



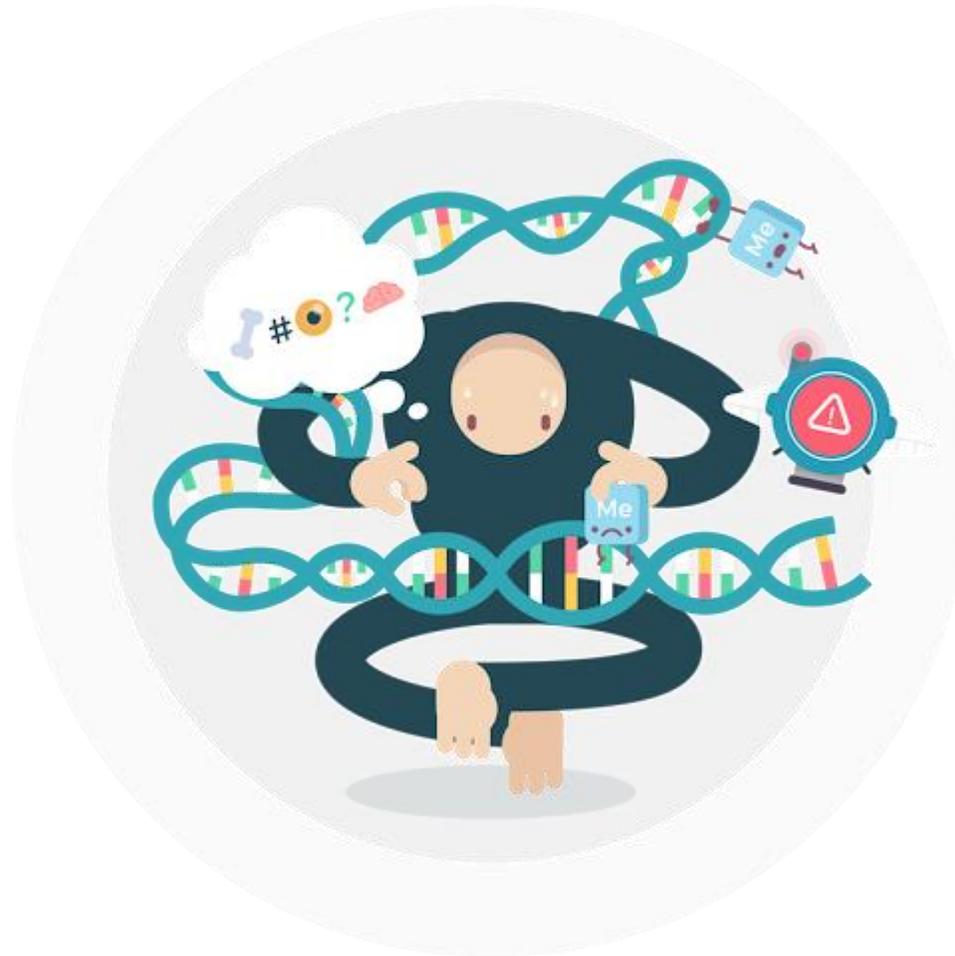
UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

## **PARTO PRE-TERMINE ED EPIGENOMICA**

Studio Genome-Wide sulle Modificazioni Epigenetiche associate al Parto Pre-Termine



Seminario Live Online 2019/2020  
Dott.ssa Elena Spada



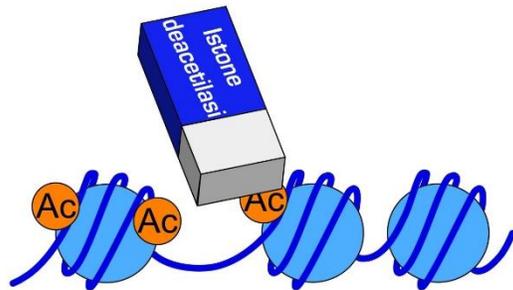
## MODIFICAZIONI EPIGENETICHE

**Modifiche chimiche**, a carico del DNA o delle proteine attorno alle quali esso si avvolge, che **non coinvolgono cambiamenti nella sequenza dei nucleotidi**.

# TIPOLOGIE DI MODIFICAZIONI EPIGENETICHE



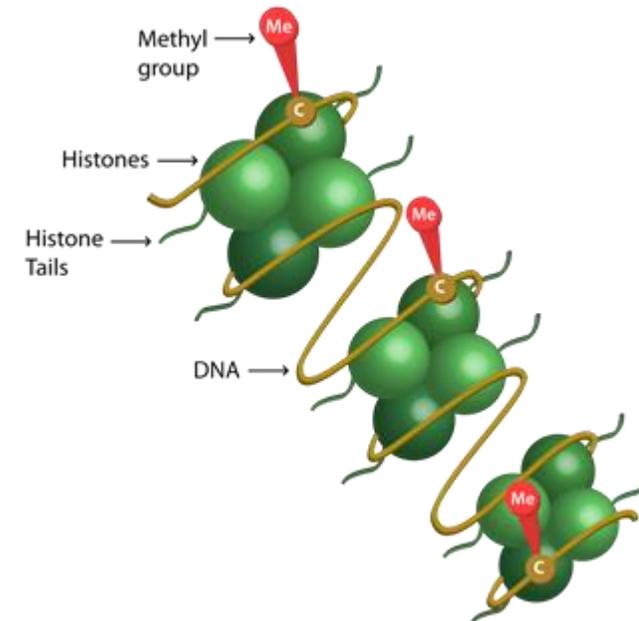
## MODIFICAZIONI CHIMICHE DELLE PROTEINE ISTONICHE



ACETILAZIONE → ATTIVAZIONE GENICA  
METILAZIONE → SIA ATTIVAZIONE CHE REPRESSIONE GENICA



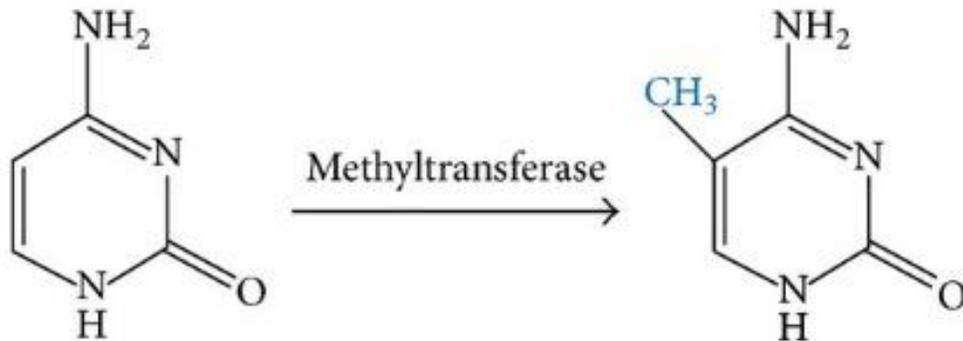
## METILAZIONE DEL DNA



Aggiunta covalente di un **gruppo metile** ad una base azotata.

# METILAZIONE DEL DNA EUCARIOTICO

Avviene ad opera delle metil-transferasi.



## SITI CpG

- **CpG Islands**

Si trovano a monte del 40-60% dei geni.  
Si trovano solitamente **demetilate**.

- **Non-CpG Islands**

Sono un insieme eterogeneo di sequenze che comprende regioni di DNA ripetuto e regioni trasponibili.  
Si trovano solitamente **metilate**.

# RUOLO BIOLOGICO DELLA METILAZIONE

Differenziamento cellulare

Imprinting Genomico

Invecchiamento

Inattivazione del  
cromosoma x

Carcinogenesi



**SVILUPPO EMBRIONALE**

# PARTO PRETERMINE

L'OMS definisce pretermine(PTB) il neonato che nasce prima di aver completato la **37° settimana di gestazione**.

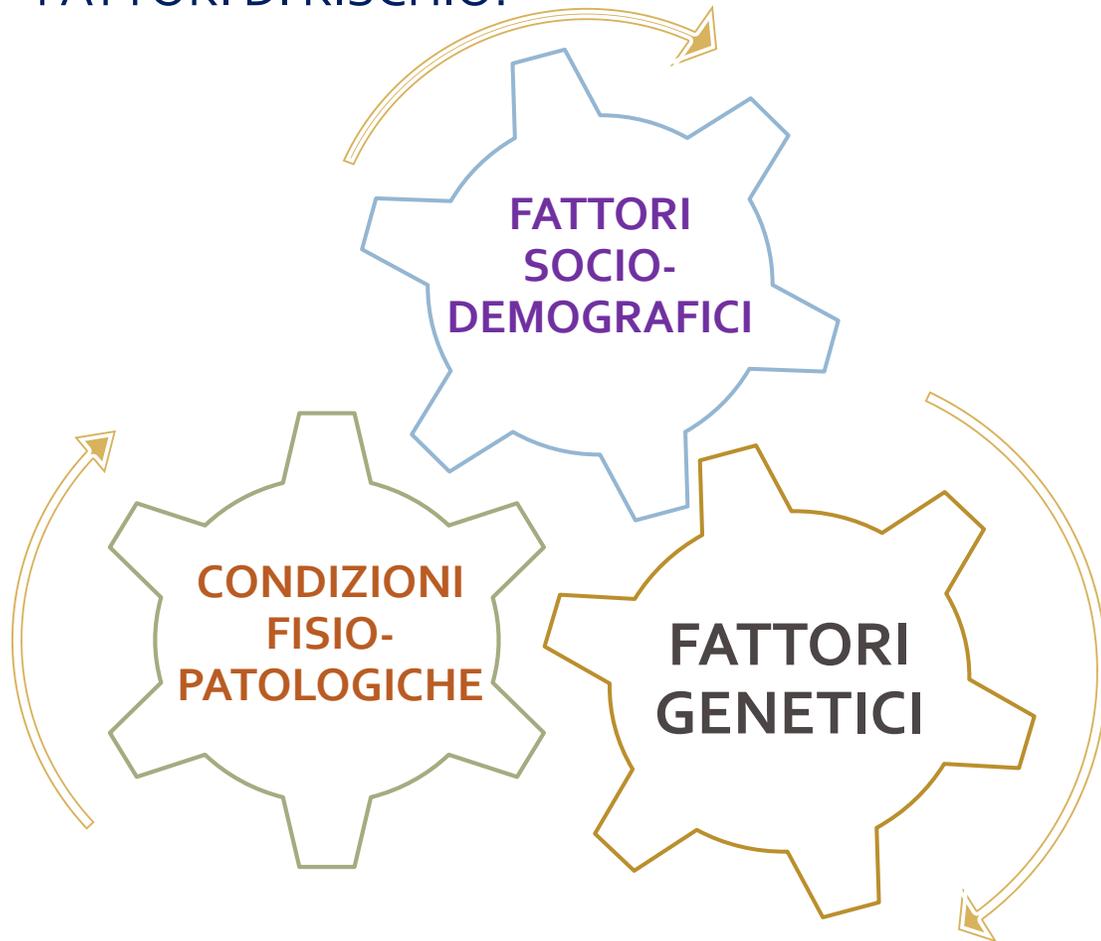


## Trend mondiali:

- La percentuale di nascite pretermine è in **crecita**
- Rappresenta la principale **causa di morte** dei neonati nel primo mese di vita e la seconda causa, dopo le pneumopatie, tra i bambini di età < 5 anni
- Più del **60%** delle nascite premature avvengono in **Africa** e in **Asia**
- In **Italia** il tasso di prematurità è attorno al 7%: riguarda circa **40.000** bambini l'anno.

# EZIOPATOGENESI DEL PARTO PRETERMINE

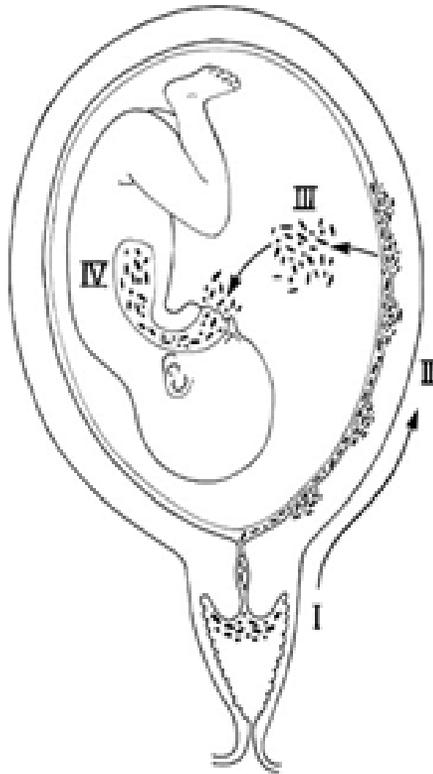
FATTORI DI RISCHIO:



Le donne nere presentano un **rischio doppio** di partorire prematuramente rispetto alle donne bianche.

# RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE E DELL'INFEZIONE NEL PARTO PRETERMINE

L'infezione è l'unico processo biologico costantemente implicato nel PTB



*Infection*

Vie di ingresso dei microrganismi:

- **Diffusione ematogena** attraverso la placenta
- Introduzione involontaria durante **interventi sanitari invasivi**
- **Percorso ascendente** dalla vagina e dalla cervice

# CONSEGUENZE DEL PARTO PRETERMINE



DECESSO NEONATALE

INFEZIONI

PARALISI CEREBRALE

DEFICIT SENSORIALI

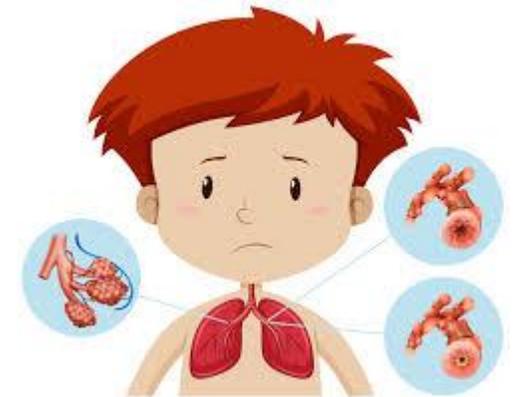
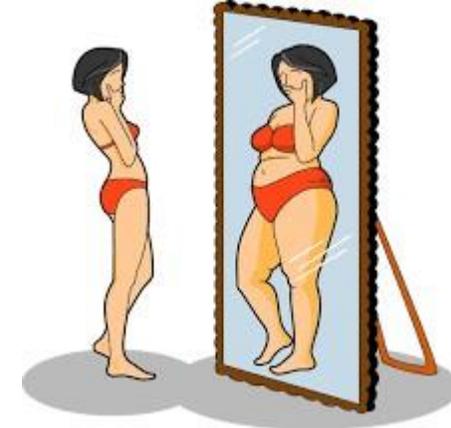
DIFFICOLTÀ DI APPRENDIMENTO

MALATTIE RESPIRATORIE

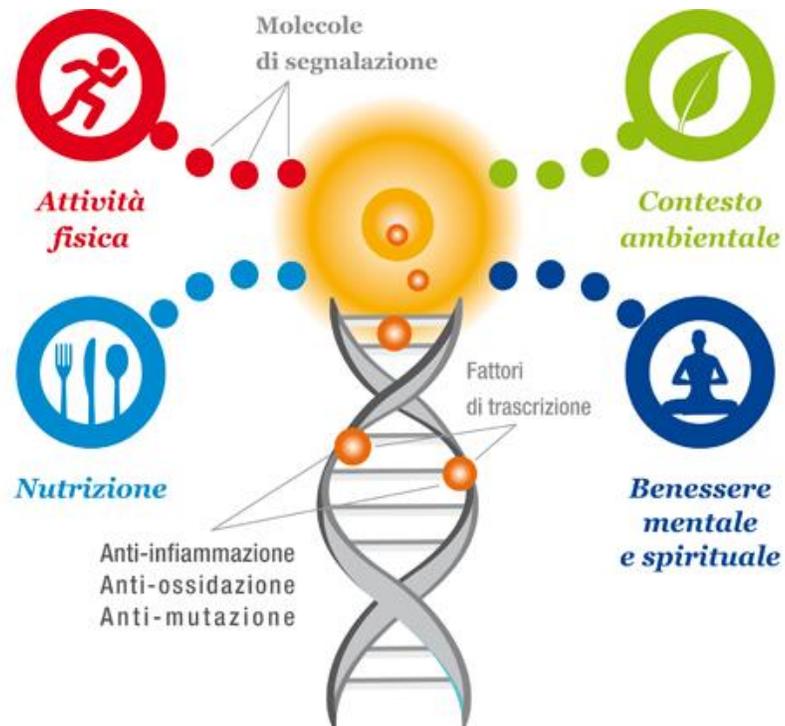
DISTURBI PSICOTICI

SVILUPPO DI ANORESSIA NERVOSA

SVILUPPO DEL DIABETE DI TIPO 2



# OBIETTIVI DELLO STUDIO



**Investigazione** sul ruolo dell'epigenetica nel parto pretermine.  
**Comparazione** tra i profili di metilazione del DNA dei bambini nati a termine e dei bambini nati pretermine.  
**Identificazione** di marcatori del DNA potenzialmente utili per un'applicazione clinica.

**EPIGENETICA «TRAIT D'UNION» TRA INFORMAZIONE GENETICA ED AMBIENTE!**

## DISEGNO DELLO STUDIO E SVILUPPO DELL'ANALISI



18 PRETERMINE



72 A TERMINE

**Studio caso-controllo** retrospettivo osservazionale.

**Campionamento di sangue cordonale**

**Estrazione del DNA**

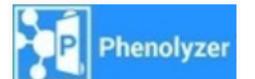
**Saggio di metilazione genome-wide** (Illumina Infinium Methylation 450K)

**Controllo qualità**

Pre-analitico, Pre-array, Post-array

**Analisi statistica:**

- Inferenza** componenti lifocitarie
- Analisi delle **variabili fenotipiche**
- Analisi delle **componenti principali**
- Analisi delle **differenze dei livelli di metilazione** tra casi e controlli
- Gene ontology** e proritizzazione
- Calcolo delle **epimutazioni**
- Confronto con la **letteratura**



# RISULTATI

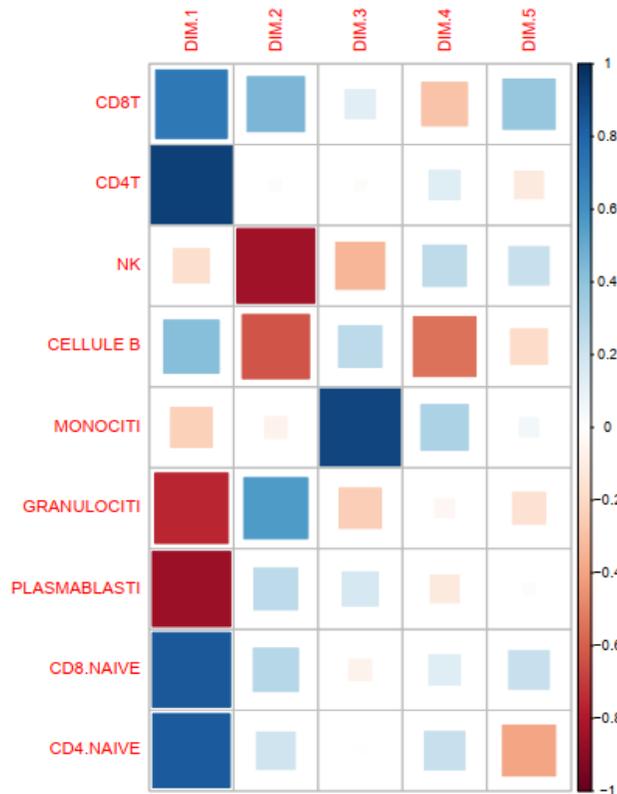
## 1. ANALISI DESCRITTIVA DELLE VARIABILI FENOTIPICHE

I DATI FENOTIPICI RELATIVI ALLE GESTANTI SONO STATI ANCHE ANALIZZATI MEDIANTE **REGRESSIONE LOGISTICA MULTIPA**: NESSUNA DELLE VARIABILI, CORRETTE PER LA VARIABILE «ETÀ», E' RISULTATA IN RELAZIONE SIGNIFICATIVA CON L'ESSERE CASO-CONTROLLO.

TABELLA

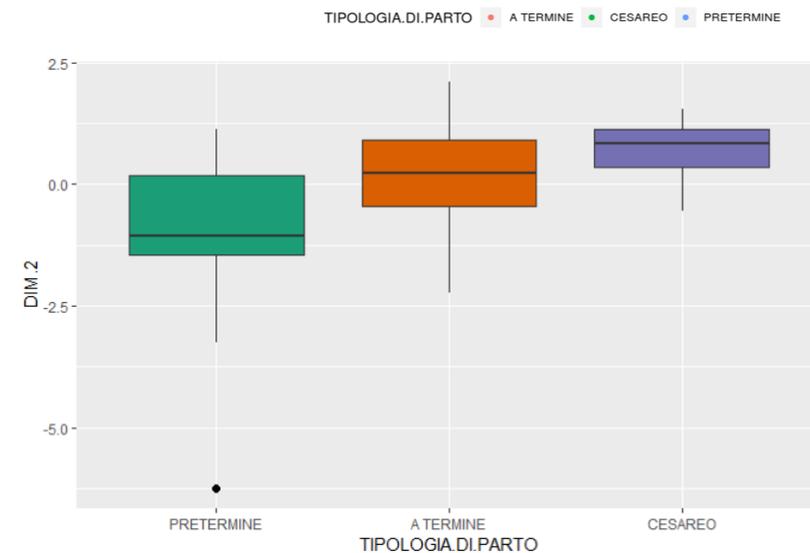
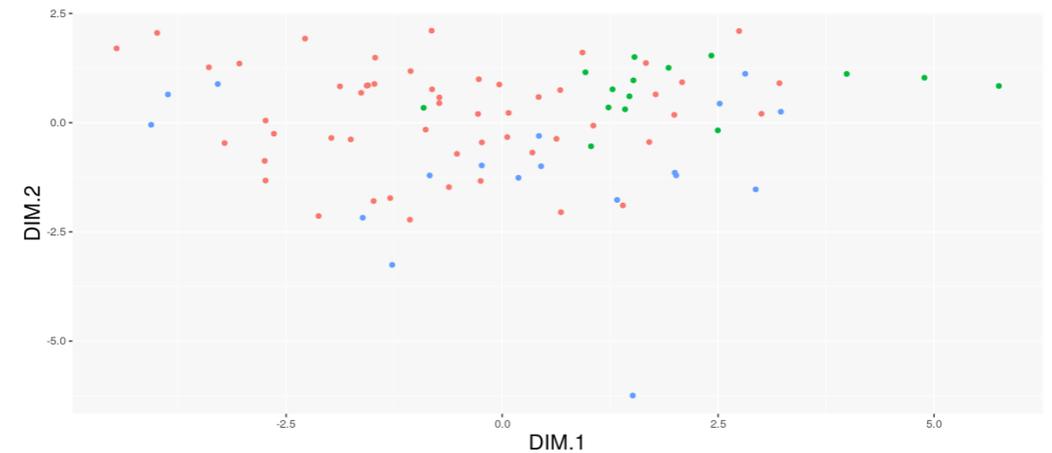
Parametri clinici dei bambini		Parto pretermine	Parto a termine(ctrl)	P.value
Numero dei soggetti		18	72	1.255e-08 **
Sesso	M	11(61%)	33(46%)	0.3701 **
	F	7(39%)	39(54%)	
Plasmablasti		1.746(0.2282)	1.841043(0.168)	0.1139 *
CD8.naive		481.052(80.994)	505.6773(61.750)	0.2408 *
CD4.naive		601.4768(176.091)	647.5592(123.992)	0.3067 *
CD8T		0.05591308(0.04)	0.06387996(0.04)	0.3829 *
CD4T		0.1912282(0.06)	0.1811221(0.05)	0.558 *
Cellule NK		0.09695331(0.07)	0.05236918(0.05)	0.0045 *
Cellule B		0.1552943(0.04)	0.1307294(0.03)	0.03207 *
Monociti		0.09342108(0.02)	0.108267(0.03)	0.124 *
Granulociti		0.4308162(0.11)	0.4969962(0.09)	0.03242 *
Peso alla nascita		2366.11(520.69)	3251.18(456.15)	0.000020 *
Parto eutocico/cesareo		EUT 18 (100%) CES 0 (0%)	EUT 53 (74%) CES 19 (26%)	0.03 **
Parametri clinici delle madri				
Età		33.27(6.49)	34.77(5.03)	0.37 *
BMI		21.49(2.47)	22.42(3.88)	0.60 *
Peso corporeo prima della gravidanza		56.16(7.40)	60.40(12.12)	0.33 *
Incremento del peso corporeo in gravidanza		10.66(4.15)	12.22(4.57)	0.29 *
Malattia durante la gravidanza		4(22%)	26(36%)	0.4017 **
Diabete		2(11%)	4(6%)	0.7513 **
Ipotiroidismo		1(6%)	10(14%)	0.5733 **
Fumo		4(22%)	16(22%)	1 **
Assunzione di acido folico		17(94%)	68(94%)	1 **
Durata della gravidanza espressa in gg		243.16(18.81)	275.58(8.39)	7.252e-11 *

## 2. ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI



La **DIM2** raccoglie la variabilità relativa ai sottotipi linfocitari: **CELLULE NK, GRANULOCITI, CELLULE B**

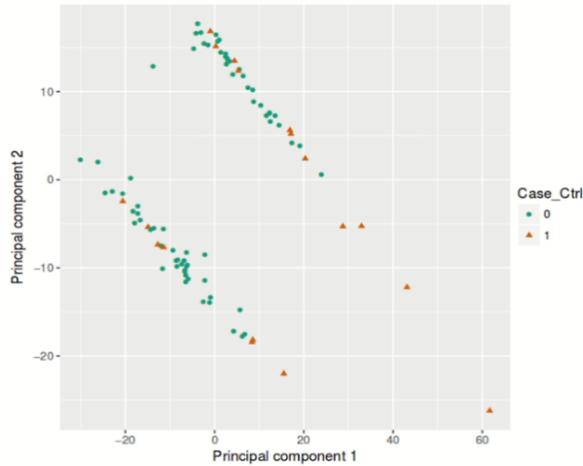
## SOTTORAGGRUPPAMENTO DELLA VARIABILE «TIPOLOGIA DI PARTO»



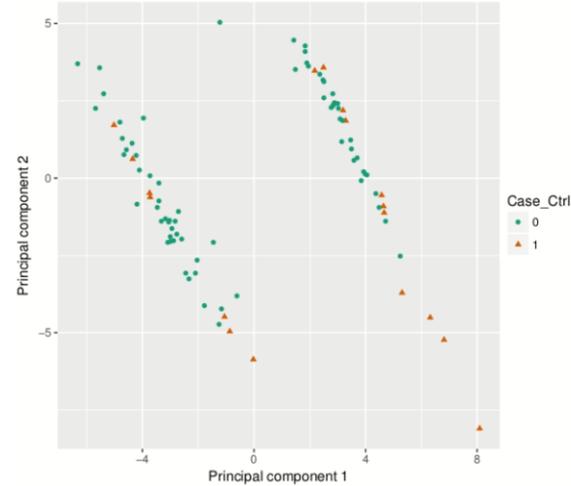
### 3. ANALISI DIFFERENZIALE DEI LIVELLI DI METILAZIONE

L'analisi esplorativa del metiloma è stata condotta a livello di:

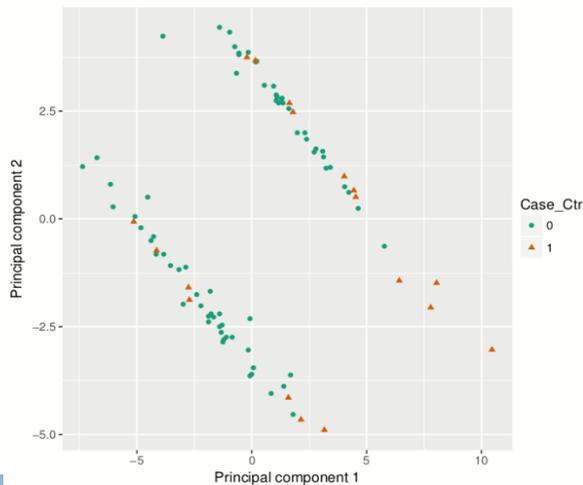
#### Siti CpG



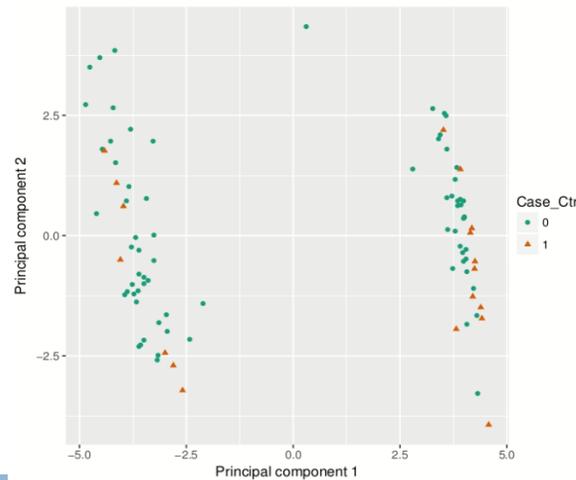
#### Promotori



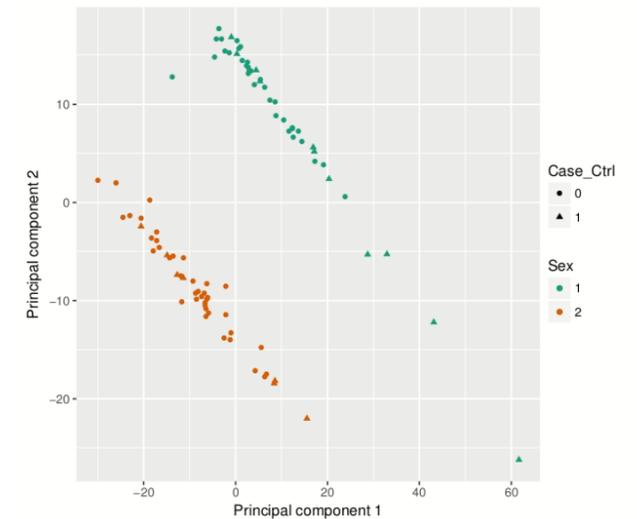
#### Geni



#### Isole CpG



**Non** sono emerse differenze macroscopiche nei livelli di metilazione del DNA.



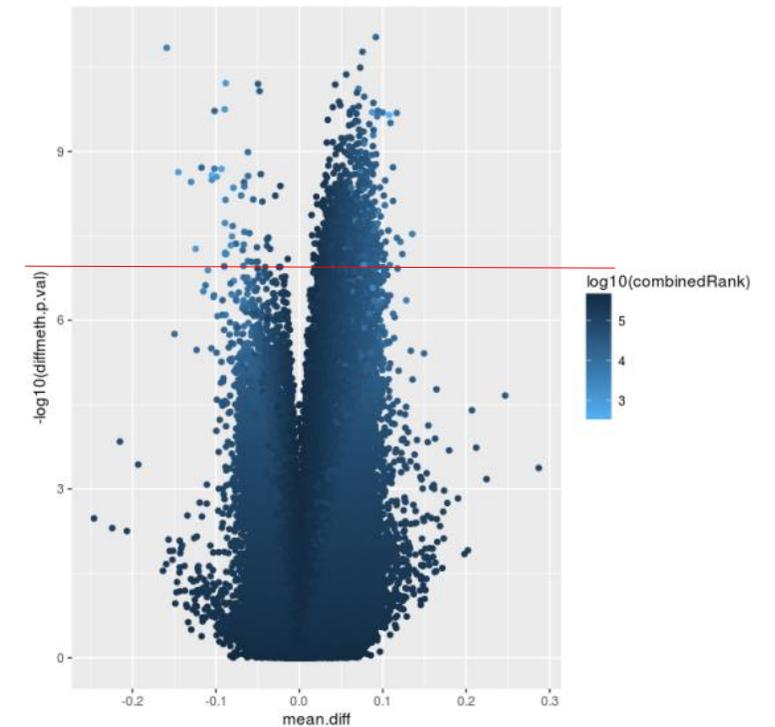
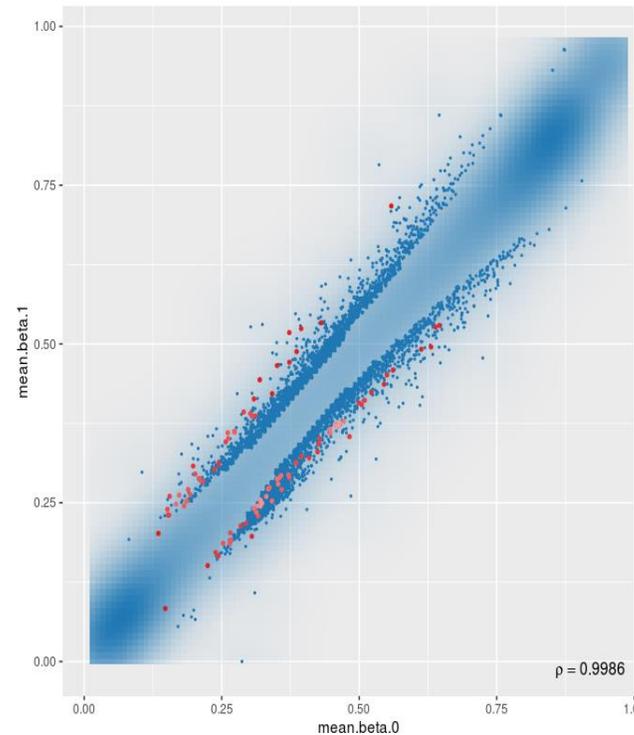
**DOVUTA AL SESSO!**

## 4. ANALISI DIFFERENZIALE IN SITI E REGIONI

Per l'analisi differenziale sono state utilizzate come **covariate**:

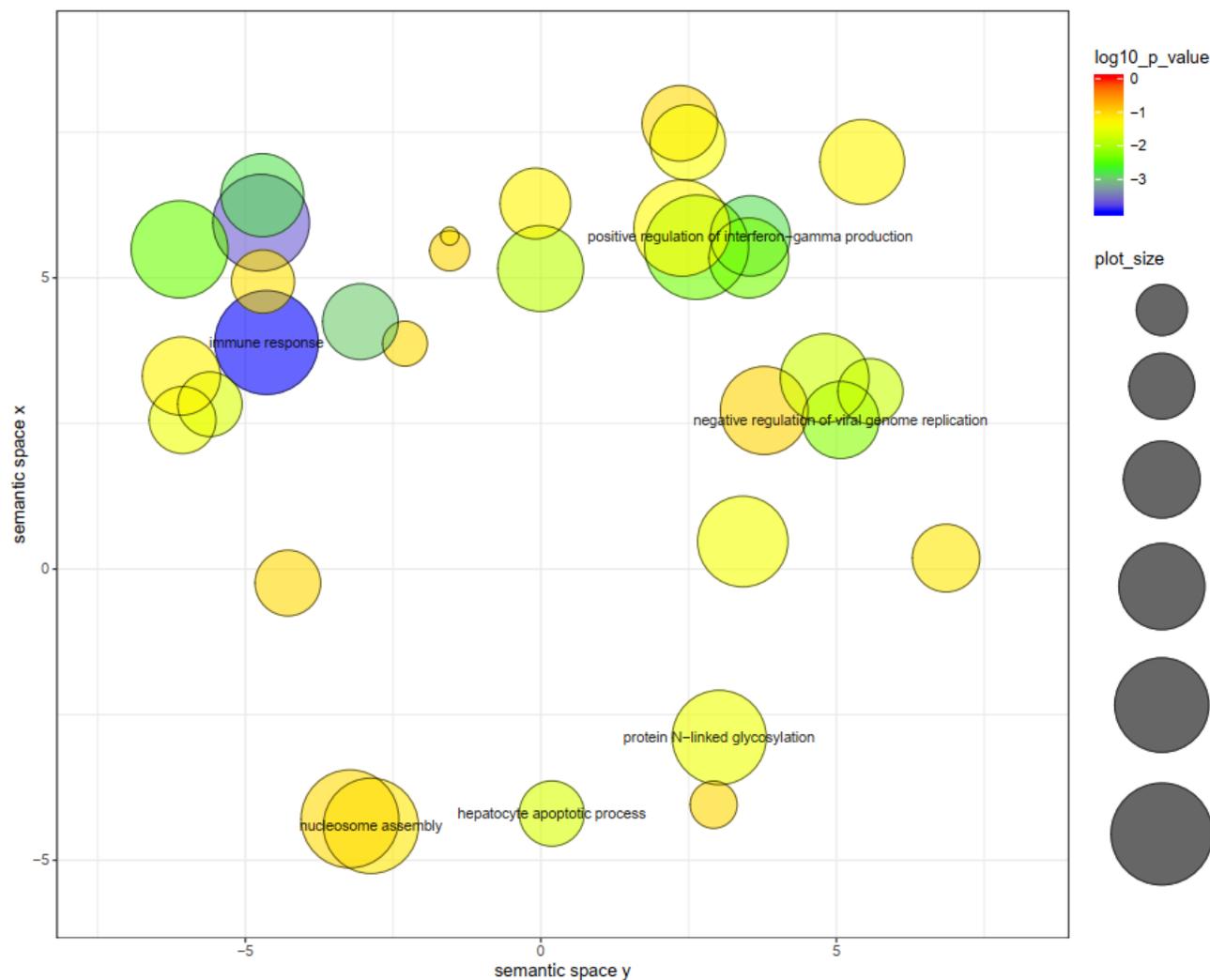
- **Le componenti principali** relative sia alle variabili fenotipiche che ai sottotipi linfocitari
- L'analisi delle variabili surrogate (**sva**)
- **Il sesso**

Dall'analisi condotta a livello di siti CpG, promotori, Geni, Tiling ed isole CpG sono emerse **differenze statisticamente significative** a livello **Genome-wide**.



## 5. GENE ONTOLOGY

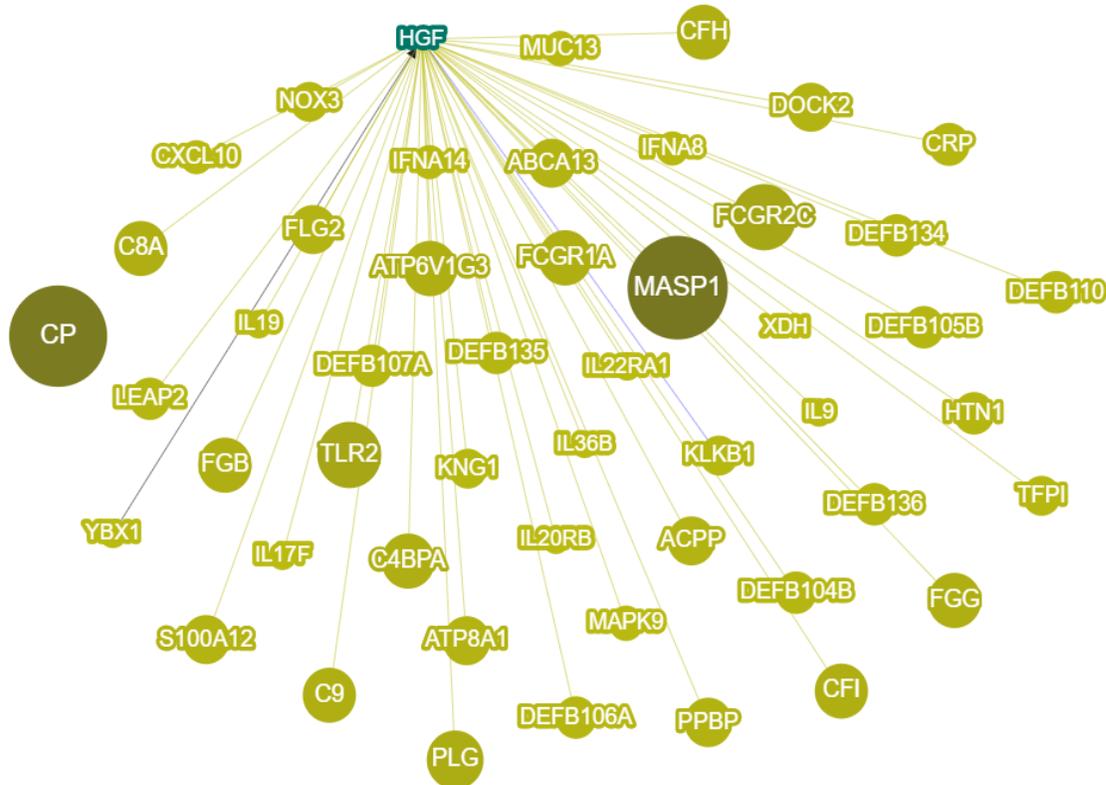
I geni risultati ipo ed ipermetilati, con p.value aggiustato  $<0.05$ , sono stati sottoposti all'analisi di gene ontology.



### GENI IPERMETILATI

Keywords	KW description	count	p.value
UP_KEYWORDS	Immunity	22	3,0E-4
UP_KEYWORDS	Innate immunity	14	9,2E-4
UP_KEYWORDS	Antiviral defense	8	4,9E-3
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	32	1,1E-2
UP_KEYWORDS	Inflammatory response	8	2,0E-2
UP_KEYWORDS	Nucleosome core	6	2,2E-2
UP_KEYWORDS	Acetylation	77	2,6E-2
UP_KEYWORDS	Antibiotic	6	2,8E-2
UP_KEYWORDS	RNA-binding	20	3,2E-2
UP_KEYWORDS	Transit peptide	17	3,3E-2
UP_KEYWORDS	Alternative initiation	6	3,9E-2
UP_KEYWORDS	Cytoplasm	102	4,1E-2
UP_KEYWORDS	Antimicrobial	6	4,5E-2
UP_KEYWORDS	Cytokine	8	5,6E-2
UP_KEYWORDS	TPR repeat	7	8,1E-2
UP_KEYWORDS	Growth regulation	4	8,2E-2
UP_KEYWORDS	Microsome	6	8,3E-2
UP_KEYWORDS	Lectin	7	8,8E-2
UP_KEYWORDS	Activator	18	8,8E-2
UP_KEYWORDS	Citrullination	5	9,7E-2

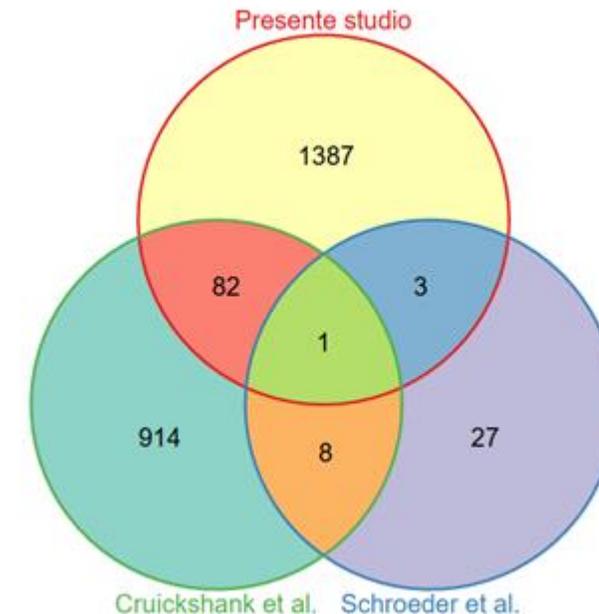
## 6. PRIORITIZZAZIONE E CONFRONTO CON LA LETTERATURA



**CRHBP:** Gene che codifica per una proteina legante il fattore che rilascia la corticotropina.

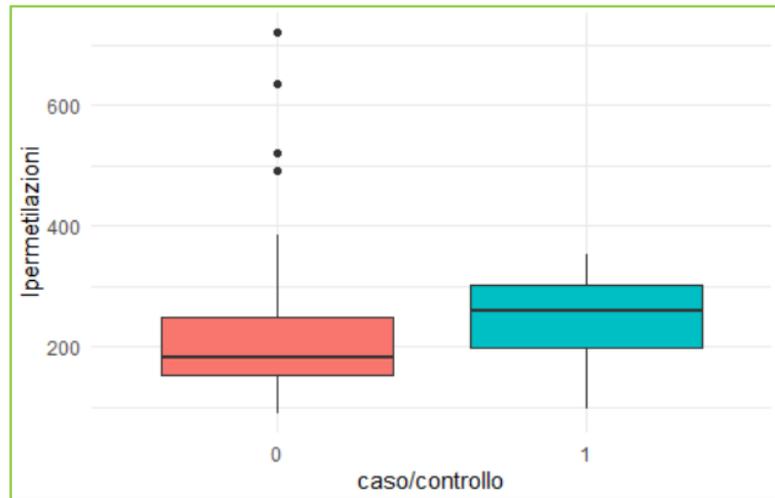
**HGF:** Gene notoriamente implicato nel parto pretermine

**MASP1:** Gene che codifica per una proteasi serinica in grado di amplificare il segnale di attivazione del sistema del complemento.

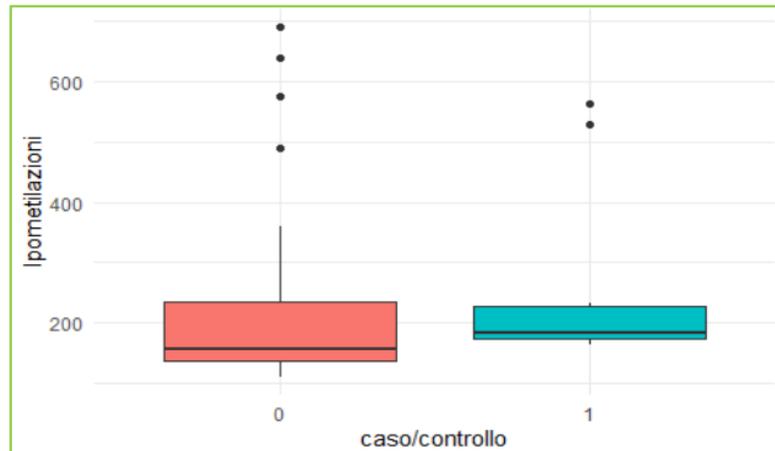


## 7. CALCOLO DELLE EPIMUTAZIONI

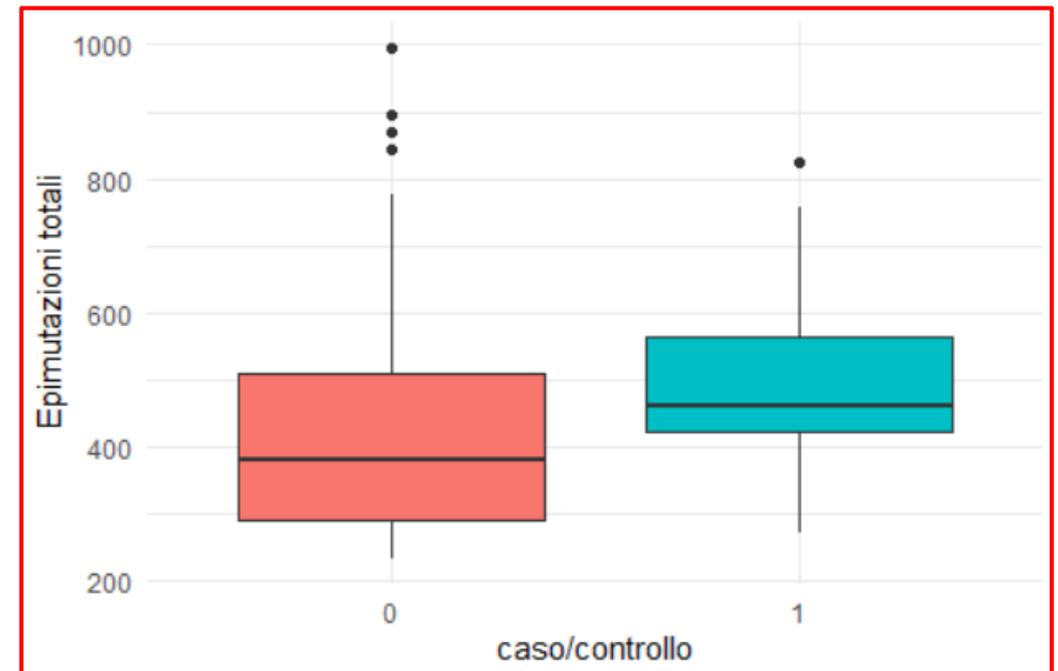
### Ipermetilazioni



### Ipometilazioni



### EPIMUTAZIONI TOTALI



# CONCLUSIONE

1. È stato confermato il **coivolgimento del sistema immunitario** nel parto pretermine.
2. Sono state evidenziate **differenze epigenetiche** anche a seguito delle correzioni.
3. Dalla sovrapposizione con i dati presenti in letteratura è emerso il **gene CRHBP**, il quale potrebbe rivelarsi un utile biomarcatore del parto pretermine.



## LIMITI DELLO STUDIO:

- Bassa numerosità campionaria
- Ulteriori fattori confondenti non considerati
- Fattori confondenti intrinsecamente legati al fattore in studio

## SVILUPPI FUTURI:

- Approfondimento sui potenziali marcatori MASP1 e CRHBP tramite replica
- Coivolgimento dei dati delle gestanti

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

