

Stato di metilazione in geni umani selezionati come marcatore di aggressività in lesioni pre-neoplastiche della cervice uterina

Trevisan M¹, Fiano V¹, Grasso C¹, Marabese F¹, De Marco L^{1,2}, Sacerdote C², Fasanelli F¹, Gillio Tos A¹

¹SC Epidemiologia dei Tumori U- CERMS, Università di Torino; ² AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

Contatto e-mail: gilliotos.demarco@cpo.it

INTRODUZIONE

L'infezione persistente da ceppi di Human Papillomavirus (HPV) ad alto rischio cancerogenico è causa necessaria per lo sviluppo del cancro cervicale (CC). I determinanti della persistenza virale e della progressione a lesioni cervicali intraepiteliali pre-neoplastiche di alto grado (CIN2/3) e a cancro invasivo sono poco conosciuti. I trials che utilizzano la ricerca di HPV come test di screening del CC evidenziano, a seguito di esito positivo al test HPV, sovra-diagnosi e sovra-trattamento di CIN spontaneamente regressive.

Sono necessari biomarcatori in grado di discriminare le lesioni aggressive da quelle regressive.

La metilazione del DNA è suggerita come indicatore di rischio di trasformazione a seguito di infezione da HPV: può introdurre disregolazioni nel processo di apoptosi favorendo insorgenza e progressione di neoplasie. I dati disponibili sui livelli di metilazione di più di 70 geni cellulari associati allo sviluppo di CC sono poco consistenti tra gli studi e necessitano studi confermativi.

OBIETTIVI

Valutare la metilazione di geni umani selezionati in associazione con la persistenza dell'infezione da HPV e l'insorgenza di lesioni CIN2/3.

Indagare la contemporanea alterazione della metilazione in più geni, per stimare l'effetto di un "pattern di metilazione" sul rischio di neoplasie cervicali. In particolare:

- 1) Analizzare lo stato di metilazione dei geni *CADM1* (*Cell Adhesion Molecole 1*), *MAL* (*Maturation Associated T-Lymphocyte protein*), *DAPK1* (*Death Associated Protein Kinase 1*), *RARb* (*Retinoic Acid Receptor beta*);
- 2) Confrontare lo stato di metilazione tra donne senza HPV e con citologia normale, donne con HPV e citologia normale, donne con lesioni CIN2/3;
- 3) Valutare il potenziale prognostico della metilazione del DNA come biomarcatore di aggressività e identificare geni o siti CpG più efficienti per il triage di donne HPV positive.

RISULTATI

- Sono stati analizzati 368 campioni per *CADM1*, 357 per *MAL*, 301 per *DAPK1*, 212 per *RARb*.

- Le curve ROC (Fig.1) identificano cut off di predizione di rischio di lesioni CIN2/3:

- 4% per *CADM1*;
- 3% per *MAL*;
- 2% per *DAPK1*;
- *RARb* non sembra essere predittivo (AUC=0.48).

- La frequenza di metilazione è riportata in Tab.1.

La media di percentuale di metilazione nei geni studiati mostra differenze significative tra i soggetti con infezione HPV vs quelli senza infezione (*CADM1* p<0.001; *MAL* p<0.001; *DAPK1* p=0.007).

- Il rischio di sviluppare una lesione CIN2/3 in donne con percentuale di metilazione superiore al cut off identificate con le curve ROC (Tab.2):

- OR aggiustato per *CADM1* è **5.30 95% CI 2.41-11.67**;
- OR aggiustato per *MAL* è **5.50 95% CI 2.77-10.90**;
- OR aggiustato per *DAPK1* è 1.33 95% CI 0.71-2.49.

METODI

- Studio caso-controllo (CIN2/3 vs Citol. neg) in donne di età 15-47 reclutate nel 2010 a Curitiba (Brasile), e testate per HPV-DNA e anomalie citologiche in prelievi cervicali.

- Analisi in pirosequenziamento dello stato di metilazione dei geni selezionati

- L'effetto [OR] della metilazione sulle lesioni CIN2/3 è stimato con regressione logistica. I modelli multivariati includono età, abitudine al fumo, uso di contraccettivi orali, età al primo rapporto sessuale e numero di partner.

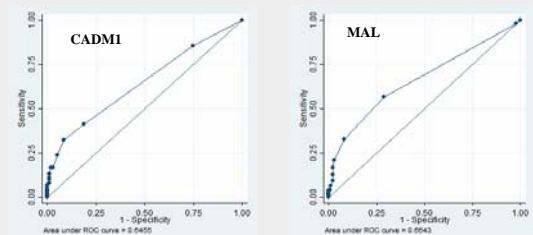


Fig.1: curve ROC

	Frequenza di metilazione (%)				p
	Cito neg HPV neg	Cito neg HPV pos	CIN 2	CIN 3	
CADM1	0.86 (N=116)	12.31 (N=65)	16.49 (N=97)	34.46 (N=89)	<0.001
MAL	6.25 (N=112)	10.94 (N=64)	19.79 (N=96)	47.42 (N=84)	<0.001
DAPK1	15.94 (N=138)	19.57 (N=46)	12.70 (N=63)	38.85 (N=53)	0.007

Tab.1: Percentuale di soggetti con livello di metilazione maggiore dei cut off identificati con le curve ROC

	OR grezzo (95% CI)	OR aggiustato (95% CI)
CADM1	5.95 (2.81-12.62)	5.30 (2.41-11.67)
MAL	5.68 (3.03-10.64)	5.50 (2.77-10.90)
DAPK1	1.50 (0.84-2.69)	1.33 (0.71-2.49)

Tab.2: OR di sviluppo di una lesione nelle donne con percentuale di metilazione dei geni selezionati superiore ai cut off identificati con le curve ROC.

CONCLUSIONI

La presenza di HPV in donne con citologia negativa sembra influenzare i livelli di metilazione dei geni studiati. Lo stato di metilazione di *CADM1*, *MAL* e *DAPK1* può essere utilizzato come variabile prognostica in donne con citologia CIN2/3 vs citologia negativa.