

PROGETTO DI RICERCA

Cognome/Surname	BUTTA'
Nome / Name	MICHELA
Titolo del progetto / Project title	Identificazione di biomarker epigenetici nel carcinoma HPV-correlato
Corso di dottorato / PhD	Oncologia E Chirurgia Sperimentali
Firma del candidato/ Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

Il tasso di incidenza dei carcinomi a cellule squamose testa-collo (HNSCC) HPV-correlati, localizzati prevalentemente a livello del distretto orofaringeo, ha visto negli ultimi anni un rapido aumento, soprattutto tra la popolazione più giovane. L'assenza di programmi di screening mirati comporta una diagnosi tardiva, che si traduce in una mortalità elevata. Un approccio volto a migliorare tali statistiche è rappresentato dall'individuazione di precisi biomarcatori molecolari diagnostici e prognostici, da ricercare a livello di matrici che non richiedono interventi invasivi, come ad esempio la saliva o il siero. I biomarcatori vanno individuati tra le alterazioni cellulari causate dall'infezione da HPV, quali la variazione nei livelli di metilazione del DNA, a carico di oncogeni e oncosoppressori. Pertanto, il progetto si pone come obiettivo l'identificazione a livello di sciacqui orali

2 - Descrizione del progetto / Project

INTRODUZIONE. Il carcinoma a cellule squamose testa-collo (HNSCC) è per incidenza il sesto tumore maligno più comune al mondo, caratterizzato da elevati tassi di morbilità e mortalità [1]. Con il termine HNSCC, ci si riferisce ad un gruppo fortemente eterogeneo di neoplasie maligne, distribuite in diversi siti anatomici della regione testa-collo, quali: cavità orale, labbra, oro-faringe, ipofaringe, rinofaringe e laringe. Tale eterogeneità si riflette anche nei dati epidemiologici ed eziologici, nonché nelle alterazioni molecolari sottostanti la carcinogenesi e quindi nelle risposte alle terapie antitumorali [2]. Secondo i dati del 2017, a partire dagli anni '90 si è osservato un aumento sostanziale dei casi di carcinoma squamocellulare della cavità orale (OSCC) in senso stretto (ossia fino ai pilastri palatini anteriori) e del carcinoma squamocellulare orofaringeo (OPSCC) [3]. Nonostante l'avvento di nuove terapie, tali carcinomi sono caratterizzati da un comportamento aggressivo e da una prognosi severa, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni che si attesta al ~50% [4]. Tradizionalmente, l'eziopatogenesi degli HNSCC è stata correlata a due fattori di rischio: uso di tabacco e abuso di alcool, a cui si correla circa il 75% dei nuovi casi. Tuttavia, negli ultimi anni, si è assistito ad una crescente incidenza di HNSCC HPV-correlati, localizzati soprattutto a livello dell'orofaringe e diffusi nei pazienti più giovani. Si calcola che, similmente alle statistiche del carcinoma cervicale, il genotipo più frequentemente associato all'insorgenza dei carcinomi orali sia l'HPV16, seguito dai genotipi -33 e -18. Secondo stime recenti, in breve tempo l'HPV-OPSCC supererà per percentuali di incidenza il carcinoma cervicale HPV-correlato e si ipotizza che entro il 2030 si tratterà della forma prevalente dei tumori testa-collo. Attualmente, l'OPSCC HPV-positivo è considerato una distinta entità molecolare e clinica rispetto al OPSCC HPV- negativo. Diverse sono infatti, la presentazione clinica, il profilo molecolare e, soprattutto, la prognosi, generalmente più favorevole per i pazienti HPV-positivi. In particolare, tale sottogruppo risponde meglio ai trattamenti chemioterapici e radioterapici, presenta una più bassa incidenza di metastasi e, complessivamente, presenta un tasso di sopravvivenza del 79%, contro il 31% del sottogruppo HPV-negativo [5-8].

A differenza del carcinoma cervicale, il cui sviluppo è preceduto da lesioni pretumorali riconoscibili e classificate secondo un sistema a tre stadi di rischio progressivo (CINI, II, III), per il carcinoma orale non sono ancora state identificate delle lesioni precancerose ben definite, che consentano quindi una precisa stratificazione del rischio di progressione maligna [9]. Ciò nondimeno, è possibile descrivere delle lesioni orali potenzialmente maligne (LMP), corrispondenti ad un gruppo eterogeneo di condizioni e patologie orali che possono precedere l'insorgere del carcinoma in situ e del carcinoma invasivo. Tra le più comuni si ricordano: leucoplachia orale (LO), la sua rara variante verrucoso-proliferativa (LVP), le lesioni lichenoidi orali (OLL), la fibrosi sottomucosa orale (OSF), il lichen planus orale (LPO) e l'eritroplachia (EP) [10]. Il tasso di rischio di trasformazione maligna di tali anomalie della mucosa è variabile, ma appare fortemente influenzato dalla presenza di displasia [11].

Attualmente, i programmi di screening assenti e le indagini cliniche non sempre efficienti nel delineare lesioni precancerose come rischio di progressione a cancro, determinano una frequente diagnosi tardiva dei carcinomi orali, con conseguente prognosi infausta per un elevato numero di pazienti. Quindi, con lo scopo di aumentare il tasso di sopravvivenza, nonché la qualità di vita dei pazienti, è necessaria l'identificazione di *bio-marcatore molecolari* dal valore diagnostico e/o prognostico. Nello specifico, la saliva sembrerebbe la matrice più promettente per la ricerca dei suddetti biomarker, in virtù di una ridotta complessità, della non invasività del prelievo e della presenza di elevate concentrazioni di DNA di origine tumorale [12].

Gli HSNCC HPV-positivi sono caratterizzati da una patogenesi molecolare complessa, che vede la comparsa di specifici pattern di mutazioni geniche, accompagnati dall'accumulo di alterazioni a livello dei meccanismi epigenetici. Tra questi, i più ampiamente caratterizzati sono la metilazione del DNA, le modifiche post-traduzionali delle proteine istoniche e gli RNA non codificanti (ncRNA). Questi regolatori epigenetici non agiscono separatamente, ma sono collegati dinamicamente l'uno all'altro nella regolazione dell'espressione genica. L'interruzione di questo complesso meccanismo di controllo epigenetico può influenzare la struttura e l'integrità del genoma e alterare l'espressione di geni criticamente coinvolti nella tumorigenesi [12].

La metilazione del DNA, in particolare, corrisponde all'aggiunta, catalizzata dalle metil-transferasi DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, di un gruppo metile al carbonio 5 delle citosine che compongono i dinucleotidi CpG. Questi, risultano particolarmente abbondanti a livello delle isole CpG o CGI, ovvero segmenti lunghi approssimativamente 1kb localizzati in corrispondenza delle sequenze di regolazione di numerosi geni. Generalmente, uno stato di ipermetilazione si associa a repressione trascrizionale e silenziamento genico, mentre l'ipometilazione favorisce gli eventi trascrizionali.

In letteratura, è descritto come variazioni del livello di metilazione a carico di specifici target siano associate a eventi fisiologici, come il differenziamento cellulare, e patologici, come il processo di carcinogenesi. Nell'evoluzione tumorale si riscontra frequentemente un'ipermetilazione degli oncosoppressori e un'ipometilazione degli oncogeni. Anche la carcinogenesi indotta da virus si associa a tali anomalie, e nel caso delle infezioni da HPV sono le proteine E6 ed E7 a influenzare lo stato di metilazione del DNA attraverso il controllo da esse effettuato sulle metil-transferasi. In particolare, DNMT1 è sottoposta ad una iper-espressione determinata dall'inibizione di p53, e la sua attività viene stimolata dall'interazione con la proteina E7. Quest'ultima, al contempo, induce l'espressione di DNMT3A e DNMT3B [13].

La metilazione del DNA si configura quindi come un meccanismo reversibile che potrebbe essere utilizzato quale *bio-marcatore clinico* utile al fine di predire l'evoluzione della lesione stessa, la prognosi, nonché la risposta alla terapia. L'aumento o la diminuzione aberrante della metilazione potrebbero quindi aiutare a prevedere il tasso e la probabilità di trasformazione maligna come anche un'inversione dello stato di malattia o, ancora, potrebbero aiutare a prevedere con largo anticipo la comparsa di recidive.

OBIETTIVO DELLO STUDIO. La necessità di avere a disposizione modalità rapide e non invasive per la valutazione prognostica delle lesioni orali ha portato alla scelta del kit PreCursor-M+, progettato per rilevare il livello di ipermetilazione dei promotori associati ai due geni oncosoppressori FAM19A4 e hsa-miR124-2 [14-17]. Tale metodica validata CE-IVD su campioni cervicali e vaginali consente una migliore stratificazione del rischio nelle donne positive ad HPV ad alto rischio caratterizzate da anomalie citologiche/istologiche, distinguendo tra le pazienti che potrebbero sviluppare il carcinoma cervicale e coloro le cui lesioni potrebbero andare incontro a regressione. Nello specifico, elevati livelli di metilazione si associano ad un alto rischio delle lesioni preneoplastiche di evoluzione a breve termine verso il cancro cervicale, a differenza delle lesioni associate a bassi, o non rilevabili, livelli di metilazione.

L'utilizzo della medesima metodica nei pazienti HPV-positivi a livello orale, affetti da lesioni potenzialmente maligne e/o neoplastiche, consentirebbe di valutare la correlazione tra ipermetilazione dei due oncosoppressori e lo sviluppo della neoplasia del cavo orale, con l'obiettivo di utilizzarli come potenziali marcatori prognostici.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO E INDAGINI MOLECOLARI

Ciascun paziente sarà inserito nel presente studio solo dopo aver espresso il suo assenso e firmato il modulo di consenso informato. Lo studio sarà sottoposto all'approvazione del comitato etico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "P. Giaccone" di Palermo.

Ai pazienti sarà inoltre somministrato un questionario al fine di raccogliere dati riguardanti variabili socio-comportamentali, quali: età anagrafica, età al primo rapporto sessuale, numero di partner nella vita, uso del preservativo, stato socioeconomico, titolo di studio, uso di tabacco e uso di alcool. I partecipanti allo studio saranno divisi in tre gruppi:

- pazienti con una diagnosi istologica di OSCC confermata
- pazienti con una diagnosi istologica di lesioni orali precancerose
- pazienti con una diagnosi istologica di lesioni benigne
- pazienti con una diagnosi istologica negativa (controlli).

I pazienti reclutati effettueranno degli sciacqui orali utilizzando 10 ml di collutorio Original Mint Scope® (Procter & Gamble), raggiungendo accuratamente ogni parte del cavo orale ed evitando i gargarismi.

Le indagini che saranno eseguite nel suddetto progetto sono:

1. Valutazione della presenza di HPV-DNA

- Estrazione del DNA dalle due tipologie di campione;
- L'adeguatezza del DNA e l'assenza di inibitori sarà confermata dall'amplificazione dei geni costitutivi "housekeeping" delle cellule;
- Identificazione del/dei genotipi presenti tramite kit di genotipizzazione disponibili.

3. Valutazione dello stato di metilazione di SOX14 e ZNF582

- Estrazione del DNA;
- Quantizzazione del DNA estratto mediante fluorimetria;
- Conversione del DNA mediante sodio-bisolfito: trattamento che agisce chimicamente sui residui di citosina non metilate e non su quelle metilate causando una conversione da citosina ad uracile;
- Real-time PCR diretta sui target FAM19A4 e hsa-miR124-2 e sul gene della β -actina (β -Act), che verifica la qualità del campione, controlla la qualità e il recupero del DNA dopo il trattamento con bisolfito e consente la quantificazione relativa del livello di metilazione, realizzata mediante il calcolo del $\Delta\Delta Ct$.

4. Valutazione statistica della correlazione tra le variabili socio-comportamentali, l'infezione da hrHPV, il diverso grado di metilazione di FAM19A4 e hsa-miR124-2 nei quattro gruppi di pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. (2016). Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332. Epub 2016 Jan 7
2. Head and neck cancer: searching for genomic and epigenetic biomarkers in body fluids – the state of art, Ilda Patricia Ribeiro, Joana Barbosa de Melo, Isabel Marques Carreira, Molecular Cytogenetics, 2019, 12:33
3. Aupérin Anne (2020). Epidemiology of head and neck cancers. Current Opinion in Oncology, 32(3), 178–186.
4. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular

concepts. Arch Iran Med. 2015; 18(5): 314 – 319

5. Gougousis S, Mouchtaropoulou E, Besli I, Vrochidis P, Skoumpas I and Constantinidis I (2021) HPV-Related Oropharyngeal Cancer and Biomarkers Based on Epigenetics and Microbiome Profile. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:625330
6. John D. Cramer, Barbara Burtneess, Quynh Thu Le and Robert L. Ferris, The changing therapeutic landscape of head and neck cancer, *Clinical oncology, Nat Rev Clin Oncol* 2019 Nov;16(11):669-683
7. C René Leemans, Peter J F Snijders, Ruud H Brakenhoff, The molecular landscape of head and neck cancer, *Nat Rev Cancer*, 2018 May;18(5):269-282.
8. Rahimi SHPV-related squamous cell carcinoma of oropharynx: a review *Journal of Clinical Pathology* 2020; 73:624-629.
9. Tara A. Berman, John T. Schiller, Human Papillomavirus in Cervical Cancer and Oropharyngeal Cancer: One Cause, Two Diseases, *Cancer* 2017;123:2219-29
10. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Dec 8;17(24):9160
11. Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jun;125(6):628-636
12. Romanowska K, Sobiecka A, Rawłuszko-Wieczorek AA, Suchorska WM, Golusiński W. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Epigenetic Landscape. *Diagnostics (Basel).* 2020 Dec 27;11(1):34
13. Julia Durzynska, Krzysztof Lesniewicz, Elzbieta Poreba, Human papillomaviruses in epigenetic regulations, *Mutation Research* 772, 36–50, (2017))
14. Vink FJ, Meijer CJLM, Clifford GM, Poljak M, Oštrbenk A, Petry KU, Rothe B, Bonde J, Pedersen H, de Sanjosé S, Torres M, Del Pino M, Quint WGV, Cuschieri K, Boada EA, van Trommel NE, Lissenberg-Witte BI, Floore AN, Hesselink AT, Steenbergen RDM, Bleeker MCG, Heideman DAM. FAM19A4/miR124-2 methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer.* 2020 Aug 15;147(4):1215-1221.
15. Bonde J, Floore A, Ejegod D, Vink FJ, Hesselink A, van de Ven PM, Valenčak AO, Pedersen H, Doorn S, Quint WG, Petry KU, Poljak M, Stanczuk G, Cuschieri K, de Sanjosé S, Bleeker M, Berkhof J, Meijer CJLM, Heideman DAM. Methylation markers FAM19A4 and miR124-2 as triage strategy for primary human papillomavirus screen positive women: A large European multicenter study. *Int J Cancer.* 2021 Jan 15;148(2):396-405.
16. Kremer WW, Dick S, Heideman DAM, Steenbergen RDM, Bleeker MCG, Verhoeve HR, van Baal WM, van Trommel N, Kenter GG, Meijer CJLM, Berkhof J. Clinical Regression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Is Associated With Absence of FAM19A4/miR124-2 DNA Methylation (CONCERVE Study). *J Clin Oncol.* 2022 Sep 10;40(26):3037-3046.
17. Dick S, Vink FJ, Heideman DAM, Lissenberg-Witte BI, Meijer CJLM, Berkhof J. Risk-stratification of HPV-positive women with low-grade cytology by FAM19A4/miR124-2 methylation and HPV genotyping. *Br J Cancer.* 2022 Feb;126(2):259-264.