



## **RELAZIONE FINALE** **DELLA RICERCA DAL TITOLO**

### **“Studio per la valutazione della metilazione nei promotori degli oncosoppressori FAM19A4 e mir124-2, quale fattore prognostico in pazienti con neoplasia intraepiteliale cervicale di alto grado (CIN2/CIN3) HPV correlata”**

#### **INTRODUZIONE**

Si stima che circa l'80% delle donne sessualmente attive contragga l'infezione da papillomavirus umano (HPV) nella propria vita, ma, nella maggior parte dei casi l'infezione scompare spontaneamente, grazie alla clearance messa in atto dal sistema immunitario. La persistenza, tuttavia, a livello cervicale, dell'infezione da HPV ad alto rischio (HR-HPV), è una condizione che si associa allo sviluppo di carcinoma invasivo, con un arco di tempo di circa 15-30 anni dall'insorgenza dell'infezione, come dimostrato da studi prospettici (1).

La correlazione tra infezione da HPV e cancro cervicale, è tra le più alte mai identificate in ambito di cancerogenesi umana, vista la sua presenza in circa il 99% dei casi, qualificando HPV come la causa necessaria anche se non sufficiente (2-3).

Degli oltre 100 genotipi di HPV individuati, 13 sono classificati ad alto rischio, in quanto in grado di causare cambiamenti atipici nelle cellule della cervice, dando luogo a lesioni precancerose (CIN = neoplasia intraepiteliale cervicale), classificate, a seconda della gravità crescente, in CIN1, CIN2 e CIN3, fino al carcinoma cervicale invasivo (ICC).

I genotipi virali di tipo oncogeno sono: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. HPV-16 è il tipo ad alto rischio più frequentemente implicato nella oncogenesi (53,5%), prevalentemente associato al carcinoma a cellule squamose (SCC) (4).



Il DNA di HPV è stato rilevato anche nelle urine di pazienti affette (5), pertanto negli ultimi anni gli sforzi si stanno concentrando per la messa a punto di sistemi affidabili per l'utilizzo di tale tipologia di prelievo per l'identificazione dell'infezione (6-7).

Il carcinoma della cervice, dopo la crescente diffusione degli screening di prevenzione, è oggi una patologia prevenibile, grazie ad una precoce identificazione e al successivo trattamento delle neoplasie intraepiteliali di alto grado, CIN2 e CIN3.

Parallelamente la vaccinazione, introdotta ormai in molte nazioni, si è rivelata non solo uno strumento di protezione primaria nei confronti dell'infezione (8), ma anche un potente strumento di prevenzione delle recidive, in donne trattate chirurgicamente per patologia HPV correlata (9).

E' stato visto che la permanenza dell'infezione da HPV è associata alla crescente espressione degli oncogeni virali E6 e E7 ed è condizione indispensabile per la progressione verso lo sviluppo di cancro della cervice. Questo processo è associato all'accumulo di alterazioni epigenetiche a carico delle cellule delle pazienti HR-HPV-positive, e in particolare all'aumento della metilazione del DNA nei promotori di specifici geni oncoprotettori, con conseguente loro silenziamento (10).

L'analisi di metilazione di tali geni, si sta recentemente rivelando come un promettente test per il follow-up di pazienti positive al test molecolare per la ricerca di HPV ad alto rischio e nei casi di Pap test con cellule squamose atipiche di significato indeterminato (ASC-US).

In particolare è stato visto che l'ipermetilazione del promotore del gene FAM19A4 è un evento associato all'acquisizione di un fenotipo immortale (11) e che il locus miR-124-2, è target d'ipermetilazione nel cancro della cervice, del colon, dello stomaco, del fegato e nella leucemia.(12)

Il presente studio ha analizzato la presenza di ipermetilazione a livello dei promotori dei geni oncosoppressori FAM19A4 e miRNA 124-2, nel DNA estratto da prelievi cervicali di pazienti con lesioni di alto grado, CIN2 e CIN3, al momento del cono, per



l'identificazione dei casi a rischio di progressione tumorale a breve termine.

Parallelamente lo studio ha testato, per la prima volta, l'efficacia di tale tipo di indagine in campioni di DNA estratto da prelievi urinari autoraccolti.

## **MATERIALI E METODI**

Nel presente studio sono state inizialmente arruolate, previa richiesta di consenso informato, 70 pazienti sottoposte a trattamento chirurgico, per presenza di lesioni di alto grado HPV-correlate.

In un sottogruppo di 51 è stato possibile ottenere i dati istologici relativi alla biopsia e al tessuto asportato al momento del cono, il prelievo cervicale (thinprep) e il prelievo urinario.

In tutte le coppie di prelievi, cervicale e urinario, è stato estratto il DNA da un'aliquota di campione.

I DNA estratti sono stati utilizzati inizialmente per l'analisi con metodica con HC2 per la valutazione della presenza di HR-HPV e la quantizzazione della carica virale, e successivamente, nei casi positivi a HC2, per l'analisi di genotipizzazione, mediante metodica Linear Array (Roche), per la definizione del tipo virale presente.

L'analisi con metodica HC2, per genotipi ad alto rischio, è un saggio di ibridazione RNA-DNA, con successiva reazione anticorpale, che permette di rilevare, mediante emissione di un segnale chemi-luminescente, un pool di 13 tipi di HPV ad alto rischio.

I tipi di HPV ad alto rischio rilevati dal test sono 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Il test fornisce stime quantitative della carica virale, che correla con la soglia clinica.

L'analisi di genotipizzazione è un test qualitativo, basato sul principio dell'ibridazione molecolare inversa, che permette l'identificazione di 13 genotipi di HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68).

La successiva **analisi di metilazione**, che ha costituito l'indagine principale di



questo studio, è una reazione di amplificazione real-time polymerase chain reaction metilazione-specifica (PCR-qMSP), con primer all'interno dei promotori dei geni FAM19A4 e has-miRNA124-2. L'analisi e l'interpretazione dei dati è stata effettuata mediante strumentazione Rotor-Gene Q, con software Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 (QIAGEN).

La positività all'ipermetilazione in uno solo dei 2 promotori genici analizzati, è sufficiente per definire un elevato rischio di progressione tumorale a breve termine.

## **RISULTATI**

Nel gruppo di 51 pazienti per le quali è stato possibile ottenere i dati istologici relativi alla biopsia e al tessuto asportato al momento del cono, l'analisi in HC2 ha dato esito positivo in tutti i campioni di DNA cervicale e in 48 campioni urinari.

L'analisi di genotipizzazione ha successivamente permesso l'identificazione dei genotipi HPV ad alto rischio in tutti i prelievi cervicali e, in parallelo anche su 48 prelievi urinari.

L'analisi di ipermetilazione su 51 prelievi cervicali analizzati, ha rilevato 29 casi ipermetilati, per la positività di uno o entrambi i geni analizzati.

Rispetto alle diverse categorie di lesione CIN (1,2 e 3), confrontabili da un punto di vista numerico (12, 19, 18 pazienti rispettivamente) è risultato che le CIN1 rappresentano il 13,8%, le CIN2 il 41,4% e le CIN3 il 38 % del gruppo con ipermetilazione positiva. Entrambi i casi con carcinoma microinvasivo (K microinv) hanno ipermetilazione positiva (Tabella 1).

Tale risultato concorda con quanto atteso, cioè con il fatto che le lesioni di alto grado, CIN2/CIN3, e naturalmente K microinvasivo, sono quelle a maggior rischio di progressione tumorale.



**TAB. 1**

<b>ISTOLOGIA</b>	<b>N° CASI</b>	<b>% ipermetilazione POS per classificazione istologica</b>	<b>% ipermetilazione NEG per classificazione istologica</b>
<b>CIN1</b>	12	<b>33%</b> (4)	<b>66%</b> (8)
<b>CIN2</b>	19	<b>63%</b> (12)	<b>37%</b> (7)
<b>CIN3</b>	18	<b>61%</b> (11)	<b>39%</b> (7)
<b>K MICROINV</b>	2	<b>100%</b> (2)	<b>0%</b> (0)
<b>Totale casi</b>	<b>51</b>	<b>29</b>	<b>22</b>

Nella tabella successiva (Tabella 2) sono riportati i dati relativi alla correlazione tra stato di metilazione dei promotori dei geni oggetto di studio e il confronto istologico tra la biopsia, eseguita antecedentemente al cono, con tempo variabile dai 6 agli 8 mesi, e il referto istologico, sul frammento ottenuto al momento del trattamento chirurgico.

**TAB. 2**

<b>Confronto istologico biopsia-cono (51)</b>	<b>% iper Metilazione POS</b>	<b>% iper Metilazione NEG</b>
AVANTI (10)	70% (7)	30% (3)
UGUALE (26)	61,5% (16)	38,5% (10)
INDIETRO (15)	40% (6)	60% (9)

**avanti** = progressione verso forma di lesione più grave / **uguale** = nessuna variazione della lesione / **indietro** = regressione verso forma di lesione meno grave.

La maggioranza dei casi, come atteso, visto il breve periodo temporale che intercorre tra la biopsia e l'esame istologico al momento del cono, cade nella categoria "uguale", quella dove, confrontando i due referti, non si assiste né a progressione né a regressione della lesione.

I risultati dell'analisi di metilazione rivelano coerentemente che la maggior



percentuale di ipermetilazione è riscontrabile nel gruppo delle pazienti nelle quali si assiste alla progressione verso una forma di lesione più grave (“avanti”).

La percentuale cala nel gruppo dove non si assiste a variazione della lesione, e ha il valore più basso nel gruppo dove è riscontrata una regressione della lesione verso una forma meno grave (“indietro”).

E’da tenere presente che non tutte le lesioni di alto grado sono comunque destinate a progredire e che esiste una certa percentuale che regredisce spontaneamente, non essendo CIN a trasformazione avanzata, identificati ugualmente da un risultato di ipermetilazione negativa.

Per quanto riguarda la presenza di HPV16 è, come atteso, il genotipo più rappresentato, 55% nella nostra casistica (28/51), in linea con i dati della letteratura (4). La ipermetilazione è presente nel 68% dei casi che presentano questo genotipo.

Dei 10 casi della categoria “avanti”, in 7 è presente HPV16, in 2 HPV 58 e in un caso HPV31.

Per quanto riguarda il test di metilazione sui campioni urinari, la correlazione con i risultati ottenuti nei campioni cervicali è riassunta nella tabella 3.

**TAB. 3**

<b>IPERMETILAZIONE CAMPIONI URINA (51)</b>				
<b>IPERMETILAZIONE CAMPIONI CERVICE (51)</b>		POS	NEG	nv
	POS	<b>15</b>	8	6
	NEG	5	<b>12</b>	5

Per ognuno delle 51 pazienti è stato possibile testare la coppia di prelievi cervicale/urinario.

Riguardo la presenza di ipermetilazione dei geni in studio, la correlazione tra i



risultati ottenuti sui prelievi cervicali e quelli ottenuti sui prelievi urinari è stata del 72,5% (37/51; 15 casi entrambi positivi e 12 casi entrambi negativi).

In 11 prelievi urinari (21%) il test non è risultato valido per carenza di DNA convertito in bisolfito, nella reazione di amplificazione.

## **CONCLUSIONI**

Il test di metilazione sui due geni presi in considerazione in questo studio, è generalmente utilizzato come un test di follow-up in donne con un HPV test positivo. Avendo il test un'alta sensibilità rispetto alla citologia, o alla semplice genotipizzazione di HPV16 e HPV18, e una bassa sensibilità per CIN con basso rischio di progressione tumorale a breve termine, il suo uso è stato proposto anche come triage per distinguere pazienti che richiedano follow up regolare, da quelle per le quali è necessario un immediato controllo colposcopico, per maggior rischio di progressione neoplastica.

In questo studio per la prima volta l'analisi di metilazione è stata utilizzata in prelievi di donne sottoposte a trattamento chirurgico, per la presenza di lesioni HPV-correlate di alto grado.

L'importanza del test, in questo caso, consiste nella possibilità di identificare quelle pazienti che, dopo l'intervento, necessitano di una più stretta sorveglianza, per la presenza, nei prelievi esaminati, di alterazioni epigenetiche sfavorevoli dal punto di vista della progressione maligna, anche nell'ottica di prevenzione di possibili recidive.

La nostra ricerca introduce, per la prima volta, anche il test di metilazione su campione urinario autoraccolto, che ha il vantaggio non solo di ridurre i costi del campionamento, se paragonati a quelli relativi all'esecuzione di cytobrush, da



effettuarsi presso strutture ambulatoriali con personale qualificato, ma anche di una maggiore accettazione da parte della paziente, che deriverebbe dalla facilità di raccolta del prelievo stesso.

Il minor quantitativo di DNA reperibile nei prelievi urinari, come testimoniato dalla presenza di una certa percentuale di casi non analizzabili, richiede una maggior messa al punto del test.

La buona correlazione dei risultati di metilazione tra i prelievi cervicali e urinari suggerisce che il test di metilazione urinario potrebbe rappresentare un strumento valido per aumentare la copertura dei soggetti analizzabili, positivi all'HPV DNA test, con lo scopo di individuare quelli a maggior rischio di progressione neoplastica.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Luttmer R., De Strooper LM, Steenberg RD, Berkhof J, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. et al. (2016). Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 16(9), 961–74.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Maxwell Parkin D, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer.* 2015, 136, E359–E386.
3. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia, Rapporto 2010. La prevalenza dei tumori in Italia. *Epidemiologia & prevenzione.* 2010, 34.
4. IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2007, Vol. 90.
5. Massimiliano Fambrini, Carlo Penna, Annalisa Pieralli, Cecilia Bussani, Maria Grazia Fallani, Karin L. Andersson, Gianfranco Scarselli, Mauro Marchionni. PCR detection rates of high risk human papillomavirus DNA in paired self-collected urine and cervical scrapes after laser CO2 conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology.* 2008, 109(1), 59-64.
6. Arbyn M, Peeters E, Benoy I, Vanden Broeck D, Bogers J, De Sutter P, Donders G, Tjalma W, Weyers S, Cuschieri K, Poljak M, Bonde J, Cocuzza C, Zhao FH, Van Keer S, Vorsters A. VALHUDES: A protocol for validation of human papillomavirus assays and collection devices for HPV testing on self-samples and urine samples. *J Clin Virol.* 2018, 107,52-56.





7. Hwang SH, Shin HY, Lee DO, Sung NY, Lee B, Lee DH, Jun JK. A prospective pilot evaluation of vaginal and urine self-sampling for the Roche cobas 4800 HPVtest for cervical cancer screening. *Sci Rep.* 2018, 8(1):9015.
8. Serrano B, Alemany L, Ruiz PA, Tous S, Lima MA, Bruni L, Jain A, Clifford GM, Qiao YL, Weiss T, et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). *Cancer Epidemiol.* 2014;38(6):748–56
9. Pieralli A, Bianchi C, Auzzi N, Fallani MG, Bussani C, Fambrini M, Cariti G, Scarselli G, Petraglia F, Ghelardi A. Indication of prophylactic vaccines as a tool for secondary prevention in HPV-linked disease. *Arch Gynecol Obstet.* 2018, 298(6):1205-1210.
10. Steenbergen R. D.M.. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer.* 2014, 14, 395–405.
11. De Strooper LM, Meijer CJ, Berkhof J, Hesselink AT, Snijders PJ, Steenbergen RD, and Heideman DA. Methylation Analysis of the FAM19A4 Gene in Cervical Scrapes Is Highly Efficient in Detecting Cervical Carcinomas and Advanced CIN2/3 Lesions *Cancer Prevention Research.* 2014, 7:1251-1257
12. Lujambio, A. et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer research.* 2007,67, 1424–1429.

Prof Massimiliano Fambrini

Dott.ssa Cecilia Bussani