



TITOLO

“Studio per la valutazione della metilazione nel promotore dell’oncosoppressore FAM19A4 e nel mir124-2, quale fattore prognostico in pazienti con neoplasia intraepiteliale cervicale di alto grado (CIN2/CIN3) HPV correlata”

PREFAZIONE

Il papillomavirus umano (HPV) è l’agente causale del tumore invasivo della cervice uterina: HPV ad alto rischio (HR-HPV) è stato isolato in circa il 99% dei carcinomi invasivi ed è rilevabile in alte percentuali anche nelle lesioni precancerose, classificate, a seconda della gravità crescente, in CIN1, CIN2 e CIN3 (CIN = neoplasia intraepiteliale cervicale).

La correlazione tra l’infezione da HPV e il cancro cervicale invasivo, è tra le più alte mai identificate in ambito di cancerogenesi umana e porta a mettere in discussione l’esistenza di cancro cervicale non associato a HPV, qualificando il papillomavirus umano come la causa necessaria anche se non sufficiente, dato il gran numero di infezioni e di lesioni che si risolvono spontaneamente (1-2).

Degli oltre 100 genotipi di HPV individuati, 13 sono classificati ad HR, in quanto in grado di causare cambiamenti atipici nelle cellule della cervice, con possibile evoluzione in carcinoma cervicale invasivo (invasive cervical cancer o ICC).

I genotipi virali implicati nello sviluppo del carcinoma invasivo sono: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 (3). La prevalenza cumulativa dei 4 tipi più coinvolti (HPV 16, 18, 45 e 31) spiegherebbe l’80% dei casi.

HPV-16 è il tipo ad alto rischio più frequentemente implicato nella oncogenesi (53,5%), in prevalenza associato al carcinoma a cellule squamose (SCC), mentre il genotipo HPV-18 è il secondo tipo in ordine di frequenza (17,2%), rilevato più specificatamente nell’adenocarcinoma.

Il DNA di HPV è stato rilevato anche nelle urine di pazienti affette (4).



L'infezione da HPV è molto frequente. Si stima che l'80% circa delle donne sessualmente attive si infetti 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, dell'infezione da HR-HPV a livello cervicale, come dimostrato da studi prospettici, è la condizione necessaria per lo sviluppo di un carcinoma invasivo, con un tempo di intercorrenza dall'insorgenza dell'infezione di circa 15-30 anni (5).

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, quale CIN2 e CIN3.

SCOPO DELLA RICERCA

Nei casi di permanenza dell'infezione da HPV, la crescente espressione degli oncogeni virali E6 e E7, 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 HPV-positive, in particolare l'aumento della metilazione del DNA nei promotori di specifici geni, chiamati oncoprotettori, con conseguente loro silenziamento (6).

L'analisi di metilazione del DNA di tali geni, correlati al tumore della cervice, si sta recentemente rivelando un promettente strumento per l'identificazione, tra le pazienti



con lesioni di alto grado CIN2/CIN3, di donne a maggior rischio di progressione tumorale. Come anche la metilazione a livello di alcuni microRNA (miRNA), piccole molecole di RNA non-codificante, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale.

È stato visto che il livello di metilazione correla con la durata e con la gravità della malattia (7).

La proposta del nostro studio è quella di analizzare la presenza di ipermetilazione sia a livello del promotore del gene oncosoppressore FAM19A4, sia a carico del miRNA 124-2, nel DNA estratto da prelievi cervicali di pazienti con lesioni di alto grado, per definire quei casi con CIN ad avanzato grado di trasformazione, a rischio quindi di progressione tumorale a breve termine. Parallelamente, con la stessa procedura, saranno analizzati per ogni paziente anche i prelievi urinari corrispondenti.

Analogamente sarà possibile distinguere le pazienti in fase produttiva o in stadi precoci di trasformazione, che sono a minor rischio di evoluzione a cancro.

MATERIALI E METODI

- reclutamento di circa 100 pazienti con diagnosi istologica di CIN2/CIN3
- richiesta di partecipazione allo studio, previa firma di consenso informato
- esecuzione dell'analisi di metilazione su campione cervicale raccolto mediante cytobrush e sul corrispondente campione urinario autoraccolto, precedentemente fornito
- analisi dei dati



L'analisi di metilazione sarà eseguita attraverso una multiplex quantitative methylation-specific PCR (polymerase chain reaction), per lo studio del promotore del gene FAM19A4 e per il miRNA 124-2, eseguita con strumentazione Rotor Q (ditta QIAGEN).

I dati verranno analizzati attraverso il software Rotor-Gene AssayManager.

CONCLUSIONI

Lo studio da noi proposto ha lo scopo di individuare, attraverso un test di metilazione del DNA delle pazienti con lesioni di alto grado HPV-correlate, quelle donne maggiormente a rischio di progressione tumorale.

Tale indagine avrebbe inoltre anche un ruolo di triage, nella distinzione tra donne che possono beneficiare semplicemente di un' aumentata sorveglianza e donne che necessitano di un intervento immediato.

La nostra ricerca introdurrebbe, per la prima volta, anche il test di metilazione su campione urinario autoraccolto, che avrebbe il vantaggio non solo di ridurre i costi del campionamento, se paragonati a quelli relativi all'esecuzione di cytobrush, da effettuarsi solamente presso strutture ambulatoriali con personale qualificato, ma anche di una maggiore adesione al tipo di esame, che deriverebbe dalla facilità di raccolta del prelievo stesso.



BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia, Rapporto 2010. La prevalenza dei tumori in Italia. *Epidemiologia & prevenzione*. 2010, 34.
3. IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2007, Vol. 90.
4. 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. *Gynecologic oncology*. 2008, 109(1), 59-64.
5. Luttmer R., [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=De%20Strooper%20LM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=De%20Strooper%20LM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" De Strooper LM , [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Steenbergen%20RD%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Steenbergen%20RD%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" Steenbergen RD , [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Berkhof%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Berkhof%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" Berkhof J , [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Snijders%20PJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Snijders%20PJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" Snijders PJ , [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heideman%20DA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heideman%20DA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" Heideman DA , [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meijer%20CJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506)
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meijer%20CJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27459506" 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.
- 6 Steenbergen R. D.M. (2014). Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 395–405.
7. Wilting S.M., Steenbergen R.D.M. (2016) 85–88. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia. *Papillomavirus Research* 2



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
SCIENZE BIOMEDICHE
SPERIMENTALI E CLINICHE

Responsabile della Ricerca
Prof. Massimiliano Fambrini

Dott.ssa Cecilia Bussani

Firenze, 9 Novembre 2017