



# Analisi critica degli indicatori di progressione

**Annarosa Del Mistro, IOV-IRCCS Padova**

***Il sottoscritto Annarosa Del Mistro***

*ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-Regione del 5 novembre 2009,*

dichiara

***X che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario***

*che negli ultimi due anni ha avuto rapporti diretti di finanziamento con i seguenti soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario:*

- .....
- .....
- .....

# Applicazioni cliniche degli indicatori

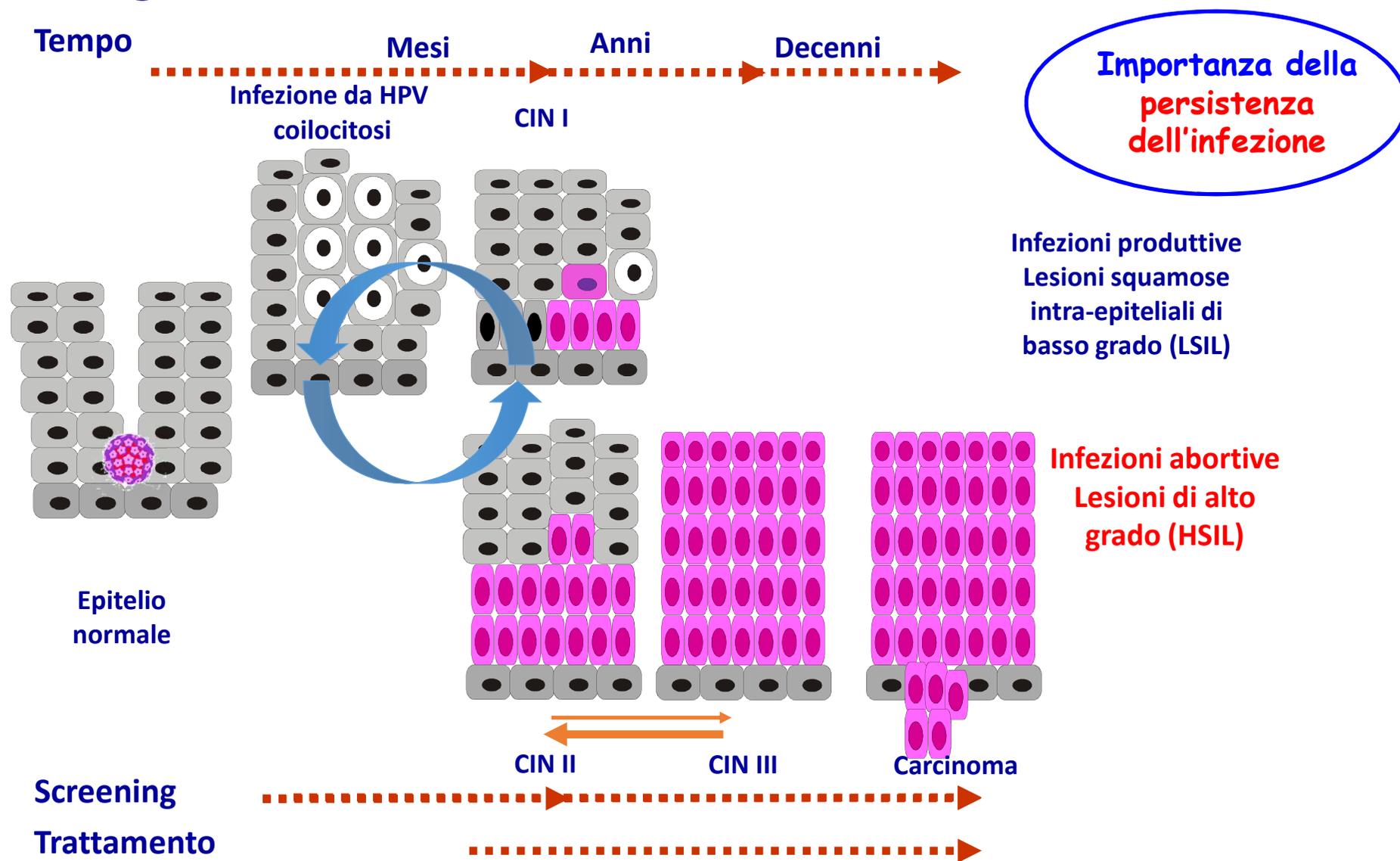
## Biomarcatori per lo screening cervicale:

- triage delle donne hrHPV+ a maggior rischio di avere / sviluppare una lesione di alto grado (CIN3+)
- identificare fra le donne con alterazioni citologiche di basso grado quelle con il più alto rischio di CIN3+
- rilevare CIN3+ nelle donne in uscita dal programma di screening

## Stratificazione del rischio di donne con lesioni preneoplastiche (CIN, VIN, AIN)

- predizione di (non) regressione / progressione

# Progressione da infezione HPV a malattia

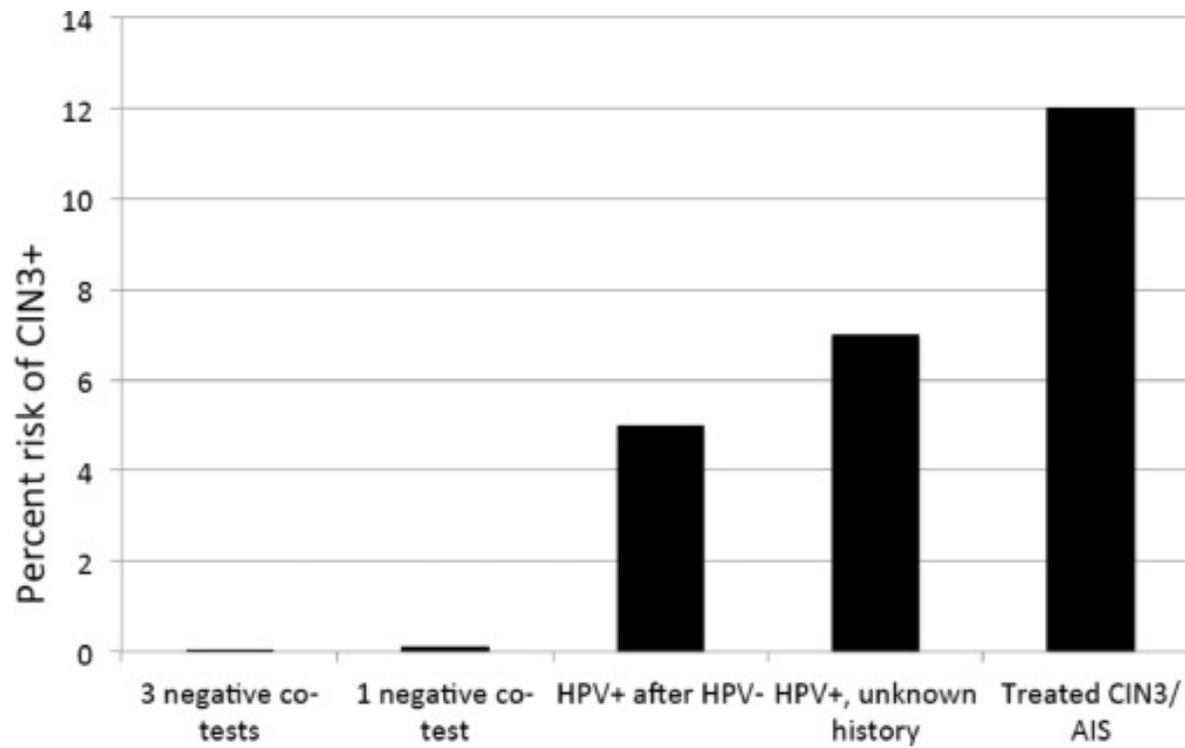


- L'infezione persistente con tipi oncogeni di HPV della cervice uterina è la causa necessaria del carcinoma
- Il carcinoma è un evento raro di un'infezione frequente
  - il riscontro di un'infezione HPV non è una diagnosi di malattia ma l'indicazione ad eseguire approfondimenti sulla base delle evidenze scientifiche
- La risoluzione spontanea della maggioranza delle infezioni richiede un tempo di mesi/anni
  - le modalità (tipologia e tempistica) degli approfondimenti devono garantire elevata sensibilità nell'identificazione precoce delle lesioni di alto grado e devono essere ridotti al minimo necessario per le donne non a rischio

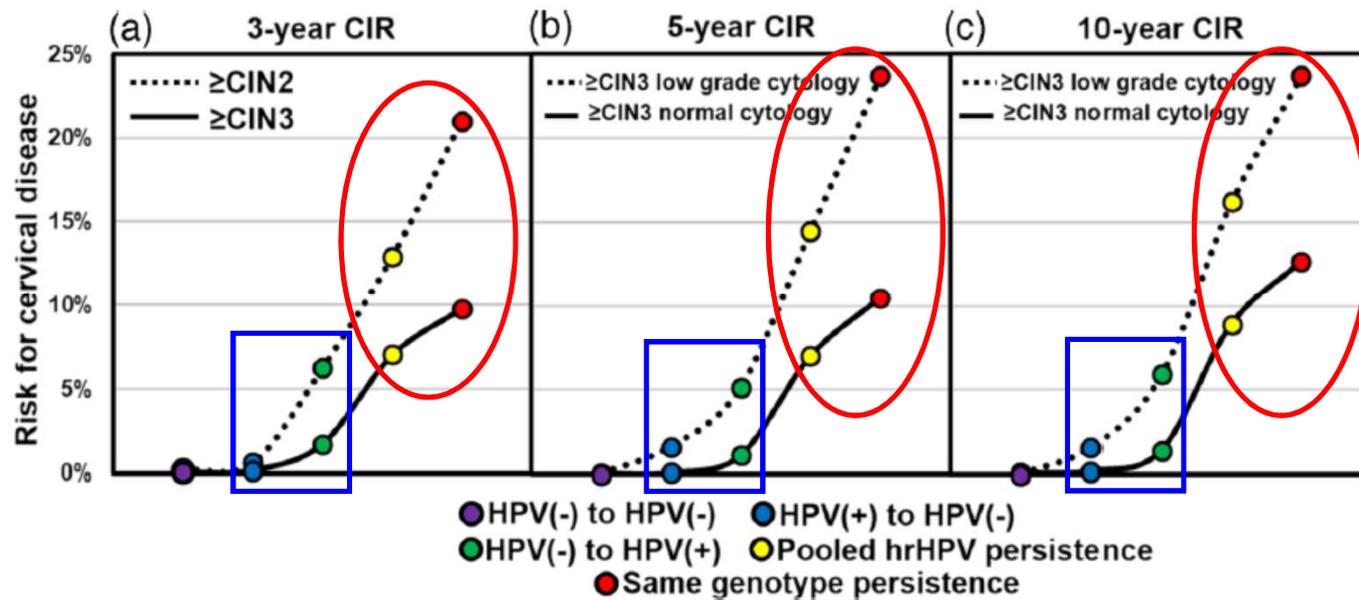
## Persistenza di HPV come marcatore di malattia

- La persistenza di HPV in round consecutivi di screening è stata identificata come marcatore di malattia in donne HPV-pos / citologia-neg
- La ripetizione di test ad intervalli brevi (es. 1 anno) comporta un aumentato numero di controlli senza rilevazione di CIN3+
- Necessario verificare l'efficienza e la sicurezza di intervalli più lunghi (es. 3-5 anni) che potrebbero aumentare l'efficienza

## Rischio di CIN3+ in base alla storia precedente



Rischio cumulativo incidente di sviluppare lesioni di alto grado in relazione alla **persistenza** dell'infezione in donne con citologia normale o con alterazioni di basso grado



**Possibile utilizzare altri biomarcatori?**

## GENOTIPIZZAZIONE

PARZIALE E COMPLETA

Anche fra i tipi di HPV ad alto rischio, il potenziale oncogeno (rischio di sviluppare CIN3+) differisce in relazione allo specifico tipo (*e alla carica virale*)

## mRNA E6/E7

La ricerca di sequenze mRNA E6/E7 dei tipi di HPV ad alto rischio identifica infezioni in cui il virus è attivo: i dati indicano che non è un buon metodo di triage, ma che può essere utilizzata come test primario

## p16/ki67

L'espressione delle proteine p16 (overespressa a seguito dell'attività degli oncogeni HPV) e ki67 (marcatore di proliferazione cellulare) correla con la gravità delle lesioni preneoplastiche

## METILAZIONE

GENI UMANI E VIRALI

La metilazione controlla l'espressione genica. I livelli di metilazione di diversi geni cellulari e di alcuni geni virali (L1 e L2) aumentano con l'aumentare del grado di severità delle lesioni, e virtualmente tutti i carcinomi sono positivi per metilazione

# Tipo HPV e rischio di CIN3+

## Ruolo di HPV 16

- Tipo più frequente in carcinomi e CIN2+
- Tipo più persistente
- Ha il più alto valore positivo predittivo (PPV) per carcinoma e CIN2+

## Ruolo di HPV 18

- Relativamente più frequente in carcinomi che in CIN2/3
- Associato con l'adenocarcinoma e le lesioni nel canale endocervicale, meno facilmente visibili alla colposcopia
- Tipo più frequente, insieme ad HPV16, in campioni con diagnosi di AGC
- PPV per CIN2+ simile ai tipi non-HPV 16

## Ruolo di HPV 33 (e 31)

- Molto meno prevalenti di HPV 16
- PPV per CIN2+ più alto di altri tipi ad alto rischio (simile a quello di HPV 16)
- Meno associato a carcinomi dei tipi 16 e 18

Studio NTCC. Genotipizzazione di 2.255 campioni hrHPV+. Sulla base dei valori di VPP per CIN2+ e CIN3+ (baseline e 3 anni FU), è stato determinato un ranking gerarchico, che ha permesso di suddividere i tipi HPV in 3 clusters

cluster	genotipo	PPV (%) CIN2+	cluster	genotipo	PPV (%) CIN3+
A	HPV33	22,39	A	HPV33	11,94
	HPV16	15,81		HPV16	8,78
	HPV35	15,82		HPV35	8,87
B	HPV31	13,99	B	HPV58	8,10
	HPV52	13,51		HPV59	7,80
	HPV18	12,68		HPV68	7,58
	HPV59	12,46		HPV31	6,43
	HPV58	12,00		HPV18	5,93
				HPV52	5,74
C	HPV39, HPV51, HPV56, HPV45, HPV68	11,64-9,61	C	HPV39, HPV45, HPV51, HPV56	5,51-4,57

Questi sono i dati al baseline. Il cluster A si conferma anche nell'analisi longitudinale.

**Tipizzazione parziale, estesa, completa?**

**Tipizzazione per singolo tipo?**

**Tipizzazione per gruppi?  
Quali tipi raggruppare?**

**Disponibilità del dato di tipizzazione (test unico, o necessità di effettuare più test)**

# Espressione di p16/ki67 e rischio di CIN2+/3+

Figure 2. Cumulative Risk of  $\geq$ CIN2 and  $\geq$ CIN3 by p16/Ki-67 Dual-Stain Testing (DS) and Papanicolaou Cytology (Pap) Results

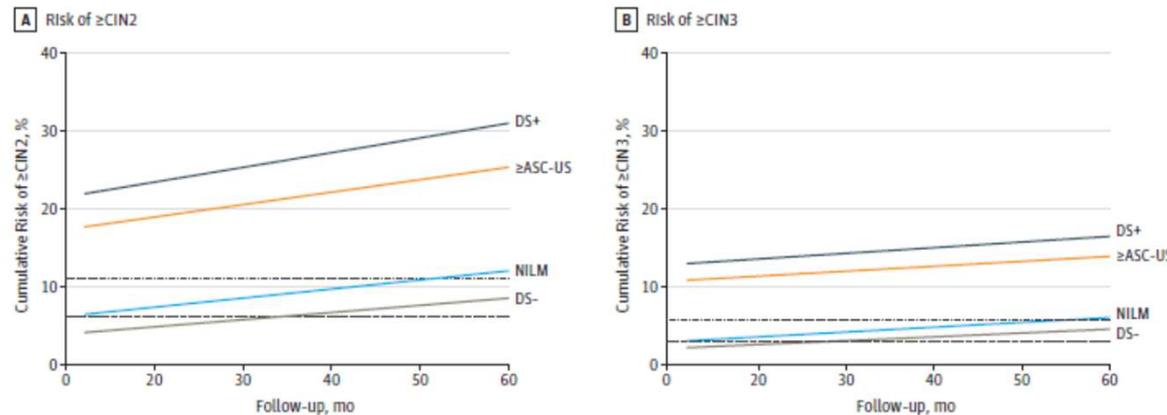
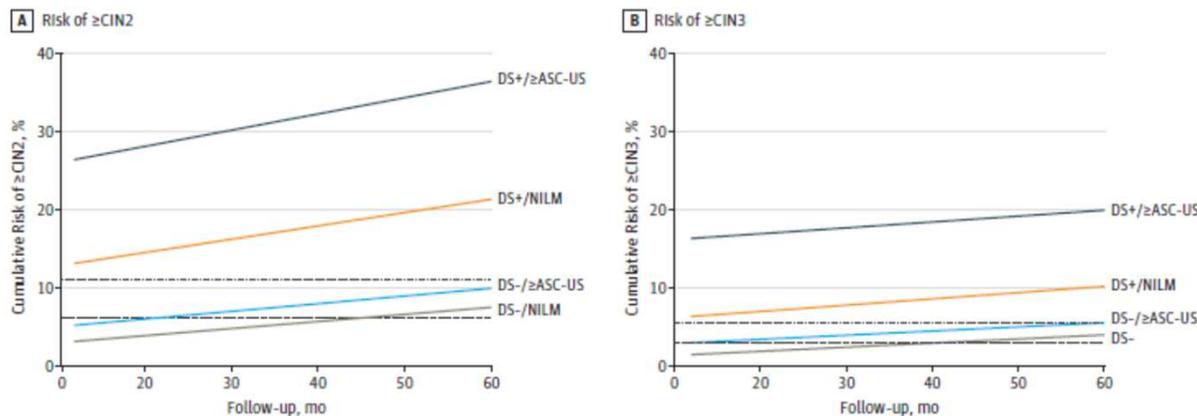


Figure 3. Cumulative Risk of  $\geq$ CIN2 and  $\geq$ CIN3 by Combined Categories of p16/Ki-67 Dual-Stain Testing (DS) and Papanicolaou Cytology (Pap) Results



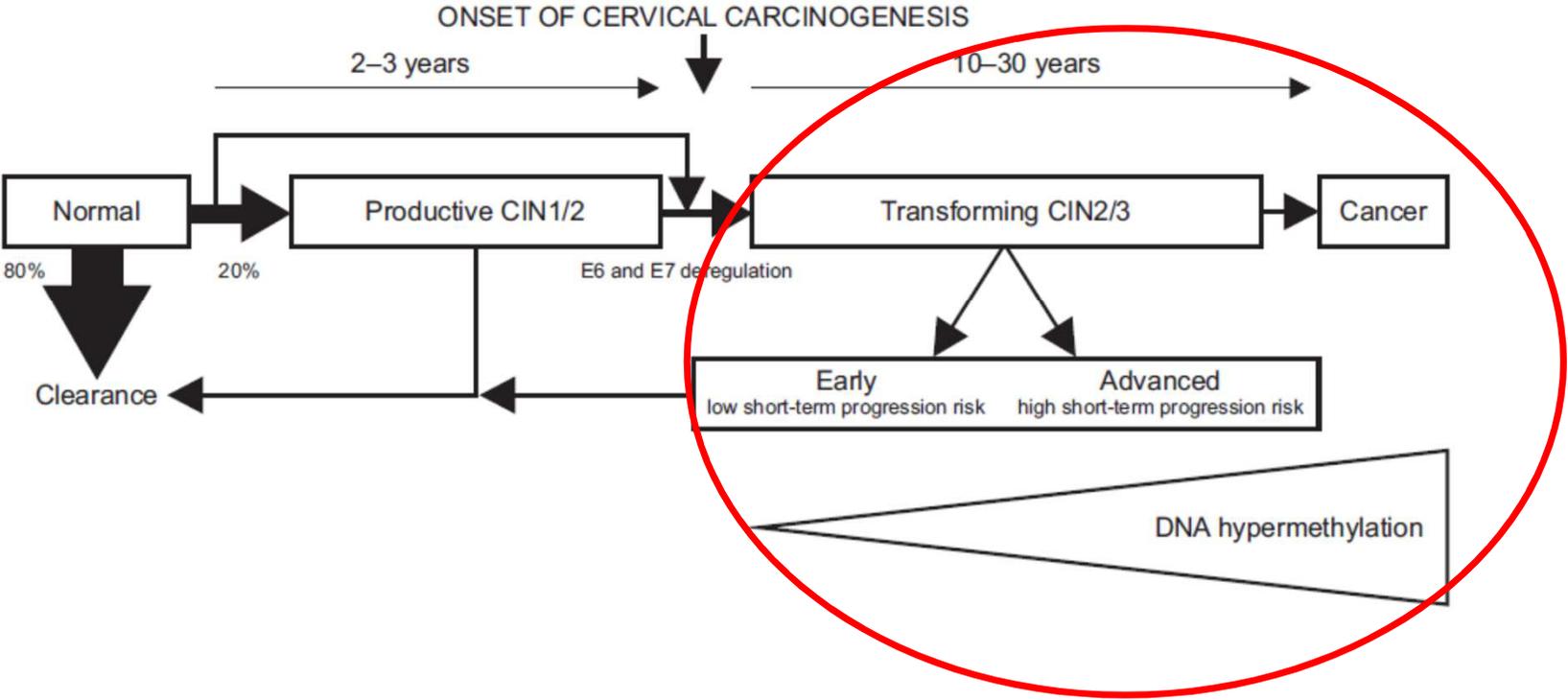
- Coorte trial KPNC
- Screening con co-testing
- Studio prospettico - 5 anni FU
- 1549 donne HPV-pos (età media all'arruolamento 42.2 anni)
- Analisi di p16/ki67 come test di triage solo su popolazione selezionata (escluse 34.5%)

→ Donne con test HPV-pos e p16/ki67-neg (rischio CIN3+ 7.5%): possono non fare la colposcopia immediata ed essere ritestate dopo 3 anni

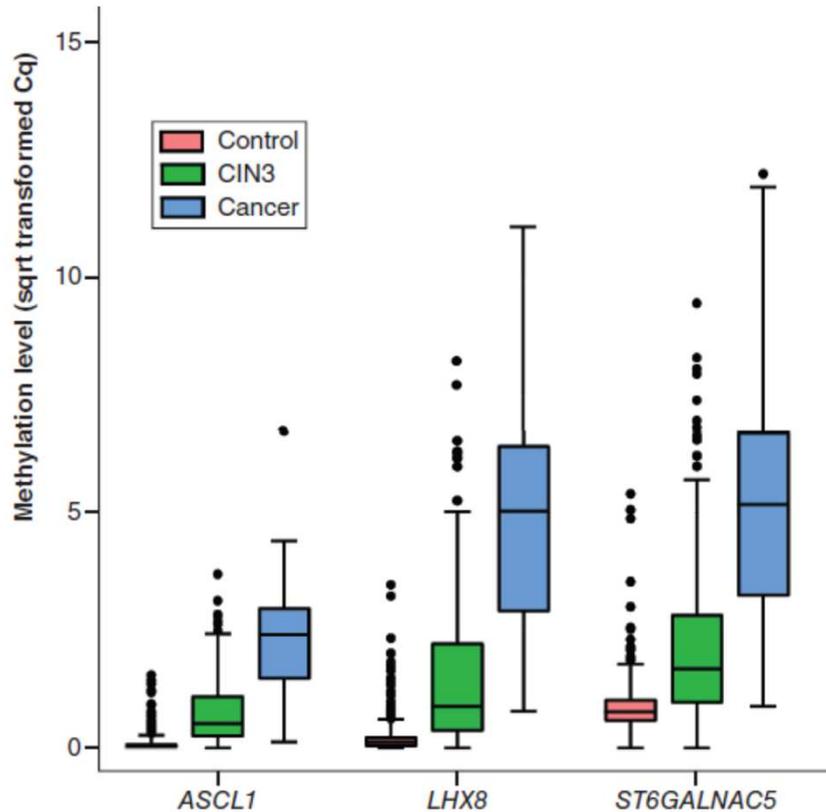
Dati coerenti con i risultati NTCC su performance di p16 valutata a 3 anni (rischio CIN3+ 1.7%)

→ Qual è il grado di accettabilità di intervalli più lunghi? (sia per le donne che per gli operatori)

# Metilazione cellulare



# Metilazione cellulare



Epigenomics 2020

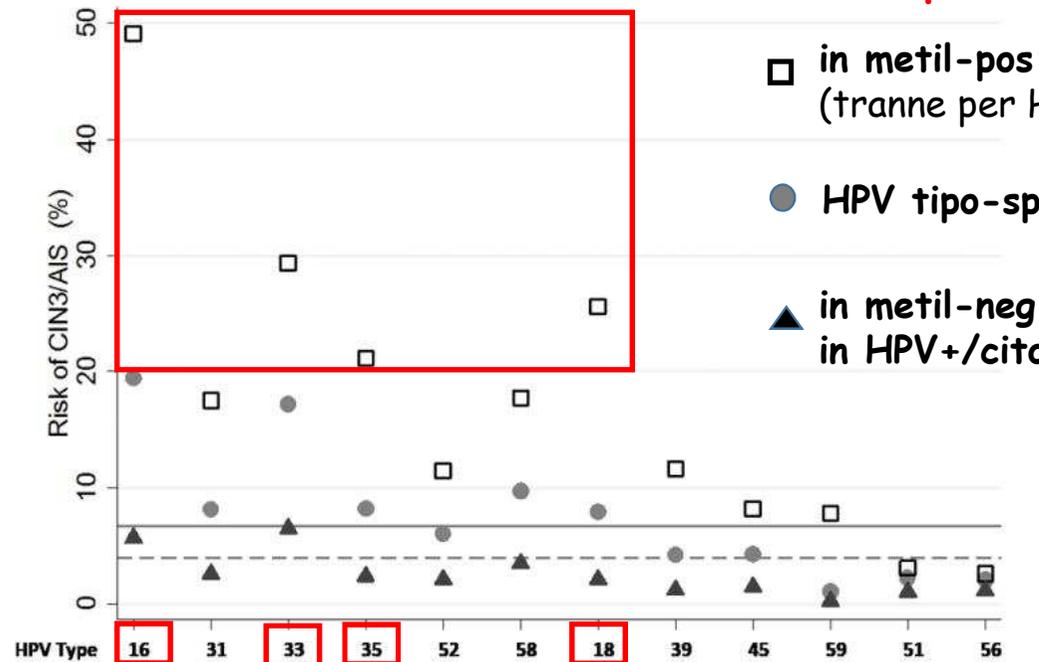
**Virtualmente tutti i carcinomi cervicali sono positivi per metilazione**

Studio su 519 carcinomi

<b><i>FAM19A4/miR124-2</i> genes</b>		
<b>Methylation positivity in cervical carcinomas</b>		
<b>Histotype</b>		
squamous carcinoma	313/318	98.4%
adenocarcinoma	121/123	98.4%
adenosquamous carcinoma	42/42	100.0%
rare/not specified carcinomas	34/36	94.4%
<b>Geographical region</b>		
Europe	318/323	98.5%
Africa	62/63	98.4%
Asia	74/76	97.4%
North America	14/14	100.0%
South America	42/43	97.7%
<b>Total</b>	<b>510/519</b>	<b>98.3%</b>

# Metilazione virale

## Rischio per CIN3/AIS



□ in metil-pos: più alto del rischio in HPV+/ASC-US (tranne per HPV51 e 56)

● HPV tipo-specifico

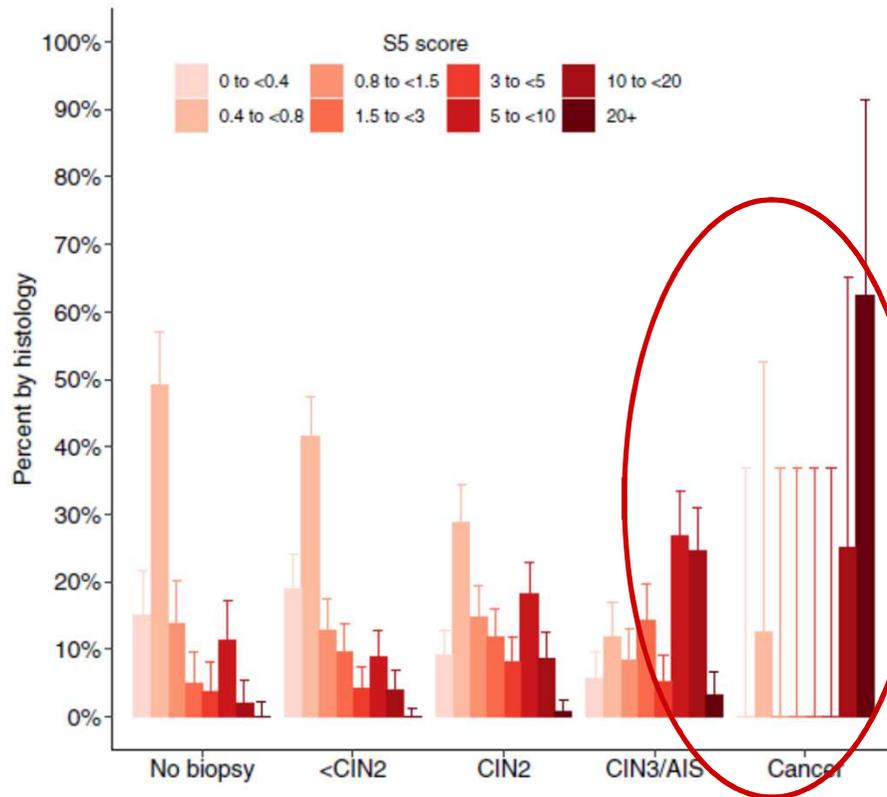
▲ in metil-neg: più basso della soglia per richiamo a 1 anno in HPV+/cito-neg (tranne per HPV16 e 33)

- Coorte trial KPNC
- Screening con co-testing
- Analisi metilazione mediante NGS
- Analizzati solo campioni con infezione da un unico tipo di HPV (299 casi e 360 controlli)
- Stima del rischio riportata a 30.000 donne

→ Un test di metilazione HPV tipo-specifico ha le potenzialità per essere un test di triage in donne hrHPV+ (in Paesi industrializzati)

HPV Type	16	31	33	35	52	58	18	39	45	59	51	56
Gene	L1	L1	L1	L2	L2	L1	L1	L1	L1	L1	L2	L1
CpG Site	5602	6363	7034	4244	4258	6446	7041	5731	7088	5584	5533	5570
Cases (n)	1,107	274	65	62	238	109	149	50	61	10	59	25
Controls (n)	4,592	3,098	314	691	3,686	1,012	1,732	1,131	1,359	916	2,628	1,207
Specificity	80.0%	66.7%	60.0%	73.3%	60.0%	60.0%	80.0%	73.3%	60.0%	90.0%	43.3%	36.6%
AUC	0.84	0.75	0.73	0.81	0.77	0.74	0.86	0.85	0.82	0.91	0.71	0.71

# Metilazione cellulare + virale (S5 classifier) (gene cellulare EPB41L3 + HPV16 + HPV18 + HPV31 + HPV33)



**Punteggi S5 elevati sono associati con gradi istologici maggiori (mediana 5.97 per CIN3 e 22.59 per cancro)**

## Biomarcatori di triage nello screening

- parametri da valutare per definire l'applicabilità clinica:

- Endpoint: CIN2+ o CIN3+
- Sensibilità per endpoint immediato
- Sensibilità a medio-lungo termine
- PPV (valore predittivo positivo)
- Specificità: referral rate a colposcopia; NPV (valore predittivo negativo)
- Fattibilità
- Accettabilità
- Costi

## Considerazioni conclusive

- I risultati di biomarcatori molecolari, insieme alla storia di screening e ai dati di altri indicatori, possono migliorare la gestione delle donne ai diversi livelli del percorso di screening  
→ management basato sul rischio
- L'applicabilità clinica degli indicatori di progressione (ed in particolare dei biomarcatori molecolari, utilizzabili anche nei campioni auto-prelevati) richiede la valutazione (in popolazione di screening) di diversi parametri e la loro eventuale combinazione
- L'obiettivo dello screening e del management basato sul rischio è quello di migliorare e personalizzare il percorso delle donne a maggior rischio di avere/sviluppare una lesione CIN3+, e nel contempo ridurre allo stretto necessario il numero di interventi (diagnostici e terapeutici) nelle donne con infezione/lesione transiente, e può comportare cambiamenti importanti nel protocollo



***Grazie per l'attenzione***