

In questo lavoro abbiamo condotto uno studio di valutazione del profilo di metilazione di un pannello di tre geni (RAR $\beta$ 2, p16<sup>INK4A</sup> e RASSF1A) in 29 pazienti con tumore polmonare identificato con TAC spirale e in un gruppo di controllo di 112 forti fumatori non affetti da neoplasia. La valutazione della metilazione genica su DNA estratto da tessuto tumorale ed espettorato, è avvenuta mediante nested-PCR metilazione specifica (MSP test), che permette una migliore discriminazione del DNA efficientemente convertito tramite sodio bisolfito e una più specifica amplificazione del DNA metilato rispetto al DNA parzialmente convertito. L'uso di due set di primers che distinguono il DNA convertito e che amplificano differenzialmente i prodotti metilati e non metilati sono alla base di questa metodica. Le condizioni sperimentali sono state definite cercando di avere un giusto rapporto fra specificità e sensibilità, risultata essere di 1/1000.

L'applicazione di questo test ai campioni dello studio ha caratterizzato la metilazione di p16<sup>INK4A</sup> e di RAR $\beta$ 2 come un marcatore di esposizione al fumo, piuttosto che tumore-specifico, poichè la percentuale di ipermetilazione trovata nell'espettorato e nel tumore di pazienti identificati con TAC spirale (prevalentemente adenocarcinomi) è molto simile a quella rilevata nei forti fumatori di controllo. Invece per quanto riguarda il gene RASSF1A abbiamo visto metilazione nel 51.7% dei casi di tumore identificati con TAC spirale, nel 5.6% dei rispettivi espettorati e in un solo caso di controllo (0.9%).

La metilazione di RASSF1A potrebbe essere quindi considerata un vero marcatore tumore-specifico, soprattutto se si confrontano questi dati con quelli relativi a 15 pazienti con diagnosi di tumore in fase sintomatica (tumori di tipo squamoso e non identificati tramite TAC spirale). In questi pazienti il promotore del gene RASSF1A è risultato metilato nel 52.3% dei tumori e similmente nel 62% dei rispettivi campioni di espettorato.

La discordanza sulla frequenza della metilazione di RASSF1A nell'espettorato dei pazienti sintomatici e dei pazienti identificati nel programma di screening è imputabile alle diverse caratteristiche clinico-patologiche dei tumori dei pazienti considerati nei diversi studi, poichè la localizzazione dei tumori squamosi è di solito più prossimale ai bronchi rispetto a quella degli adenocarcinomi che è più periferica e inoltre l'esfoliazione cellulare dei tumori di tipo squamoso è maggiore rispetto a quella degli adenocarcinomi.

In questo contesto di screening stiamo valutando l'applicazione della Real-time PCR quantitativa a studi di metilazione. L'uso di questo test molecolare infatti fornirebbe una valutazione quantitativa oltre che qualitativa dello stato di metilazione dei geni target. Oltre ad essere caratterizzato da alta sensibilità, specificità e riproducibilità risulta essere compatibile con la presenza di basse quantità di DNA template e quindi con il campionamento di fluidi biologici quali espettorato/lavaggio bronchiale e plasma.