



# Identificazione e confronto di microRNA in campioni di plasma e feci mediante tecnologia next-generation sequencing per lo studio del cancro coloretale

**Alessio Naccarati**

*Human Genetics Foundation (HuGeF) Torino*

*WORKSHOP PRECONGRESSUALE GISCoR  
Genetica e neoplasie del colon-retto:  
il ruolo delle analisi molecolari all'interno del programma di screening  
Firenze, 10 Novembre 2016*

# Outline

## Scopo dello studio

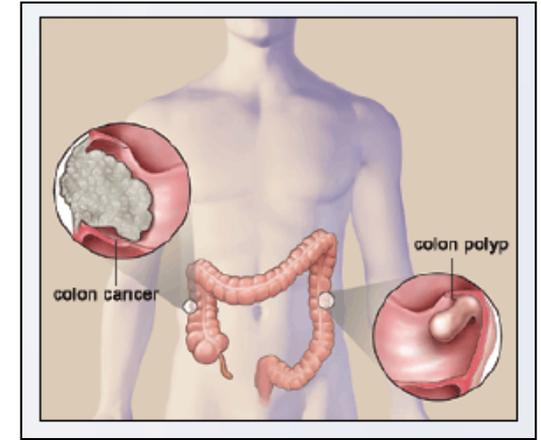
- ❑ Identificare e confrontare **profili di microRNA** (miRNA) in campioni di **plasma/feci** in relazione al cancro del colon-retto (CRC)
- ❑ Studiare il ruolo della dieta e dello stile di vita nell'alterazione dei microRNA nella cascata di eventi che portano al cancro

## La strategia

- A. Implementazione della metodologia e della pipeline di analisi per lo studio dei miRNA con tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) in campioni di feci e plasma.
- B. Valutazione dei profili di espressione di miRNA in plasma e feci in soggetti sani e pazienti con CRC o lesioni precancerose.
- C. Studio del ruolo della dieta e di altri fattori rilevanti, raccolti mediante questionari validati, nel modulare i livelli di espressione dei miRNA.
- + { D. Analisi della composizione del microbioma intestinale nello stesso gruppo di soggetti mediante NGS (collaborazione con il Dr. Nicola Segata, Univ. di Trento).
- + { E. Implementazione dello studio dell'espressione dei miRNA in tessuti surrogati e del microbioma in un contesto di screening del CRC.

# Cancro del colon-retto (CRC): ricerca di nuovi biomarcatori molecolari

- Il CRC è il 3° tumore più comune nel mondo e la 2° causa di morte per cancro nei paesi occidentali.
- La colonscopia rimane il *gold standard* per la diagnosi.
- Per lo screening, il *fecal occult blood test* (FOBT) e il *fecal immunochemical test* (FIT) sono i metodi più utilizzati. Entrambi sono economici, facili da effettuare.
- La ricerca di nuovi biomarcatori non invasivi e accurati si avvale del rapido sviluppo della biologia molecolare.



Nel **processo multi-step di carcinogenesi del CRC** alterazioni **genetiche ed epigenetiche** sono comunemente osservate: singole mutazioni o pannelli sono stati identificati come potenziali marcatori.

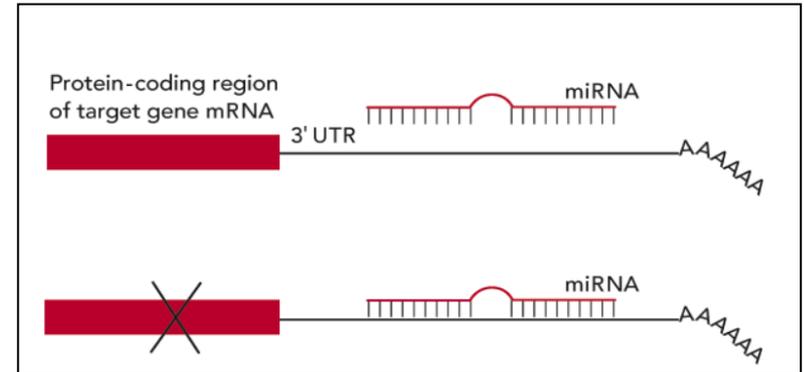
➤ *Ad es. il pannello approvato dall'FDA basato su mutazioni, metilazione aberrante e FIT.*

Sono stati pure proposti test basati su proteine fecali, ma con risultati non ancora soddisfacenti.

Tra i promettenti marcatori per lo screening del CRC, sono stati proposti anche i **microRNA, sia in campioni di plasma che di feci.**

# I miRNA

- Sono la classe più nota di small non-coding RNA (18-25 nt di lunghezza)
- Nel genoma umano sono noti >1800 miRNA (contro i ~30000 mRNA)
- 30-50% dei geni umani sono regolati dai miRNA
- Un miRNA singolo può controllare l'espressione di più geni
- Un gene può presentare più siti di legami per differenti miRNA
- Sono altamente conservati
- Sono identificabili e stabili in differenti tipi di campioni biologici



Sample type	Typical miRNA yield	Considerations
Cell lines	>1,000 ng	High-quality miRNA (usually)
Fluorescence-activated cell sorting	1–100 ng	Lower yield but less cell-type heterogeneity
Fresh tissue (for example, tumour tissue)	>1,000 ng	Cell-type heterogeneity
Formalin-fixed paraffin-embedded tissue	1–100 ng	More reliable than mRNA as an analyte in FFPE
Laser capture microdissected tissue	<1–10 ng	Less heterogeneity but lower yield, never completely pure
Plasma or serum	<1–10 ng	RNases, low yield, typically cannot measure quantity of extracted RNA
Urine	<1–10 ng	Can evaluate cell pellet versus supernatant

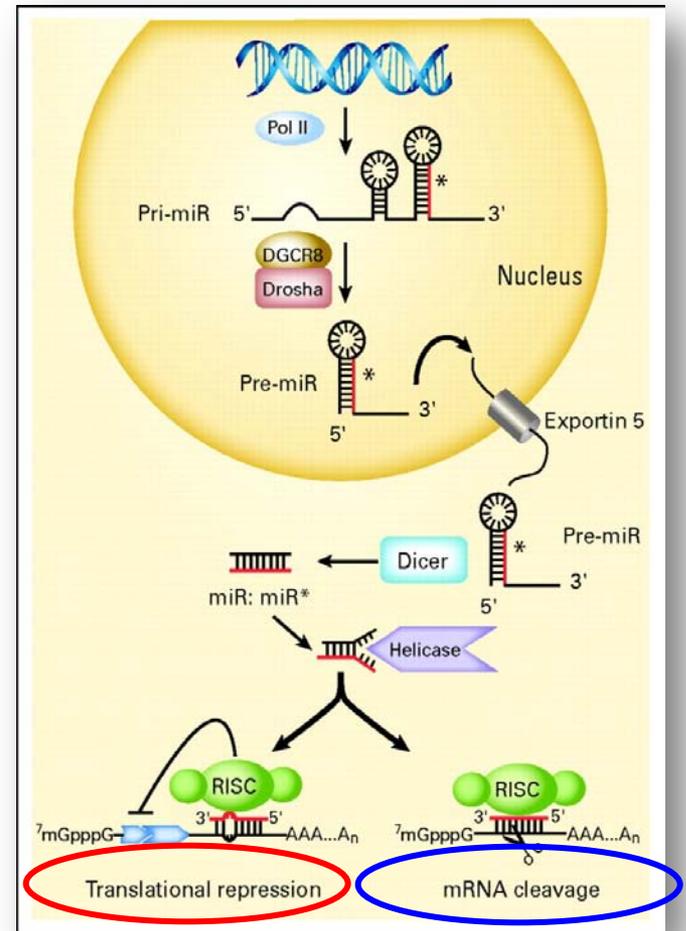
*Iorio, MV. et al. JCO 2009*



# Biogenesi dei miRNA e meccanismo di azione

- I geni dei miRNA sono distribuiti in tutto il genoma come geni indipendenti oppure dentro introni di altri geni ospite.
- Spesso sono raggruppati in famiglie di miRNA o cluster (es- cluster 17-92a).
- Una volta trascritti subiscono vari processi di maturazione ed una volta nel citoplasma esercitano la loro azione di regolazione dell'espressione genica.

**La sequenza del seed** (nt 2-8) mostra una perfetta complementarietà con la regione target del gene (generalmente sul 3'UTR).



*Pritchard et al, Nat Rev Genetics, 2012*

Parziale appaiamento → *Repressione della traduzione*

Totale complementarietà → *mRNA cleavage e degradazione (in presenza del complesso AGO)*

# Alterazioni dei miRNA nel cancro

Le cellule tumorali presentano:

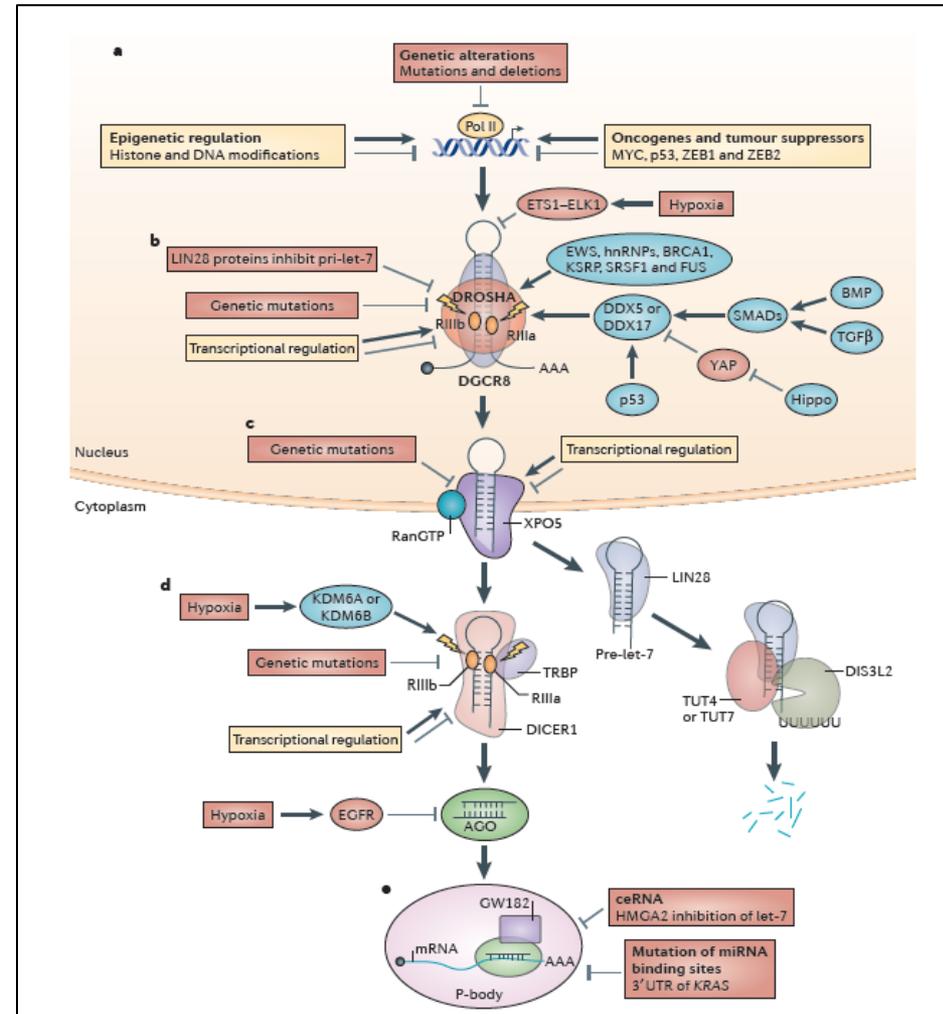
- un'alterazione dell'espressione di molti miRNAs
- la perdita di tumour-suppressor miRNA
- l'accumulo specifico di oncomiRNA

L'espressione degli oncomiRNA può essere aumentata da:

- Amplificazione genomica
- Mutazioni attivanti
- Perdita di silenziamento epigenetico.
- Attivazione trascrizionale.

I tumour-suppressor miRNA sono persi per:

- Delezione genomica
- Mutazioni inattivanti
- Silenziamento epigenetico
- Repressione trascrizionale



# miRNA e CRC

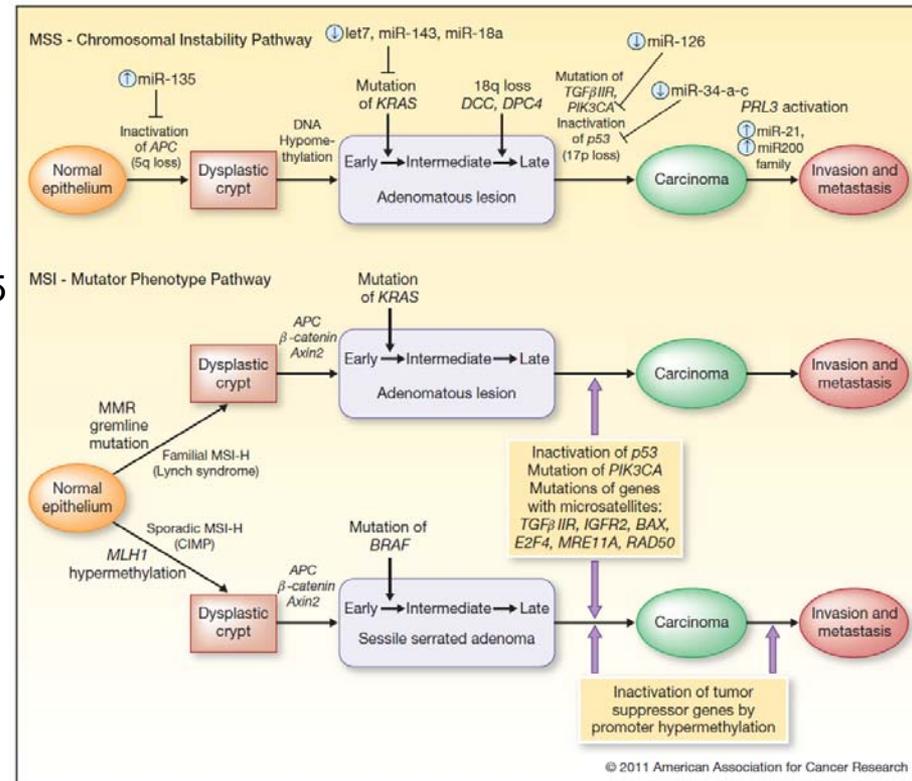
- Molti studi hanno analizzato profili di espressione dei miRNA in differenti campioni biologici in relazione al CRC e alle lesioni precancerose.
- Diversi miRNA presentano un'alterazione nei livelli di espressione in relazione al CRC.

- Esempi di *pathways* e miRNA coinvolti nel CRC:

Epithelial differentiation (miRNA-141 e miRNA-200c),

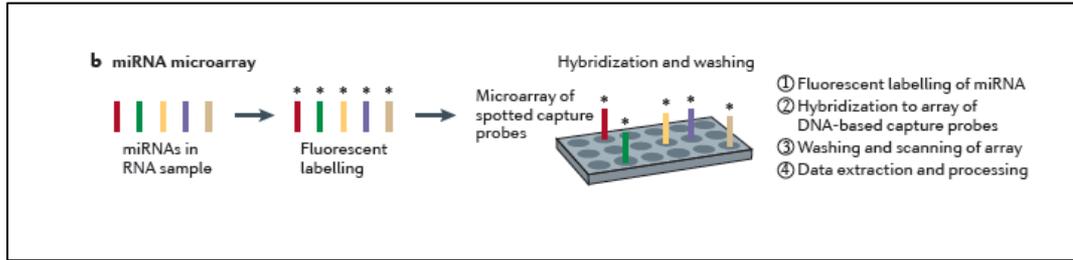
WNT signaling (miRNA-145, miRNA-135a e miRNA-135)

Migration and invasion (miRNA-373 e miRNA-520c).



# Analisi dei miRNA: metodiche impiegate

## Microarray:



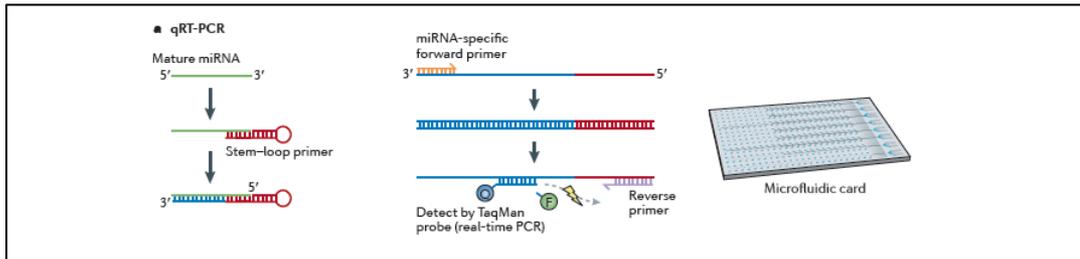
+

- High throughput
- Meno costosi

-

- Ristretto range di quantificazione, alta aspecificità
- Necessaria validazione con qPCR

## qPCR:



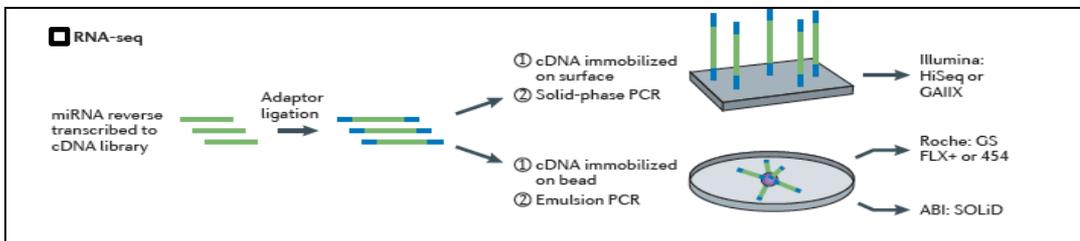
+

- Molto sensibile e specifica
- Easy workflow in lab familiar to qPCR

-

- Capacità limitate
- Alti costi per vasti studi

## Small RNA-sequencing:



+

- Detection dell'intero miRNome
- Precisa identificazione delle sequenze di miRNA

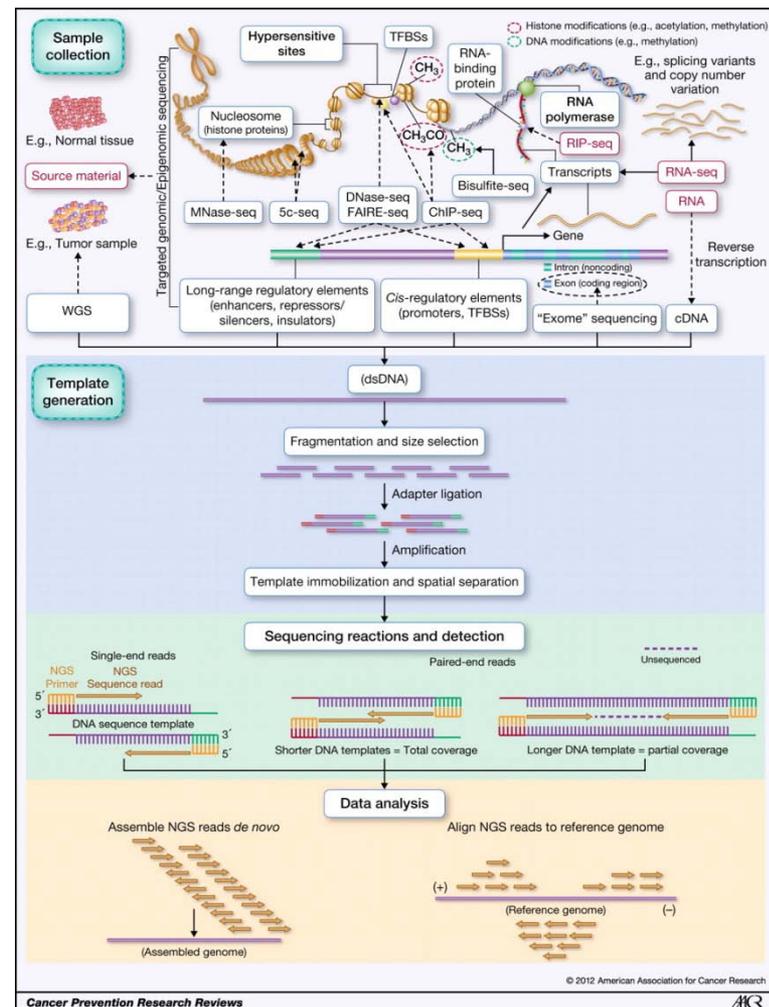
-

- Esperienza informatica richiesta per l'analisi e l'interpretazione dei dati
- Alti costi (in calo)
- Bias legati alla preparazione delle library

# Next-Generation Sequencing (NGS)

La tecnologia NGS rappresenta un mezzo molto potente per sequenziare campioni di DNA o RNA

- I principali **vantaggi** dell'NGS per il profiling di small RNA sono:
  - ✓ Uso di RNA da campioni biologici differenti
  - ✓ Individuazione di miRNA noti e non
  - ✓ Precisa identificazione delle sequenze di miRNA (inclusi pre/pri-miRNA e isomiR)
  - ✓ Possibilità di studiare altri small noncoding RNA (es. piRNA, tRNA)
- Possibili **svantaggi** sono:
  - ✓ Elevato supporto computazionale per analizzare i dati
  - ✓ Mancanza di guideline per l'analisi dei dati
  - ✓ Necessità di validazione dei risultati con una tecnica differente



# Plasma e Feci: potenziali fonti di biomarcatori

Plasma e feci rappresentano importanti campioni biologici nei quali i miRNA possono essere studiati.

In questi campioni i profili di espressione possono essere analizzati mediante NGS.

## Feci

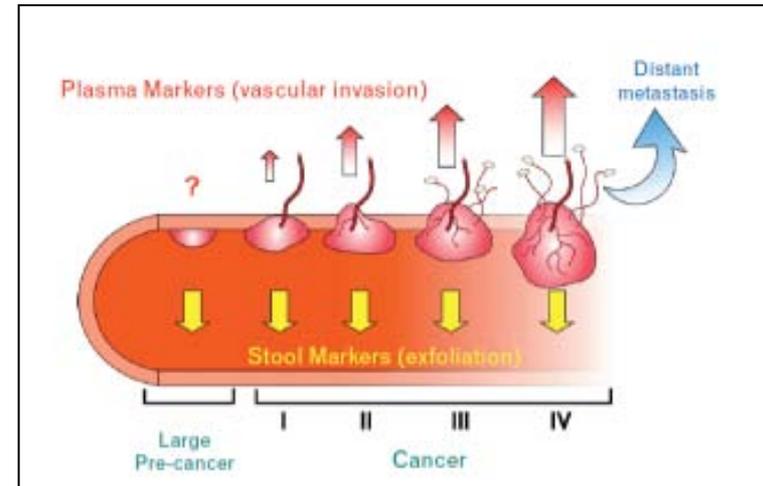
I miRNA umani in campioni di feci possono derivare da:

- Sfaldamento dei colonociti dalla superficie luminale dell'intestino;
  - Marcatori secreti dall'epitelio cellulare che fodera il lume del colon;
  - Marcatori prodotti dal sangue o da vasi linfatici a seguito di crescite tumorali.
- 
- Nei campioni di feci si possono ritrovare anche miRNA introdotti con la dieta (XenomiR)

## Plasma

Il sopranatante cell-free ottenuto per centrifugazione del sangue raccolto in presenza di anticoagulanti può presentare:

- miRNA liberamente circolanti oppure associati in complessi con proteine, lipoproteine o in esosomi.



*Berger BM and Ahlquist DA, Pathology 2012*

# Relazione tra miRNA e microbioma intestinale

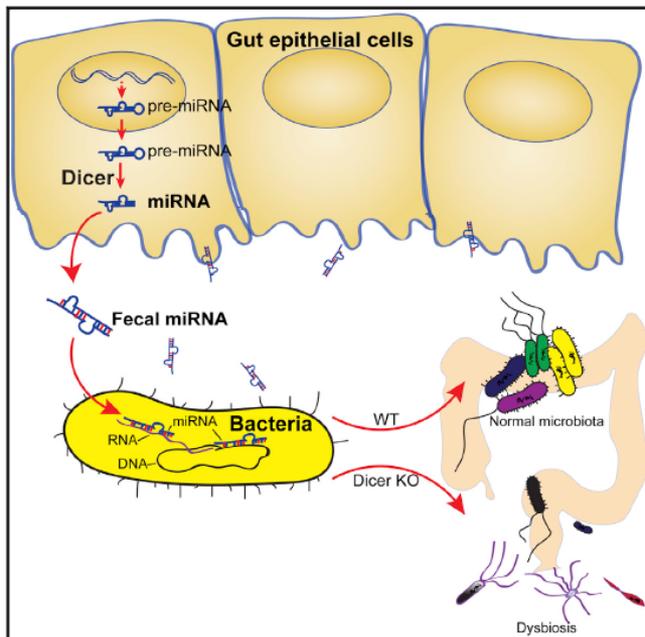
Microbioma converte i fattori della dieta e le componenti digestive in metaboliti che influenzano positivamente o negativamente lo stato di salute degli individui.

L'alterazione del microbioma (disbiosi) può essere messa in relazione con l'insorgenza di numerose malattie tra le quali il cancro.

Uno studio recente ha evidenziato come i miRNA umani identificati nelle feci possano entrare nelle cellule batteriche intestinali ed influenzarne la loro attività.



Cell Host & Microbe  
Article



## The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA

Shirong Liu,<sup>1</sup> Andre Pires da Cunha,<sup>1</sup> Rafael M. Rezende,<sup>1</sup> Ron Cialic,<sup>1</sup> Zhiyun Wei,<sup>1</sup> Lynn Bry,<sup>2</sup> Laurie E. Comstock,<sup>3</sup> Roopali Gandhi,<sup>1</sup> and Howard L. Weiner<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>Department of Neurology, Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA  
<sup>2</sup>Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA  
<sup>3</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA  
\*Correspondence: hweiner@rics.bwh.harvard.edu  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005>

Cell Host & Microbe 19, 32–43, January 13, 2016

### Highlights

- miRNAs are normal constituents of murine and human feces
- Host gut epithelial cells and Hopx<sup>+</sup> cells are the main sources of fecal miRNA
- miRNAs enter bacteria and regulate bacterial gene expression and growth
- Fecal miRNAs are essential for the maintenance of normal gut microbiota

# Il nostro studio

## Endpoint studiati al momento

miRNA

microbioma

miRNA *in esosomi*

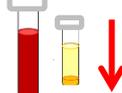


Campioni biologici raccolti

*Feci*

*Sangue/plasma*

*Tumore/Tessuto sano*



Reclutamento



Colonscopia



Diagnosi



Resezione chirurgica



## Questionari somministrati

*Dieta e stili di vita (da studio EPIC)*

Altre informazioni

Raccolta di dati demografici



## Dati clinici:

- 1) *Controlli sani*
- 2) *Emorroidi*
- 3) *Malattie infiammatorie*
- 4) *Polipi*
- 5) *CRC*



*Criteri di esclusione di soggetti con :*

Colonscopia non eseguita,

Storia Familiare

Precedenti tumori al CRC

No raccolta di campioni biologici

# Il nostro studio

## Disegno dello studio:

- A. **Discovery phase:** plasma e feci di 120 soggetti analizzati con NGS
- B. **Validation phase:** 120-150 soggetti con simile distribuzione e caratteristiche con qPCR

## Analisi previste:

1. miRNA e altri sncRNA in CRC or lesioni precancerose (plasma)
2. miRNA e altri sncRNA in CRC or lesioni precancerose (feci)
3. Composizione del microbioma intestinale in CRC or lesioni precancerose (feci)
4. Ruolo della dieta e altri fattori sui livelli di espressione di miRNA/sncRNA e del microbioma intestinale in differenti campioni biologici
5. Relazione tra miRNA/sncRNA e composizione del microbioma intestinale

*Altri studi:* metalloproteine in emorroidi, miRNA esogeni nelle feci e dieta, espressione di miRNA/mRNA in tessuti primari in relazione ai risultati su tessuti surrogati.

# Discovery phase: soggetti reclutati

Al momento abbiamo raccolto campioni da più di 180 soggetti. Per 94 soggetti è stato effettuato il sequenziamento di RNA estratto da campioni di feci e plasma

## Soggetti campionati:

- 39 sani
- 21 infiammazioni
- 20 lesioni precancerose
- 16 CRC



Dai campioni di feci è stato estratto anche il DNA per le analisi di sequenziamento sul microbioma.

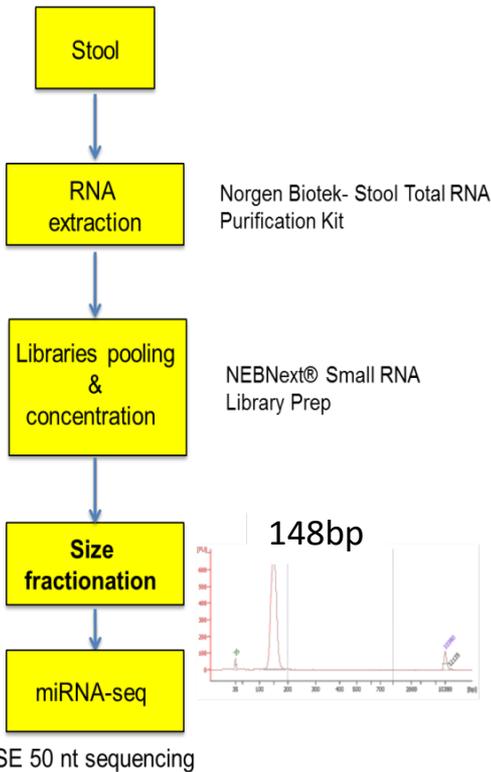
Characterics		All (n=96)	Healthy (n=39)	Polyps (n=20)	Inflamations (n=21)	CRC (n=16)
Age (years)	Mean (range)	57.7 (22-82)	53.7 (22-77)	61.7 (43-79)	60.1 (31-82)	66.5 (58-78)
Sex	Male	50	17	10	11	12
	Female	46	22	10	10	4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Mean± SD	25±5	24.5±5.3	24.1±3.3	25±3	28.4±15.7
	Median	25	24.4	22.8	25	28.5
	<18.5	4	3	0	0	0
	18.5-24.9	35	12	12	8	2
	>25	44	16	8	11	10
Diabetes	Yes	5	0	2	1	2
	No	91	39	18	20	14
High Blood pressure	Yes	31	13	5	7	6
	No	55	25	13	11	6
Hypercholesterolemi a	Yes	42	13	9	9	11
	No	49	25	11	10	3
Polyps	Yes	29	6	12	5	6
	No	57	32	6	13	6
Tumours	Yes	8	4	3	0	1
	No	78	34	15	18	11
Physical Activity	Never	22	10	3	6	3
	Low (< 3 hours/week)	23	10	4	6	3
	Average (3-6 hours/week)	22	11	6	3	2
	High (> 6 hours/week)	15	6	3	3	3
Drugs	Yes	48	18	10	11	9
	No	38	20	8	7	3
Smoking	Never	38	19	8	9	2
	Former	27	13	4	3	7
	Current	21	6	6	6	3

# Small RNA sequencing: preparazione delle library

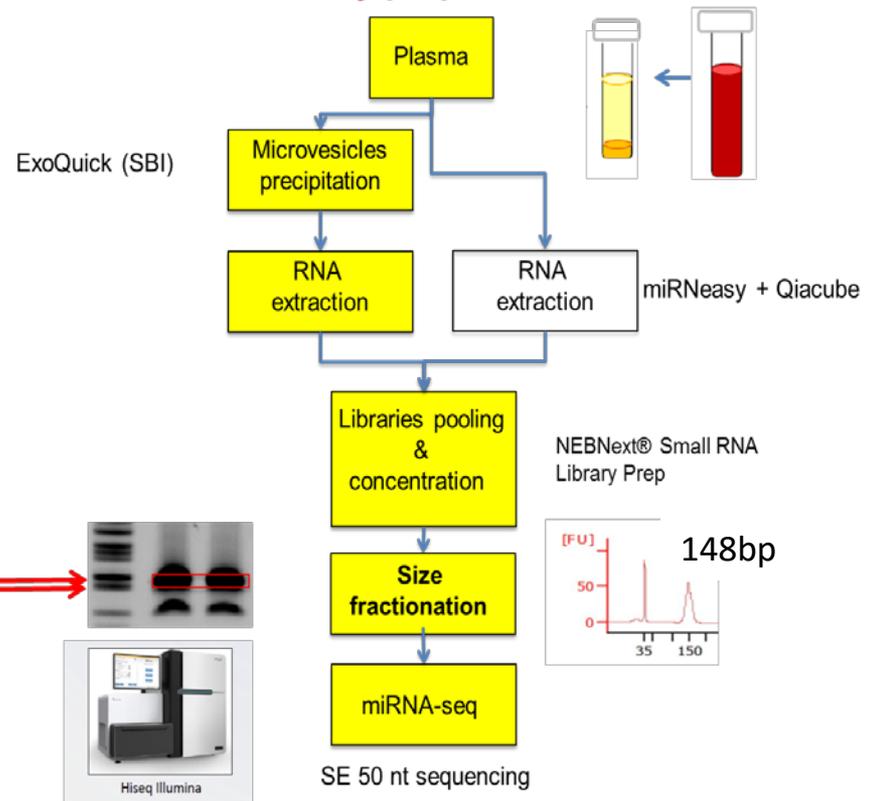
Per i campioni di feci il kit di estrazione di RNA non richiede omogeneizzazione

Per gli esosomi da plasma si aggiunge una fase iniziale di precipitazione delle microvescicole

## Stool library preparation



## Plasma library preparation



# Small RNA sequencing: analisi dei dati

Abbiamo definito una pipeline di analisi per valutare le differenze nei livelli di espressione dei miRNA:

## Analysis pipeline

1. Quality check of raw reads

FastQC

2. Remove adaptor sequences from high-throughput sequencing data.

Cutadapt

3. Map reads with respect to premiRNA sequences.

SHRiMP

4. Creation of a matrix with the number of mapped reads for each miRNAs in each sample

Counting program

5. Count normalisation and identification of putative miRNA biomarkers

DESeq2 (R library)

→ **Downstream analyses**  
**(Target genes, pathway enrichment)**

# Small RNA sequencing: risultati preliminari

Le analisi preliminari sui dati di smallRNA sequencing di 94 campioni di plasma e feci mostrano risultati confrontabili con quelli ricavati da altri tessuti in altri studi (plasma, urine ed esfoliato cervicale).

La percentuale, la composizione delle reads e le risultanti conte per sncRNA da 8 libraries sono riportate di seguito:

	Category	Number of Samples	Raw reads	Low quality(%)	miRNA	piRNA(%)	tRNA(%)
<b>PLASMA</b>	Controls	39	7,212,802	0.013	1104	0.017	0.012
	Polyps	20	5,955,735	0.016	1051	0.013	0.009
	Infiar	20	7,208,765	0.015	1101	0.018	0.013
	CRC	15	4,447,041	0.017	918	0.017	0.014
<b>STOOL</b>	Controls	39	15,986,548	0.006	1190	0.027	0.026
	Polyps	20	8,540,596	0.008	1103	0.043	0.039
	Infiar	20	10,433,646	0.007	1178	0.083	0.076
	CRC	15	9,634,322	0.010	1276	0.136	0.131

# Small RNA sequencing: risultati preliminari

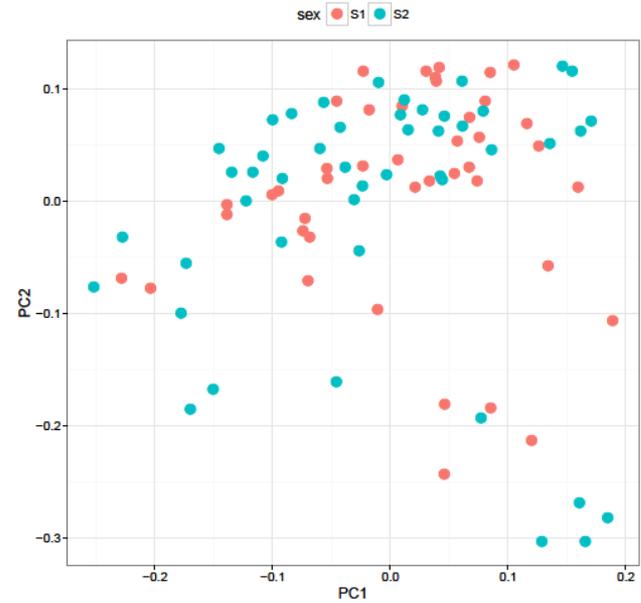
I risultati dell'analisi delle componenti principali (PCA) dei primi 94 campioni di feci e plasma mostrano :



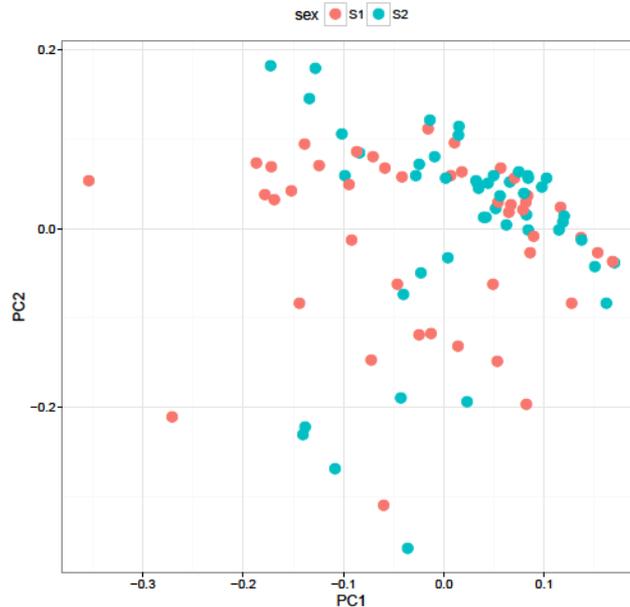
# Small RNA sequencing: risultati preliminari

PCA dei campioni analizzati evidenziati in base al sesso:

Campioni di plasma



Campioni di feci



# Small RNA sequencing: risultati preliminari

Si osserva un grande numero di miRNA differentemente espressi tra le categorie studiate e nei due tipi di campioni biologici

Confronto	DEmiRNAs	
	Plasma	Feci
Infiammazioni vs. Sani	0	307
Infiammazioni vs. Polipi	0	87
Polipi vs. Sani	19	6
CRC vs. Sani	96	349
CRC vs. Infiammazioni	4	212
CRC vs. Polipi	22	145

Dati aggiustati per età e sesso  
Likelihood-Ratio test (DESeq2, Adj. p-value<0.05)

# Small RNA sequencing: risultati preliminari

Dettagli sui miRNA differentemente espressi in campioni di feci.

Confronto	N. miRNA differentemente espressi
CRC vs. Sani	170

Up-regolati  
N=142

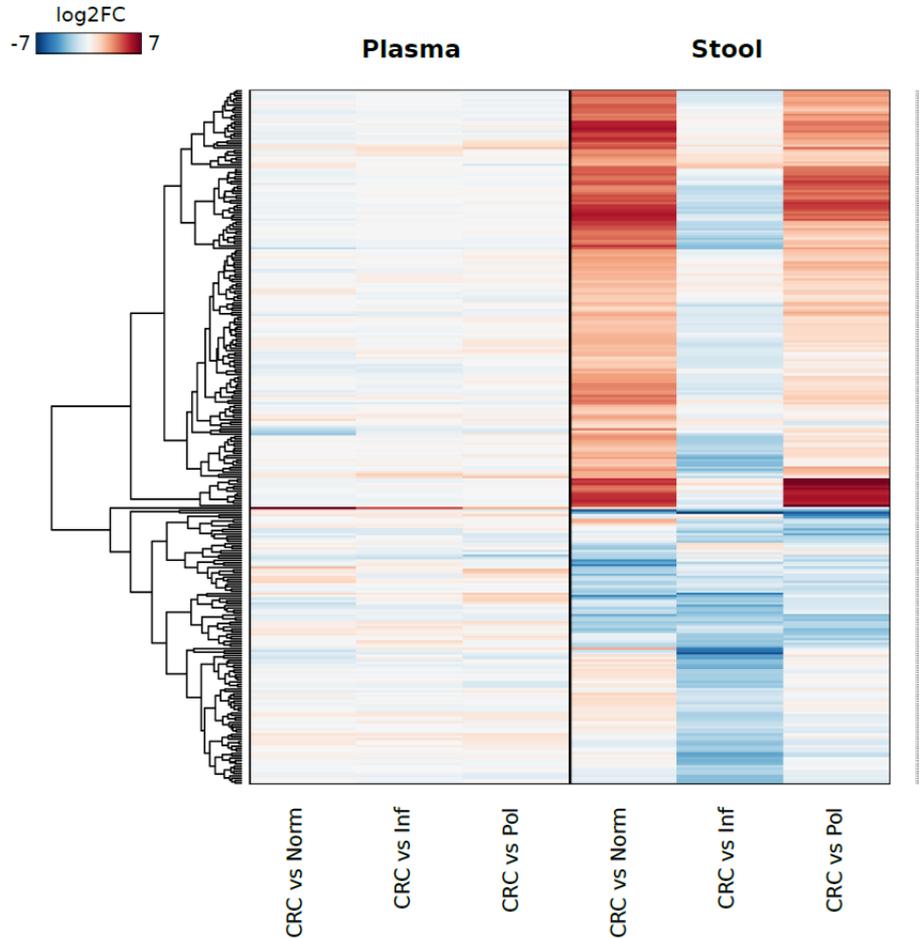
hsa-mir-4791	hsa-mir-873	hsa-mir-744	hsa-mir-93
hsa-mir-7847	hsa-mir-5096	hsa-mir-552	hsa-mir-4773-1
hsa-mir-940	hsa-mir-7641-1	hsa-mir-3908	hsa-mir-4301
hsa-mir-3615	hsa-mir-145	hsa-mir-223	hsa-mir-24-1
hsa-mir-4741	hsa-mir-3687	hsa-mir-5588	hsa-mir-196a-1
hsa-mir-499a	hsa-mir-1303	hsa-mir-320a	hsa-mir-148b
hsa-mir-6743	hsa-mir-214	hsa-mir-1-2	hsa-mir-361
hsa-mir-501	hsa-mir-4634	hsa-mir-423	hsa-mir-16-2
hsa-mir-151b	hsa-mir-1268a	hsa-mir-4289	hsa-mir-101-1
hsa-mir-658	hsa-mir-3976	hsa-mir-10b	hsa-mir-375
hsa-mir-566	hsa-mir-652	hsa-mir-629	hsa-mir-27b
hsa-mir-4419a	hsa-mir-221	hsa-mir-615	hsa-mir-26a-1
hsa-mir-941-1	hsa-mir-4700	hsa-mir-30e	hsa-mir-6513
hsa-mir-197	hsa-mir-513a-1	hsa-mir-1273d	hsa-mir-200a
hsa-mir-1273e	hsa-mir-1254-2	hsa-mir-378a	hsa-let-7a-1
hsa-mir-1273g	hsa-mir-1290	hsa-mir-92a-1	hsa-mir-29a
hsa-mir-4706	hsa-mir-6850	hsa-mir-28	hsa-mir-199a-1
hsa-mir-1273a	hsa-mir-6073	hsa-mir-181a-2	hsa-mir-194-1
hsa-mir-34a	hsa-mir-4485	hsa-mir-1255a	hsa-mir-17
hsa-mir-567	hsa-mir-8086	hsa-mir-29b-1	hsa-let-7g
hsa-mir-6723	hsa-mir-6872	hsa-mir-30c-2	hsa-mir-20a
hsa-mir-4739	hsa-mir-30b	hsa-mir-151a	hsa-mir-140
hsa-mir-193a	hsa-mir-6512	hsa-mir-128-1	hsa-mir-103a-2
hsa-mir-378f	hsa-mir-1254-1	hsa-mir-1246	hsa-mir-23a
hsa-mir-4497	hsa-mir-3173	hsa-mir-142	hsa-mir-16-1
hsa-mir-4459	hsa-mir-30a	hsa-mir-532	hsa-mir-215
hsa-mir-342	hsa-mir-7110	hsa-mir-340	hsa-mir-27a
hsa-mir-1248	hsa-mir-1285-1	hsa-mir-95	hsa-mir-10a
hsa-mir-937	hsa-mir-210	hsa-mir-30d	hsa-mir-25
hsa-mir-589	hsa-mir-101-2	hsa-mir-183	hsa-mir-200c
hsa-mir-6087	hsa-mir-152	hsa-mir-374a	hsa-let-7f-2
hsa-mir-4659a	hsa-mir-663a	hsa-mir-6077-1	hsa-mir-224
hsa-mir-3658	hsa-mir-338	hsa-mir-22	hsa-mir-106b
hsa-mir-6883	hsa-mir-141	hsa-let-7d	hsa-mir-21
hsa-mir-619	hsa-mir-191	hsa-mir-3135b	hsa-mir-192
			hsa-mir-148a
			hsa-mir-200b

hsa-mir-3156-1
hsa-mir-2278
hsa-mir-3686
hsa-mir-1297
hsa-mir-6826
hsa-mir-4322
hsa-mir-4499
hsa-mir-3611
hsa-mir-654
hsa-mir-8055
hsa-mir-1293
hsa-mir-509-1
hsa-mir-4689
hsa-mir-617
hsa-mir-133a-2
hsa-mir-3622b
hsa-mir-650
hsa-mir-5094
hsa-mir-4437
hsa-mir-6843
hsa-mir-885
hsa-mir-6748
hsa-mir-6823
hsa-mir-550a-2
hsa-mir-4999
hsa-mir-3622a
hsa-mir-1284
hsa-mir-3125

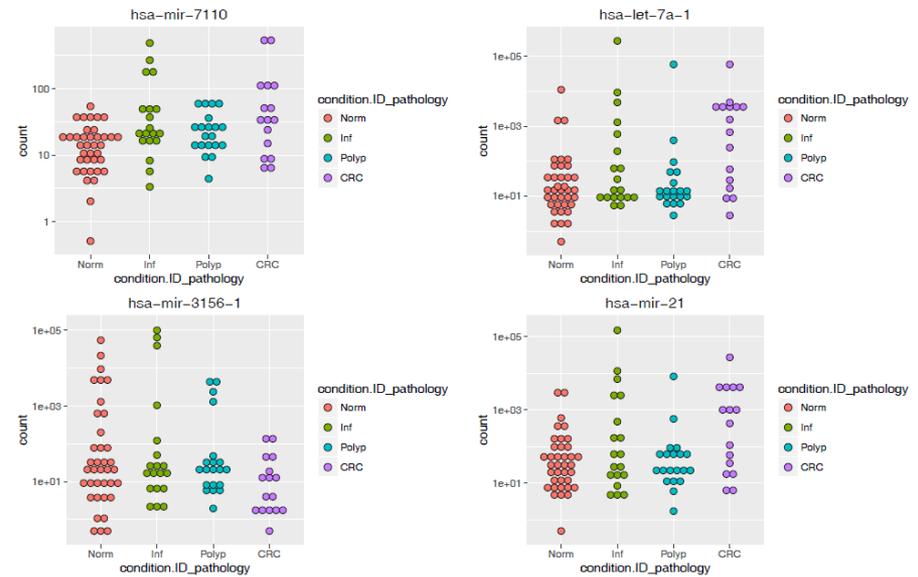
Down-regolati  
N=28

Aggiustato per Library, Sesso, Età (DESeq2, Adj. p-value < 0.05)

# Small RNA sequencing: risultati preliminari

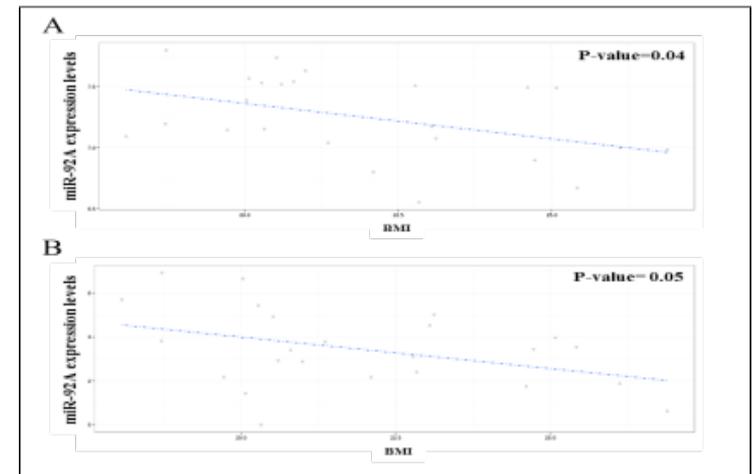
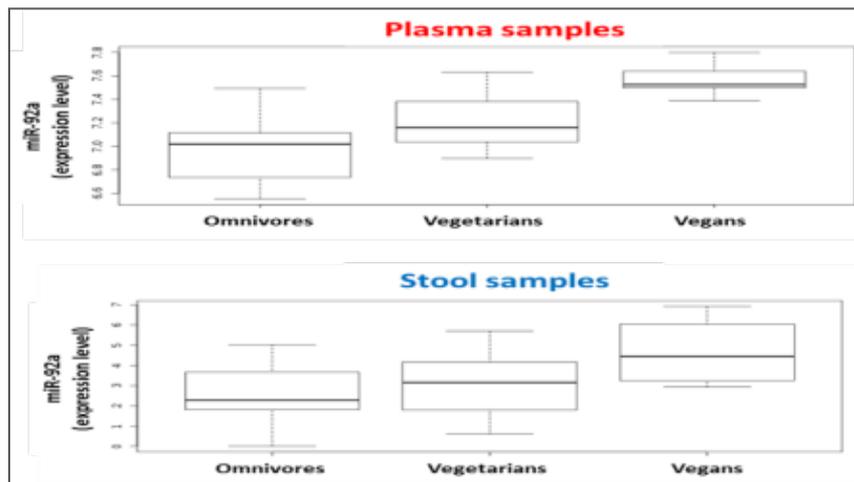


miRNA con >fold change e n. di conte che mostrano un trend tra categorie studiate



# Espressione dei miRNA in feci e plasma: studio pilota su differenti abitudini alimentari

**Disegno sperimentale:** i livelli di espressione dei miRNA sono stati analizzati in plasma e feci di volontari sani (n=24) con differenti diete: vegana, vegetariana e onnivora. I miRNA sono stati analizzati mediante qPCR.



- miR-92a è risultato differentemente espresso nei 3 gruppi, sia in plasma ( $p < 0.0001$ ) sia in campioni fecali ( $p = 0.014$ ).
- miR-92a era inversamente correlato al BMI in entrambi i tipi di campioni ( $p < 0.05$ ).
- miR-92a è un componente chiave del cluster miR-17-92 alterato nel CRC.

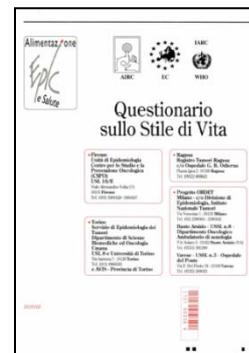
# Dieta e abitudini di vita

I profili di miRNA individuali verranno analizzati in relazione ad un ampio spettro di informazioni sulle abitudini alimentari e lo stile di vita dei soggetti reclutati e raccolte da questionari validati nello studio EPIC.

Esempi di informazioni raccolte:

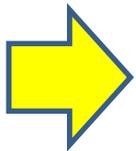
Characteristics		All (n=96)	Healthy (n=39)	Polyps (n=20)	Inflammations (n=21)	CRC (n=16)
Fruit consumption	Yes/No	86/4	35/2	19/1	19/2	13/2
	< 3		5	6	4	2
	4-6		13	7	10	5
Fruit intake (portion/week)	>7		16	6	5	6
	Yes/No	86/-	35/-	19/-	19/-	13/-
	< 3		23	14	15	9
Vegetables consumption (raw+cooked)	4-6		11	5	4	4
	>7		1	0	0	0
	Yes/No	86	35	19	19	12
Vegetables intake (raw+cooked) (portion/week)	< 3		7	1	0	1
	4-6		3	2	1	1
	>7		25	16	18	11
Pasta/Bread consumption	Yes/No	86	35	19	19	12
Pasta/bread intake(portion/week)	< 3		7	1	0	1
	4-6		3	2	1	1
	>7		25	16	18	11
Cheese consumption	Yes/No	86/-	35/-	19/-	19/-	13/-
	< 3		23	8	12	6
	4-6		6	10	6	4
Cheese intake (portion/week)	>7		6	1	1	3
	Yes/No	84/-	35/-	19/-	18/-	13/-
	< 3		13	10	4	4
Total Meat consumption	4-6		8	5	9	5
	>7		14	4	5	4
	< 3		31	16	15	12
Meat intake (portion/week)	4-6		3	2	3	0
	>7		1	0	1	1
	Yes/No	27/8	12/7	13/6	8/4	
Processed meat (portion/week)	< 3		13	10	4	4
	4-6		8	5	9	5
	>7		14	4	5	4
Fish consumption (portion/week)	< 3		31	16	15	12
	4-6		3	2	3	0
	>7		1	0	1	1

Characteristics		All (n=96)	Healthy (n=39)	Polyps (n=20)	Inflammations (n=21)	CRC (n=16)
Alcohol consumption	Yes/No	51/30	19/17	9/8	15/3	8/2
	< 3		11	3	3	5
	3-6		9	3	0	3
Glass per week	>6		31	13	6	7
	Yes/No	67/14	31/5	14/3	13/5	9/1
	< 2		0	0	0	0
Coffee consumption	2-3		1	0	0	0
	>3		66	28	14	13
	Yes/No	63/28	11/28	20/0	21/0	16/0
Milk consumption	Yes/No	71/16	30/6	14/5	13/5	14/5
	1		1	0	1	0
	2-4		0	0	0	0
Sugar	>5		70	30	13	13
	Yes/No	67/14	31/5	14/3	13/5	9/1
	Number of teaspoons per day		0	0	0	0



# Prospettive future

- **Concludere la fase di Discovery** allargando il numero di casi e controlli
- Identificare un numero di miRNA che sembrano caratterizzare le differenti categorie di studio ed effettuare la **validazione dei risultati**
- Definire un **pannello di miRNA come potenziali marker** nei due tessuti surrogati
- Analizzare le informazioni sulla **dieta** e lo **stile di vita** con i profili di miRNA
- Esplorare **la relazione tra miRNA e la composizione del microbioma intestinale** per identificare lesioni precoci per il CRC



In tal senso, stiamo per implementare l'analisi di miRNA e del microbioma nell'ambito dei programmi di **screening del CRC**

# miRNA/microbiome profiling in programmi di screening del CRC

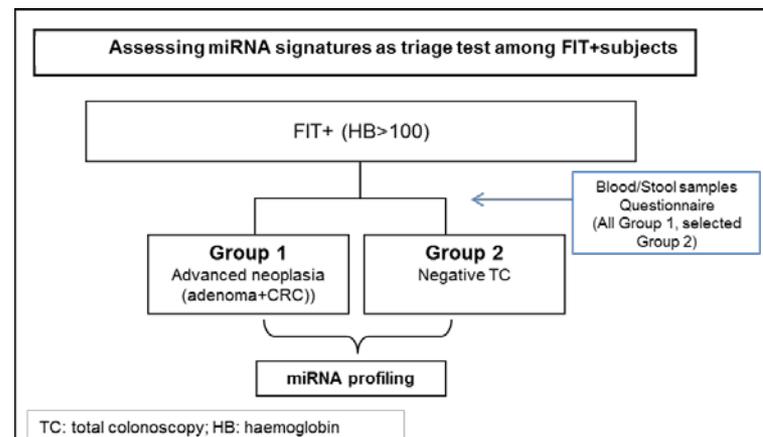
- I programmi di screening del CRC possono offrire un'ottima opportunità per esplorare profili di miRNA e di microbioma in relazione alla comparsa di lesioni precancerose/tumori o altre malattie.
  - Possibilità di raccogliere campioni di feci da vaste popolazioni (in concomitanza con test FOBT, FIT)
  - Possibilità di screening ripetuti con un'accurata selezione dei casi
  - Opportunità di ottenere dati clinici ed epidemiologici per sviluppare uno studio di coorte

# Scopo dello studio

Nell'ambito della collaborazione tra il CPO Regione Piemonte (C. Senore), l'ISPO (F. Carozzi) e lo HuGeF Torino è in corso di attuazione un progetto sullo studio di marcatori molecolari che prevede il coinvolgimento del National Cancer Institute (Rashmi Sinha) e dello IARC (Marc Gunter):

**Aim 1:** Valutare la relazione tra miRNA (precedentemente evidenziati dallo studio cross-sectional), microbioma (16S rRNA fecale) e neoplasia coloretta:

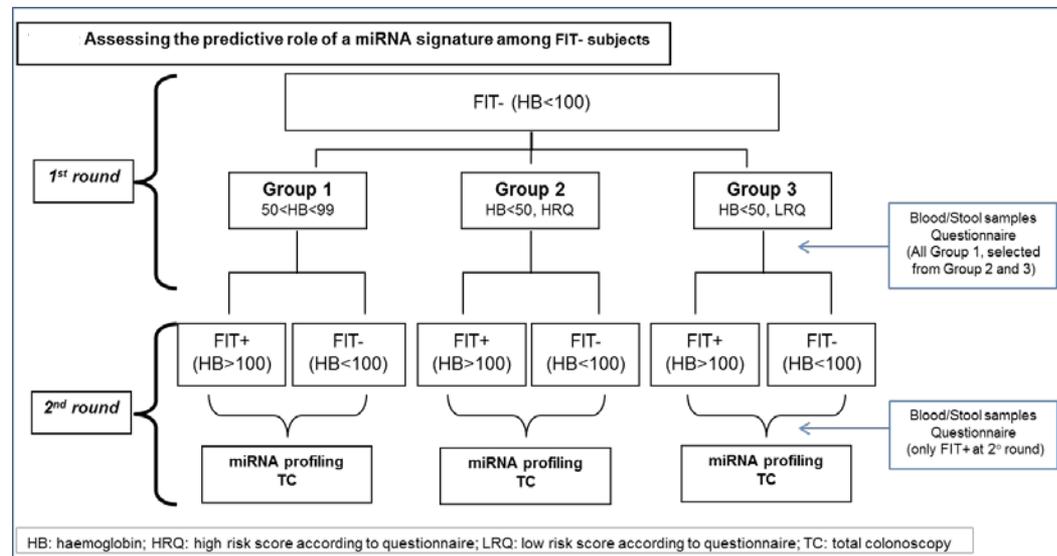
In soggetti FIT-positivi che vengono sottoposti a colonscopia (tra cui adenomi, CRC e soggetti sani).



# Studio prospettico

**Aim 2:** Valutare la possibilità di effettuare uno studio di coorte all'interno del Programma di Screening del CRC:

In soggetti FIT-negativi che aderiscono a partecipare ad uno studio prospettico, con la possibilità di raccogliere campioni biologici e dati da questionari sul rischio.



# Ringraziamenti



## Molecular and Genetic Epidemiology Unit

Alessio Naccarati  
Sonia Tarallo  
Giovanni Fiorito  
Antonio Francavilla  
Paolo Vineis

## Genomic Variation in Human Population and Complex Diseases Unit

Barbara Pardini



## Dipartimento di Informatica, Università di Torino

Francesca Cordero  
Giulio Ferrero

## Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute

Raffaele A. Calogero  
Maddalena Arigoni



Giuseppe Clerico  
Gaetano Gallo  
Alberto Realis  
Mario Trompetto



## Dipartimento di Informatica, Università di Trento

Nicola Segata  
Federica Armanini



## S.C. Epidemiologia, Screening e Registro Tumori, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

Carlo Senore  
Paola Armaroli  
Nereo Segnan



Study supported by  
LILT  
(Bando di ricerca sanitaria 2015)