

## Biomarkerii de metilare *FAM19A4* și *miR124*

Test de metilare **PreCursor-M+** pentru detecția calitativă a gradului de metilare de la nivelul promotorului genelor *FAM19A4* și *hsa-miR124-2* din celulele gazdă.

Marcă CE-IVD.

### Răspuns la trei întrebări esențiale din practica ginecologică:

- Care dintre pacientele cu diagnostic biopsic HSIL/CIN2,3 au risc de progresie către cancer invaziv pe termen scurt? ⇒ *prognostic evoluție***  
Situatii clinice particulare: CIN2 tinere nulipare, CIN3 în sarcină
- Care paciente HPV pozitive au nevoie de colposcopie și tratament și care pot fi doar supravegheate? ⇒ *triaj și stratificarea riscului în locul triajului citologic „reflex” în screeningul primar HPV***  
Situatie particulară în screening: Evaluarea riscului lezional la paciente HPV pozitive cu rezultate ASC-US/LSIL la triajul citologic
- Care dintre pacientele cu intervenții pentru precancer de col au risc de recidivă?**

### Principiul metodei

- **Infecția cu HPV este insuficientă pentru a conduce singură la transformarea unui precancer al colului uterin în cancer.** La procesul oncogenetic contribuie și unele **modificări epigenetice** care au loc la nivelul genomului gazdă, între care **inactivarea genelor tumoro-supresoare prin metilarea ADN-ului din regiunile promotoare ale celulei gazdă** este un eveniment comun.
- Metilarea ADN este un mecanism epigenetic care constă în transferul unui grup metil la citozină, cu formarea de 5-metilcitozină, care modifică activitatea segmentului de ADN afectat fără a schimba secvența structurală a acestuia.
- Numeroase studii recente arată că **gradul de severitate a leziunilor (de la CIN1 la CIN3) și riscul acestora de progresie către cancer cresc paralel cu creșterea nivelului de metilare a genelor tumoro-supresoare specifice**, proces denumit și hipermetilare.
- Astfel, **markerii de metilare sunt capabili să facă diferența între**
  - leziunile cervicale precanceroase spontan regresive (cu risc scăzut, care pot fi supravegheate) și
  - cele cu un real potențial evolutiv pe termen scurt către o formă de cancer HPV indus (cu risc înalt, care necesită tratament imediat).
- Informația oferită de nivelul de metilare **este esențială în adoptarea atitudinii medicale adecvate la caz și reprezintă o noutate care se transferă din cercetarea științifică recentă în practica medicală.**

Valorile de metilare nu sunt dependente de genotipul HPV.

## Tehnica

- **Test Real-time PCR Multiplex specific** care utilizează ADN extras din probe recoltate de la nivelul colului uterin după conversie cu bisulfit, sau probe tratate direct cu bisulfit.
- **Țintă: promotorul hipermetilării de la nivelul a două gene *FAM19A4* și *hsa-miR124-2* asociate cu cancerul de col**
- **Tipul probelor: celule recoltate de la nivelul colului uterin** (cu un procedeu medical identic cu cel utilizat la recoltarea examenului citologic și a testării HPV) și conservate în mediu lichid ThinPrep; lichid rezidual ThinPrep după procesarea testării HPV; probe autorecoltate de la nivel vaginal.

## Performanța clinică

- **Sensibilitate foarte înaltă pentru cancerul de col (95-100%)**
- **Sensibilitate înaltă pentru CIN3+ (78,6%)**
- **Valoare predictivă negativă (VPN) mare pentru  $\geq$ CIN3 (96,9%) și pentru cancer (99,9%)**
- **Specificitate înaltă pentru CIN3+ (76,8%)**
- **Valoare predictivă pozitivă mare pentru CIN3+**
- **Reproductibilitate foarte bună, acord interlaboratoare de 90%**

## Rezultatele testului PreCursor-M+

- se obțin cu ajutorul unui **program informatic automatizat**, care indică nivelul hipermetilării pentru fiecare din genele țintă și **clasifică proba ca fiind pozitivă la hipermetilare sau negativă la hipermetilare pentru fiecare genă în parte**
- în cazul în care nu sunt îndeplinite criteriile de validare pentru unul dintre controalele specifice, rezultatele testului sunt invalide și testarea trebuie repetată

## UTILITATEA CLINICĂ A BIOMARKERILOR DE METILARE. INDICAȚII.

### 1. Identificarea riscului înalt de agravare pe termen scurt a leziunilor CIN2, CIN3

Metodele clasice de depistare și diagnostic – citologia, colposcopia, histopatologia nu pot face deosebirea între pacientele cu CIN2 și CIN3 care vor progresa pe termen scurt către cancer și au deci nevoie de tratament sau de alte proceduri diagnostice și cele care au potențial de regresie spontană și a căror evoluție poate fi doar supravegheată activ. În lipsa informației privind riscul de agravare imediată a precancerului identificat, conduita medicală etică actuală este de a trata prin proceduri chirurgicale excizionale locale toate leziunile CIN2 și CIN3.

Rezultatul biomarkerilor de metilare reprezintă un **argument important în decizia de conduită medicală adecvată la caz: tratament excizional vs. supravegherea evoluției leziunii.**

Astfel,

- **pacientele cu markeri de metilare pozitivi, care prezintă risc crescut de agravare pe termen scurt, au nevoie urgentă de examinare colposcopică, pentru decizia privind tratamentul adecvat de aplicat**
- **la pacientele cu markeri de metilare negativi, care prezintă risc scăzut de progresie lezională pe termen scurt, se temporizează trimiterea la colposcopie în favoarea unei supravegheri active.**

**Utilitatea markerilor de metilare în situațiile clinice particulare de CIN2,3 de mai jos:**

- **Tinere nulipare, diagnosticate cu leziuni de tip CIN2**  
Deoarece multe dintre aceste leziuni pot regresa spontan, un rezultat negativ al biomarkerilor de metilare poate conduce la **evitarea tratamentului nenecesar înainte de o sarcină și implicit la evitarea consecințelor posibile ale intervențiilor locale asupra capacității colului de a susține dezvoltarea unei sarcini ulterioare.**
- **Gravide diagnosticate cu CIN3 în timpul sarcinii**  
Rezultatul negativ al markerilor de metilare permite o **abordare conservatoare de supraveghere și efectuarea unui bilanț multidisciplinar de reevaluare după lăuzie.** Se pot evita astfel supratratamentul și riscurile asociate procedurilor excizionale în sarcină, cât și riscul rezidual de boală progresivă în urma unui tratament suboptimal.

## 2. Triajul rezultatelor HPV pozitive, în locul citologiei „reflexe” (în screening primar HPV)

În screening-ul bazat pe HPV ca test inițial, triajul pacientelor HPV pozitive care au nevoie de explorare colposcopică se realizează uzual prin examen citologic (citologie „reflexă”). Un rezultat dublu pozitiv (HPV pozitiv și citologie de la ASC-US în sus) are indicație de evaluare colposcopică și – în funcție de situație – și de examen histopatologic.

Studii științifice noi propun efectuarea markerilor de metilare, care au o sensibilitate și specificitate similare cu citologia, ca alternativă de triaj al rezultatelor HPV pozitive, în locul triajului citologic.

Aplicarea biomarkerilor de metilare ca **triaj al rezultatelor HPV pozitive**, sau chiar ca **test primar de screening** se prefigurează la nivel mondial ca **noi strategii de dezvoltare a unui screening exclusiv molecular.**

**Utilitatea markerilor de metilare în situația particulară a pacientelor HPV pozitive cu rezultate interpretate ASC-US și LSIL la triajul citologic**

- Rezultatele citologice ASC-US și LSIL exprimă de obicei prezența unor modificări histopatologice minore, dar pot ascunde în proporție de aprox. 15% leziuni de grad înalt. Majoritatea examenelor colposcopice efectuate în aceste cazuri sunt fără modificări sau cu modificări minore și recomandare de supraveghere.
- **Triajul molecular al asocierii HPV pozitiv/citologie ASC-US, LSIL poate discerne între pacientele cu test de metilare pozitiv, care au nevoie direct de colposcopie și cele cu test de metilare negativ, care se pretează la supraveghere.**

## 3. Modalitate de predicție a răspunsului la tratament la pacientele cu intervenții pentru precancer

Rezultatul pozitiv al markerilor de metilare indică riscul de leziune restantă sau recidivantă și ghidează conduita medicală spre control histopatologic.

Rezultatul negativ al acestora permite continuarea supravegherii uzuale postoperatorii.