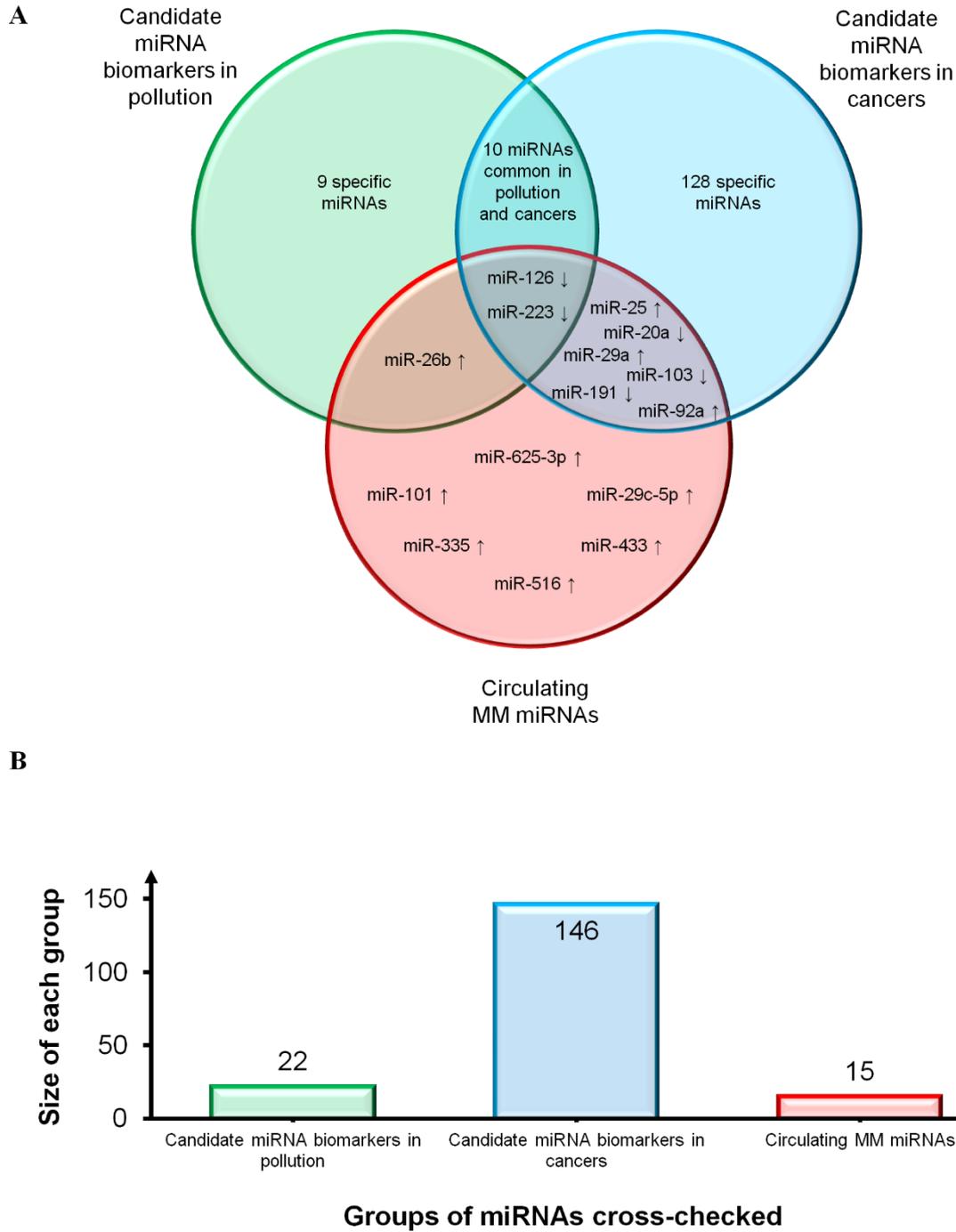


Figure 16. Assessment of diagnostic potential and specificity of circulating MM-miRNAs. *A.* Venn diagram showing circulating MM miRNAs, the circulating miRNAs most frequently reported in a variety of conditions and in a pool of different cancers particularly enriched in lung cancer miRNAs, and deregulated miRNAs responsive to personal or environmental pollution exposure including smoking, chemicals and air pollution. Common miRNA names are reported at the intersections. MiRNAs were identified by comparing not only miRNA identifiers, but also deregulation trends, depicted by arrows (↑: up-regulated miRNAs and ↓ down-regulated miRNAs). *B.* Histogram displays groups of miRNAs

cross-checked and size of each group [Micolucci L et al., 2016].

E' interessante notare che diversi miRNA sono comuni tra due gruppi in particolare: quelli relativi all'esposizione all'inquinamento e quelli relativi ai pazienti affetti da neoplasie, ma considerando che molti tumori sono appunto correlati all'inquinamento, il risultato non è in fondo così inaspettato. Infine, il nostro pool di miRNA circolanti associati MM è stato confrontato con i miRNA circolanti descritti più frequentemente in letteratura in soggetti sani [Reid G *et al.*, 2011]. Il diagramma **in Figura 17** documenta che 9 MM-miRNA su 15 si trovano nell'intersezione tra i due gruppi, con l'unica nota che molti di questi miRNA sono fortemente ipo-espressi nel MM, mentre 6 su 15 si trovano esclusivamente nel gruppo dei associati al MM e comprendono il miR-625-3p (up-regolato) e 5 altri miRNA.

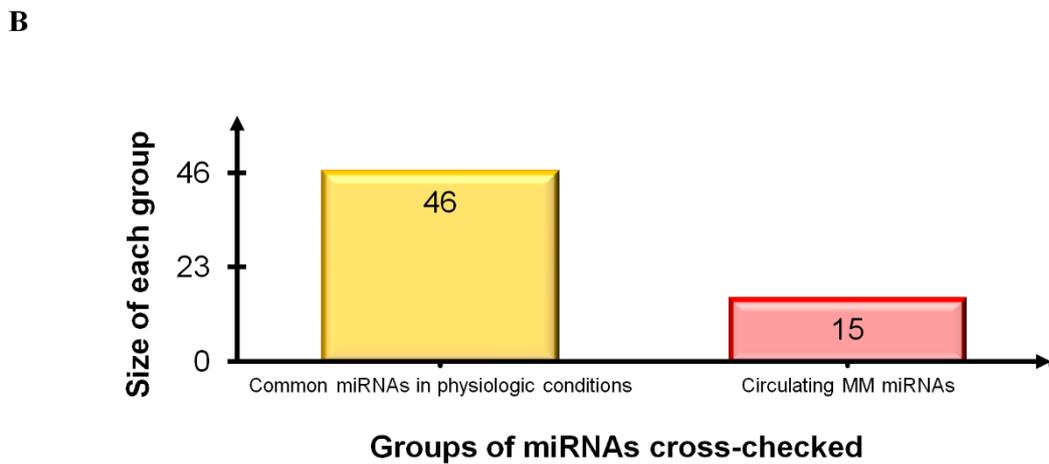
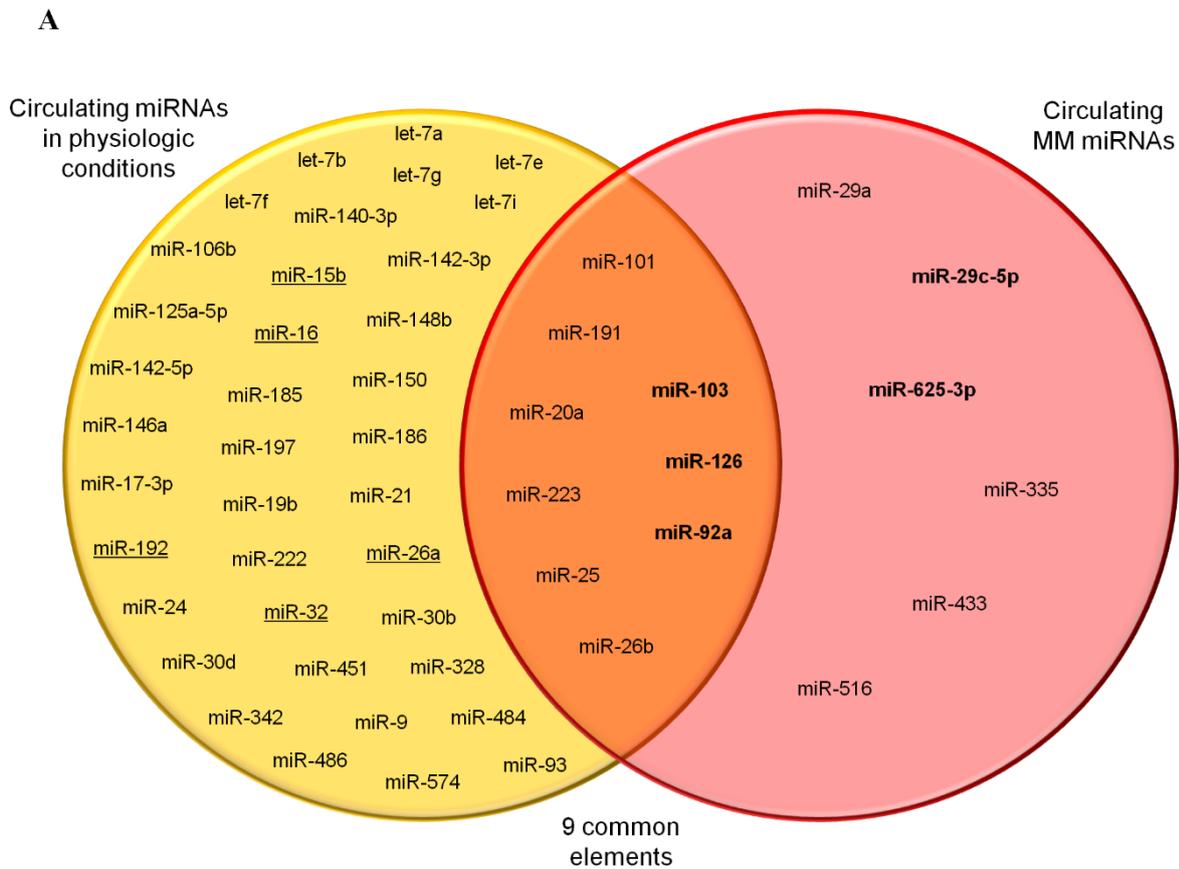


Figure 17. Comparison of circulating MM-miRNAs and the miRNAs most frequently reported in healthy individuals. *A.* Venn diagram comparing the datasets. Common miRNAs are reported at intersections. MiRNAs in bold are the most significant circulating MM miRNAs. Underlined miRNAs are also listed among the deregulated miRNAs analyzed in MM tissues. *B.* Histogram displays groups of miRNAs cross-checked and size of each group [Micolucci L et al., 2016].

4.1.2.3. *Functional and statistical evaluation of the most significant circulating mm miRNAs*

Per identificare i miRNA circolanti associati al MM caratterizzati da un significativo potenziale diagnostico e la loro funzione, abbiamo utilizzato Mirandola, un database manualmente curato contenente le informazioni riguardo tutti i miRNA circolanti extracellulari fino'ora identificati [Russo F *et al.*, 2012, 2014]. Mirandola classifica i miRNA extracellulari in quattro categorie a seconda del loro *carrier* specifico: “miRNA-Ago2”, “miRNA-exosome”, “miRNA-HDL” e “circulating miRNA” quando il *carrier* specifico è sconosciuto [Russo F *et al.*, 2012, 2014]. Inoltre, abbiamo utilizzato lo strumento miRNAexpress, integrato nel database Mirandola, che fornisce una comparazione sistematica dei profili di espressione dei miRNA cellulari ed extracellulari [Russo F *et al.*, 2012, 2014]. MiRNAexpress consente di individuare i miRNA che sono distintamente espressi in tessuti e cellule, quelli identificabili esclusivamente in circolazione, e quelli in entrambi i gruppi. I risultati ottenuti dalle analisi effettuate in Mirandola e miRNAexpress per i miR-103a-3p, miR-126-3p, miR-29c-5p, miR-92a-3p e miR-625-3p sono riportati nella **Tabella 6**, che riporta per ogni miRNA i tipi di campioni esaminati, il *carrier* identificato, eventuali target validati, il potenziale valore come biomarcatore acquisito in altre patologie.

Tabella 6. *Analisi dei miRNA circolanti più significativi in miRandola e miRNAExpress.*

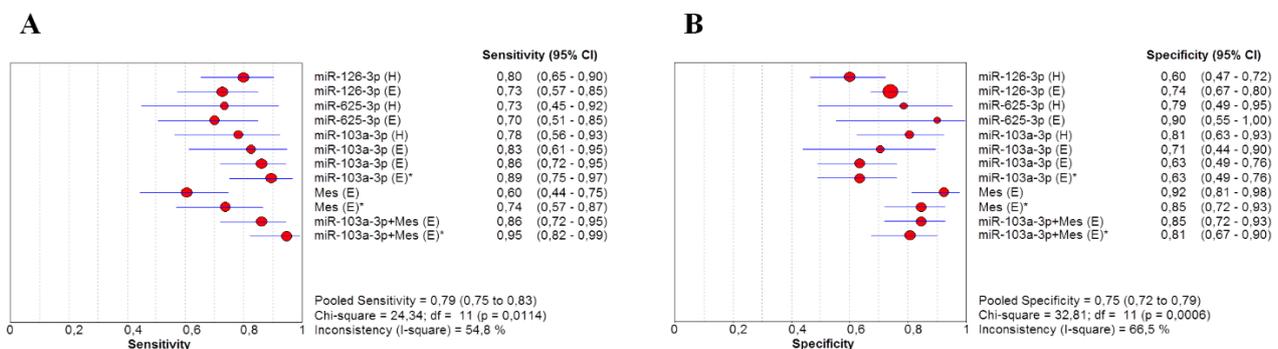
Circulating MM miRs *miR-126-3p* ↓ *miR-103a-3p* ↓ *miR-625-3p* ↑ *miR-29c-5p* ↑ *miR-92a-3p* ↑

Samples	Plasma/serum	T cells/Dendritic cells	Plasma/serum	Serum/T cells	Plasma/serum/T cells/Dendritic cells
Specific carrier identified	Exosome	Ago2/Exosome	HDL (normal)/Exosomes (prostate cancer)	Exosomes	Ago2/Exosome

Validated target and function	VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1)	ICOS (inducible T-cell co-stimulator), SERPBP1 (SERPINE1 MRNA Binding Protein 1), FBXW11 (F-box and WD repeat domain containing 11)	Unknown	Unknown	Unknown
Potential biomarker in other diseases	Yes: metastatic colorectal cancer*, prostate cancer*, urothelial bladder cancer*, osteoarthritis, type 2 diabetes, acute myocardial infarction, endurance exercise, stable/unstable angina	Unknown	Yes: low levels in NSCLC	Unknown	Yes: high level in gastric cancer, colorectal carcinomas, and hepatitis C infection
miRNAExpress output	Cells and circulation	Cells and circulation	Circulation	Cells	Cells and circulation

Note: information retrieved in miRandola is organized into four groups: miRNA-Ago2, miRNA-HDL, miRNA-exosomes and miRNA-circulating. The latter is used here when Ago2, exosome and HDL are not described in the paper. * = up-regulated in these cancers [Micolucci L et al., 2016].

Dal momento che gli studi originali hanno fornito le stime di accuratezza per i miR-103a-3p, miR-126-3p e miR-625-3p, sono stati elaborati i “forest plot” per i dati di sensibilità (**Figura 18A**) e specificità (**Figura 18B**) per ottenere una stima generale dell’accuratezza diagnostica dei tre miRNA, della mesotelina e della loro associazione. Siccome è stata trovata una significativa eterogeneità tra gli studi, è stato applicato il modello ad effetti casuali. La curva SROC per i biomarcatori in esame è mostrata in Figura 18C e il valore dell’area sottesa alla curva (AUC) è 0,8563, suggerendo una buona accuratezza per i miRNA circolanti nella diagnosi di MM.



C

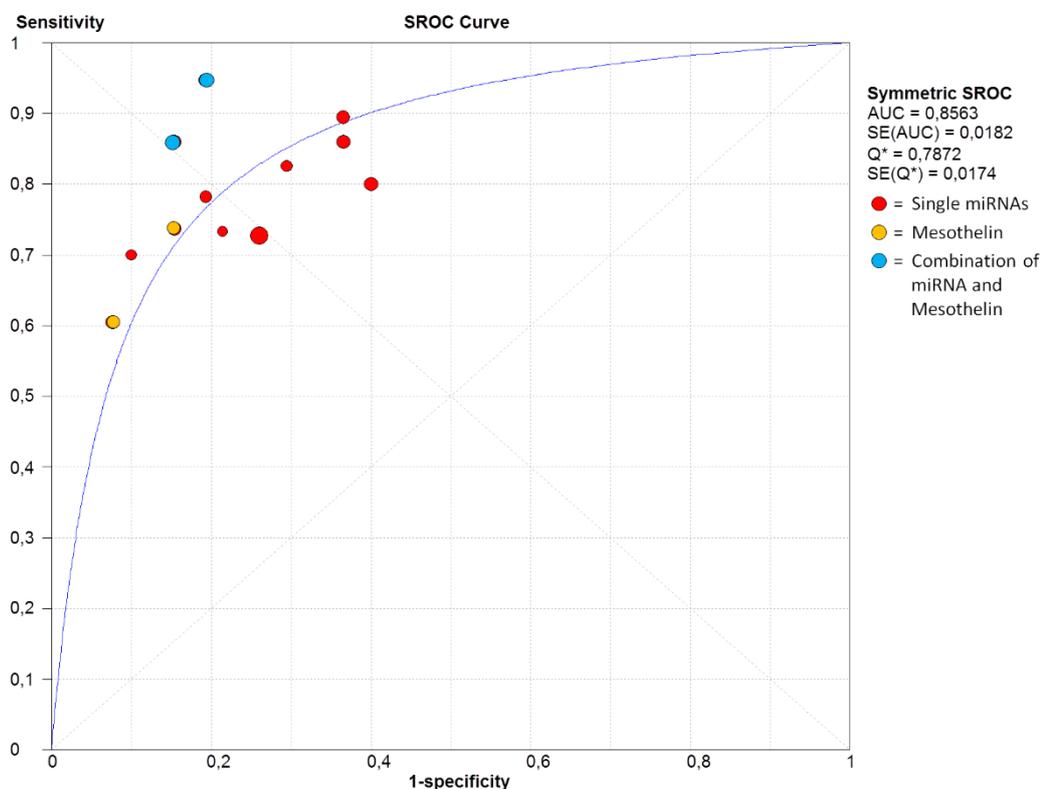


Figure 18. Forest plot of sensitivities (A) and specificities (B) of miRNAs, mesothelin and their combination in the diagnosis of MM. The point estimate is bounded by a 95% confidence interval (CI). Forest plots do not contain a pooled summary due to the high heterogeneity of data. The plots are useful to obtain a general overview of the accuracy estimates from each miRNAs, mesithelin or their combination. (C) Summary receiver operating characteristics (SROC) curve for the diagnosis of MM through circulating miRNA, mesothelin and a combination of both biomarkers. AUC area under curve, Q^* index, SE standard error [Micolucci L et al., 2016].

La **Tabella 7** mostra i risultati di accuratezza diagnostica nei diversi sottogruppi. La diagnosi differenziale di MM ottenuta scegliendo diversi gruppi di controllo (soggetti sani o soggetti esposti ad amianto) mostra risultati simili. Tuttavia, l'analisi di sottogruppo suggerisce che un test costituito da più biomarcatori, ad esempio l'associazione di miRNA e mesotelina come nel caso del miR-103a-3p e mesotelina riportato nella **Tabella 7**, mostra proprietà diagnostiche superiori rispetto all'utilizzo della mesotelina o del miRNA singolarmente.

Tabella 7. Analisi di sottogruppo per la diagnosi di MM.

Analysis	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)	Positive LR (95 % CI)	Negative LR (95 % CI)	DOR (95 % CI)
Single-miRNA					
Reference group: healthy subjects	0,783 [0,679-0,866]	0,686 [0,588-0,773]	2,682 [1,610-4,468]	0,315 [0,205-0,483]	8,277 [4,187-16,363]
Reference group: asbestos exposed subjects	0,785 [0,706-0,851]	0,724 [0,667-0,776]	2,815 [2,216-3,575]	0,297 [0,209-0,421]	10,250 [6,046-17,376]
Combination of miRNA and mesothelin*					
Reference group: asbestos exposed subjects	0,901 [0,815-0,956]	0,827 [0,740-0,894]	5,234 [3,416-8,019]	0,118 [0,060-0,230]	46,650 [18,944-114,88]

CI confidence interval, LR likelihood ratio, DOR diagnostic odds ratio.

* Combination of miR-103a-3p and mesothelin as proposed by [Weber DG et al., 2014].

[Micolucci L et al., 2016].

4.2. ANALISI DEI TARGET DEI MICRORNA PIÙ SIGNIFICATIVI IDENTIFICATI DALLA RASSEGNA SISTEMATICA

L'identificazione dei microRNA caratterizzati da una espressione aberrante in determinati stati fisiopatologici, consente non solo di indagare sui meccanismi molecolari che ne sono alla base per migliorare la nostra comprensione della malattia, ma anche di giungere al riconoscimento di nuovi bersagli terapeutici. In questa parte dello studio, ci siamo focalizzati nella definizione del ruolo potenziale giocato dai mesomiRs (miR-16-5p, miR-143-3p, miR-126-3p, miR-145-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-652-3p) sul meccanismo patogenetico alla base del MM. I 9 miRNA sono stati sottoposti ad analisi bioinformatica per analizzare i loro targets molecolari e prevedere in quali vie di trasduzione del segnale possono essere coinvolti. L'analisi è stata eseguita con il *software* miRNet ed il processo di analisi, articolato in numerosi passaggi consecutivi, prevede

l'integrazione di dati biologici ottenuti con metodi *high-throughput* e la loro analisi funzionale. In fine c'è la possibilità di eseguire una “*functional enrichment analysis*” per la predizione e l'analisi di *pathways* e *network* in cui i miRNA sono coinvolti. Il processo di analisi è sintetizzato nel diagramma di flusso in **Figura 19**.

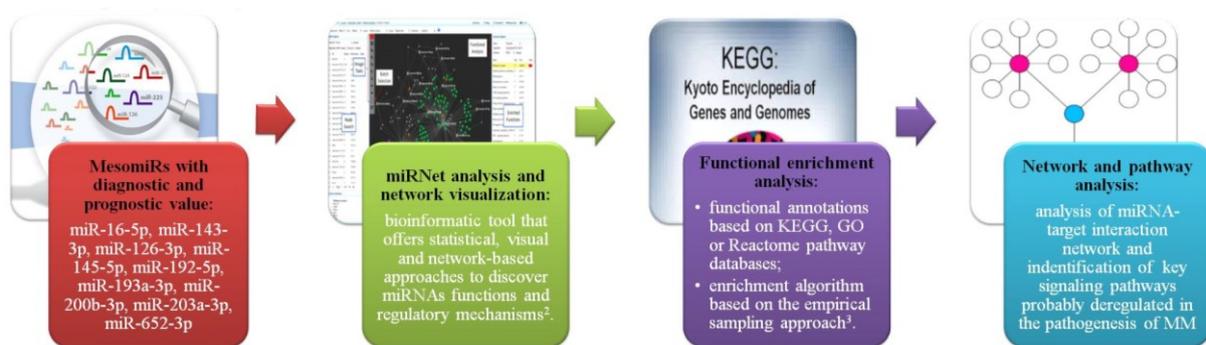


Figura 19. Metodo di analisi bioinformatica adottato per lo studio dei mesomiRNAs.

Effettuando un'analisi preliminare esplorativa dei *targets* sperimentati di questi miRNA, si può avere un'idea dell'enorme numero di proteine potenzialmente modulate e dell'influenza che queste possano avere sulle relative vie metaboliche (**Figura 20**).

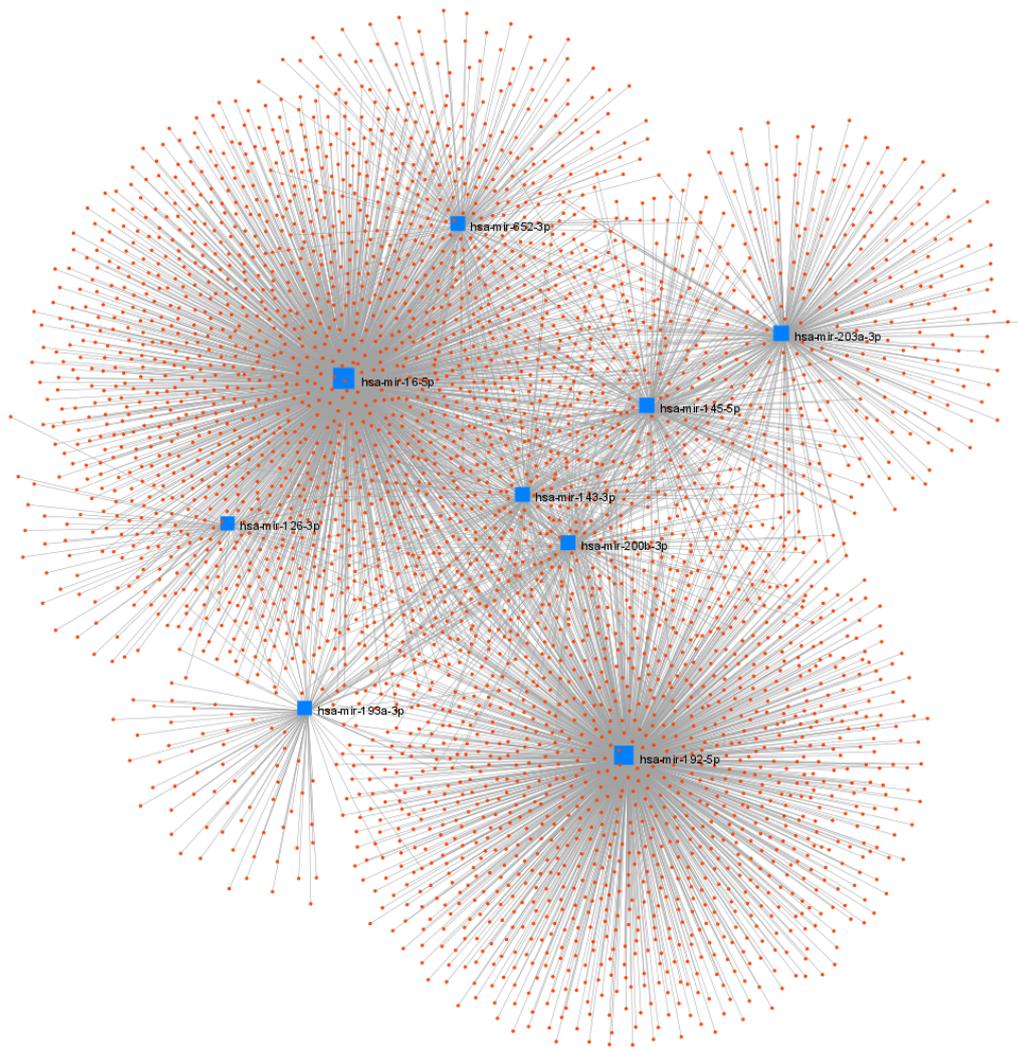


Figura 20. Analisi in miRNet dei target sperimentali, ottenuti da metodi high-throughput, dei miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-652-3p, miR-16-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p e miR-203a-3p.

MiRNet permette comunque di arrivare alla prioritizzazione dei target dei miRNA in esame grazie al settaggio della *performance* del metodo di analisi. Quindi, come illustrato nella **Figura 21**, i mesomiRs appaiono fortemente coinvolti in più vie molecolari deregolate nei tumori, tra le principali si osservano: le pathways che regolano la pluripotenza delle cellule staminali, l'apoptosi, il ciclo cellulare, PI3K-Akt, p53, TGF-beta, mTOR, FoxO, ed infine i meccanismi alla base dell'adesione cellulare (*focal adhesion* ed *adherens junction*). Poiché queste vie sono importanti durante lo sviluppo tumorale, forniscono dei candidati interessanti su cui investigare sperimentalmente e sia per la comprensione dei meccanismi molecolari sia per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Futuri

studi sperimentali saranno eseguiti per indagare sul valore effettivo di questi identificato.

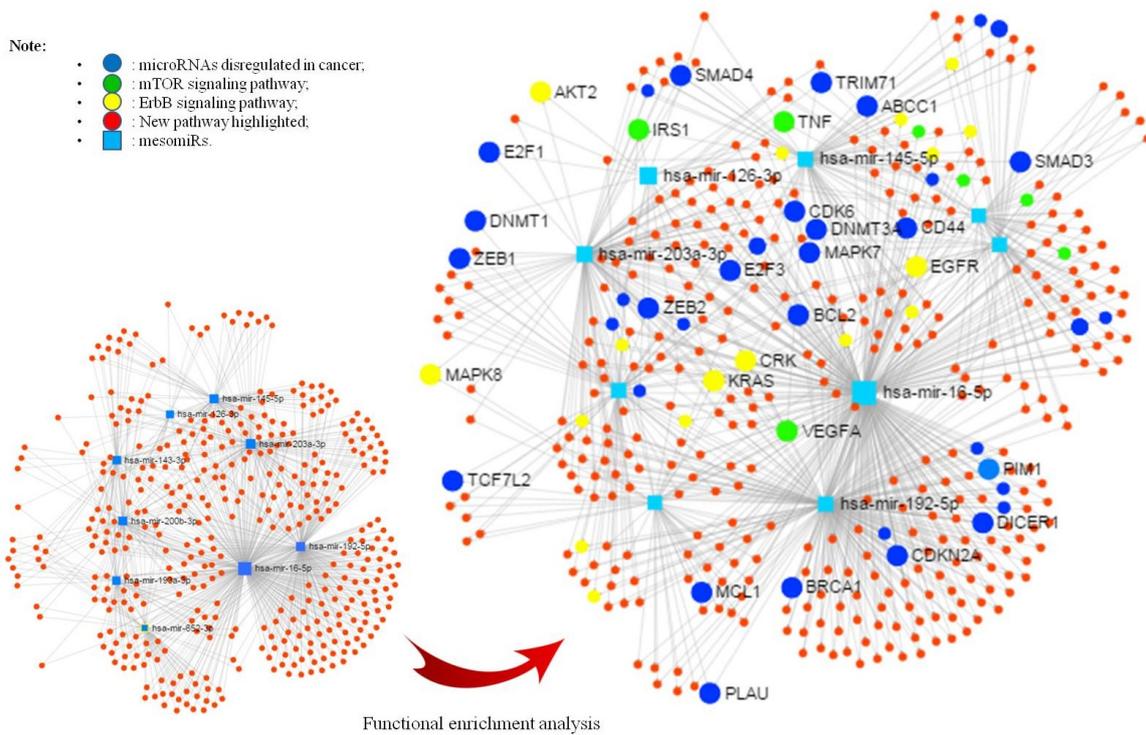


Figura 21. Sulla sinistra, la rete costruita tramite miRNet che vede coinvolti i mesomiRs in “hubs” contenenti i loro bersagli proteici. Sulla destra, le vie chiave di trasduzione del segnale evidenziate dalla “functional enrichment analysis”.

4.3. ANALISI SPERIMENTALE DEI MIRNA NEL MM

La rassegna sistematica della letteratura ha denunciato un’enorme variabilità di metodo tra gli studi inclusi che riguardano tantissimi aspetti dell’analisi sperimentale. *In primis*, la tipologia dei campioni analizzati spazia dai tessuti congelati/freschi a quelli inclusi in paraffina (FFPE); da biopsie *in toto* a quelle micro dissecate, per arrivare alle linee cellulari; mentre per l’analisi dei miRNA circolanti troviamo: plasma, siero e frazione cellulare del sangue. Lo stesso vale per i campioni di controllo che però differiscono per la tipologia e per caratteristiche (esempi di campioni di controllo rinvenuti nei

vari studi sono: biopsie di pleura sana, pleura non neoplastica adiacente al tessuto tumorale, pericardio, polmone, tessuto polmonare sano da soggetti esposti all'amianto, biopsie di varie neoplasie, proliferazioni non neoplastiche, plasma/siero di soggetti sani o esposti, frazione cellulare del sangue di soggetti sani/esposti ed infine linee cellulari immortalizzate). Anche il metodo di analisi differisce tra gli studi, includendo qRT-PCR, serie multiple di qRT-PCR, *microarray* e ibridizzazione *in situ*. Diversi sono: i metodi statistici, i metodi di normalizzazione dei dati, l'approccio per la validazione, le dimensioni campionarie, i criteri applicati per valutare i pazienti esposti e non esposti. Oltre a queste, numerose altre differenze ostacolano il confronto e la riproducibilità dei dati tra gli studi. Complessivamente, queste variabili possono spiegare le numerose incongruenze riguardo il *trend* di espressione dei miRNA riportati nella **Tabella Supplementare 4** [Micolucci L *et al.*, 2016]. Di conseguenza abbiamo deciso di intraprendere un'analisi sperimentale nel tentativo di identificare i microRNA associati al MM e i relativi *targets*. In questa fase abbiamo cercato inoltre di porre le basi per una standardizzazione del metodo di analisi.

4.3.1. Analisi del profilo di espressione dei miRNA nel MM:

Il profilo di espressione dei miRNA è stato valutato mediante *microarray* su (i) 7 campioni tissutali di MM ottenuti mediante microdissezione laser del preparato in toto *vs.* 6 campioni di tessuto mesoteliale (2 di pleura microdissecata, 2 di pleura autoptica, 1 di pericardio e 1 di peritoneo tutti ottenuti da pazienti senza una storia clinica di malattia tumorale), e su (ii) 3 colture cellulari primarie di MM e 3 di cellule mesoteliali normali. La scelta di analizzare il profilo di espressione dei miRNA nelle colture cellulari primarie, è stato un tentativo di mettere a punto un modello cellulare *in vitro* che potesse rispecchiare il più fedelmente il profilo molecolare *in vivo*. Le cellule primarie infatti derivano direttamente dalla dissociazione di un tessuto, nel nostro caso da campioni tissutali di MM

e da sacchi erniari per quanto riguarda la controparte sana. Nella maggior parte dei casi, le cellule derivate dalla dissociazione dei tessuti hanno una capacità replicativa limitata, ma rimangono un modello di studio eccezionale a confronto delle linee cellulari “immortalizzate” (possono essere mantenute in coltura per tempi indefiniti) che presentano instabilità cromosomica, mutazioni epigenetiche e caratteristiche tali che le rendono differenti dalle cellule di origine.

L’analisi dei dati è stata effettuata con il software miRNet e l’adozione del metodo statistico Limma.

L’analisi dei profiling ha mostrato una spiccata *down*-regolazione dei miRNA dei campioni di MM rispetto ai controlli, sia per quanto riguarda i campioni tissutali che per quanto riguarda quelli cellulari. Nelle figure (**Figura 22** e **23**) sono riportati gli istogrammi dei $\text{Log}_2(\text{FC})$ dei miRNA significativamente *up*- o *down*-regolati per $p < 0,05$ rispettivamente calcolati nei campioni tissutali e nelle colture cellulari primarie.

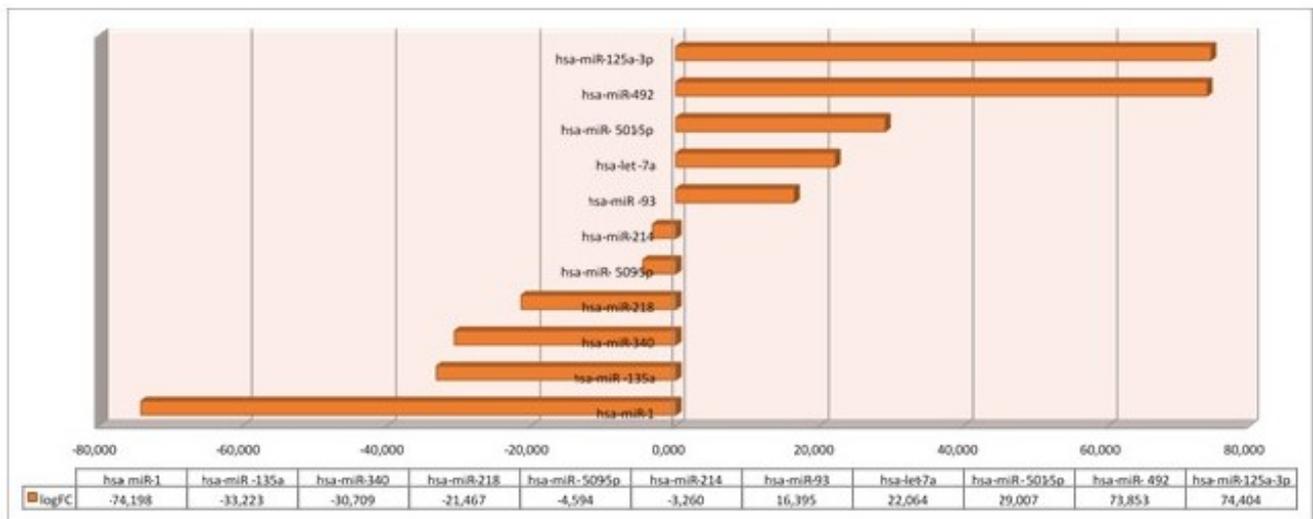


Figura 22. Istogramma relativo ai $\text{Log}(\text{FC})$ significativi per $p < 0,05$ dei miRNA tissutali.

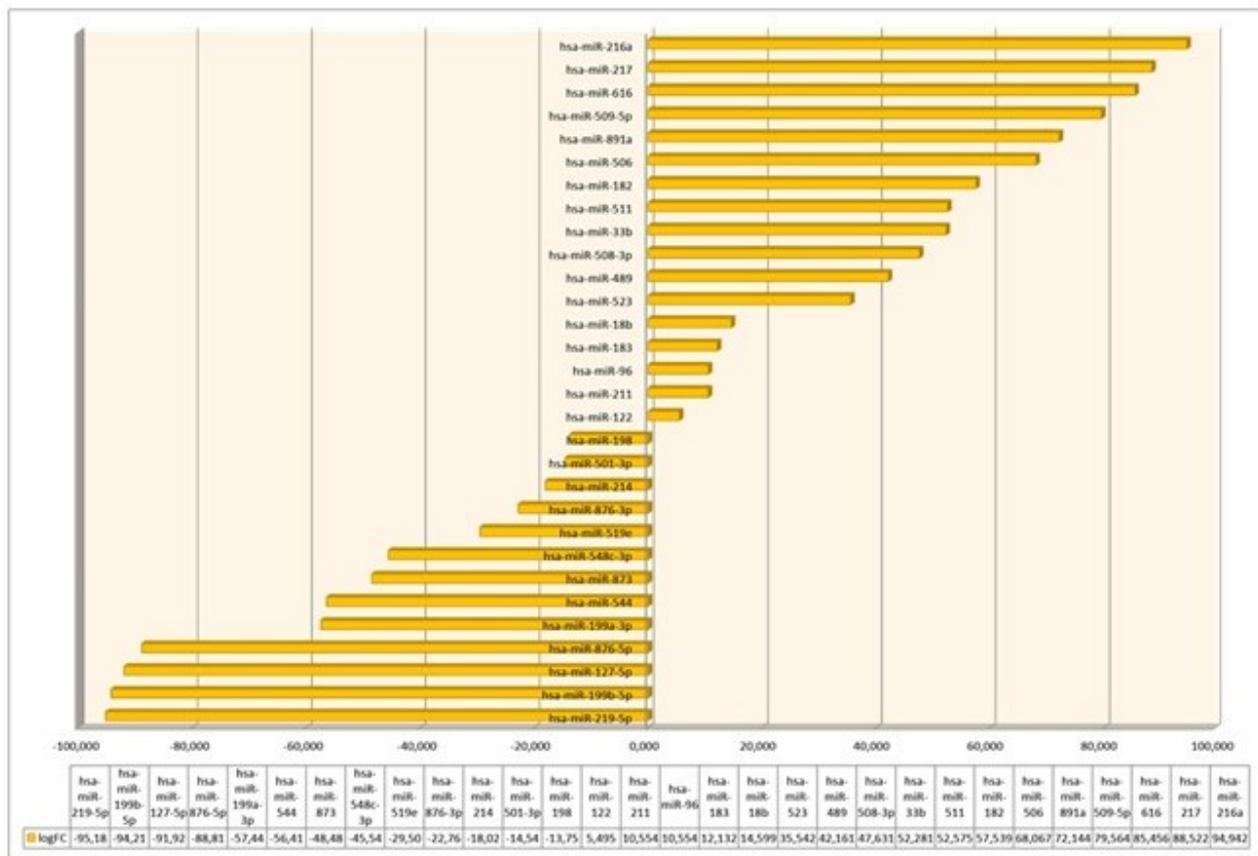


Figura 23. Istogramma relativo ai Log(FC) significativi per $p < 0,05$ dei miRNA cellulari

Nel *profiling* dei campioni tissutali sono stati considerati come controlli le quattro tipologie di tessuti mesoteliali (2 pleure non microdisseccate, 2 pleure microdisseccate, 1 pericardio e 1 peritoneo), visto che la dimensione campionaria dei singoli controlli sani non raggiungeva significatività statistica.

A livello esplorativo, abbiamo confrontato la deregolazione dei microRNA tra i campioni tissutali patologici e le diverse controparti sane prese singolarmente. Nello specifico sono state confrontate con l'uso del software miRNet i livelli di espressione dei miRNA in: MM vs. pleure non microdisseccate, MM vs. pleure microdisseccate e MM vs. verso pericardio/peritoneo.

I risultati mostrano che i miRNA differenzialmente espressi nei vari gruppi di comparazione sono diversi tra loro. Questo dato preliminare conferma la variabilità tra i miRNA identificati con la rassegna sistematica ed indica chiaramente l'importanza della scelta dei campioni di controllo per avere replicabilità dei dati.

Dall'intersezione dei miRNA *up-* e *down-*regolati nei due modelli di studio, è stato identificato l'unico miRNA in comune: il miR-214 *down-*regolato sia nei tessuti che nelle colture cellulari (**Figura 24**).

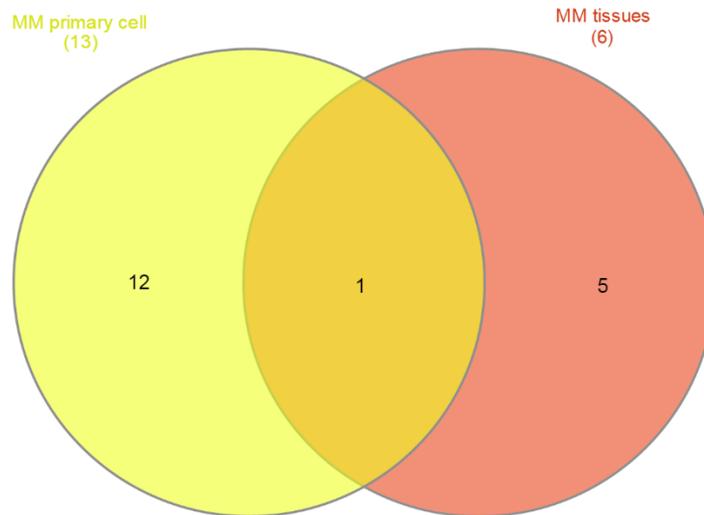


Figura 24. Diagramma di Venn che mostra l'unico miRNA condiviso dai due modelli di studio.

Purtroppo i risultati ottenuti con la tecnologia dei *microarray* non hanno valore assoluto, ma vanno confermati tramite analisi con qRT-PCR, attualmente considerato il *gold standard* per l'analisi dei miRNA. Si è proceduto alla validazione dell'espressione del miR-214 mediante qRT-PCR, confrontando 7 tessuti microdissecati vs. 3 pleure normali. Il confronto analizzato mediante t test, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa per $p < 0,05$ (**Figura 25**). Informazioni dettagliate sulla struttura del pre-miR e del miR-214-3p maturo sono riportate in **Figura 26**.

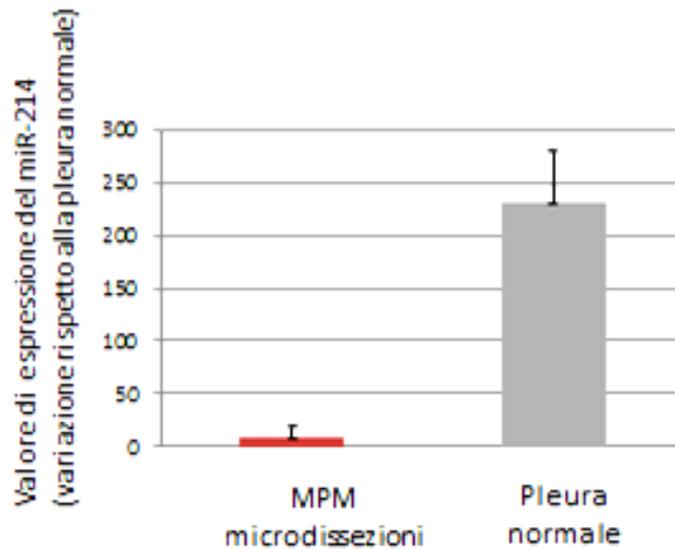
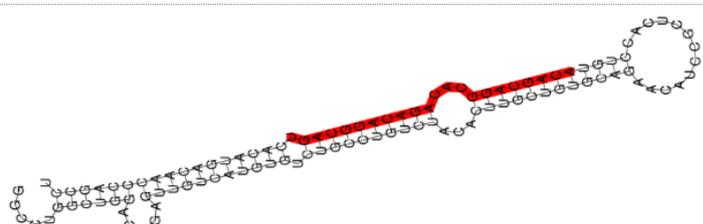


Figura 25. Espressione differenziale del miR-214 tra MM e controlli sani.

pre-miRNA Information

pre-miRNA ID	hsa-mir-214 LinkOut: [miRBase]
Synonyms	MIRN214, miRNA214, mir-214, MIR214
Description	Homo sapiens miR-214 stem-loop
Comment	This human miRNA was predicted by computational methods using conservation with mouse and Fugu rubripes sequences .
2nd Structure of pre-miRNA	

Mature miRNA Information

Mature miRNA	hsa-miR-214-3p
Mature Sequence	71 ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU 92
Evidence	Experimental
Experiments	Cloned

Figura 26. Informazioni sulla struttura del pre-miR e del hsa-miR-214-3p maturo: Accession ID: MIRT000148.

Poichè l'importanza di un miRNA risiede nell'identificazione della sua funzione biologica e dei pathways che regola, abbiamo deciso di utilizzare il software miRTarBase per l'identificazione dei

bersagli molecolari del miR-214. Fra i *targets* individuati, alcuni dei quali riportati in **Tabella 8**, è sembrata particolarmente interessante la proteina EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2).

Tabella 8. Alcuni dei *targets* del miR-214 individuati grazie all'analisi con miRTarBase.

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT000148	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	EZH2	✓	✓	✓				✓	4	5
MIRT000799	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	PTEN	✓	✓	✓	✓			✓	5	7
MIRT004738	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	DAPK1			✓	✓			✓	3	1
MIRT005426	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	MAP2K3	✓	✓	✓	✓			✓	5	1
MIRT005427	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	MAPK8	✓	✓	✓	✓			✓	5	1
MIRT005551	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	POU4F2	✓	✓	✓				✓	4	1
MIRT005765	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	PLXNB1	✓	✓	✓	✓			✓	5	2

EZH2 appartiene al complesso PcG2 (Polycomb Repressive Complex 2), una classe di mediatori epigenetici della staminalità, coinvolti nella metilazione degli istoni. Il complesso PcG2 svolge un ruolo essenziale nei processi biologici poiché in grado di reprimere la trascrizione e lo sviluppo delle cellule staminali [Kemp CD et al., 2012]. E' stato inoltre implicato nella patogenesi di molti tumori e sembra che possa inibire la trascrizione della regione genica intronica in cui mappa il miR-214. Con la differenziazione cellulare il PcG viene rimosso con conseguente attivazione del miRNA-214 che, con un meccanismo a un *feed-back* negativo, regola il complesso in questione e il suo *target* diretto EZH2.

Se la relazione tra l'espressione del miRNA-214 e della proteina EZH2 fosse confermato anche nella patogenesi del MM, il deragliamenti di tale meccanismo potrebbe essere alla base dell'aberrante regolazione cellulare che alla fine porta alla patogenesi tumorale. Informazioni dettagliate sull'interazione tra il miR-214 ed il *target* EZH2 e sono riportate in **Figura 27**.

Gene Information

Gene Symbol	EZH2 LinkOut: [Entrez Gene BioGPS Wikipedia iHop]
Synonyms	ENX-1, ENX1, EZH1, KMT6, KMT6A, WVS2
Description	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
Transcript	NM_004456 LinkOut: [RefSeq]
Other Transcripts	NM_152998
Expression	LinkOut: [BioGPS]
Putative miRNA Targets on EZH2	LinkOut: [TargetScan 5.1 MicroCosm miRNome 2.0]
3'UTR of EZH2 (miRNA target sites are highlighted)	<pre>>EZH2 NM_004456 3'UTR 1 CCTTGACATCTGCTACCTCCTCCCCCTCCTCTGAAACAGCTGCCTTAGCTTCAGGAACCTCGAGTACTGTGGCAATTT 81 AGAAAAAGAACATGCAGTTTGAATTTCTGAATTTGCAAGTACTGTAAGAATAATTTATAGTAATGAGTTTAAAAATCA 161 CTTTTATTGCCCTTCTCACCAGCTGCAAAGTCTTTTGTACCAGTGAATTTTGGCAATAATGCAGTATGGTACATTTTCA 241 ACTTTGAATAAAGAATACTTGAACCTGTCCTTGTGGAATC</pre>
	Target sites Provided by authors Predicted by miRanda

ID	Duplex structure	Position	Score	MFE
1	<pre>miRNA 3' ugACGGACAGACACGGACGACa 5' Target 5' atTGCCT-TCT-CACCAGCTGc 3'</pre>	167 - 186	126.00	-15.30
2	<pre>miRNA 3' ugACGGAC--AGACACGGACGACa 5' : : : Target 5' aaTACTTGAACCTTGTCTTGTGa 3'</pre>	254 - 277	126.00	-13.10
3	<pre>miRNA 3' ugacGGACAGACACGGACGACa 5' : : Target 5' ---cCTTGAC---ATCTGTac 3'</pre>	1 - 16	107.00	-6.50

Figura 27. "Minimum free energy" (MFE) e pValue dell'allineamento tra miR-214 – EZH2.

5. DISCUSSIONE

Un numero crescente di studi ha documentato il coinvolgimento dei miRNA nella perturbazione delle vie di trasduzione del segnale alla base dei meccanismi patogenetici indotti dall'esposizione a diverse fonti di inquinamento, suggerendo la possibilità di utilizzarli come marcatori diagnostici e bersagli terapeutici in una varietà di malattie. Trovare biomarcatori in grado di predire lo sviluppo del MM in soggetti con una storia di esposizione all'amianto di tipo occupazionale e/o ambientale avrebbero implicazioni enormi, soprattutto se si considera che la diagnosi MM è particolarmente invasiva e che, ad oggi, non vi è ancora alcuna cura efficace. Tuttavia, nonostante gli intensi sforzi di ricerca in corso in diversi laboratori, l'ottenimento di risultati coerenti e consistenti è ostacolato da differenze sostanziali nei metodi di analisi adottati. Di conseguenza, l'obiettivo di individuare test diagnostici/prognostici per il MM che siano accurati, economici, facili da analizzare e poco invasivi, è ancora sfuggente. Dato che i lavori incentrati sullo studio differenziale dei miRNA forniscono una miriade di dati, molti dei quali senza alcuna rilevanza clinica, la conduzione di una meta-analisi che valuti nell'insieme il valore dei miRNA comuni a più studi, potrebbe produrre dei risultati importanti. Fino ad oggi, nonostante il valore dell'analisi secondaria dei dati nel fornire la miglior evidenza possibile quando gli studi sperimentali sono in disaccordo, non è stata effettuata nessuna meta-analisi incentrata sul valore dei miRNA nell'esposizione ad amianto e nel MM. D'altra parte, la condizione essenziale per la conduzione di una meta-analisi è la disponibilità di dati confrontabili. Nel nostro caso purtroppo, la scarsità dei *dataset* di dati grezzi relativi all'espressione dei miRNA nel MM, ha reso impossibile l'applicazione di un approccio statistico più ampio. Solo pochi dei 39 studi recuperati dallo screening della letteratura erano basati su ampi *profiling* e ancor meno sono i dataset di dati grezzi pubblicati nei *repositories* on-line [Micolucci L *et al.*, 2016]. Per far fronte a questa grave limitazione, abbiamo ritenuto che l'approccio più razionale e trasparente fosse quello di utilizzare una strategia basata sul conteggio dei voti. Questo metodo ha prodotto un pool, di 213 miRNA, altamente eterogeneo e ha fornito due informazioni importanti: in primo luogo, ha evidenziato una

generale ipo-espressione dei miRNA nel MM rispetto ai gruppi di controllo; ed in secondo luogo ha permesso di notare che i miRNA in campioni ematici e bioptici mostrano una certa consistenza, mentre l'espressione nelle linee cellulari è sostanzialmente diversa (**Tabella 4** e **Tabella supplementare 4**). Questo suggerisce che l'uso delle linee cellulari dovrebbe essere limitato ai soli saggi funzionali. Numerosi miRNA sono stati comunemente riportati in più di uno studio ed anche se in assenza di un chiaro trend (**Tabella 4**), potrebbero essere coinvolti nella modulazione delle principali vie metaboliche alla base delle ARD e del MM [Micolucci L *et al.*, 2016].

Successivamente, per snellire il set dei 213 miRNA escludendo quelli spuri, sono stati selezionati solo i miRNA validati con qRT-PCR e sono stati sottoposti ad ulteriori analisi. Questa selezione ha permesso di conservare 41 miRNA (**Tabella 5**) ai quali è stata applicata una meta-analisi qualitativa mediante l'ideazione di un'apposita strategia di conteggio dei voti. Questo approccio consente di assegnare un valore ad ogni miRNA sulla base di cinque caratteristiche: *i*) il numero di serie di qRT-PCR condotti per la validazione di ogni miRNA; *ii*) il numero totale di campioni di MM, *iii*) il numero totale di campioni di controllo; e *iv*) il numero di studi che riportano lo stesso miRNA ed in fine *v*) il trend di deregolazione. I miRNA circolanti e tissutali così individuati hanno in seguito mostrato di avere una potenzialità molto elevata di poter funzionare come biomarcatori e meritano ulteriori indagini come “microRNA associati al mesotelioma” da qui denominati “mesomiRs” (*mesothelioma-associated miRNAs*).

5.1. LA SIGNATURE DEI MICRORNAS ASSOCIATI A MM IN CAMPIONI TISSUTALI

Anche l'esame dei 41-miRNA dimostra chiaramente una tendenza generale verso la down-regolazione dei miRNA nei tessuti (**Tabella 5**), confermando l'ipotesi che i miRNA ipoespressi nei tumori possono avere una funzione di tipo tumor-ruppressor mentre quelli iper-espressi possano

essere oncomiRs [Micolucci L *et al.*, 2016]. L'ipotesi è supportata anche dai dati di correlazione tra diversi miRNA *tumor-suppressor* e *oncomiRs*, e la modulazione dei loro target [John-Aryankalayil M *et al.*, 2012]. Inoltre, dal momento che il MM è caratterizzato da instabilità cromosomica (ne sono un sempio le delezioni in posizione 1p36, 9p21, 3p, 4q, 6q, 14q32, 17p13 e 22q12), che è stata correlata al silenziamento di geni oncosoppressori [Crispi S *et al.*, 2010], i miRNA che li riconoscerebbero come target potrebbero essere anch'essi analizzati per la ricerca di potenziali biomarcatori. Al contrario, amplificazioni cromosomiche sono state riportate in 1q, 5p15, 7p12, 8q24 e 17q [Takeda M *et al.*, 2012; Guo G *et al.*, 2015]. Diversi miRNA individuati nel nostro studio, mappano sui loci sopra menzionati o in regioni cromosomiche fragili (Tabella 2), ciò potrebbe in parte spiegare la loro espressione differenziale [Micolucci L *et al.*, 2016].

La down-regolazione dei miR-145-5p, miR-143-3p, miR-126-3p, miR-652-3p, e miR-16-5p, e la up-regolazione del miR-625-3p, evidenziati dalla meta-analisi qualitativa, sono in accordo con l'instabilità cromosomica e le modificazioni epigenetiche descritte nel MM. La down-regolazione del miR-145 (score più alto nel *box-plot* in **Figura 13**) nel MM e in altre neoplasie polmonari potrebbe spiegare il suo ruolo nella carcinogenesi. Il miR-145 e la famiglia dei miR-143 sono miRNA *in cluster* coinvolti nella regolazione di p53. Entrambi mappano sul locus 5q32, che nelle linee cellulari di mesotelioma è soggetto ad ipermetilazione. Questo probabilmente spiega la loro bassa espressione nei campioni di MM [Micolucci L *et al.*, 2016].

I miR-126-3p, miR-625-3p e miR-16-5p mappano rispettivamente sui loci 9q34.3, 14q23.3 e 13q14.2, che sono soggetti a delezioni a cambiamenti del numero di copie. La down-regolazione della famiglia dei miR-15 è stata descritta in altri tumori solidi come quello del polmone, del colon, dell'ovaio e della prostata, e il locus genico corrispondente è interessato da delezioni in più della metà delle cellule B nella leucemia linfocitica cronica (CLL); in cui, il cluster miR-15a/16-1 ha come target l'oncogene BCL2 e funzionando da tumor-suppressor [Calin GA *et al.*, 2008]. Il miR-126-3p tende ad essere deregolato in qualsiasi malattia che causa danni micro- o macro-vascolari, infiammazione e invecchiamento [Olivieri F *et al.*, 2013]. I risultati più recenti suggeriscono un suo ruolo nella

regolazione del trasportatore LAT1 in cellule di MM e nel controllo dello stress ossidativo in MM, osservazione in linea con il suo silenziamento osservato nei pazienti affetti da MM [Tomasetti M *et al.*, 2014]. Al contrario, sono necessari ulteriori studi per chiarire i ruoli biologici di miR-625-3p e miR-652-3p nella carcinogenesi.

Oltre all'instabilità cromosomica, la down-regolazione dei miRNA potrebbe essere spiegata da due caratteristiche chiave del MM: il fenotipo ipossico e gli alti livelli del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) [Shen J *et al.*, 2013]. Nel citoplasma, i pre-miRNA vengono scissi dalla ribonucleasi Dicer alla loro lunghezza matura e vengono poi caricati sulle proteine Ago2; la formazione del complesso RISC conduce al raggiungimento della loro forma funzionale. In condizioni di ipossia, EGFR viene interiorizzato in vescicole intracellulari, dove fosforila la Ago2 citoplasmatica, riducendo il legame dei precursori a Dicer e quindi il numero di miRNA maturi [Shen J *et al.*, 2013].

Inoltre, l'analisi dei miRNA del quartile Q2 condividono interessanti caratteristiche con quelli in posizione Max e Q3 del *box-plot* (**Figura 13**). L'ipo-espressione dei miR-15a-5p, miR-15b-5p e miR-195-5p è stata segnalata da uno studio condotto su più di 50 campioni di MM; significativamente, tutti questi miRNA appartengono alla stessa famiglia genica o sono miRNA *in cluster*, così come miR-16-5p. Dal momento che solo uno studio ha descritto il comportamento dei miRNA in tumori polmonari legate all'amianto [Nymark P *et al.*, 2011], non è possibile trarre conclusioni a riguardo, ma la constatazione che i miR-15b e miR-195 sono legati alla carcinogenesi precoce nei soggetti esposti all'amianto (**Figura 14**) aggiunge ulteriore rilievo alla famiglia dei miR-15. È interessante notare che la fase I della sperimentazione "MesomiR I" ha rivelato una notevole risposta metabolica e radiologica in un paziente affetto da MM utilizzando trattato con un nuovo sistema di vettori (denominati TargomiRs) in grado di veicolare dei *mimic* del miR-16 [Kao SC *et al.*, 2015]. Anche se preliminari, questi dati preclinici sono promettenti e confermano che i *mimic* dei miRNA e gli anti-miR possono essere in grado di ripristinare le *network* geniche.

Valutazione del potenziale diagnostico dei miRNA più significativi nei tessuti (**Figura 15**) ha rivelato

che 3 miRNA sono comunemente deregolati in alcuni tipi tumorali, ma la disparità dei siti di insorgenza li rende ancora discriminanti per il MM [Micolucci L *et al.*, 2016].

La meta-analisi qualitativa, condotta con un metodo di conteggio dei voti appositamente ideato, ha identificato quei miRNA particolarmente rilevanti nel meccanismo patogenetico legato all'amianto. E' stato recentemente suggerito che un classificatore composto da quattro-miRNA (miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-652-3p) potesse essere applicato nella differenziazione del MM da campioni di tessuto non-neoplastici, con alta sensibilità e specificità [Andersen M *et al.*, 2014]. E' ragionevole ipotizzare che le sue prestazioni potrebbero essere migliorate con l'aggiunta di altri cinque miRNA identificati dalla nostra meta-analisi qualitativa - miR-16-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, e miR-203a-3p - dando così luogo ad una "*MM-miR signature*". L'analisi dei nove miRNA potrebbe fornire informazioni diagnostiche più accurate, e in teoria anche dividere i pazienti sulla base dell'espressione relativa dei miRNA e valutare la velocità di progressione tumorale. L'ipotesi che l'uso di più miRNA potrebbe essere più preciso è supportata dalla potenziale natura policlonale del MM e degli altri ARD. Infatti, dal momento che l'effetto cancerogeno delle fibre minerali comporta che più celle subiscano l'impulso verso la trasformazione maligna, è probabile che ogni clone possa sviluppare ed espandere la propria serie distintiva di alterazioni molecolari [Comertpay S *et al.*, 2014]. Questi 9 miRNA tissutali dovrebbero essere studiati a fondo per valutare il loro coinvolgimento nelle vie di trasduzione del segnale che conducono all'innescò e alla progressione delle ARDs [Micolucci L *et al.*, 2016].

L'analisi esplorativa, condotta con il *software* miRNet su questi dati, ha dimostrato che *i*) i mesomiRs appaiono fortemente coinvolti in più vie molecolari importanti durante lo sviluppo tumorale, tra le principali si osservano: le pathways che regolano la pluripotenza delle cellule staminali, l'apoptosi, il ciclo cellulare, PI3K-Akt, p53, TGF-beta, mTOR, FoxO, ed infine i meccanismi alla base dell'adesione cellulare (*focal adhesion* ed *adherens junction*); e che *ii*) un processo di analisi dei dati secondaria seguito da un approccio bioinformatico potrebbe rivelare dati affidabili riguardo i microRNA e i loro geni *targets* proteici. Questi risultati forniscono nuove conoscenze "*evidence-*

based” per la scoperta di nuovi approcci terapeutici.

5.2. CIRCULATING MIRNAS AS BIOMARKERS IN MM AND ASBESTOS-EXPOSED PATIENTS

I miRNA circolanti hanno tutte le caratteristiche del “*biomarker* ideale” poiché sono: stabili, variano poco nella popolazione generale, non sono costosi da analizzare ed il loro prelievo non è invasivo.

I cinque miRNA circolanti evidenziati dalla meta-analisi qualitativa comprendono quattro miRNA analizzati nel plasma/siero - miR-126-3p, miR-29c-5p, miR-92a-3p e miR-625-3p - e uno - miR-103a-3p - analizzato nella frazione cellulare del sangue periferico (**Figura 13**). Numerosi miRNA circolanti che mostrano proprietà clinicamente significative, sono stati analizzati anche in pazienti con diverse condizioni fisiopatologiche, compresi individui esposti a inquinanti ambientali. Per testare il potenziale diagnostico e la specificità dei miR-126-3p, miR-29c-5p, miR-92a-3p, miR-625-3p e miR-103a-3p, abbiamo confrontato tre gruppi di miRNA circolanti – “miRNA associati al MM”, “miRNA correlati ad altre neoplasie” e “miRNA derivanti dall’esposizione all’inquinamento” (**Figura 16**). Anche in questo caso il miR-126 è comune a tutti i gruppi. Nello specifico, occorre considerare che la sua down-regolazione è stata riportata in pazienti affetti da NSCLC rispetto a fumatori sani/controlli sani [Del Vescovo V *et al.*, 2014], ma il miR-126 rimane significativamente più down-regolato nel MM che nei pazienti con NSCLC/controlli sani, ed in più la sua analisi potrebbe essere utile per stratificare i pazienti MM in base alle prospettive di sopravvivenza [Tomasetti M *et al.*, 2012].

Nel set di “miRNA derivanti dall’esposizione all’inquinamento”, l’ipo-espressione del miR-126 è stata rilevata nei leucociti come effetto dell’esposizione a particolato, carbonio nero, carbonio organico, e ioni SO_4^{2-} [Vrijens K *et al.*, 2015]; quest’ultimi si trovano nell’atmosfera sottoforma di aerosol prodotti dalla combustione di combustibili fossili e di biomassa. Un trend simile potrebbe

essere verosimilmente indotto dalle fibre minerali e dalle polveri contenenti amianto.

Il miR-103, anche se in comune tra due gruppi, è comunque specifico per il MM visto il diverso tipo di campioni in cui è stato analizzato (rispettivamente frazione cellulare del sangue periferico e siero) (**Figura 16**).

Anche se i dati sperimentali suggeriscono che i miRNA rilasciati nei fluidi corporei non riflettano necessariamente la loro abbondanza nelle cellule di origine [Russo F *et al.*, 2014], abbiamo provato a verificare se il nostro gruppo di miRNA circolanti nel MM siano specifici del tumore oppure sono miRNA comunemente rilevabili in circolazione. Per perseguire questo obiettivo, abbiamo confrontato il nostro set di miRNA con quelli che si trovano comunemente in individui sani. Il diagramma di Venn in **Figura 17** mostra che nove miRNA comunemente rilevati in individui sani sono invece down-regolati nel MM, e comprendono i miR-103 e miR-126 (il quale mostra la stessa tendenza anche nei campioni di tessuto). Al contrario sei miRNA, tra cui i miR-625-3p e miR-29c-5p up-regolati, sono specifici del set MM. Il miR-29c-5p ha valore prognostico, dal momento che una sua espressione più alta è associata ad una prognosi favorevole nei pazienti [Pass HI *et al.*, 2010], rafforzando il suo valore come aspirante biomarcatore.

Dal momento che i miRNA sono trasportati verso i loro target da specifici *carrier*, abbiamo ipotizzato che i miRNA associati ad esosomi, Ago2 e HDL possano originare da tipi cellulari differenti andando a riflettere specifici meccanismi. Un'analisi del database Mirandola ha dimostrato che nel plasma e nel siero il miR-126-3p è principalmente associato ad esosomi (**Tabella 6**). Gli esosomi funzionano come navette nel *cross-talk* tra microambiente tumorale e i target in cellule lontane. Gli oncomiRs sono attivamente secreti dalle cellule tumorali e promuovono la formazione e la progressione tumorale, agendo sul rimodellamento della matrice extracellulare, inducendo l'angiogenesi e regolando le cellule stromali e nicchie di cellule staminali [Zhao L *et al.*, 2015]. Il miR-126-3p ha la funzione di tumor-suppressor [Ebrahimi F *et al.*, 2014], e la sua perdita promuove la formazione del tumorale, la migrazione e l'invasione, prevenendo la risposta immunitaria anti-tumorale. Tra i suoi target è annoverata la proteina VCAM1 (**Tabella 6**), importante per il riconoscimento cellula-cellula,

per l'adesione cellulare e la trasduzione del segnale; inoltre può svolgere un ruolo fisiopatologico sia nella risposta immunitaria che nella migrazione dei leucociti verso i siti dell'infiammazione [Alexander M *et al.*, 2015]. In particolare, il fatto che il miR-126-3p tenda ad essere up-regolato in altri tipi di tumore (**Tabella 6**), che sia associato ad esosomi e che abbia lo stesso trend anche nei tessuti di MM, conferma il suo valore di potenziale biomarker. VEGF è un altro target specifico del miR-126-3p [Lui B *et al.*, 2009] infatti nel sangue di pazienti affetti da MM si rilevano livelli inversamente proporzionali di VEGF/miR-126-3p [Santarelli L *et al.*, 2011]. Il miR-126-3p potrebbe rappresentare anche un potenziale target terapeutico, poiché la sua espressione in cellule di MM guidata dall'uso di vettori ingegnerizzati, riduce la migrazione delle cellule tumorali e la capacità invasiva nel tumore del colon. Infine, entrambe le forme mature del mir-126 ostacolano la progressione delle metastasi riducendo il reclutamento di monociti infiammatori e di cellule staminali mesenchimali nel sito del tumore primario [Micolucci L *et al.*, 2016].

In seguito ad uno studio condotto su campioni di tumore ovarico [Häusler SFM *et al.*, 2010] è stato suggerito che tutte le neoplasie possono generare “un'impronta caratteristica unica” nei miRNA della frazione cellulare del sangue periferico. Uno studio ha condotto un'indagine simile su campioni ematici da pazienti con MM ed in seguito a *profiling* ha proposto un ruolo da *biomarker* per il miR-103a-3p [Weber DG *et al.*, 2012, 2014]. Dal momento che la nostra ricerca non ha recuperato ulteriori studi che utilizzano questo approccio, i dati disponibili non sono sufficienti per giudicare se i miRNA nella frazione di cellule del sangue periferico riflettano un fenomeno specifico della patologia o delle cellule sanguigne. Il profilo d'espressione dei miRNA della frazione cellulare del sangue periferico è probabilmente in gran parte influenzata dai miRNA endogeni delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC). Inoltre le cellule immunitarie T, B, e dendritiche hanno dimostrato di avere un diverso carico esosomiale di miRNA rispetto alle loro cellule madri, ciò è dovuto ad un *cross-talk* a livello esosomiale tra gli RNA regolatori e le cellule riceventi durante la sinapsi immunitaria [Mittelbrunn M *et al.*, 2011]. In questo contesto, bassi livelli di miRNA specifici o l'alterazione genetica dei miRNA che fungono da componenti chiave nella trasformazione

tumorale, possono compromettere la risposta immunitaria e portare alla cancerogenesi [Mittelbrunn M *et al.*, 2011]. L'esame delle caratteristiche del miR-103a-3p nel database Mirandola, ha dimostrato che miR-103a-3p è associato alle proteine Ago2 e agli esosomi nelle cellule T e nelle cellule dendritiche (**Tabella 6**). E' stato documentato che l'inalazione di fibre di amianto può compromettere la risposta immunitaria e l'immunità tumorale colpendo le cellule immunocompetenti. In particolare, l'esposizione all'amianto sopprime la differenziazione dei linfociti CD8+ naïve umani in linfociti T citotossici (CTL), che riconoscono e uccidono le cellule target non-self. L'analisi del numero e delle caratteristiche dei PBMC ha dimostrato che il loro numero totale è inferiore nei pazienti esposti ad amianto e in quelli affetti da MM rispetto agli individui sani, e che i linfociti CD8+ sono affetti da una compromissione funzionale sia nei primi due gruppi di individui. Mentre il MM è associato ad una ridotta immunità tumorale, i pazienti esposti conservano un'attività immunitaria efficace [Kumagai-Takei N *et al.*, 2013, 2014]. Questi risultati sono in linea con la down-regolazione del miR-103a-3p descritta in pazienti affetti da MM. L'analisi effettuata con Mirandola (**Tabella 6**) ha identificato target validati che rafforzano questi risultati: *i*) inducible T-cell co-stimulator (ICOS), che svolge un ruolo importante nella comunicazione cellula-cellula, nella risposta immunitaria e nella regolazione della proliferazione cellulare; *ii*) SERPINE1 (SERBP1), un mRNA capace di legare le proteine che può svolgere un ruolo nella regolazione stabilità degli mRNA; *iii*) FBXW11 (F-box and WD repeat domain containing 11), che è coinvolto nella ubiquitinazione e conseguente degradazione di proteine bersaglio, partecipa nella via di trasduzione del segnale mediata da Wnt, e può avere una funzione importante nello stress ossidativo. Mirandola non considera il miR-103a-3p come un potenziale biomarcatore in altre malattie; *iv*) il miR-625-3p è trasportato da HDL ed esosomi, ha valore di *biomarker* nel siero di pazienti con NSCLC quando risulta significativamente down-regolato rispetto agli individui sani [Roth C *et al.*, 2012]; *v*) livelli elevati del miR-625-3p sono stati riportati nel plasma/siero di pazienti affetti da MM, e l'analisi tramite miRNAexpress lo ha classificato come "specifico" nella circolazione mentre i miR-126-3p e miR-103a-3p sono comunemente ritrovati anche nelle cellule; evidenza confermata anche da un ulteriore studio che si prefiggeva di valutare

l'impatto dei miRNA cellulari su quelli presenti in circolazione [Dutttagupta R *et al.*, 2011]. Anche se la funzione e i target del miR-625-3p sono ancora poco chiari, i nostri dati lo identificano come un miRNA potenzialmente MM-specifico; *vi*) il miR-29c-5p è up-regolato sia nelle cellule che in circolazione, ma secondo il database Mirandola è prevalentemente associato a cellule. Questo concorda con la constatazione che esso ha un potenziale prognostico se analizzato nei campioni tissutali di MM [Pass HI *et al.*, 2010], visto che i suoi livelli di espressione possono segregare i pazienti in base all'istotipo e, precisamente, l'espressione più alta correla con una prognosi più favorevole; tuttavia la sua espressione nel plasma/siero è meno significativa [Kirschner MB *et al.*, 2012]; infine *vii*) il miR-92a-3p è up-regolato nelle cellule e nella circolazione; alti livelli sono stati riportati nel tumore gastrico, CRC e nell'infezione da epatite C. È quindi poco specifico e meno significativo come potenziale biomarker nel MM (**Tabella 6**).

I miR-126-3p, miR-103a-3p, miR-29c-5p, miR-92a-3p e miR-625-3p sono probabilmente rilasciati dalle cellule tumorali attraverso *pathways* diversi per assolvere a diverse funzioni. L'ipotesi è sostenuta da alcuni dati che hanno mostrato marcate differenze di questi miRNA sia in specifiche frazioni di siero dello stesso individuo, sia tra individui sani e pazienti affetti da tumore [Ashby J *et al.*, 2014]. Ciò suggerisce che la stratificazione dei miRNA in campioni ultracentrifugati potrebbe riflettere la natura dei loro differenti *carriers* e sottolinea la necessità, per gli studi futuri, di valutare i livelli di miRNA contestualmente ai loro vettori quando si è alla scoperta di nuovi biomarcatori.

5.3. MM-MIRNA E POSSIBILI APPLICAZIONI CLINICHE

I miR-126-3p, miR-103a-3p e miR-625-3p hanno fornito alcuni risultati interessanti nel distinguere i pazienti affetti da MM da quelli sani o da quelli che dichiarano di avere una pregressa storia di esposizione occupazionale/ambientale all'amianto, al contrario la capacità diagnostica dei miR-29c-5p e miR-92a-3p richiede ulteriori valutazioni. I miR-126-3p e miR-103a-3p hanno dimostrato una

sensibilità rispettivamente del 73-80% e del 83-89%, ma la loro relativamente bassa specificità (rispettivamente 60-74% e 63-71%,) impedisce un loro utilizzo nella pratica clinica come biomarcatori singoli [Snatarelli L *et al.*, 2011; Weber DG *et al.*, 2012, 2014]. Al contrario, il miR-625-3p ha mostrato una specificità del 78-90% e una sensibilità del 70-73% (**Figura 18A-18B**) [Kirschner MB *et al.*, 2012]. Nel corso degli ultimi anni, anche diverse proteine sono state proposte come biomarcatori nel MM. La mesotelina è attualmente il biomarcatore più utilizzato grazie alla sua elevata specificità (circa 89%), ma che purtroppo rivela una bassa sensibilità (58%) [Cui A *et al.*, 2014]. Secondo dati recenti, i livelli sierici di HMGB1 e i livelli relativi delle sue diverse isoforme (HMGB1 iper-acetilato e HMGB1 non acetilato) sarebbero in grado di distinguere i pazienti di MM da individui esposti all'amianto e dai controlli non esposti con una sensibilità e specificità del 100%, superando tutti i valori di accuratezza dei biomarcatori esistenti (mesotelina, fibulina-3 e osteopontina), per di più l'analisi combinata di HMGB1 e fibulin-3 dovrebbe migliorare la diagnosi differenziale [Napolitano A *et al.*, 2016].

E' interessante notare che l'utilizzo marcatori di diverse classi molecolari ha dimostrato di garantire alte prestazioni diagnostiche nel MM. In base alle nostre conoscenze, un'analisi che valutasse l'accuratezza diagnostica di miRNA e HMGB1 in associazione non è mai stata eseguita, ma l'analisi combinata di mesotelina e miR-126-3p oppure miR-103a-3p ha migliorato la specificità e la sensibilità di ognuno dei biomarcatori presi singolarmente nel distinguere pazienti affetti da pazienti esposti (**Figura 18A-18B-18C**) [Santarelli L *et al.*, 2011; Weber DG *et al.*, 2014]. Questa scoperta e l'evidenza che una combinazione di miRNA circolanti piuttosto che un singolo miRNA possano aumentare le prestazioni dei biomarcatori nell'ambito della diagnosi precoce [Cuk K *et al.*, 2013] suggeriscono che una *signature*, composta da miR-126-3p, miR-103a-3p, miR-625-3p e mesotelina, sarebbe in grado di massimizzare l'efficacia del monitoraggio dei pazienti esposti ad amianto per la diagnosi precoce dello *switch* carcinogenetico. La stima complessiva per l'accuratezza diagnostica della combinazione "miR-103a-3p e mesotelina" ha rivelato il valore più alto di sensibilità del 90% (0,82-0,96), specificità 82,7% (0,74-0,89) e DOR 46,65 (18,94-114,9) (**Tabella 7**).

Inoltre, sarebbe utile poter valutare la possibilità di utilizzare le diverse frazioni del sangue intero nel monitoraggio dei pazienti ad alto rischio. Infatti, i livelli plasmatici/sierici dei miRNA circolanti possono essere mascherati da altri miRNA rilasciati dalle cellule ematopoietiche, e le differenze del numero delle cellule del sangue, dell'emolisi del campione e dei materiali residui dopo la morte delle cellule, sono tutte cause di variabilità dei livelli dei miRNA [Pritchard CC *et al.*, 2012; Kirschner *et al.*, 2013]. Il problema potrebbe essere affrontato dall'ideazione e messa a punto di un protocollo standard. La base per lo sviluppo di tale protocollo, potrebbe essere verosimilmente costruita sull'analisi simultanea a partire dallo stesso campione del miR-103a-3p nella frazione cellulare e dei miR-126-3p, miR-625-3p e mesotelina nel plasma/siero, associato ad una conta delle cellule del sangue e alla valutazione del grado di emolisi. La valutazione dei risultati di tale approccio fornirebbero prove concrete circa il valore di questi *biomarkers* nella diagnosi precoce ed, eventualmente, nella capacità di stratificazione dei pazienti in base alle condizioni fisiopatologiche e alla prognosi [Micoliucci L *et al.*, 2016]. Nella figura (**Figura 28**) è riportato schematicamente il potenziale valore rivestito dai meso miRs nella pratica clinica.

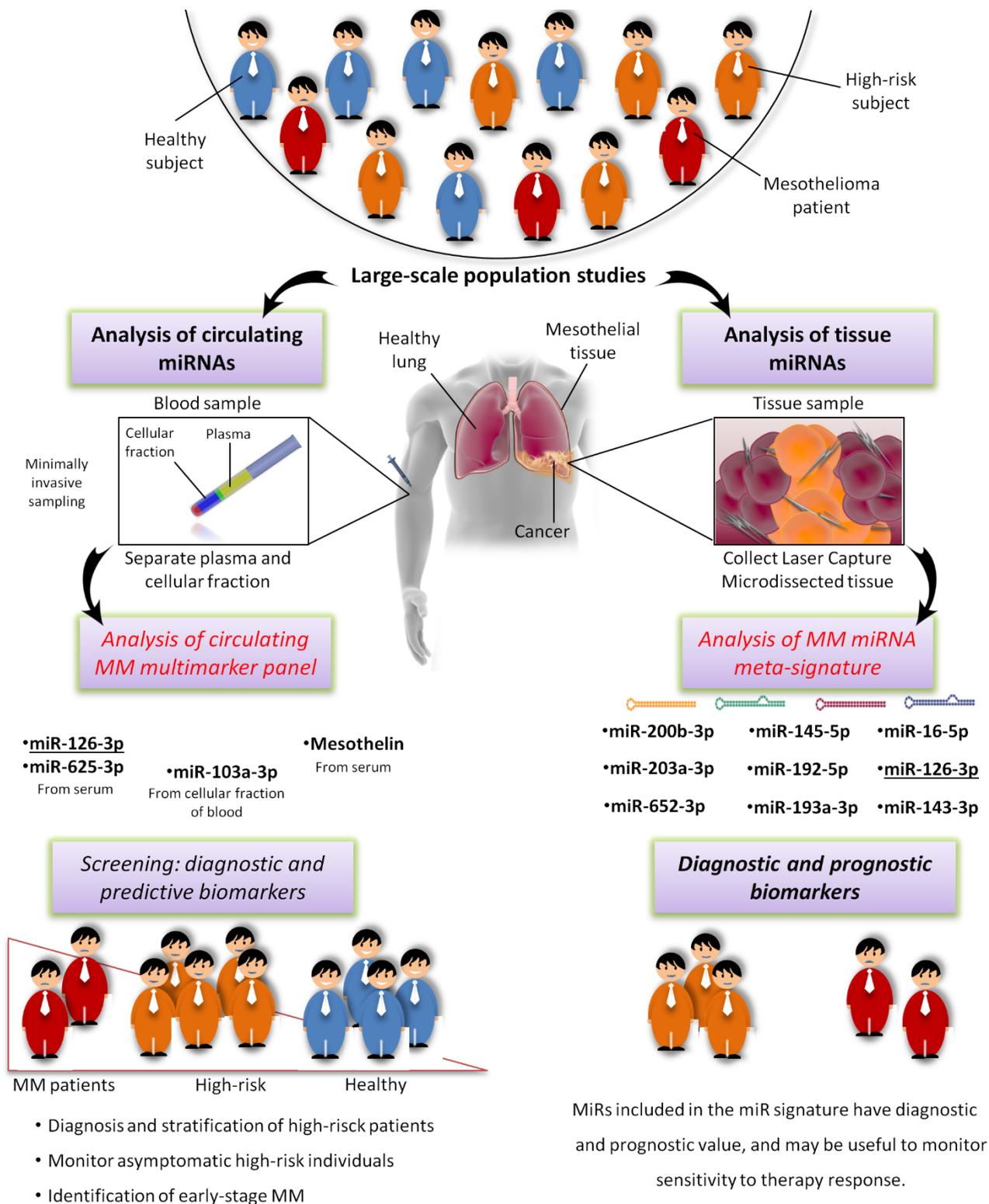


Figure 28. Schematic drawing illustrating summary findings. On left side: potential pivotal role of miRNAs in the minimally invasive surveillance of high risk patients and early diagnosis of MM cases. On right side: diagnostic and prognostic potential of the most important tissue miRNAs. Parts of the images were adapted from (<http://www.somersault1824.com/>) [Micolucci L et al., 2016].

E' stato visto che le cellule mesoteliali rispondono a danni di tipo meccanico e/o all'inflammatione cronica invertendo il loro fenotipo da epiteliale a mesenchimale. Questa transdifferenziazione, definita "*epithelial-mesenchymal transition*", richiede l'intervento specific di EZH2 per essere effettuata [Rao RA *et al.*, 2015].

E' quindi ipotizzabile che la ridotta espressione del miR-214 nel MPM si associ ad un aumento di espressione della proteina EZH2 con conseguente deregolazione dell'espressione genica e acquisizione delle caratteristiche di malignità tipiche delle cellule neoplastiche.

6. CONCLUSIONI ED IMPLICAZIONI FUTURE

Si ritiene che la morbilità e la mortalità causata dall'esposizione all'amianto raggiungerà il suo picco nel prossimo decennio [Sen D *et al.*, 2015]. E' urgente individuare nuovi approcci diagnostici minimamente invasivi per lo *screening* dei soggetti a rischio, per cercare di estendere la *life span* dei pazienti e preservarne la qualità di vita. La rassegna sistematica condotta in questo studio, confermano l'importanza dei miRNA nella diagnosi, nella prognosi e nel trattamento del MM, confermando la possibilità di poterli utilizzare come biomarcatori specifici dell'esposizione all'amianto.

Di recente, una valutazione del valore dei metodi basati sul conteggio dei voti, ha rivelato che il numero di studi a sostegno di uno stesso biomarcatore combinato con le dimensioni del campione esaminato mediante RT-qPCR, fornisce un ottimo ranking dei valori dei biomarcatori in esame [Rikke BA *et al.*, 2015]. Di conseguenza, in seguito alla revisione sistematica della letteratura, è stato illustrato un approccio basato sul *vote-counting* utile per l'identificazione dei miRNA più significativi. Il processo ha fornito un elenco affidabile di candidati aventi le caratteristiche di potenziali biomarcatori. Una validazione standardizzata su larga scala, dovrà stabilire se la *signature* di miRNA tissutali (miR-16-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-192-5p, miR-193a-3p, miR-200b-3p, miR-203a-3p e miR-652-3p) e il pannello costituito da più classi di biomarcatori (miR-126-3p, miR-103a-3p, miR-625-3p e mesotelina) qui proposti, sono in grado di fornire una diagnosi accurata e identificare i pazienti ad alto rischio [Micolucci *et al.*, 2016]

Le successive analisi computazionali e sperimentali hanno proposto una serie di nuovi miRNA e *targets* molecolari interessanti nella biologia del MM. I risultati sperimentali, seppur preliminari, indicano che l'interazione miR-214-EZH2 dovrebbe essere studiata a fondo per valutare il coinvolgimento di questi due "*molecular players*" strategici nell'insorgenza e nella progressione delle patologie causate dall'esposizione all'amianto. L'approccio utilizzato in questo lavoro potrebbe essere un metodo utile per sfruttare i dati esistenti in letteratura ed indirizzare i futuri studi sperimentali.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed I, Ahmed Tipu S, Ishtiaq S. Malignant mesothelioma. *Pakistan J Med Sci.* 2013; 29:1433-8.
- Ak G, Tomaszek SC, Kosari F, Metintas M, Jett JR, Metintas S, Yildirim H, Dunder E, Dong J, Aubry MC, Wigle DA, Thomas CF. MicroRNA and mRNA features of malignant pleural mesothelioma and benign asbestos-related pleural effusion. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:635748.
- Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 8;44(1):24-44. doi: 10.1093/nar/gkv1221. Review.
- Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.* 2015; 6:7321.
- Ambros V. A uniform system for microRNA annotation. *Rna.* 2003; 9:277-9.
- Ambros, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107, 823-826.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350-355.
- Andersen M, Grauslund M, Muhammad-Ali M, Ravn J, Sørensen JB, Andersen CB, Santoni-Rugiu E. Are differentially expressed microRNAs useful in the diagnostics of malignant pleural mesothelioma? *APMIS.* 2012; 120:767-9.
- Andersen M, Grauslund M, Ravn J, Sørensen JB, Andersen CB, Santoni-Rugiu E. Diagnostic Potential of miR-126, miR-143, miR-145, and miR-652 in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Mol Diagn.* 2014; 16:418-30.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl*

- Acad Sci USA. 2011; 108:5003-8.
- Ashby J, Flack K, Jimenez LA, Duan Y, Khatib A-K, Somlo G, Wang SE, Cui X, Zhong W. Distribution profiling of circulating microRNAs in serum. *Anal Chem*. 2014; 86:9343-9.
 - Bader, A.G., Brown, D., Stoudemire, J. and Lammers, P. (2011) Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene therapy*, 18, 1121-1126.
 - Balatti V, Maniero S, Ferracin M, Veronese A. MicroRNAs Dysregulation in Human Malignant Pleural Mesothelioma. 2011; 6:844-51.
 - Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15:293.
 - Bartel, B. (2005) MicroRNAs directing siRNA biogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12, 569.
 - Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116, 281-297.
 - Baumann F, Ambrosi JP, Carbone M. *The Lancet Oncology*. 2013; 14:576-578.
 - Baumann F, Buck BJ, Metcalf R V, McLaurin BT, Merkler DJ, Carbone M. The Presence of Asbestos in the Natural Environment is Likely Related to Mesothelioma in Young Individuals and Women from Southern Nevada. *J Thorac Oncol*. 2015; 10:731-7.
 - Benedetti S, Nuvoli B, Catalani S, Galati R. Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma. *Oncotarget*. 2015; 6:16848-65. doi: 10.18632/oncotarget.4253.
 - Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, Cohen L, Gibori H, Barabash N, Ashkenazi K, Goren E, Meiri E, Morgenstern S, Perelman M, Barshack I, Goren Y, et al. A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn*. 2010; 12:771-9.
 - Bianchi C, Bianchi T. Global mesothelioma epidemic: Trend and features. *Indian J Occup Environ Med*. 2014; 18:82-8.
 - Birnie KA, Yip YY, Ng DCH, Kirschner MB, Reid G, Prele CM, Musk AWB, Lee YG,

- Thompson PJ, Mutsaers SE, Badrian B. Loss of mir-223 and JNK Signalling Contribute to Elevated Stathmin in Malignant Pleural Mesothelioma. *Mol Cancer Res.* 2015; 13:1106-18.
- Bocchetta M, Elias S, De Marco MA, Rudzinski J, Zhang L, Carbone M. The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth. *Cancer Res.* 2008; 68:1022-9.
 - Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and GÃ–lich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, 10, 185-191.
 - Borchert, G.M., Lanier, W. and Davidson, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13, 1097-1101.
 - Busacca S, Germano S, De Cecco L, Rinaldi M, Comoglio F, Favero F, Murer B, Mutti L, Pierotti M, Gaudino G. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42:312-9.
 - Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10, 1957-1966.
 - Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zaneni N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:5166-71.
 - Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:2999-3004.
 - Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M. and Rai, K. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 15524-15529.
 - Carbone M, Baris YI, Bertino P, Brass B, Comertpay S, Dogan AU, Gaudino G, Jube S,

- Kanodia S, Partridge CR, Pass HI, Rivera ZS, Steele I, Tuncer M, Way S, Yang H, Miller A. Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:13618-13623.
- Carbone M, Pannuti A, Zhang L, Testa JR, Bocchetta M. A novel mechanism of late gene silencing drives SV40 transformation of human mesothelial cells. *Cancer Res*. 2008; 68:9488-96.
 - Carbone M, Pass HI, Rizzo P, Marinetti M, Di Muzio M, Mew DJ, Levine AS, Procopio A. Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene*. 1994; 9:1781-90.
 - Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, Procopio A, Mew DJ, Shridhar V, de Bartolomeis A, Esposito V, Giuliano MT, Steinberg SM, Levine AS, Giordano A, Pass HI. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med*. 1997; 3:908-12.
 - Carbone M, Rizzo P, Pass H. Simian virus 40: the link with human malignant mesothelioma is well established. *Anticancer Res*. 2000; 20:875-7
 - Carbone M. Simian virus 40 and human tumors: It is time to study mechanisms. *J Cell Biochem*. 1999; 76:189-93.
 - Cheng YY, Kirschner MB, Cheng NC, Gattani S, Klebe S, Edelman JJB, Valley MP, McCaughan BC, Jin HC, van Zandwijk N, Reid G. ZIC1 is silenced and has tumor suppressor function in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2013; 8:1317-28.
 - Cheng, H., Zhang, L., Cogdell, D.E., Zheng, H., Schetter, A.J., Nykter, M., Harris, C.C., Chen, K., Hamilton, S.R. and Zhang, W. (2011) Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PloS one*, 6, e17745.
 - Cho, W. (2010) MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42, 1273-1281.
 - Choi, W.-Y., Giraldez, A.J. and Schier, A.F. (2007) Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science*, 318, 271-274.

- Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, Yang CD, Hong HC, Wei TY, Tu SJ, Tsai TR, Ho SY, Jian TY, Wu HY, Chen PR, Lin NC, Huang HT, Yang TL, Pai CY, Tai CS, Chen WL, Huang CY, Liu CC, Weng SL, Liao KW, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. (2016) *Nucleic acids research*.
- Cioce M, Ganci F, Canu V, Sacconi A, Mori F, Canino C, Korita E, Casini B, Alessandrini G, Cambria A, Carosi MA, Blandino R, Panebianco V, et al. Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene*. 2013; 33:5319-31.
- Comertpay S, Pastorino S, Tanji M, Mezzapelle R, Strianese O, Napolitano A, Baumann F, Weigel T, Friedberg J, Sugarbaker P, Krausz T, Wang E, Powers A, et al. Evaluation of clonal origin of malignant mesothelioma. *J Transl Med*. 2014; 12:301.
- Condorelli, G., Latronico, M.V.G. and Cavarretta, E. (2014) microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *Journal of the American College of Cardiology*, 63, 2177-2187.
- Consensus report. Asbestos, asbestosis, and cancer: The Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health*. 1997; 23:311-316.
- Cooper H (2010). *Research synthesis and meta-analysis: a step-by-step approach*, 4th Edition. Thousand Oaks, CA: Sage.
- Crispi S, Cardillo I, Spugnini EP, Citro G, Menegozzo S, Baldi A. Biological agents involved in malignant mesothelioma: relevance as biomarkers or therapeutic targets. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010; 10:19-26.
- Crocetti E (2015). *Rassegne sistematiche, sintesi della ricerca e meta-analisi*. North Charleston, SC, USA: CreateSpace
- Cui A, Jin X-G, Zhai K, Tong Z-H, Shi H-Z. Diagnostic values of soluble mesothelin-related peptides for malignant pleural mesothelioma: updated meta-analysis. *BMJ Open*. 2014; 4:e004145.

- Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, Arlt D, Rath M, Sohn C, Benner A, Junkermann H, Schneeweiss A, Burwinkel B. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132:1602-12.
- Cullen MR, Barnett MJ, Balmes JR, Cartmel B, Redlich CA, Brodtkin CA, Barnhart S, Rosenstock L, Goodman GE, Hammar SP, Thornquist MD, Omenn GS. Predictors of lung cancer among asbestos-exposed men in the β -carotene and retinol efficacy trial. *Am. J. Epidemiol*. 2005; 161: 260-270.
- de Assis LVM, Locatelli J, Isoldi MC. The role of key genes and pathways involved in the tumorigenesis of Malignant Mesothelioma. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1845:232-47.
- Del Vescovo V, Grasso M, Barbareschi M, Denti MA. MicroRNAs as lung cancer biomarkers. *World J Clin Oncol*. 2014; 5:604-20.
- Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ*. 2011; 89:716-24, 724A-724C.
- Dickersin K, Min YI. NIH clinical trials and publication bias. *Online J Curr Clin Trials*. 1993; Doc No 50:[4967 words; 53 paragraphs].
- Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*. 2011; 6:e20769.
- Dwan K, Gamble C, Williamson PR, Kirkham JJ. Systematic review of the empirical evidence of study publication bias and outcome reporting bias - an updated review. *PLoS One*. 2013; 8(7):e66844.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R. and Sharp, P.A. (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods*, 4, 721-726.
- Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol*. 2014; 96:98-107.
- Echevarría-Vargas, I.M., Valiyeva, F. and Vivas-Mejía, P.E. (2014) Upregulation of miR-21

- in Cisplatin Resistant Ovarian Cancer via JNK-1/c-Jun Pathway. *PloS one*, 9, e97094.
- Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R. and Hickey, C.J. (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140, 652-665.
 - Elshazley M, Shibata E, Hisanaga N, Ichihara G, Ewis AA, Kamijima M, Ichihara S, Sakai K, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Pleural plaque profiles on the chest radiographs and CT scans of asbestos-exposed Japanese construction workers. *Ind Health*. 2011; 49:626-33.
 - Fan Y, Siklenka, K., Arora, SK., Ribeiro, P., Kimmins, S. and Xia, J. (2016). miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis *Nucl. Acids Res*.
 - Fassina A, Cappellesso R, Guzzardo V, Dalla Via L, Piccolo S, Ventura L, Fassan M. Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma. *Mod Pathol*. 2012; 25:86-99.
 - Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O. and Santoro, S. (2005) MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18081-18086.
 - Frank AL, Joshi TK. The global spread of asbestos. *Ann Glob Heal*. 2014; 80:257-62.
 - Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19, 92-105.
 - Garzon, R., Marcucci, G. and Croce, C.M. (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews Drug discovery*, 9, 775-789.
 - Gazdar AF, Carbone M. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma and its relationship to simian virus 40. *Clin Lung Cancer*. 2003; 5:177-81.
 - Gee G V, Koestler DC, Christensen BC, Sugarbaker DJ, Ugolini D, Ivaldi GP, Resnick MB, Houseman EA, Kelsey KT, Marsit CJ. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2010; 127:2859-69.

- Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, Murray F, Laytragoon-Lewin N. miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment. *Oncology*. 2011; 81:330-5.
- Gong, H., Liu, C.M., Liu, D.P. and Liang, C.C. (2005) The role of small RNAs in human diseases: potential troublemaker and therapeutic tools. *Medicinal research reviews*, 25, 361-381.
- Goparaju CM, Blasberg JD, Volinia S, Palatini J, Ivanov S, Donington JS, Croce C, Carbone M, Yang H, Pass HI. Onconase mediated NFK downregulation in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene*. 2011; 30:2767-77.
- Greillier L, Baas P, Welch JJ, Hasan B, Passiukov A. Biomarkers for malignant pleural mesothelioma: current status. *Mol Diagn Ther*. 2008; 12:375-90.
- Guay, C., Roggli, E., Nesca, V., Jacovetti, C.c. and Regazzi, R. (2011) Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational Research*, 157, 253-264.
- Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I. CDKN2A , NF2 , and JUN Are Dysregulated Among Other Genes by miRNAs in Malignant Mesothelioma — A miRNA Microarray Analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009; 48:615-23.
- Gumireddy, K., Young, D.D., Xiong, X., Hogenesch, J.B., Huang, Q. and Deiters, A. (2008) Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 7482-7484.
- Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, Heguy A, Dolgalev I, Carbone M, Seepo S, Meyerson M, Pass HI. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*. 2015; 75:264-9.
- Gwinn MR, DeVoney D, Jarabek AM, Sonawane B, Wheeler J, Weissman DN, Masten S, Thompson C. Meeting report: mode(s) of action of asbestos and related mineral fibers. *Environ Health Perspect*. 2011; 119:1806-10.
- Häusler SFM, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, Krockenberger M, Engel

- JB, Hönig A, Scheffler M, Dietl J, Wischhusen J. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer*. 2010; 103:693-700.
- Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003; 327:557-60.
 - Higgins JPT and Green S (2011). *Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions*. Version 5.1.0. The Cochrane Collaboration 2011.
 - Hsu, S.-D., Lin, F.-M., Wu, W.-Y., Liang, C., Huang, W.-C., Chan, W.-L., Tsai, W.-T., Chen, G.-Z., Lee, C.-J. and Chiu, C.-M. (2010) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic acids research*, 39, D163-169.
 - Hsu, S.-D., Tseng, Y.-T., Shrestha, S., Lin, Y.-L., Khaleel, A., Chou, C.-H., Chu, C.-F., Huang, H.-Y., Lin, C.-M. and Ho, S.-Y. (2014) miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic acids research*, 42, D78-D85.
 - Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, É., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834-838.
 - IARC. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012; 100:11-465.
 - Ivanov S V, Goparaju CM V, Lopez P, Zavadil J, Toren-Haritan G, Rosenwald S, Hoshen M, Chajut A, Cohen D, Pass HI. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem*. 2010; 285:22809-17.
 - Jacobsen, A., Silber, J., Harinath, G., Huse, J.T., Schultz, N. and Sander, C. (2013) Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types. *Nature structural & molecular biology*, 20, 1325–1332.
 - John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor

- miRNAs in human prostate cancer cells. *Radiat Res.* 2012; 178:105-17.
- Kao SC, Fulham M, Wong K, Cooper W, Brahmabhatt H, MacDiarmid J, Pattison S, Sagong JO, Huynh Y, Leslie F, Pavlakis N, Clarke S, Boyer M, et al. A Significant Metabolic and Radiological Response after a Novel Targeted MicroRNA-based Treatment Approach in Malignant Pleural Mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191:1467-9.
 - Kemp CD, Rao M, Xi S, Inchauste S, Mani H, Fetsch P, Filie A, Zhang M, Hong J a, Walker RL, Zhu YJ, Ripley RT, Mathur A, et al. Polycomb repressor complex-2 is a novel target for mesothelioma therapy. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:77-90.
 - Khodayari N, Mohammed KA, Goldberg EP, Nasreen N. EphrinA1 inhibits malignant mesothelioma tumor growth via let-7 microRNA-mediated repression of the RAS oncogene. *Cancer Gene Ther.* 2011; 18:806-16.
 - Kim, D.H., SÅtrom, P.I., SnÅve, O. and Rossi, J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 16230-16235.
 - Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6, 376-385.
 - Kirschner MB, Cheng YY, Armstrong NJ, Lin RCY, Kao SC, Linton A, Klebe S, McCaughan BC, van Zandwijk N, Reid G. MiR-Score: A novel 6-microRNA signature that predicts survival outcomes in patients with malignant pleural mesothelioma. *Mol Oncol.* 2015; 9:715-26.
 - Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, Kao SC, Creaney J, Edelman JJB, Armstrong NJ, Valley MP, Musk AW, Robinson BWS, McCaughan BC, Klebe S, Mutsaers SE, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2012; 7:1184-91.
 - Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SC-H, Valley MP, van Zandwijk N, Reid G. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet.* 2013; 4:94.

- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:D68-73.
- Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:4965-74.
- Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hiratsuka J, Otsuki T. Effect of asbestos exposure on differentiation of cytotoxic T lymphocytes in mixed lymphocyte reaction of human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol. American Thoracic Society;* 2013; 49:28-36.
- Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Functional properties of CD8(+) lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. *J Immunol Res.* 2014; 2014:670140.
- LaDou J. The asbestos cancer epidemic. *Environ Health Perspect.* 2004; 112:285-90.
- Lamberti M, Capasso R, Lombardi A, Di Domenico M, Fiorelli A, Feola A, Perna AF, Santini M, Caraglia M, Ingrosso D. Two Different Serum MiRNA Signatures Correlate with the Clinical Outcome and Histological Subtype in Pleural Malignant Mesothelioma Patients. *PLoS One.* 2015; 10:e0135331.
- Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:125094.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boultonwood, J. and Wainscoat, J.S. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141, 672-675.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23, 4051-4060.
- Li, H. and Yang, B.B. (2013) Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 870-879.
- Li, Z. and Rana, T.M. (2014) Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 622-638.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009; 6(7):e1000100.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *nature*, 433, 769-773.
- Lipsey M and Wilson G (2001). *Practical meta-analysis*. Thousand Oaks, CA: Sage.
- Liu B, Peng X-C, Zheng X-L, Wang J, Qin Y-W. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer*. 2009; 66:169-75.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435:834-8.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J. and Weinberg, R.A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449, 682-688.
- Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, et al. MicroRNA miR-34b/c enhances cellular radiosensitivity of malignant pleural mesothelioma cells. *Anticancer Res*. 2012; 32:4871-5.
- Maragkakis, M., Reczko, M., Simossis, V.A., Alexiou, P., Papadopoulos, G.L., Dalamagas,

- T., Giannopoulos, G., Goumas, G., Koukis, E. and Kourtis, K. (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic acids research*, gkp292.
- Marinaccio A, Binazzi A, Bonafede M, Corfiati M, Di Marzio D, Scarselli A, Verardo M, Mirabelli D, Gennaro V, Mensi C, Schallemborg G, Merler E, Negro C, et al. Malignant mesothelioma due to non-occupational asbestos exposure from the Italian national surveillance system (ReNaM): epidemiology and public health issues. *Occup Environ Med*. 2015; 72:648-55.
 - Matsumoto S, Nabeshima K, Hamasaki M, Shibuta T, Umemura T. Upregulation of microRNA-31 associates with a poor prognosis of malignant pleural mesothelioma with sarcomatoid component. *Med Oncol*. 2014; 31:303.
 - Matsuzaki H, Maeda M, Lee S, Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Yamamoto S, Hatayama T, Kojima Y, Tabata R, Kishimoto T, Hiratsuka J, Otsuki T. Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:492608.
 - Mensi C, Riboldi L, De Matteis S, Bertazzi PA, Consonni D. Impact of an asbestos cement factory on mesothelioma incidence: global assessment of effects of occupational, familial, and environmental exposure. *Environ Int*. 2015; 74:191-9.
 - Micolucci L, Akhtar MM, Olivieri F, Rippo MR, Procopio AD. Diagnostic value of microRNAs in asbestos exposure and malignant mesothelioma: systematic review and qualitative meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Jun 1. doi: 10.18632/oncotarget.9686. [Epub ahead of print] Review.
 - Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011; 2:282.
 - Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews

- and meta-analyses: the PRISMA statement. *J Clin Epidemiol*. 2009; 62(10):1006–12.
- Muraoka T, Soh J, Toyooka S, Aoe K, Fujimoto N, Hashida S, Maki Y, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, et al. The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2013; 82:485-90.
 - Nana-Sinkam, S.P. and Croce, C.M. (2013) Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 93, 98-104.
 - Napolitano A, Antoine DJ, Pellegrini L, Baumann F, Pagano IS, Pastorino S, Goparaju CM, Prokrym K, Canino C, Pass H, Carbone M, Yang H. HMGB1 and its hyper-acetylated isoform are sensitive and specific serum biomarkers to detect asbestos exposure and to identify mesothelioma patients. *Clin Cancer Res*. 2016.
 - Nasu M, Carbone M, Gaudino G, Ly BH, Bertino P, Shimizu D, Morris P, Pass HI, Yang H. Ranpirnase interferes with NF- κ B Pathway and MMP9 activity, inhibiting Malignant Mesothelioma cell invasiveness and xenograft growth. *Genes Cancer*. 2011; 2:576-584. doi: 10.1177/1947601911412375.
 - Nishikawa K, Takahashi K, Karjalainen A, Wen C-P, Furuya S, Hoshuyama T, Todoroki M, Kiyomoto Y, Wilson D, Higashi T, Ohtaki M, Pan G, Wagner G. Recent mortality from pleural mesothelioma, historical patterns of asbestos use, and adoption of bans: a global assessment. *Environ Health Perspect*. 2008; 116:1675-80.
 - Norbet C, Joseph A, Rossi SS, Bhalla S, Gutierrez FR. Asbestos-Related Lung Disease: A Pictorial Review. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2015; 44:371-82.
 - Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K, Kettunen E, Anttila S, Knuutila S. Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50:585-97.
 - Olivieri F, Rippo MR, Prattichizzo F, Babini L, Graciotti L, Recchioni R, Procopio AD. Toll like receptor signaling in “inflammaging”: microRNA as new players. *Immun Ageing*. 2013;

10:11.

- Opitz I. Management of malignant pleural mesothelioma-The European experience. *J Thorac Dis.* 2014; 6:S238-52.
- Pan, X., Wang, Z.-X. and Wang, R. (2010) MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer biology & therapy*, 10, 1224-1232.
- Panou V, Vyberg M, Weinreich UM, Meristoudis C, Falkmer UG, Røe OD. The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Rev.* 2015; 41:486-95.
- Park E-K, Takahashi K, Hoshuyama T, Cheng T-J, Delgermaa V, Le GV, Sorahan T. Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect.* 2011; 119:514-8.
- Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, Cohen D, Chajut A, Rosenwald S, Dan H, Benjamin S, Aharonov R. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2010; 70:1916-24.
- Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. Asbestos Exposure, Pleural Mesothelioma, and Serum Osteopontin Levels. *N Engl J Med.* 2005; 353:1564-73.
- Pillai, R.S. (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna*, 11, 1753-1761.
- Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S.W., Croce, C.M. and Dejean, A. (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 264-269.
- Porpodis K, Zarogoulidis P, Boutsikou E, Papaioannou A, Machairiotis N, Tsakiridis K, Katsikogiannis N, Zaric B, Perin B, Huang H, Kougioumtzi I, Spyrtos D, Zarogoulidis K. Malignant pleural mesothelioma: current and future perspectives. *J Thorac Dis.* 2013; 5:S397-406.

- Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res.* 2012; 5:492-7.
- Ramírez-Salazar EG, Salinas-Silva LC, Vázquez-Manríquez ME, Gayosso-Gómez LV, Negrete-García MC, Ramírez-Rodríguez SL, Chávez R, Zenteno E, Santillán P, Kelly-García J, Ortiz-Quintero B. Analysis of microRNA expression signatures in malignant pleural mesothelioma, pleural inflammation, and atypical mesothelial hyperplasia reveals common predictive tumorigenesis-related targets. *Exp Mol Pathol.* 2014; 97:375-85.
- Rao RA, Dhele N, Cheemadan S, Ketkar A, Jayandharan GR, Palakodeti D, Rampalli S. Ezh2 mediated H3K27me3 activity facilitates somatic transition during human pluripotent reprogramming. *Sci Rep.* 2015 Feb 4;5:8229. doi: 10.1038/srep08229
- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011; 80:193-208.
- Reid G, Pel ME, Kirschner MB, Cheng YY, Mugridge N, Weiss J, Williams M, Wright C, Edelman JJB, Vallely MP, McCaughan BC, Klebe S, Brahmabhatt H, et al. Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2013; 24:3128-35.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 403, 901-906.
- Rikke BA, Wynes MW, Rozeboom LM, Barón AE, Hirsch FR. Independent validation test of the vote-counting strategy used to rank biomarkers from published studies. *Biomark Med.* 2015; 9:751-61.
- Rippo MR, Moretti S, Vescovi S, Tomasetti M, Orecchia S, Amici G, Catalano A, Procopio A. FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells. *Oncogene.* 2004; 23:7753-60.

- Riquelme E, Suraokar MB, Rodriguez J, Mino B, Lin HY, Rice DC, Tsao A, Wistuba II. Frequent Coamplification and Cooperation between C-MYC and PVT1 Oncogenes Promote Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2014; 9:998-1007.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. and Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14, 1902-1910.
- Roth C, Stückerath I, Pantel K, Izbicki JR, Tachezy M, Schwarzenbach H. Low levels of cell-free circulating miR-361-3p and miR-625* as blood-based markers for discriminating malignant from benign lung tumors. *PLoS One.* 2012; 7:e38248.
- Russo F, Di Bella S, Bonnici V, Laganà A, Rainaldi G, Pellegrini M, Pulvirenti A, Giugno R, Ferro A. A knowledge base for the discovery of function, diagnostic potential and drug effects on cellular and extracellular miRNAs. *BMC Genomics.* 2014; 15 Suppl 3:S4.
- Russo F, Di Bella S, Nigita G, Macca V, Laganà A, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A. miRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One.* 2012; 7:e47786.
- Santamaria, X. and Taylor, H. (2014) MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertility and sterility*, 101, 1545-1551.
- Santarelli L, Strafella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, Pozzi V, Carbonari D, Bracci M, Pignotti E, Mazzanti P, Sabbatini A, Ranaldi R, et al. Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma. *PLoS One.* 2011; 6:e18232.
- Sen D. Working with asbestos and the possible health risks. *Occup Med (Lond).* 2015; 65:6-14.
- Shea BJ, Grimshaw JM, Wells GA, Boers M, Andersson N, Hamel C, Porter AC, Tugwell P, Moher D, Bouter LM. Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMC Med Res Methodol.* 2007; 7:10.
- Shen J, Xia W, Khotkaya YB, Huo L, Nakanishi K, Lim S-O, Du Y, Wang Y, Chang W-C, Chen C-H, Hsu JL, Wu Y, Lam YC, et al. EGFR modulates microRNA maturation in response

- to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*. 2013; 497:383-7.
- Stahel RA, Weder W, Lievens Y, Felip E. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010; 21:v126-8.
 - Stern JM, Simes RJ. Publication bias: evidence of delayed publication in a cohort study of clinical research projects. *BMJ*. 1997; 315(7109):640–5.
 - Suárez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009; 104:442-54.
 - Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M. and Nimura, Y. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*, 64, 3753-3756.
 - Takeda M, Kasai T, Enomoto Y, Takano M, Morita K, Kadota E, Iizuka N, Maruyama H, Nonomura A. Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by FISH analysis of paraffin-embedded tissues. *J Clin Pathol*. 2012; 65:77-82.
 - Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Yamamoto H, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S. Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep*. 2013; 29:2169-74.
 - Tavazoie, S.F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L. and Massagué, J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *nature*, 451, 147-152.
 - Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011; 43:1022-5.
 - Thum, T. (2012) MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO molecular medicine*, 4, 3-14.

- Tomasetti M, Nocchi L, Staffolani S, Manzella N, Amati M, Goodwin J, Kluckova K, Nguyen M, Strafella E, Bajzikova M, Peterka M, Lettlova S, Truksa J, et al. MicroRNA-126 Suppresses Mesothelioma Malignancy by Targeting IRS1 and Interfering with the Mitochondrial Function. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21:2109-25.
- Tomasetti M, Staffolani S, Nocchi L, Neuzil J, Strafella E, Manzella N, Mariotti L, Bracci M, Valentino M, Amati M, Santarelli L. Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients. *Clin Biochem*. 2012; 45:575-81.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39:7223-33.
- Ueno T, Toyooka S, Fukazawa T, Kubo T, Soh J, Asano H, Muraoka T, Tanaka N, Maki Y, Shien K, Furukawa M, Sakaguchi M, Yamamoto H, et al. Preclinical evaluation of microRNA-34b/c delivery for malignant pleural mesothelioma. *Acta Med Okayama*. 2014; 68:23-6.
- Valeria Sala, Lorenzo Moja, Ivan Moschetti, Sabrina Bidoli, Vanna Pistotti, Alessandro Liberati. "Revisioni sistematiche - Breve guida all'uso" - Centro Cochrane Italiano 2006
- Van Peer G, Lefever S, Anckaert J, Beckers A, Rihani A, Van Goethem A, Volders P-J, Zeka F, Ongenaert M, Mestdagh P, Vandesompele J. miRBase Tracker: keeping track of microRNA annotation changes. *Database (Oxford)*. 2014; 2014. pii: bau080.
- Van Rooij, E. and Kauppinen, S. (2014) Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Molecular Medicine*, 6, 851-864.
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931-1934.
- Vester, B. and Wengel, J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 43, 13233-13241.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell*

- Biol. 2011; 13:423-33.
- Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environ Health Perspect.* 2015; 123:399-411.
 - Walter L Devillé, Frank Buntinx, Lex M Bouter, Victor M Montori, Henrica CW de Vet, Danielle AWM van der Windt, and P Dick Bezemer. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. *BMC Med Res Methodol.* 2002; 2: 9.
 - Weber DG, Casjens S, Johnen G, Bryk O, Raiko I, Pesch B, Kollmeier J, Bauer TT, Brüning T. Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLoS One.* 2014; 9:e114483.
 - Weber DG, Johnen G, Bryk O, Jöckel K-H, Brüning T. Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma--a pilot study. *PLoS One.* 2012; 7:e30221.
 - Williams M, Kirschner MB, Cheng YY, Hanh J, Weiss J, Mugridge N, Wright CM, Linton A, Kao SC, Edelman JJB, Vallely MP, McCaughan BC, Cooper W, et al. miR-193a-3p is a potential tumor suppressor in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2015; 6:23480-95. doi: 10.18632/oncotarget.4346.
 - Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11, 228-234.
 - Xu Y, Zheng M, Merritt RE, Shrager JB, Wakelee H, Kratzke RA, Hoang CD. miR-1 induces growth arrest and apoptosis in malignant mesothelioma. *Chest.* 2013; 144:1632-43.
 - Xue Z, Wen J, Chu X, Xue X. A microRNA gene signature for identification of lung cancer. *Surg Oncol.* 2014; 23:126-31.
 - Yamamoto K, Seike M, Takeuchi S, Soeno C, Miyanaga A, Noro R, Minegishi Y, Kubota K, Gemma A. miR-379/411 cluster regulates IL-18 and contributes to drug resistance in malignant pleural mesothelioma. *Oncol Rep.* 2014; 32:2365-72.

- Yang H, Testa JR, Carbone M. Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol.* 2008; 9:147-57.
- Yates, L.A., Norbury, C.J. and Gilbert, R.J.C. (2013) The long and short of microRNA. *Cell*, 153, 516-519.
- Yusa T, Hiroshima K, Sakai F, Kishimoto T, Ohnishi K, Usami I, Morikawa T, Wu D, Itoi K, Okamoto K, Shinohara Y, Kohyama N, Morinaga K. Significant relationship between the extent of pleural plaques and pulmonary asbestos body concentration in lung cancer patients with occupational asbestos exposure. *Am J Ind Med.* 2015; 58:444-55.
- Zamora J, Abraira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol.* 2006; 6:31.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research*, 32, 4776-4785.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302, 1-12.
- Zhang, B., Pan, X., Wang, Q., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2006) Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry*, 30, 395-407.
- Zhao L, Liu W, Xiao J, Cao B. The role of exosomes and “exosomal shuttle microRNA” in tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Lett.* 2015; 356:339-46.
- Zhao, Y.-N., Chen, G.-S. and Hong, S.-J. (2014) Circulating MicroRNAs in gynecological malignancies: from detection to prediction. *Experimental Hematology & Oncology*, 3, 14.
- Zheng, H., Liu, J.-Y., Song, F.-J. and Chen, K.-X. (2013) Advances in circulating microRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer. *Cancer biology & medicine*, 10, 123.

8. MATERIALI SUPPLEMENTARI

Tabella supplementare 1. PRISMA check list [Micolucci *et al.*, 2016].



Supplementary Table 3: PRISMA 2009 Checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	Pag. 1
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	Pag. 2
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	Pag. 3-6
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	Pag. 6
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	/
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	Table 1
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	Table 1
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	Table 1, Pag. 29-30
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	Figure 9
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	Suppl. Methods
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	Table 2
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	/
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	Pag. 30-31, Suppl. Methods
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	Pag. 30-31, Suppl. Methods



Supplementary Table 3: PRISMA 2009 Checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	Suppl. Methods
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	/
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	Figure 9, Table 2
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	Table 2
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	/
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	Table 1, 3-5, Suppl. Tab 3
Synthesis of results	21	Present the main results of the review. If meta-analyses are done, include for each, confidence intervals and measures of consistency	Table 5, Pag. 6-18, Fig. 2
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	/
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	/
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	Pag. 18-28
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	Pag. 12-14
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	Pag. 28-29
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	Pag. 33

From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(6): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit: www.prisma-statement.org.

Tabella supplementare 2. AMSTAR checklist [Micolucci *et al.*, 2016].

Supplementary Table 4 – AMSTAR

<p>1. Was an ‘a priori’ design provided? The research question and inclusion criteria should be established before the conduct of the review.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>2. Was there duplicate study selection and data extraction? There should be at least two independent data extractors and a consensus procedure for disagreements should be in place.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>3. Was a comprehensive literature search performed? At least two electronic sources should be searched. The report must include years and databases used (e.g. Central, EMBASE, and MEDLINE). Key words and/or MESH terms must be stated and where feasible the search strategy should be provided. All searches should be supplemented by consulting current contents, reviews, textbooks, specialized registers, or experts in the particular field of study, and by reviewing the references in the studies found.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>4. Was the status of publication (i.e. grey literature) used as an inclusion criterion? The authors should state that they searched for reports regardless of their publication type. The authors should state whether or not they excluded any reports (from the systematic review), based on their publication status, language etc.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>5. Was a list of studies (included and excluded) provided? A list of included and excluded studies should be provided.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>6. Were the characteristics of the included studies provided? In an aggregated form such as a table, data from the original studies should be provided on the participants, interventions and outcomes. The ranges of characteristics in all the studies analyzed e.g. age, race, sex, relevant socioeconomic data, disease status, duration, severity, or other diseases should be reported.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>7. Was the scientific quality of the included studies assessed and documented? ‘A priori’ methods of assessment should be provided (e.g., for effectiveness studies if the author(s) chose to include only randomized, double-blind, placebo controlled studies, or allocation concealment as inclusion criteria); for other types of studies alternative items will be relevant.</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input checked="" type="checkbox"/> Not applicable</p>

<p>8. Was the scientific quality of the included studies used appropriately in formulating conclusions? The results of the methodological rigor and scientific quality should be considered in the analysis and the conclusions of the review, and explicitly stated in formulating recommendations.</p>	<p><input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input checked="" type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>9. Were the methods used to combine the findings of studies appropriate? For the pooled results, a test should be done to ensure the studies were combinable, to assess their homogeneity (i.e. Chi-squared test for homogeneity, I^2). If heterogeneity exists a random effects model should be used and/or the clinical appropriateness of combining should be taken into consideration (i.e. is it sensible to combine?).</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>10. Was the likelihood of publication bias assessed? An assessment of publication bias should include a combination of graphical aids (e.g., funnel plot, other available tests) and/or statistical tests (e.g., Egger regression test).</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>
<p>11. Was the conflict of interest stated? Potential sources of support should be clearly acknowledged in both the systematic review and the included studies.</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Can't answer <input type="checkbox"/> Not applicable</p>

Tabella supplementare 3: panoramica degli studi inclusi nell'analisi [Micolucci *et al.*, 2016].

Author, year of publication and reference	Characteristics of tumor samples	Tumor content	Characteristics of control samples	Study phase	qRT-PCR Platform	Microarray platform	Relevant findings	GEO Database and MIAME accession numbers
Guled M <i>et al.</i> 2009 [71]	Fresh tissue: MM (Total, 17: 10 epith, 1 sarc, 5 biph, 1 other)	30-90%	Fresh tissue: pericardium (Total, 1)	Screening	/	Agilent's miRNA microarray system (V.2) - Agilent Technologies	12 miRNAs exclusively expressed in MM samples, 9 miRNAs exclusively expressed in control samples. (Analysis of association with histopathological subtypes)	/
Busacca S <i>et al.</i> 2010 [82]	Cell lines: MPP-89 (spindle-shaped), REN (epithelial-like)	/	Cell lines: HMC-TERT (immortalized human mesothelial cells-telomerase reverse transcriptase) (Total, 1)	Screening and validation	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: U6, calibrator sample)	miRCURY locked nucleic acid [LNA] microarray kit, V.8 - Exiqon	65 dysregulated miRNAs and 10 miRNAs validated by qRT-PCR	A-MEXP-1260, E-MEXP-1699
	FFPE tissue: MM (Total, 24: 8 epith, 8 sarc, 8 biph)	>80%	/	/	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: U6, calibrator sample)	/	10 miRNAs (analysis of association with histopathological subtypes)	
Pass HI <i>et al.</i> 2010 [74]	Fresh-frozen tissue: MPM (Total, 142: 81 epith, 48 other)	129/142 good RNA quality	/	Training set, test set	/	Nexterion® Slide	Analysis of association with histopathological subtypes and prognosis.	/
	16 MPM samples (8 good prognosis, 8 poor prognosis)	/	/	Validation	qRT-PCR (Ref Gene: miR-181a, miR-let-7c, miR-193a-5p, miR-27b, miR-339-5p)	/	Elevated miR-29c* is associated with longer survival	
	Cell lines: HP1, HP3, H2373, H2452, H2591, H2595, H2596, H2461	/	Cell lines: NYU-590.2 (primary mesothelial cell culture), LP9 (TERT-immortalized mesothelial cell line), SV40-transformed mesothelial cell line Met-5A	/	qRT-PCR (Ref Gene: n.a.)	n.a.	MiR-29e* is downregulated in MM cell lines	
Ivanov SV <i>et al.</i> 2010 [84]	Cell lines: HP1, HP3, H2373, H2452, H2591, H2595, H2596, H2461	/	Cell lines: NYU-590.2 (primary mesothelial cell culture), LP9 (TERT-immortalized mesothelial cell line), SV40-transformed mesothelial cell line Met-5A	Analysis of chromosome deletion	Loop RT-PCR technology (Ref Gene: n.a.)	Nexterion® Slide	Loss of miR-31 has a pro-tumorigenic effect in MM	/
Benjamin H <i>et al.</i> 2010 [73]	FFPE tissue: MPM (Total, 47: 29 epith, 6 sarc, 6 biph, 6 other)	Used 33/47	FFPE tissues: carcinomas (Total, 210/259)	Biomarker discovery, training phases	qRT-PCR (Ref Gene: U6)	Nexterion® Slide	Search for miRNAs capable of differentiating MM from carcinoma	/
	FFPE tissue: MPM (Used n=14/47)	≥ 50%	FFPE tissues: carcinomas (Total, 49/259)	Validation phase	qRT-PCR (Ref Gene: U6)	/	MiR-193-3p, miR-200c, and miR-192 are useful to differentiate MPM from other	

							pleural malignancies (sensitivity 100%, specificity 94%)	
Gee GV <i>et al.</i> 2010 [72]	Fresh tissue: MPM (Total, 15 other)	/	Fresh tissues: lung adenocarcinoma (Total, 10)	Screening	/	Affimetrix gene chip miRNA microarrays (TGmirV1b520432f)	Mesothelial-specific downregulation of 7 miRNAs in MPM compared with lung adenocarcinoma	/
	Fresh tissue: MPM (Total, 100: 39 epith, 10 sarc, 19 biph, 32 other)	/	Fresh tissue: lung adenocarcinoma (Total, 32) and normal lung tissue (Total, 4)	Validation	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: RNU44, RNU48)	/	MPM can be distinguished from lung adenocarcinoma by downregulation of 7 miRs	
Balatti V <i>et al.</i> 2011 [81]	Cell lines: MSTO-211H, MPP-89, IST-MES2, NCI-H2052, NCI-H28 (Total, 5)	/	Cell lines: HMCs (primary mesothelial cell culture: 4N, 6N, 13N, 16N, 26N) (Total, 5)	Screening	/	Agilent Human microRNA microarray G4470A - Agilent Technologies	MiRNAs found to be dysregulated may be potential MPM targets	/
				Validation	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: U6)	/		
Santarelli L <i>et al.</i> 2011 [85]	Fresh tissue: MPM (Total, 10: 9 epith, 1 sarc)	/	Fresh tissue: adjacent non-cancerous tissues (Total, 5)	Screening	/	miRNA qRT-PCR array MAH-102A - SABiosciences (Ref Gene: /)	Several downregulated miRs in MPM specimens	
	Fresh tissue: MPM (Total, 27: 23 epith, 1 sarc, 3 biph)	/	FFPE tissue: adjacent non-cancerous tissues (Total, 27)	Larger-scale analysis	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: U6)	/	MiR-126 allows to discriminate cancer from non-malignant tissue	/
	Serum: MPM patients (Total, 44: 30 epith, 6 sarc, 8 biph) and healthy asbestos-exposed subjects (Total, 196)	/	Serum: healthy subjects (Total, 50)	Validation	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: U6)	/	MiR-126, in association with SMRPs, was proposed as a marker for early detection of MPM	
Kubo T <i>et al.</i> 2011 [101]	Cell lines: NCI-H28, NCI-H290, NCI-H2052, NCI-H2452, HP1, MSTO-211H (Total, 6)	/	Cell cultures: non-malignant mesothelial primary cultures (Total, 2)	Analysis of expression status and methylation	qRT-PCR (Ref Gene: Expression levels of 2 non-malignant mesothelial cells mixed)	/	MiR-34b/c expression was reduced in all methylated MPM cell lines and tumors	/
	Fresh tissue: MPM (Total, 47: 32 epith, 4 sarc, 10 biph, 1 lymph) only 10 samples used for miRNA expression analysis	/	Fresh frozen tissue: non-neoplastic pleura from lung cancer patients (Total, 10)		qRT-PCR (Ref Gene: Expression levels of two non-malignant mesothelial cells mixed)	/		
Fassina A <i>et al.</i> 2011 [92]	FFPE tissue: 74 MPM and 35 peritoneal MM. Total, 109: 58 epith (35 pleural, 23 peritoneal), 25 sarc (18 p1+7 p), 26 biph (21 p1+5 p)	/	/	Analysis of miR-205	<i>In Situ</i> Hybridization and NCodeTM miRNA qRT-PCR - Invitrogen (Ref Gene: RNU6B)	/	MiR-205 downregulation correlated with both the mesenchymal phenotype and a more aggressive behavior	/
	Cell lines: H2452, MSTO-211H (Total, 2)	/	Cell line: SV40-transformed mesothelial cell line Met-5A (Total, 1)		NCodeTM miRNA qRT-PCR - Invitrogen (Ref Gene: RNU6B)	/		

Nymark P et al. 2011 [70]	13 lung tumors from asbestos-exposed patients (large cell lung cancer, adeno-squamous cell carcinoma, small cell lung cancer, adenocarcinoma)	/	8 control patients (hamartoma, lymph node, lymphoid hyperplasia, tuberculoma, inflammatory pseudotumor, lung abscess) and 13 lung tumors from non-exposed patients (large cell lung cancer, adeno-squamous cell carcinoma, small cell lung cancer, adenocarcinoma)	/	/	Agilent Human miRNA v2 G2565CA - Agilent Technologies	13 novel asbestos-related miRNAs were identified	Accession number: GSE25508
Kemp CD et al. 2012 [93]	Cell lines: H28, H2052, H2452, NCI-SB-MES1-4 (MPM primary culture) (Total, 4)	/	Cell lines: LP3, LP9, NCI-SB-NMES1-2 (isolated from normal pleura) (Total, 3)	Association of EZH2 with miRNA expression	qRT-PCR - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU44)	/	EZH2 overexpression coincided with decreased miR-101 and miR-26a levels	/
	MPM tissue (n.a.)	/	Normal pleura tissue (n.a.)		(n.a.)	/		
Weber DG et al. 2012 [88]	Cellular fraction of peripheral blood: MM patients (Total, 23: 12 epith, 1 sarc, 7 biph, 3 other)	/	Cellular fraction of peripheral blood: asbestos-exposed subjects (Total, 17) and healthy subjects (Total, 25)	Screening and validation	TaqMan MicroRNA assays - Applied Biosystem (Ref Gene: miR-125a)	MirVana miRNA Probe Set v2.0 - Ambion	34 down-regulated and 15 up-regulated miRNAs. A cut-off for miR-103 was determined to discriminate MM patients from asbestos-exposed and healthy subjects	Accession number: GSE29707 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Tomasetti M et al. 2012 [86]	Serum: MM patients (Total, 45 other)	/	Serum: NSCLC patients (Total, 20) and healthy subjects (Total, 56)	Clinical validation	qRT-PCR - Applied Biosystems (Ref Gene: U6 RNA, cel-miR-39)	/	MiR-126 differentiated MM patients from healthy controls and NSCLC from MM, but not NSCLC from control subjects	/
Kirschner MB et al. 2012 [90]	Plasma: MM patients (Total, 5: 3 epith, 2 sarc)	/	Plasma: healthy subjects (Total, 3)	Screening	/	Human Sx15K miRNA Microarray Kit V3 - Agilent Technologies	15 miRNAs showed significantly higher plasma levels in patients vs. controls; only 3 miRNAs had previously been reported	/
	Plasma: MM patients (Total, 15: 9 epith, 2 sarc, 3 biph, 1 other)	Free hemoglobin level < 0.25	Plasma: healthy subjects (Total, 14)	Test	microRNA-specific TaqMan Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: miR-16)	/	MiR-625-3p, miR-29e*, and miR-92a levels were higher in MM patients vs. controls	
	Serum: MM patients (Total, 30: 29 epith, 1 other)	Free hemoglobin level < 0.25	Serum: asbestosis (Total, 10)	Validation	microRNA-specific TaqMan Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: miR-16)	OpenArray platform - Applied Biosystems	MiR-625-3p levels discriminated MM patients from asbestosis patients (accuracy 79.3%, sensitivity 70%, specificity 90%)	
	FFPE tissue-LCM: MM (Total, 18: 15 epith, 3 biph)	LCM	FFPE tissue: pericardium (Total, 7)	Tissue analysis	microRNA-specific TaqMan Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU6B)	/	Only high miR-625-3p level was confirmed	
Andersen M et al. 2012 [83]	FFPE tissue: MPM (Total, 13 epith)	/	FFPE tissue: diagnostic biopsies (Total, 12) and NNP treat (Total, 13)	Analysis of 4 previously reported miRNAs	TaqMan MicroRNA Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU6B)	/	Significant downregulation of miR-17-5p and upregulation of miR-221 (opposite of expression pattern previously reported in cell lines)	/

Xu Y et al. 2013 [75]	Fresh frozen tissue: (Total, 25: 18 epith, 3 sarc, 4 biph)	> 80%	Fresh tissue: normal pleura (Total, 6)	Screening and validation	ViiA™ 7 RT-PCR System - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU44)	Human miRNA BeadChip v2 - Illumina	MiR-1 is downregulated in MM and its forced expression induces growth arrest and apoptosis	Accession number: GSE40345 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Red G et al. 2013 [94]	FFPE tissue: MPM (Total, 60: 46 epith, 16 biph)	/	FFPE tissue: normal pleura (Total, 23)	Analysis and validation of 4 miRNAs	miRNA-specific TaqMan assays - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU6B)	/	MiR-15/16 family is downregulated and has tumor suppressor function in MPM	/
	Cell lines: H2052, H2452, H28, H226, MSTO-211H (Total, 5) and cell cultures: MM05 (primary mesothelioma cell line)	/	Cell line: MeT-5A (immortalized mesothelial cell line) (Total, 1)					
Cioce M et al. 2013 [76]	FFPE tissue: MPM (Total, 29: 25 epith, 3 biph, 1 deam)	/	FFPE tissue: mesothelial cysts (Total, 12)	Screening	/	Human miRNA microarray V2 Rel.16 - Agilent Technologies	MiR-145 downregulation is a characteristic trait of malignant vs. benign mesothelial tissue	/
	Fresh tissue: MPM (Total, 6), fresh frozen tissue: MPM (Total, 36)	/	Fresh-frozen tissue: normal pleura (Total, 14) and matched peritonea (Total, 36)	Double step validation	TaqMan MiRNA Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU6B, RNU49)	/		
	Cell lines: H2052, H2452, H28, H226, MSTO-211H (Total, 5) and cell cultures: MM05 (primary mesothelioma cell line)	/	Cell line (mesothelial cell line, Total, 1)					
Chong YY et al. 2013 [95]	Cell lines: H2052, H2452, H28, H226, MSTO, REN (Total, 6) and cell cultures: MM05 (primary mesothelioma cell line)	/	Cell cultures: HMCs (normal human mesothelial cells) (Total, 1) and cell line MeT-5A (immortalized mesothelial cell line) (Total, 1)	Screening and validation	miRNA-specific TaqMan assays - Life Technologies (Ref Gene: RNU6B)	Ncode Human miRNA Microarray V3 system - Life Technologies	4 miRNAs were higher in MPM cells with reduced ZIC1 expression	/
	FFPE tissue-LCM: MPM (Total, 27/31: 27 epith, 4 biph)	LCM	/	Analysis of expression status and survival	miRNA-specific TaqMan assays - Life Technologies (Ref Gene: RNU6B)	/	Higher expression in tumors correlates with shorter survival	
Andersen M et al. 2014 [77]	FFPE tissue: preoperative MPM diagnostic biopsy and post-treatment samples (Total, 5+5 epith)	40-85%	FFPE tissues: NNP post treatment (Total, 5)	Screening	miRCURY LNA Universal RT miRNA Ready-to-Use PCR, Human panels I + II version 2.0 - Exiqon A/S (Ref Gene: SNORD49A)	/	23 miRNAs are differentially expressed between groups; chemotherapy reduces the differential expression	Accession number: GSE54394 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
	FFPE tissues: post-treatment MPM samples (Total, 40: 18 epith, 22 biph)	>50%	FFPE tissues: NNP treat (Total, 14) and PTHX (Total, 5)	Double step validation	TaqMan miRNA Assays - Life Technologies (Ref Gene: SNORD49A)	/	A 4-miRNA (miR-126, miR-143, miR-145, miR-652, downregulated) diagnostic classifier distinguishes MPM from NNP with high overall	
	FFPE tissues: MPM preoperative diagnostic	>40%						

	biopsies (Total, 12: 9 epith, 3 biph)						accuracy	
Riqueleme E et al. 2014 [96]	Cell lines: H28, H2452, HP10, HP7, HCT4012, H2052, MSTO-211H (Total, 7)	/	/	MIRNA analysis of in 8q24 region	TaqMan MicroRNA Assays - Applied Biosystems (Ref Gene: U6)	/	Different expression level of miRNAs spanning the PV77 region in MPM cell lines	/
Ramirez-Salazar EG et al. 2014 [78]	FFPE macro-dissected MPM tissues: (Total, 5 epith)	> 80%	FFPE tissues: PP (Total, 4), HP (Total, 5), Ctrl group (adjacent non-cancerous - non-inflammatory tissue, Total, 5).	Profiling	/	TaqMan Array Human MicroRNA Panel v2.0 (A+B) - Applied Biosystems	Bioinformatic and network analysis of deregulated miRNAs (19 in MM vs. Ctrl group)	/
Matsumoto S et al. 2014 [97]	FFPE macro-dissected MPM tissues: (Total, 25: 16 epith, 5 sarc, 4 biph)	> 90%	FFPE tissue: RMPs (Total, 20)	Analysis of miR-31	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG and TaqMan miRNA-specific Primers - Applied Biosystems (Ref Gene: RNU6B)	/	MiR-31 is down-regulated in MM vs. RMP, but miR-31 upregulation in MM patients with sarcomatoid component is significantly associated with a worse prognosis	/
Weber DG et al. 2014 [89]	Cellular fraction of peripheral blood: MM patients (Total, 43: 28 epith, 5 sarc, 6 biph, 4 other)	/	Cellular fraction of periferal blood: asbestos-exposed subjects (Total, 52)	Analysis of miR-103a-3p	TaqMan miRNA Assays - Life Technologies (Ref Gene: miR-125a)	/	Combination of miR-103a-3p and mesothelin showed 95% sensitivity and 81% specificity in discriminating epith and biph MM from controls	/
Kirschner MB et al. 2015 [79]	FFPE tissues: 8 long-term and 8 short-term MPM survivors (Total, 16 epith)	LCM	8 epith short-term vs. 8 epith long-term survivors	Discovery set	/	Agilent Technologies Human 8x15 k microRNA Array Kit V3 - Agilent Technologies	A 6-miRNA signature (miR-score) is associated with longer survival in MM patients undergoing EPP and palliative surgery	Accession number: GSE59180 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
	FFPE tissues: MPM EPP including patients who received chemotherapy (13/48) and those who died <8 weeks after surgery (2/48) (Total, 48: 31 epith, 17 biph)	LCM	Median expression of miRNAs observed across all samples	Training set	Stem-loop primers and hydrolysis probes - Life Technologies (Ref Gene: RNU6B)	/		
	FFPE tissue: MPM patients undergoing (Total, 43: 25 epith, 5 sarc, 13 biph)	LCM		Validation set				
Ak G et al. 2015 [80]	Fresh-frozen tissue: MPM patients (Total, 18: 10 epith, 4 sarc, 4 biph)	> 50%	Fresh-frozen tissue: from BAPE patients (Total, 6)	Profiling	/	TaqMan Human MicroRNA Array Card A - Applied Biosystems	11 significantly up-regulated miRNAs in MPM compared with BAPE	/
Birnie KA et al. 2015 [98]	Cell lines: NO36, JU77, LO68 (MPM cell lines) (Total, 3)	/	Primary human mesothelial cells and Met-5A	Profiling and Validation of miR-223	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - Life Technologies (Ref Gene: RNU48, RNU44, SNOR202)	Taqman Open Array - Life Technologies	MiR-223 showed reduced levels in MPM specimens. MiR-223 targets STMN1, a microtubule regulator associated with MPM.	/

	Cell lines: NO36, JU77, LO68, CRL2081, CRL5820 (MPM cell lines) (Total, 5) and mouse MPM cell lines (Total, 3)	/	Human and mouse mesothelial cells	Validation of miR-223	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - Life Technologies (Ref Gene: RNU48, RNU44, SNOR203)	/	
	FFPE tissues: MPM (Total, 17; histology n.a.)	/	FFPE tissues: pericardial mesothelium samples (Total, 6)	Validation of miR-223	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - Life Technologies (Ref Gene: RNU6B)	/	
	Cells from pleural effusion of MPM patients (histology n.a.)	/	Cells from pleural effusion of benign diseases	Profiling and Validation of miR-223	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - Life Technologies (Ref Gene: RNU6B)	Taqman Open Array - Life Technologies	
Williams M et al. 2015 [99]	FFPE tissues: 59 EEP and 61 P/D (Total, 120: 72 epith, 9 sarc, 39 biph)	/	FFPE tissue: normal mesothelium (Total, 23)		See Reid G et al. 2013 and Kirschner MB et al. 2014	/	Levels of mature miR-193a-3p and miR-192 are reduced in MPM
	Cell lines H28, H2052, H2452, H226, MSTO-211H, MM05, VMC23, F31, SPC111 and SPC212 (Total, 10)	/	MeT-5A, non-small cell lung cancer line A549 and LP9 (Total, 3)		TaqMan low-density array cards - Life Technologies (Ref Gene: RNU48)	/	
Lamberti M et al. 2015 [91]	Serum: MM patients (Total, 14: 7 epith, 3 sarc, 4 biph)	/	Serum: non-cancer-related pleural effusion patients (Total, 10)	Profiling and Validation	TaqMan microRNA Assays - Applied biosystems (Ref Gene: miR-16)	Megaplex Microfluidic Card Pool A - Applied Biosystems	Two distinctive miRNA signatures predicting histotype and survival in patients

Note: characteristics of samples, miRNA detection methods, relevant findings, submission of array data to a public repository (GEO or ArrayExpress) are reported. Studies are listed by year of publication. The following abbreviations describe sample characteristics as reported in relevant papers. **BAPE:** benign asbestos-related pleural effusion, **biph:** epithelioid-sarcomatoid, **Ctrl group:** adjacent non-cancerous – non-inflammatory tissue, **DB:** preoperative diagnostic biopsies, **EPP:** extrapleural pneumonectomy, **epith:** epithelioid, **HP:** atypical mesothelial hyperplasia, **lym:** lymphohistiocytic, non-epithelioid or sarcomatoid and mixed, **n.a.:** not available, **NNP:** patient-matched non-neoplastic pleura, **PB:** peripheral blood, **P/D:** pleurectomy ± decortication, **PP:** pachypleuritis/chronic inflammation, **PTHX:** non-neoplastic reactive mesothelial proliferation due to pneumothorax, **RMPs:** reactive mesothelial proliferations, **sarc:** sarcomatoid, **treat:** three series of cisplatin and vinorelbine treatments, **WT:** non-transfected MM cell line.

Note: Adattato da [Micolucci et al., 2016].

Tabella Supplementare 4. MiRNA deregolati nel MM analizzati tramite il conteggio dei voti tradizionale.

Number of common comparison categories	miRNAs	MM vs normal tissues / benign proliferations	MM vs other cancers or different histotypes	MM blood samples vs blood healthy samples	MM cells vs Normal cells
MiRNAs deregulated in all comparison categories	miR-17-5p	↓ [83]	→ [79], [82]	↓ [88]	↑ [81], [82]
	miR-20a / miR-20a-5p	↑ [80]	→ [79]	↓ [88]	↑ [81], [82]
	miR-21 / miR-21-5p	↑ [77]	→ [79], [82]	↓ [88]	→ [82]
	miR-29c* / miR-29c-5p	↓ [90]	→ [74], [79]	↑ [90]	↓ [74]
	miR-30c	↓ [85]	→ [82]	↓ [88]	↑ [82]
	miR-92 / miR-92a / miR-92a-3p	→ [90] ↑ [80]	→ [79]	↑ [90] ↓ [88]	↑ [81]
MiRNAs deregulated in three comparison categories	miR-101/miR-101-3p	↓ [78], [93]		↓ [88] ↑ [91]	↓ [93]
	miR-106b / miR-106b-5p		→ [79]	↓ [88]	↑ [81]
	miR-126 / miR-126-3p	↓ [77], [85]	→ [79]	↓ [85], [86]	
	miR-143	↓ [77]	→ [82]		↑ [82]
	miR-15b / miR-15b-5p	↓ [94]		↓ [88]	↓ [94]
	miR-16 / miR-16-5p	↓ [90], [94]		↓ [88]	↓ [94]
	miR-192	↓ [99]	↓ [73]		↓ [99]
	miR-193a-3p	↑ [77] → [77] ↓ [99]	↑ [73]		↓ [99]
	miR-195 / miR-195-5p	↓ [94]		↓ [88]	↓ [94]
	miR-196b / miR-196b-5p	↓ [90] ↑ [78]		↑ [90]	↑ [81]
	miR-205	→ [92]	↓ [72]		↓ [92]
	miR-221 / miR-221-3p	↑ [83]	→ [74], [79], [82]		↓ [82]
	miR-223	↓ [98]		↓ [91]	↓ [98]
	miR-29a		→ [82]	↑ [91]	→ [82]
	miR-30b	↓ [77]		↓ [88]	→ [82] ↑ [95]
	miR-31 / miR-31-5p	↓ [97]	→ [82], [79]		↓ [82], [84]
	miR-625-3p	↑ [90]	→ [79]	↑ [90]	
	MiRNAs deregulated in two comparison categories	let-7a	↑ [80]		↓ [88]
let-7c		↓ [77]		↓ [88]	
let-7d		↑ [80]		↓ [88]	
let-7f / let-7f-5p		↑ [77]		↓ [88]	
miR-106a / miR-106a-5p			→ [79], [82]		↑ [81], [82]
miR-141		↓ [76] → [99]	↓ [72], [73]		
miR-144 / miR-144-3p		↓ [75]		↓ [88]	
miR-145 / miR-145-5p		↓ [76], [77], [78]			↓ [76]
miR-152		↑ [80]	↑ [73]		
miR-15a-5p		↓ [94]			↓ [94]
miR-182				↓ [88]	↑ [81]
miR-18a / miR-18a-5p		↑ [78]			↑ [81], [82]
miR-1914-3p		↓ [90]		↑ [90]	
miR-193b		↓ [85] ↑ [80] → [77]	↑ [73]		
miR-194			↓ [73]		↓ [99]
miR-19b / miR-19b-3p			→ [79]		↑ [81]
miR-200a		↑ [75]	↓ [73]		
miR-200b		↑ [75] ↓ [99]	↓ [72], [73]		
miR-200c		↓ [76] → [99]	↓ [72], [73]		
miR-203		↓ [71], [99]	↓ [72]		
miR-20b				↓ [88]	↑ [81]
miR-210 / miR-210-3p		↑ [76], [77]	→ [74], [79]		
miR-214				↑ [88]	↓ [81]
miR-215				↓ [88]	↓ [99]
miR-22				↑ [90]	↓ [81]
miR-222 / miR-222-3p			→ [79], [82]		↓ [82]
miR-23a / miR-23a-3p			→ [79]		↑ [95]
miR-24 / miR-24a-3p			→ [79]	↓ [88]	
miR-25				↓ [88] ↑ [91]	↑ [81]
miR-26a / miR-26a-5p		↓ [93]			↓ [93]
miR-26a-2-3p		↓ [90]		↑ [90]	
miR-27a / miR-27a-3p			→ [79]		↑ [95]
miR-302b / miR-302b-3p		↑ [78]		↑ [88]	
miR-30e-5p			→ [79], [82]		↑ [82]
miR-323 / miR-323-3p		↑ [75]		↑ [88]	
miR-328		↓ [77]			↓ [81]
miR-335 / miR-335-3p		↓ [85]		↑ [90], [91]	
miR-34a / miR-34a-5p		↓ [101]			↓ [101]
miR-34b		↓ [101] ↑ [75]			↓ [101]
miR-34c		↓ [101]			↓ [101]

	miR-429	↓ [71]	↓ [72],[73]		
	miR-433			↑ [91]	
	miR-451 / miR-451a	↓ [77]	⇒ [74]		
	miR-483-5p	↓ [75]		↑ [90]	
	miR-548c-3p	↑ [76]		↑ [90]	
	miR-99a	↓ [77]	⇒ [74]		
MIRNAs deregulated in only one comparison category	HS_130	↓ [75]			
	HS_29	↓ [75]			
	HS_35	↓ [75]			
	let-7 family				↑ [82]
	let-7b			↓ [88]	
	let-7b*	↑ [71]			
	let-7e			↓ [88]	
	let-7e*	↓ [71]			
	let-7f			↓ [88]	
	let-7g / let-7g-5p	↓ [77] ↑ [78]			
	miR-1	↓ [75]			
	miR-103 / miR-103a-3p			↓ [88],[89]	
	miR-107			↓ [88]	
	miR-10b			↑ [88]	
	miR-1204				⇒ [96]
	miR-1205				⇒ [96]
	miR-1207-5p				⇒ [96]
	miR-1208				⇒ [96]
	miR-1228*	↑ [71],[75]			
	miR-1238	↓ [75]			
	miR-125a-5p	↑ [80]			
	miR-1273	↓ [75]			
	miR-1280	↑ [76]			
	miR-1287	↓ [76]			
	miR-1306	↑ [76]			
	miR-130a	↓ [85]			
	miR-130b*	↑ [75]			
	miR-133b	↓ [75]			
	miR-135b / miR-135b-5p	↑ [75],[78]			
	miR-142-5p			↓ [88]	
	miR-144* / miR-144-5p	↓ [71],[77]	⇒ [79]		
	miR-1469				↓ [81]
	miR-146b			↓ [88]	
	miR-148a				
	miR-149	↑ [75]			
	miR-150		⇒ [74]		
	miR-155	↑ [80]			
	miR-155*	↑ [75]			
	miR-17-3p				↑ [82]
	miR-181a-5p	↓ [78]			
	miR-181b	↑ [76]			
	miR-181c	↓ [85]			
	miR-181d	↑ [76]			
	miR-1826		⇒ [79]		
	miR-186-3p			↑ [90]	
	miR-18a-3p	↓ [78]			
	miR-191			↓ [91]	
	miR-193a-5p	↑ [76]			
	miR-195* / miR-195-3p	↑ [71]			
	miR-199b-5p		⇒ [74]		
	miR-200a*		↓ [72]		
	miR-204	↓ [76]			
	miR-206	↑ [76] ↓ [75]			
	miR-21*	↑ [75]			
	miR-212 / miR-212-3p	↓ [78],[85] ↑ [75]			
	miR-221*	↑ [75]			
	miR-22-5p	↑ [77]			
	miR-23b			↓ [88]	
	miR-26b			↓ [88] ↑ [91]	
	miR-296-5p	↑ [77]			
	miR-298		⇒ [79]		
	miR-29b			↓ [88]	
	miR-29c			↓ [88]	
	miR-302aAS			↑ [88]	
	miR-302bAS			↑ [88]	
	miR-302d			↑ [88]	
	miR-30a				↑ [95]
	miR-30b*	↑ [71]			
	miR-30d			↓ [88]	
	miR-30c-3p	↑ [78]			

miR-32	↓	[85]			
miR-32*	↑	[71]			
miR-320	↑	[80]			
miR-329			↑	[88]	
miR-33					↑ [81]
miR-338-3p	↓	[77]			
miR-339					↑ [81]
miR-340*	↓	[71]			
miR-345	↑	[71]			
miR-34a* / miR-34a-3p	↓	[71]			
	↑	[78]			
miR-363			↓	[88]	
miR-363*	↓	[75]			
miR-365a	↑	[77]			
miR-371			↑	[88]	
miR-377			↑	[88]	
miR-378	↑	[77]			
miR-379*	↑	[75]			
miR-409-3p	↑	[75]			
miR-409-5p	↑	[75]			
miR-424*	↑	[76]			
miR-425	↓	[77]			
miR-432	↑	[76]			
miR-450b-5p	↑	[75]			
miR-454-5p			↑	[90]	
miR-483-3p	↑	[71]			
miR-484	↑	[80]			
miR-486-3p	↓	[75]			
miR-486-5p	↓	[76], [77]			
miR-497					↓ [81]
miR-500					↓ [81]
miR-501-3p	↓	[78]			
miR-502					↓ [81]
miR-507			↑	[88]	
miR-508-3p	↑	[75]			
miR-509-3p	↑	[75]			
miR-512-5p	↓	[75]			
miR-514	↑	[75]			
miR-516			↑	[91]	
miR-517b-3p	↓	[78]			
miR-518e	↓	[75]			
miR-520a-3p			↑	[90]	
miR-520g			↑	[88]	
miR-525AS			↑	[88]	
miR-539			↑	[88]	
miR-544			↑	[88]	
miR-549					↓ [81]
miR-551b	↓	[75]			
miR-569	↓	[75]			
miR-575			↑	[90]	
miR-582-5p	↓	[71]			
miR-584	↑	[71]			
miR-591	↓	[75]			
miR-595	↑	[71], [76]			
miR-596	↓	[78]			
miR-615-3p	↑	[71]			
miR-622	↑	[78]			
miR-627	↓	[78]			
miR-629*	↑	[75]			
miR-652	↓	[77]			
miR-662			⇒	[79]	
miR-671-3p	↓	[78]			
miR-7 / miR-7-5p					↑ [81]
miR-7-1* / miR-7-1-3p	↓	[71]			
miR-744	↑	[80]			
miR-766-3p	↓	[78]			
miR-767-3p			↑	[90]	
miR-885-3p	↑	[71]			
miR-9	↓	[71]			
miR-92a-1					↑ [81]
miR-92a-2					↑ [81]
miR-934	↑	[71]			
miR-93-5p			⇒	[79]	
miR-938	↓	[75]			
miR-96	↑	[76]			

MiRNAs deregulated in only one comparison category

Note: deregulated miRs extracted from relevant papers and classified based on four comparison categories: a) MM tissue vs. normal or non-cancer tissue; b) MM tissue vs. other cancer tissues; c) MM blood samples vs. normal blood samples; and d) MM cell lines vs. normal cell lines. MiRs are reported as being up-regulated, down-regulated or deregulated based on the relevant studies. ↑: up-regulated, ↓: down-regulated, →: deregulated miRs. For the latter clear expression information is not provided in the corresponding article, or they have been found to be deregulated in different MM histotypes. Numbers to the right of each arrow are the references numbered according to the reference list. The new nomenclature is reported where the old miR name could be ambiguous [Micolucci et al., 2016].

