

Early and accurate detection of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis by methylation markers in bile

Hege Marie Vedeld^{1,2,*}, Marit Mæhle Grimsrud^{3,4,*}, Kim Andresen^{1,2}, Heidi D. Pharo^{1,2}, Erik von Seth⁵, Tom H. Karlsen^{3,4,6}, Hilde Honne^{1,2}, Vemund Paulsen⁶, Martti A Färkkilä⁷, Annika Bergquist⁵, Marine Jeanmougin^{1,2}, Lars Aabakken^{4,6}, Kirsten M. Boberg^{3,4,6}, Trine Folseraas^{3,6}, Guro E. Lind^{1,2,#}

INTRODUCCION

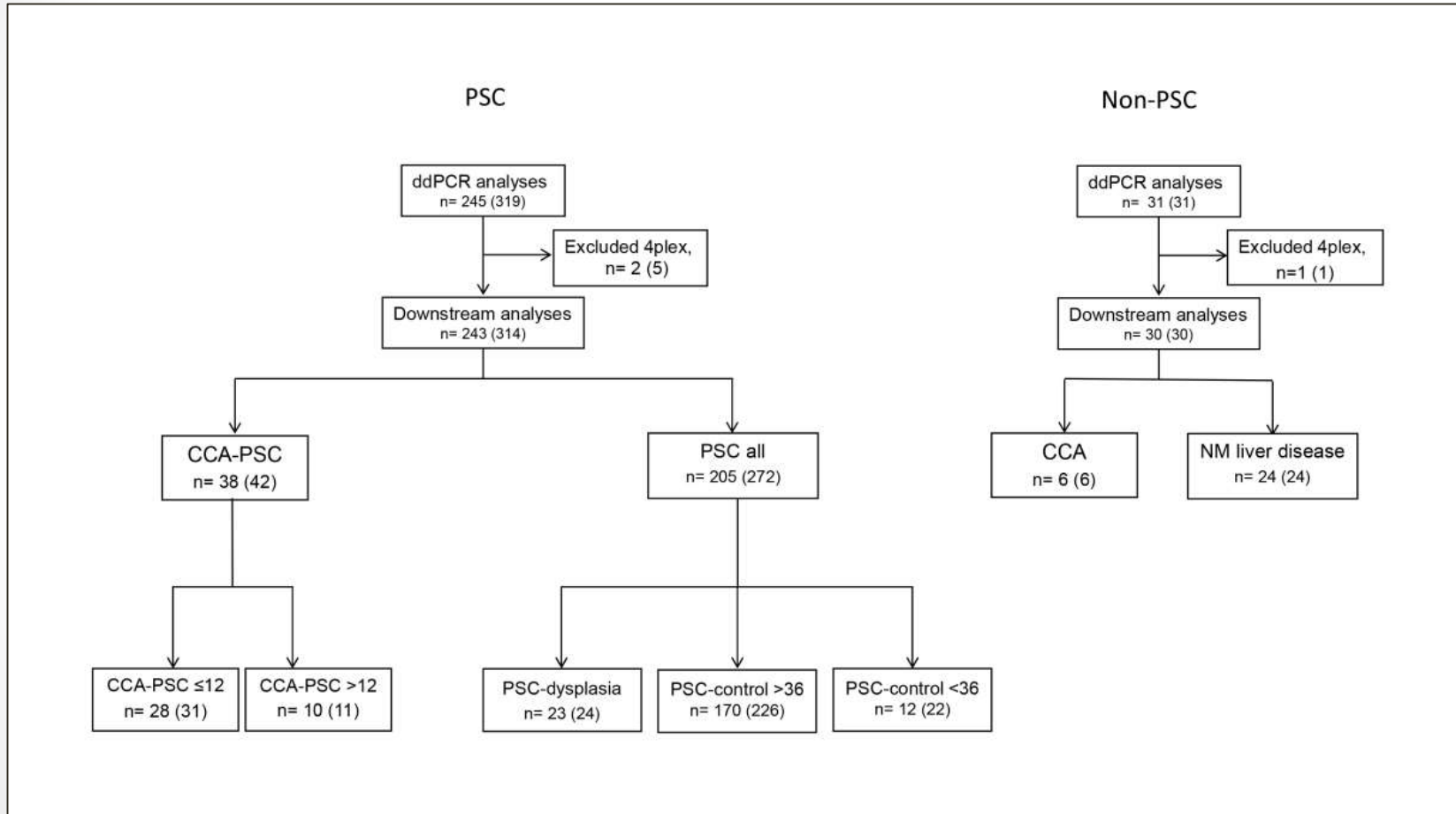
- El desarrollo de colangiocarcinoma (CCA) antes del trasplante representa una complicación de la CEP, con un importante impacto negativo en la esperanza de vida.
- Tienen un riesgo de por vida de 160 a 600 veces mayor de desarrollar CCA en comparación con la población general.
- La detección del CCA en la CEP es un desafío, debido a características de presentación inespecíficas y hallazgos superpuestos en la progresión de la enfermedad maligna y benigna en la CEP

- Las alteraciones aberrantes de metilación del ADN son valiosas como biomarcadores del cáncer, incluidos los marcadores de detección temprana.
- **OBJETIVO: validar marcadores en pequeños volúmenes de bilis para la detección temprana y precisa de CCA en pacientes con CEP, usando PCR digital de gotas (ddPCR).**

MATERIAL Y METODOS

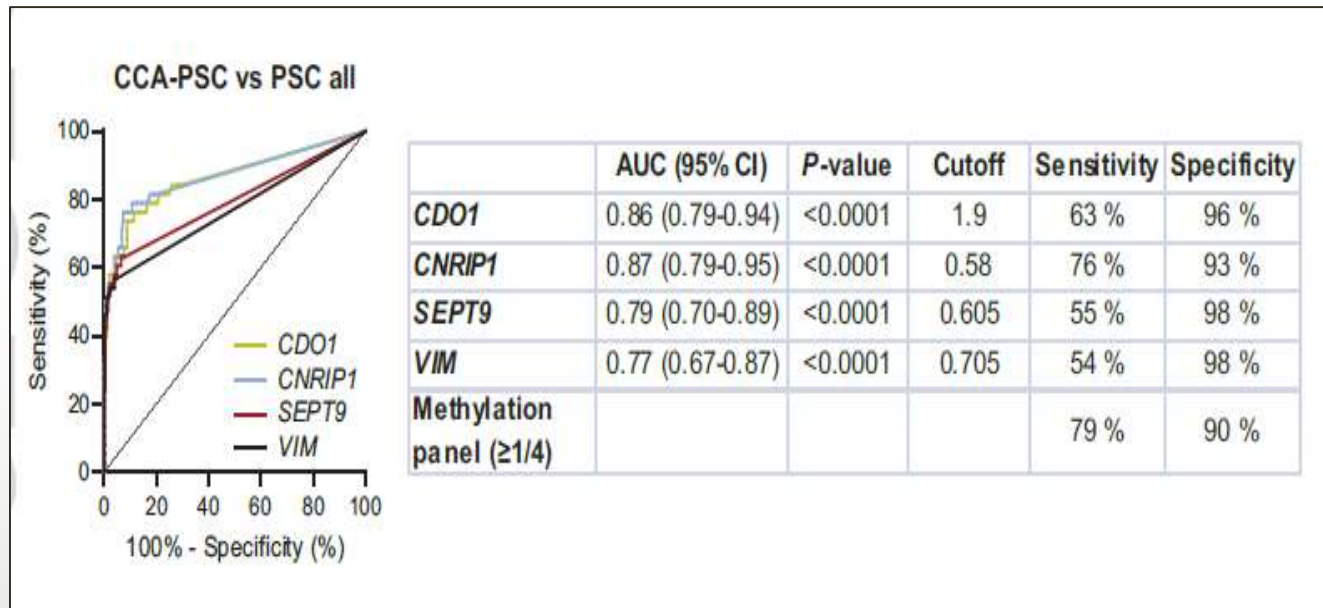
- Multicentrico
- Retro-prospectivo 2008 -2019
- 344 muestras de bilis de 273 pacientes diagnosticados con CCA (con o sin CEP subyacente), CEP con displasia biliar, CEP no maligna y otras enfermedades hepáticas benignas
- Extracción de ADN, utilizando alícuotas de 100-200µl de bilis por muestra. Secuencias de cebador y sonda para los genes diana; **CDO1, CNRIP1, SEPT9 y VIM** usando PCR digital de gotas (ddPCR).

RESULTADOS

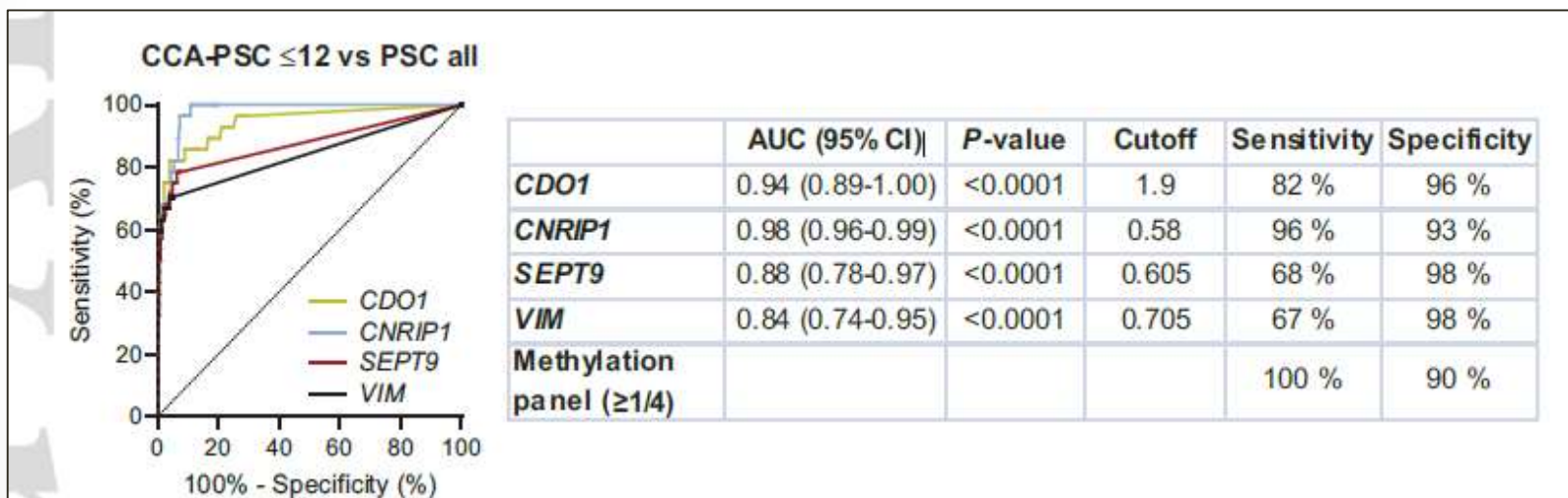


CCA-CEP frente a controles de CEP

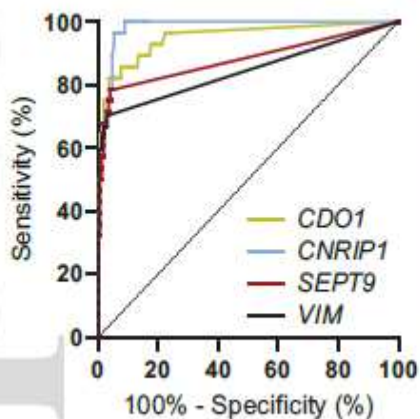
- Alta precisión para la detección de CCA en pacientes con CEP subyacente hasta 12 meses antes del diagnóstico de CCA establecido por modalidades de diagnóstico estándar.
- Pacientes con CCA-CEP mostraron niveles de metilación significativamente más altos que las muestras de pacientes con CEP para los cuatro marcadores (Mann-Whitney U, $P < 0,0001$)



- Para ver si el tiempo transcurrido desde el muestreo de bilis hasta el diagnóstico de CCA podría afectar la sensibilidad de los marcadores de metilación del ADN, solo incluimos muestras de CCA de pacientes diagnosticados con CCA-PSC ≤ 12 meses
- Como controles, incluimos todas las muestras de CEP (n = 205)



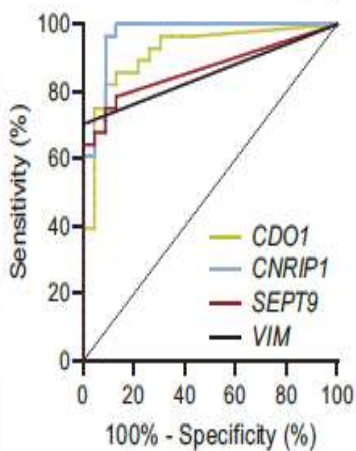
CCA-PSC ≤ 12 vs PSC-control >36



	AUC (95% CI)	P-value	Cutoff	Sensitivity	Specificity
<i>CDO1</i>	0.95 (0.90-1.00)	<0.0001	1.9	82 %	96 %
<i>CNRIP1</i>	0.98 (0.97-1.00)	<0.0001	0.58	96 %	95 %
<i>SEPT9</i>	0.88 (0.79-0.97)	<0.0001	0.605	68 %	98 %
<i>VIM</i>	0.84 (0.74-0.95)	<0.0001	0.705	67 %	98 %
Methylation panel ($\geq 1/4$)				100 %	93 %

Incluir solo el control de CEP > 36 como controles aumentó la especificidad para el panel de biomarcadores al 93% .

CCA-PSC ≤ 12 vs PSC-dysplasia



	AUC (95% CI)	P-value	Cutoff	Sensitivity	Specificity
<i>CDO1</i>	0.92 (0.84-1.00)	<0.0001	1.9	82 %	91 %
<i>CNRIP1</i>	0.97 (0.92-1.00)	<0.0001	0.58	96 %	91 %
<i>SEPT9</i>	0.87 (0.76-0.97)	<0.0001	0.605	68 %	96 %
<i>VIM</i>	0.85 (0.74-0.96)	<0.0001	0.705	67 %	100 %
Methylation panel ($\geq 1/4$)				100 %	83 %

- las muestras de bilis de los pacientes CCA-PSC ≤ 12 (todas positivas para el panel de metilación) se recolectaron de pacientes con cáncer en estadio temprano y tardío en el momento del diagnóstico (0-II y III-IV), diferente crecimiento tumoral patrones (formación de masa, infiltración periductal y crecimiento intraductal), tamaño del tumor (<3 cm, 3-5 cm y > 5 cm) y ubicación anatómica (CCA intrahepática (iCCA), CCA perihiliar (pCCA) y CCA extrahepática (dCCA));
- el panel de metilación alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% para detectar CCA en pacientes con CEP subyacente, hasta 12 meses antes de un diagnóstico confirmado de CCA, independientemente de las características clínicas y moleculares.

Comparación del panel de metilación con niveles de CA 19-9 y citología con cepillo para indicar CCA en CEP

Table 3. Sensitivity and specificity of the biomarker panel in patients with CA 19-9 level above and below 100 U/ml

	CCA-PSC ≤12			CCA-PSC >12			PSC all			PSC-control >36			PSC- dysplasia		
	Total n	Pos (%)	Neg (%)	Total n	Pos (%)	Neg (%)	Total n	Pos (%)	Neg (%)	Total n	Pos (%)	Neg (%)	Total n	Pos (%)	Neg (%)
No. of patients	28	28 (100)	0 (0)	10	2 (20)	8 (80)	203	20 (10)	183 (90)	168	12 (7)	156 (93)	23	4 (17)	19 (83)
CA-19-9 (U/ml)															
>100	14	14 (100)	0 (0)	0	0	0	13	1 (8)	12 (92)	11	0 (0)	11 (100)	2	1 (50)	1 (50)
<100	11	11 (100)	0 (0)	10	2 (20)	8 (80)	180	18 (10)	162 (90)	150	12 (8)	138 (92)	21	3 (14)	18 (86)
NA	3	3 (100)	0 (0)	-	-	-	10	1 (10)	9 (90)	7	0 (0)	7 (100)	-	-	-

Sensibilidad (100%) del panel de biomarcadores para el diagnóstico de CCA fue independiente del nivel de CA 19-9, y la especificidad se mantuvo alta (> 90%) tanto en pacientes con un nivel de CA 19-9 por encima como por debajo de 100 U / ml.

Nivel de metilación del ADN y asociación con la supervivencia.

La división de las muestras CCA-PSC ≤ 12 en niveles de metilación alto (nivel de metilación del ADN normalizado > 10) y 0 / bajo (nivel de metilación del ADN normalizado < 10) mostró que los pacientes con un nivel alto de metilación tenían una tendencia a una supervivencia general más corta en comparación con a pacientes sin o con un nivel bajo de metilación (CDO1, P = 0.059, CNRIP1, P = 0.016, SEPT9, P = 0.078 y VIM P = 0.203)

CCA sin CEP subyacente frente a otra enfermedad hepática no maligna

- comparo las muestras de CCA derivadas de pacientes sin CEP subyacente (n = 6) con muestras de pacientes con otras enfermedades hepáticas de NM (n = 24).
- AUC de 0,78 (CDO1), 1,00 (CNRIP), 0,75 (SEPT9) y 0,90 (VIM).
Combinado, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% para distinguir los dos grupos

DISCUSION

- La precisión diagnóstica deL CCA fue alta tanto en el cáncer esporádico como en el asociado a la CEP, lo que se subraya por la alta especificidad y el hallazgo de marcadores de metilación positivos en todas las muestras de bilis obtenidas hasta 12 meses antes de un diagnóstico confirmado de CCA.
- Un potencial para utilizar estos marcadores de metilación del ADN en la bilis para i) complementar los métodos de detección actuales para CCA, y ii) para la vigilancia de CCA en pacientes con CEP.
- mediante el uso de la metodología ddPCR altamente sensible en cantidades limitadas de bilis, se logro detectar alteraciones en los niveles de metilación que diferenciaron de manera sólida la CCA de los pacientes sin CCA, incluso en pacientes con CEP subyacente.

- sensibilidad para la detección de CCA fue independiente de las características clínicas y moleculares, incluida la etapa del cáncer en el momento del diagnóstico, el patrón de crecimiento del tumor, el tamaño del tumor, la ubicación anatómica y los niveles de CA 19-9.
- El estudio actual demuestra que los cambios de metilación pueden detectarse hasta 12 meses antes que los métodos de detección de CCA estándar
- **A pesar hallazgos prometedores, se justifica la validación en series de muestras multicéntricas más grandes. Idealmente, estos análisis deben realizarse a largo plazo, longitudinalmente en una gran cohorte prospectiva.**