


PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

Cognome/Surname	BUTTA'
Nome / Name	MICHELA
Titolo del progetto / Project title	Identificazione di biomarker epigenetici in campioni salivari a scopo diagnostico e/o prognostico nella prevenzione del carcinoma orale 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: metilazione del DNA ed espressione di miRNA oncogeni ed oncosoppressori. Pertanto, il progetto si pone come obiettivo l'identificazione a livello salivare di tre possibili marcatori: livello di metilazione dei due target SOX14 e ZNF582, e concentrazione del miR-134.

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 squamo-cellulare della cavità orale (OSCC) in senso stretto (cioè fino ai pilastri palatini anteriori) e del carcinoma squamo-cellulare 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.

Un altro meccanismo di regolazione epigenetica influenzato dall'infezione di HPV e alterato nel processo di carcinogenesi è quello svolto dai miRNA o microRNA [14]. Questi, corrispondono ad una specifica categoria di RNA non codificanti, lunghi in media 22 nucleotidi e coinvolti nella regolazione post-trascrizionale di numerosi geni: a seconda degli studi, una percentuale di geni compresa tra 30 e 60% viene riconosciuta come target dei miRNA. In particolare, in seguito ad un processo di biogenesi composto da più fasi, i miRNA si localizzano a livello citoplasmatico, dove, insieme al complesso proteico RISC, riconoscono la regione 3' UTR di più RNA target, di cui mediano la repressione traduzionale o la degradazione. Tali molecole rappresentano dei regolatori chiave coinvolti in processi cellulari, quali: sviluppo, differenziamento, proliferazione e omeostasi cellulare. Una deregolazione dell'espressione dei miRNA è stata osservata nella genesi di numerose patologie, tra cui il cancro. In particolare, i miRNA possono svolgere sia una funzione di oncogeni, sia di oncosoppressori. In alcuni casi, è stata inoltre osservata una duplice funzione dipendente dal citotipo o dal contesto tissutale. Molteplici sono gli studi volti a caratterizzare il livello di espressione di specifici miRNA a livello tumorale con

lo scopo di comprenderne le alterazioni e quindi poterne utilizzare la detection come marker nella diagnosi primaria, nel follow-up o nella risposta alle terapie. L'esistenza di miRNA extracellulari fortemente stabili contenuti in corpi vescicolari o associati a proteine e localizzati a livello di fluidi biologici, tra cui plasma, siero, fluido cerebrospinale, saliva e urine, ne consente una facile e non invasiva identificazione [15].

OBIETTIVO DELLO STUDIO. La necessità di avere a disposizione modalità rapide e non invasive per la valutazione prognostica delle lesioni orali precancerose ha portato alla scelta di tre differenti papabili biomarker epigenetici, da valutare a livello salivare. In particolare, la scelta è ricaduta sui seguenti target:

- SOX14: appartenente alla famiglia dei geni SOX, i cui prodotti genici esercitano funzioni regolatrici del ciclo cellulare, dello sviluppo e del differenziamento. In uno studio recente, Zhao et al. hanno valutato il livello di metilazione del gene SOX14 nel cancro cervicale vs tessuto normale, nelle lesioni preneoplastiche vs cancro cervicale e nel tessuto sano vs CINII, identificando una correlazione tra ipermetilazione del gene e gravità della lesione. Poiché si osserva che in seguito all'acquisizione dell'HPV i meccanismi biologici che portano allo sviluppo tumorale siano paragonabili indipendentemente dal sito anatomico (cervice, orofaringe, ano) [16] si è ritenuto opportuno analizzare se la correlazione osservata tra ipermetilazione di SOX14 e gravità della lesione tumorale a livello cervicale possa verificarsi anche a livello orale, e dunque possa consentire una diagnosi precoce delle lesioni orali cancerose [17].
- ZNF582: gene codificante per una zinc-finger protein avente funzione di regolatore trascrizionale. Juan et al., sulla base di un follow up di cinque anni effettuato su pazienti con mucosa intatta o affetti da lesioni orali, descrivono come l'ipermetilazione del locus genico in questione sia un efficiente biomarker per l'identificazione precoce di lesioni ad alto potenziale di evoluzione maligna. Nel presente studio si vuole valutare l'associazione tra la metilazione del gene e l'infezione orale da HR-HPV [18].
- miR-134: miRNA oncogeno coinvolto nell'evoluzione dei tumori testa-collo e la cui up-regolazione nei pazienti HNSCC si associa ad un aumento del tasso di mortalità e della comparsa di metastasi. In particolare, Wan et al. ne hanno osservato una concentrazione elevata in campioni di saliva provenienti da pazienti affetti da HNSCC HPV-positivi. Ad oggi, non è stato valutato come potenziale marker diagnostico [19].

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 negativa (controlli).

I partecipanti allo studio forniranno campioni di saliva, in assenza di previa stimolazione, raccolti in Falcon sterili e conservati in ghiaccio. Inoltre, ai pazienti dei primi due gruppi verrà effettuato un prelievo biotico, con lo scopo di valutarne la concordanza con i risultati dei campioni salivari.

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;

- Trattamento con sodio bisolfito che agisce chimicamente sui residui di citosina non metilate e non su quelle metilate causando una conversione da citosina ad uracile;
- Amplificazione delle isole CpG metilate tramite MS-PCR;
- Quantizzazione dei prodotti amplificati tramite cromatografia (DHPLC);
- Sequenziamento dei prodotti MS-PCR. Per confermare la specificità della MS-PCR e l'affidabilità dell'analisi DHPLC, i prodotti MS metilati sono successivamente purificati e sequenziati.

4. Valutazione della concentrazione del miR-134 tramite stem-loop RT-qPCR

- Estrazione dell'RNA totale contenente i miRNA;
- Valutazione della concentrazione e del grado di purezza dell'estratto;
- Sintesi dei cDNA utilizzando primer specifici stem-loop;
- RT-qPCR.

Il prelievo e l'analisi verranno eseguiti all'arruolamento dei pazienti (tempo 0), a 12 e a 24 mesi, così da valutare le variazioni nella concentrazione dei marcatori e quindi evidenziarne l'eventuale valore prognostico.

5. Valutazione statistica della correlazione tra le variabili socio-comportamentali, l'infezione da HR-HPV, il diverso grado di metilazione di SOX14 e ZNF582 e la concentrazione di miR-134 nei tre gruppi di pazienti. Conferma della concordanza dei risultati dei campioni salivari e delle biopsie.

ANALISI STATISTICA

Le valutazioni statistiche nei pazienti con lesioni, cancro e nel gruppo controllo saranno determinati con il test t di Chi square (χ^2). Per valutare le associazioni tra il grado di metilazioni dei geni, la concentrazione del miRNA, le lesioni premaligne e l'infezione HR-HPV sarà utilizzata l'analisi di regressione logistica considerando le odds ratios (ORs) e l'intervallo di confidenza del 95% .

TIME SHEET

Novembre 2021- maggio 2022

Arruolamento dei pazienti:

- Selezione dei tre gruppi di pazienti
- Somministrazione del questionario
- Prelievo dei campioni
- Estrazione di DNA ed RNA totale da campioni salivari e bioptici
- Ricerca del HPV-DNA
- Identificazione dei genotipi HPV
- Trattamento con sodio bisolfito ed MS-PCR diretta su SOX14 e ZNF582

Giugno 2022- ottobre 2022

- Quantizzazione dei prodotti amplificati tramite cromatografia (DHPLC)
- Sequenziamento genomico degli amplificati
- stem-loop RT-qPCR diretta sul miR-134

Novembre 2022- maggio 2023

Secondo campionamento:

- Aggiornamento del questionario
- Prelievo dei campioni
- Estrazione di DNA ed RNA totale da campioni salivari e bioptici
- Ricerca del HPV-DNA
- Identificazione dei genotipi HPV
- Trattamento con sodio bisolfito ed MS-PCR diretta su SOX14 e ZNF582

Giugno 2023- ottobre 2023

- Quantizzazione dei prodotti amplificati tramite cromatografia (DHPLC)
- Sequenziamento genomico degli amplificati

- stem-loop RT-qPCR diretta sul miR-134

Novembre 2023- maggio 2024

Terzo campionamento:

- Aggiornamento del questionario
- Prelievo dei campioni
- Estrazione di DNA ed RNA totale da campioni salivari e bioptici
- Ricerca del HPV-DNA
- Identificazione dei genotipi HPV
- Trattamento con sodio bisolfito ed MS-PCR diretta su SOX14 e ZNF582

Giugno 2023- ottobre 2023

- Quantizzazione dei prodotti amplificati tramite cromatografia (DHPLC)
- Sequenziamento genomico degli amplificati corrispondenti ai due target
- stem-loop RT-qPCR diretta sul miR-134
- Ricerca bibliografica

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 Burtness, 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. Lajer, C., Garnæs, E., Friis-Hansen, L. *et al.* The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer* **106**, 1526–1534 (2012)
15. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 3;9:402
16. Giuliano AR, Nedjai B, Lorincz AT, Schell MJ, Rahman S, Banwait R, Boulware D, Sirak B, Martin-Gomez L, Abrahamsen M, Isaacs-Soriano KA, Wenig B, Chung CH, Caudell J. Methylation of HPV 16 and EPB41L3 in oral gargles: Associations with oropharyngeal cancer detection and tumor characteristics. *Int J Cancer.* 2020 Feb 15;146(4):1018-1030
17. Zhao J, Cao H, Zhang W, Fan Y, Shi S, Wang R. SOX14 hypermethylation as a tumour biomarker in cervical cancer. *BMC Cancer.* 2021 Jun 7;21(1):675. doi: 10.1186/s12885-021-08406-2
18. Juan YC, Su YF, Bai CH, Fan YC, Kuo TT, Ko HH, Peng HH, Chiang CP, Fwu CW, Cheng SJ. ZNF582 hypermethylation as a prognostic biomarker for malignant transformation of oral lesions. *Oral Dis.* 2021 Jun 19
19. Wan Y, Vagenas D, Salazar C, Kenny L, Perry C, Calvopiña D, Punyadeera C. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget.* 2017 Oct 10;8(59):9990-10001