

+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





Metilazione del DNA e diagnosi precoce del Carcinoma Endometriale: una rassegna delle evidenze scientifiche.



Van den Helder et al. Clin Epigenet (2020) 12:165. "Non-invasive detection of endometrial cancer by DNA methylation analysis in urine."

DOI: [10.1186/s13148-020-00958-7](https://doi.or-g/10.1186/s13148-020-00958-7)

BIOMARCATORI

I principali biomarcatori di metilazione del DNA testati per la diagnosi del carcinoma endometriale sono:

- 1. GHSR (Ghrelin Receptor)
- 2. SST (Somatostatin)
- 3. ZIC1 (Zic Family Member 1)

METODO

1. Estrazione e Conversione del DNA:

- Il DNA è stato estratto da campioni di urina (urina completa, sedimento urinario e supernatante urinario) utilizzando specifici kit di estrazione.
- Il DNA estratto è stato poi sottoposto a conversione con bisolfito, un passaggio necessario per distinguere le citosine metilate da quelle non metilate.

2. PCR Quantitativa Specifica per la Metilazione (qMSP):

- La qMSP è stata utilizzata per analizzare i livelli di metilazione dei geni GHSR, SST e ZIC1.
- Ogni saggio qMSP ha incluso il gene di riferimento **ACTB** per la quantificazione e il controllo della qualità. Campioni con un valore Ct per ACTB ≥ 32 sono stati esclusi dall'analisi per garantire una qualità sufficiente.
- I livelli di metilazione sono stati determinati utilizzando il metodo comparativo Ct con la formula: 2^-(Ct marker - Ct ACTB) * 100)



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





CAMPIONI

- 1. Tipi di Campioni:
- Urina Completa: Raccoglie tutte le componenti dell'urina senza pre-trattamento.
- Sedimento Urinario: Contiene principalmente DNA cellulare proveniente da cellule epiteliali e altre componenti cellulari.
- Supernatante Urinario: Contiene principalmente DNA libero da cellule (cfDNA), derivante dal rilascio di DNA tumorale nel flusso sanguigno e successivamente filtrato nei reni.

2. Raccolta dei Campioni:

I campioni di urina sono stati raccolti a casa dalle pazienti e dai controlli sani utilizzando tubi di raccolta contenenti EDTA come conservante.

Dopo la raccolta, i campioni sono stati spediti e processati entro 24-72 ore.

RISULTATI

I marcatori di metilazione GHSR, SST e ZIC1 hanno mostrato livelli significativamente aumentati nei pazienti con carcinoma endometriale rispetto ai controlli sani in tutte le frazioni urinarie testate (P < 0.001).

La frazione di urina completa ha mostrato il miglior potenziale diagnostico, con valori dell'area sotto la curva ROC (AUC) di 0.95, 0.92 e 0.86 per GHSR, SST e ZIC1, rispettivamente.

Forti correlazioni sono state osservate tra le diverse frazioni urinarie per tutti i marcatori (r = 0.77-0.92), suggerendo che l'urina completa può essere la frazione più ottimale per la rilevazione del carcinoma endometriale senza necessità di pre-processamento del campione.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra la fattibilità dell'analisi della metilazione del DNA in campioni di urina come metodo non invasivo per la rilevazione del carcinoma endometriale. I risultati indicano che l'urina completa è la frazione più efficace per la diagnosi, offrendo una strategia potenzialmente utile per lo screening e il monitoraggio delle popolazioni a rischio.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





Wever, T. et al. "DNA methylation testing for endometrial cancer detection in urine, cervicovaginal self-samples, and clinician-taken cervical scrapes."

International Journal of Cancer, 2023. DOI: 10.1002/ijc.33816.

L'incidenza del carcinoma endometriale è in aumento e le attuali procedure diagnostiche spesso richiedono biopsie invasive.

L'analisi dei marcatori di metilazione del DNA in campioni minimamente invasivi o non invasivi potrebbe fornire un'alternativa facile da applicare e più tollerabile per il paziente.

BIOMARCATORI

I principali biomarcatori di metilazione del DNA testati sono:

1.ADCYAP1

2.BHLHE22

3.CDH13

4.CDO1

5.GALR1

6.GHSR

7.HAND2

8.SST

9.ZIC1

METODO

1. Estrazione e Conversione del DNA:

- Il DNA è stato estratto da campioni di urina, auto-campioni cervicovaginali e raschiati cervicali eseguiti da clinici.
- Il DNA estratto è stato poi sottoposto a conversione con bisolfito, necessario per distinguere le citosine metilate da quelle non metilate.

2. PCR Quantitativa Specifica per la Metilazione (qMSP):

- La qMSP è stata utilizzata per analizzare i livelli di metilazione dei geni ADCYAP1, BHLHE22, CDH13, CDO1, GALR1, GHSR, HAND2, SST e ZIC1.
- Ogni saggio qMSP ha incluso il gene di riferimento **ACTB** per la quantificazione e il controllo della qualità.
- Campioni con un valore Ct per ACTB ≥ 32 sono stati esclusi dall'analisi.
- I livelli di metilazione sono stati determinati utilizzando il metodo comparativo Ct con la formula: 2^-(Ct marker Ct ACTB) * 100.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





CAMPIONI

1. Tipi di Campioni:

Urina Completa:

Raccoglie tutte le componenti dell'urina senza pre-trattamento.

I campioni di urina sono stati raccolti a casa dalle pazienti utilizzando tubi di raccolta contenenti EDTA come conservante.

Auto-campioni Cervicovaginali:

Raccoglie materiale endometriale esfoliato e cellule epiteliali dalla cervice e dalla vagina. Gli auto-campioni sono stati raccolti a casa usando un dispositivo a secco e inviati al laboratorio per l'analisi.

• Raschiati Cervicali Eseguiti da Clinici:

Raccoglie cellule dalla superficie della cervice.

I campioni sono stati raccolti dai clinici nella sala operatoria prima del trattamento primario.

2. Raccolta dei Campioni:

I campioni di urina sono stati raccolti a casa dalle pazienti e dai controlli sani utilizzando tubi di raccolta contenenti EDTA come conservante.

Dopo la raccolta, i campioni sono stati spediti e processati entro 24-72 ore.

RISULTATI

I marcatori di metilazione GHSR, SST e ZIC1 hanno mostrato livelli significativamente aumentati nei pazienti con carcinoma endometriale rispetto ai controlli sani in tutte le frazioni urinarie testate (P < 0.001).

La frazione di urina completa ha mostrato il miglior potenziale diagnostico, con valori dell'area sotto la curva ROC (AUC) di 0.95, 0.92 e 0.86 per GHSR, SST e ZIC1, rispettivamente.

Forti correlazioni sono state osservate tra le diverse frazioni urinarie per tutti i marcatori (r = 0.77-0.92), suggerendo che l'urina completa può essere la frazione più ottimale per la rilevazione del carcinoma endometriale senza necessità di pre-processamento del campione.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra la fattibilità dell'analisi della metilazione del DNA in campioni di urina come metodo non invasivo per la rilevazione del carcinoma endometriale. I risultati indicano che l'urina completa è la frazione più efficace per la diagnosi, offrendo una strategia potenzialmente utile per lo screening e il monitoraggio delle popolazioni a rischio.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





Wever, T. et al. "DNA methylation testing for endometrial cancer detection in urine, cervicovaginal self-samples, and clinician-taken cervical scrapes."

International Journal of Cancer, 2023. DOI: 10.1002/ijc.33816.

L'incidenza del carcinoma endometriale è in aumento e le attuali procedure diagnostiche spesso richiedono biopsie invasive.

L'analisi dei marcatori di metilazione del DNA in campioni minimamente invasivi o non invasivi potrebbe fornire un'alternativa facile da applicare e più tollerabile per il paziente.

BIOMARCATORI

I principali biomarcatori di metilazione del DNA testati sono:

- 1. ADCYAP1
- **2. BHLHE22**
- 3. CDH13
- 4. CDO1
- **5. GALR1**
- 6. GHSR
- **7. HAND2**
- **8. SST**
- 9. ZIC1

METODO

1. Estrazione e Conversione del DNA:

- Il DNA è stato estratto da campioni di urina, auto-campioni cervicovaginali e raschiati cervicali eseguiti da clinici.
- Il DNA estratto è stato poi sottoposto a conversione con bisolfito, necessario per distinguere le citosine metilate da quelle non metilate.

2. PCR Quantitativa Specifica per la Metilazione (qMSP):

- La qMSP è stata utilizzata per analizzare i livelli di metilazione dei geni ADCYAP1, BHLHE22, CDH13, CDO1, GALR1, GHSR, HAND2, SST e ZIC1.
- Ogni saggio qMSP ha incluso il gene di riferimento **ACTB** per la quantificazione e il controllo della qualità.
- Campioni con un valore Ct per ACTB ≥ 32 sono stati esclusi dall'analisi.
- I livelli di metilazione sono stati determinati utilizzando il metodo comparativo Ct con la formula: 2^-(Ct marker Ct ACTB) * 100.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





CAMPIONI

1. Tipi di Campioni:

Urina Completa:

Raccoglie tutte le componenti dell'urina senza pre-trattamento.

I campioni di urina sono stati raccolti a casa dalle pazienti utilizzando tubi di raccolta contenenti EDTA come conservante.

Auto-campioni Cervicovaginali:

Raccoglie materiale endometriale esfoliato e cellule epiteliali dalla cervice e dalla vagina. Gli auto-campioni sono stati raccolti a casa usando un dispositivo a secco e inviati al laboratorio per l'analisi.

• Raschiati Cervicali Eseguiti da Clinici:

Raccoglie cellule dalla superficie della cervice.

I campioni sono stati raccolti dai clinici nella sala operatoria prima del trattamento primario.

RISULTATI

I livelli di metilazione di tutti i marcatori erano significativamente più alti nei pazienti con carcinoma endometriale rispetto ai controlli sani in tutti i tipi di campioni (P < 0.01).

Le combinazioni ottimali di tre marcatori hanno dimostrato eccellenti performance diagnostiche con valori dell'area sotto la curva ROC (AUC) di:

- 0.95 per l'urina (95% CI: 0.92-0.98)
- 0.94 per gli auto-campioni cervicovaginali (95% Cl: 0.90-0.97)
- 0.97 per i raschiati cervicali eseguiti da clinici (95% CI: 0.96-0.99)

Sensibilità variavano dall'89% al 93% con specificità dal 90% al 92%.

Performance simili sono state ottenute dopo la validazione incrociata, mantenendo eccellenti performance diagnostiche per la rilevazione del carcinoma endometriale in stadio I.

CONCLUSIONI

L'analisi della metilazione del DNA in campioni raccolti a casa, come urina e auto-campioni cervicovaginali, mostra un grande potenziale per lo screening non invasivo delle popolazioni a rischio di carcinoma endometriale. Questo approccio potrebbe ridurre la necessità di procedure invasive come le biopsie, fornendo un metodo di screening accessibile e ripetibile.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





Verlaat et al. Clin Cancer Res (2017) 23:3813-3822. "Genome-wide DNA methylation profiling reveals methylation markers associated with 3q gain for detection of cervical precancer and cancer."

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2641.

Lo studio si concentra sulle alterazioni epigenetiche delle cellule ospiti coinvolte nello sviluppo del cancro cervicale a seguito di un'infezione persistente da papillomavirus umano ad alto rischio (hrHPV). In particolare, i marcatori basati sulla metilazione del DNA dei promotori dei geni soppressori tumorali sono considerati promettenti per la gestione delle donne positive per hrHPV.

BIOMARCATORI

I tre principali biomarcatori di metilazione del DNA identificati nello studio sono:

- 1. GHSR (Ghrelin Receptor)
- 2. SST (Somatostatin)
- 3. ZIC1 (Zic Family Member 1)

METODO

1. Profilazione della Metilazione del DNA a Livello del Genoma:

- È stata utilizzata la MBD-Seq (sequenziamento del DNA arricchito di dominio di legame metilico) per la scoperta dei profili di metilazione del DNA associati alla carcinogenesi indotta da hrHPV.
- Le regioni promotrici ipermetilate sono state identificate e verificate utilizzando NGS bisolfito multiplex mirato e PCR specifica per la metilazione (MSP).

2. PCR Quantitativa Specifica per la Metilazione (qMSP):

- Per la qMSP sono stati utilizzati 50 ng di DNA convertito con bisolfito come input.
- I valori di metilazione sono stati normalizzati rispetto al gene di riferimento **ACTB** utilizzando il metodo comparativo Ct.

CAMPIONI

1. Tipi di Campioni:

• Campioni di Linee Cellulari e Tessuti Clinici

- Sono stati utilizzati cheratinociti umani, linee cellulari immortali di HPV16 e HPV18, e campioni di tessuto cervicale congelati.
- Campioni aggiuntivi comprendevano tessuti cervicali normali, lesioni CIN2/3, e carcinomi a cellule squamose (SCC).

Campioni di Raschiati Cervicali

- Sono stati raccolti campioni da donne positive per hrHPV con citologia normale e/o senza evidenza di CIN2+ o da donne con diagnosi istologica di CIN2, CIN3, o SCC.
- Altri campioni provenivano da donne con lesioni CIN2/3 avanzate con una durata nota di infezione precedente da hrHPV.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





RISULTATI

I livelli di metilazione di GHSR, SST, e ZIC1 sono aumentati significativamente con la gravità della malattia sia nei campioni di tessuto che nei raschiati cervicali.

La metilazione di questi tre geni ha mostrato un'alta correlazione con la presenza di un guadagno del cromosoma 3q, comune nel cancro cervicale.

Le curve ROC e l'analisi dell'area sotto la curva (AUC) hanno rivelato buone performance cliniche per la rilevazione del CIN3+ nei raschiati cervicali positivi per hrHPV con AUC di 0.87 per GHSR, 0.86 per SST, e 0.89 per ZIC1.

CONCLUSIONI

I marcatori di metilazione GHSR, SST e ZIC1 sono promettenti per la rilevazione del carcinoma cervicale (pre)cancro. La metilazione di questi geni, associata al guadagno del 3q, può migliorare la gestione delle donne positive per hrHPV, riducendo la sovra-diagnosi e il trattamento eccessivo.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





Wang, S., Du, C., Li, M., Wen, B., Shen, Q., Ma, F., Zhang, L., & Deng, H. (2024). Endometrial Cancer Detection by DNA Methylation Analysis in Cervical Papanicolaou Brush Samples. International Journal of Cancer. DOI: 10.1177/15330338241242637.

Il carcinoma endometriale (EC) è il principale tumore ginecologico a livello mondiale, ma gli attuali approcci di screening non sono soddisfacenti. Lo scopo di questo studio retrospettivo era valutare la fattibilità e la capacità dell'analisi della metilazione del DNA nei campioni di spazzole cervicali Papanicolaou (Pap) per la rilevazione dell'EC.

BIOMARCATORI

Sono stati esaminati i seguenti marcatori diagnostici per l'EC nei campioni di spazzole cervicali Pap da donne con lesioni endometriali di vari gradi di gravità:

1.RASSF1A

2.HIST1H4F

METODOLOGIA E CAMPIONI

- Raccolta dei Campioni: 32 campioni di tessuto con EC comprovato istopatologicamente sono stati utilizzati per esaminare i geni ipermetilati nell'EC, includendo tessuti endometriali freschi e campioni FFPE (paraffina).
- Campioni di Spazzole Cervicali Pap: Sono stati raccolti da 94 soggetti, tra cui 19 pazienti con EC, 21 donne con iperplasia atipica (AH) dell'endometrio, 20 soggetti con endometrio normale ma con CIN 1-2 e 34 individui sani.
- **Estrazione e Conversione del DNA**: Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit TIANamp Genomic DNA Extraction Kit e convertito con bisolfito.

ANALISI STATISTICA

- **Test Statistici:** T-test, analisi della varianza (ANOVA), e test post hoc per confronti multipli sono stati utilizzati per confrontare i livelli di metilazione tra i vari gruppi.
- Significato Statistico: Tutte le differenze significative sono state valutate utilizzando P<0.05.

DISCUSSIONE

- Metilazione come Marker Diagnostico: La metilazione del DNA è un evento precoce nella tumorigenesi e abbastanza stabile per i test molecolari. Questo studio ha dimostrato il potenziale dell'analisi della metilazione del DNA per migliorare la gestione clinica dell'EC.
- Limitazioni dello Studio: La dimensione relativamente piccola del campione limita la potenza statistica e sono necessari cohorti più grandi per validare i risultati. Inoltre, sono stati osservati diversi modelli di metilazione tra i tipi di EC (Tipo I e Tipo II).



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it





RISULTATI

RASSF1A e HIST1H4F: Sono stati trovati metilati nei tessuti di EC e nei campioni di Pap delle pazienti con EC.

Livelli di Metilazione: I livelli di metilazione di RASSF1A e HIST1H4F aumentavano con la progressione delle lesioni endometriali.

Analisi ROC e AUC: Le curve ROC e le analisi dell'area sotto la curva (AUC) hanno rivelato che la metilazione di RASSF1A e HIST1H4F ha avuto un AUC combinato di 0.938 e 0.951 rispettivamente per la rilevazione di EC/pre-EC nei campioni di spazzole cervicali Pap.

CONCLUSIONI

L'analisi della metilazione del DNA nei campioni di spazzole cervicali Pap può essere utile per la rilevazione dell'EC, ampliando l'ambito dello screening citologico comunemente utilizzato. Lo studio fornisce nuove intuizioni nel campo della diagnosi clinica dell'EC.

In generale: l'analisi della metilazione del DNA nei campioni di spazzole cervicali Pap è fattibile e potrebbe avere il potenziale per un'applicazione su larga scala per lo screening del carcinoma endometriale

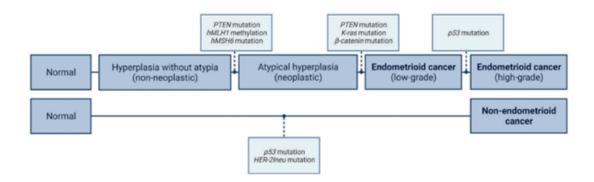


+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it

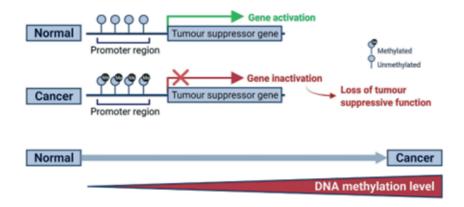




Il carcinoma endometriale (EC) è il tumore ginecologico più comune nei paesi sviluppati e il sesto più comune a livello mondiale. La sua incidenza è in aumento a causa di fattori di rischio come l'obesità. Non esiste attualmente un programma di screening per l'EC, e la diagnosi spesso richiede procedure invasive come le biopsie.



La metilazione del DNA alterata rappresenta un evento epigenetico comune nel cancro. La metilazione del DNA nelle regioni promotrici dei geni può portare al silenziamento genico, che nel caso dei geni soppressori tumorali porta alla perdita della funzione soppressiva del tumore. La metilazione del DNA dei geni soppressori tumorali si verifica spesso durante l'inizio precoce del cancro.



Diversi geni sono stati trovati metilati in lesioni CIN di alto grado, cancro cervicale e carcinoma endometriale. I marcatori di metilazione del DNA offrono il potenziale per identificare lesioni precancerose con un alto rischio di progressione verso il cancro e per rilevare il cancro nei vari tipi di campioni. La valutazione dei marcatori di metilazione del DNA potrebbe essere utilizzata per 1) rilevazione primaria del (pre)cancro in donne con sintomi, 2) triage delle donne HPV-positive nello screening, 3) screening primario, 4) guida nelle decisioni cliniche, 5) previsione della prognosi e 6) monitoraggio della risposta alla terapia.

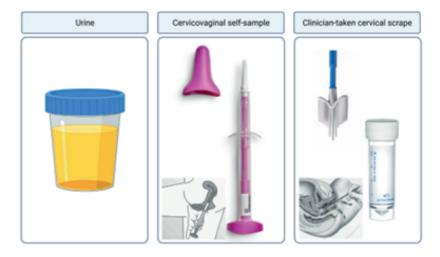
Diversi studi hanno dimostrato che firme di metilazione specifiche per l'EC possono essere misurate in vari tipi di campioni minimamente invasivi, inclusi i raschiati cervicali, le spazzole endometriali, i tamponi vaginali e le urine. I principali marcatori di metilazione del DNA testati per la diagnosi del carcinoma endometriale includono GHSR, SST e ZIC1. Questi marcatori hanno mostrato un eccellente potere discriminante per la rilevazione dell'EC, con valori AUC variabili tra 0.86 e 0.95.



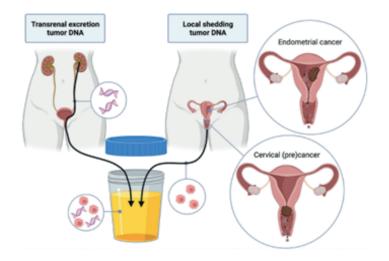
+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it







La rilevazione di biomarcatori nell'urina è stata ampiamente esplorata per la diagnosi del cancro alla vescica. Inoltre, la ricerca dell'ultimo decennio ha dimostrato che il DNA dell'HPV può essere rilevato in modo affidabile nei campioni di urina. Si suggerisce che le cellule esfoliate dal tratto ginecologico vengano eliminate nei detriti vaginali e lavate dall'apertura uretrale e dalla vulva nell'urina. Oltre a questa via di eliminazione locale, è stata proposta l'escrezione transrenale del DNA libero da cellule tumorali nell'urina come via alternativa



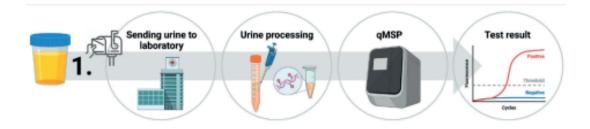
La maggior parte dei marcatori di metilazione del DNA che hanno promesse per la rilevazione dell'EC sono stati derivati da studi sull'EC, ma anche marcatori sviluppati per la rilevazione del cancro cervicale hanno mostrato potenziale rilevanza diagnostica per la rilevazione dell'EC. Abbiamo considerato i marcatori GHSR, SST e ZIC1 come candidati interessanti per valutare la rilevazione dell'EC nell'urina attraverso il test dei marcatori di metilazione del DNA, basandoci su studi precedenti sui marcatori di metilazione urinaria e sul loro potenziale come marcatori diagnostici per diversi tipi di cancro.



+39 0824 363764 +39 351 657 2647 info@centrodeltasrl.com centrodeltasrl.com oncocenter.it







L'analisi della metilazione del DNA di GHSR, SST e ZIC1 nell'urina completa ha mostrato un eccellente potere discriminante per la rilevazione dell'EC (AUC 0.86 – 0.95). Le attuali metodologie diagnostiche per il carcinoma endometriale (EC) presentano sfide significative. La sonografia transvaginale spesso non distingue adeguatamente tra lesioni benigne e maligne, con specificità variabile dal 36% al 68% nelle donne sintomatiche. Non tutte le neoplasie endometriali mostrano ispessimento dell'endometrio e il cutoff ottimale per lo spessore endometriale è dibattuto. Di conseguenza, molte donne devono sottoporsi a biopsie invasive, che possono essere complicate da condizioni come stenosi cervicale o disagio e possono fornire tessuto insufficiente per una diagnosi accurata.

