

ALLEGATO 1

Piano di lavoro progettuale 5 per mille anno 2017

Alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori
Via Alessandro Torlonia, 15
00161 – Roma

Piano di lavoro progettuale

Il sottoscritto Alloisio Marco, in qualità di Presidente della Sezione Provinciale di Milano, via Venezian 1, 20133 Milano, C.F. 80107930150, intende richiedere alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sede Centrale – un finanziamento nell’ambito del “programma 5 per mille anno 2017” tramite il predisposto “piano di lavoro progettuale”.

Titolo del Progetto

Studio della variazione dell’incidenza dell’infezione da HPV nei carcinomi dell’orofaringe

Area tematica di ricerca (come individuate nel bando)

Prevenzione secondaria

Durata: Annuale Biennale X

Costo finanziato con fondi oggetto del bando di
ricerca sanitaria 2018 LILT:

€ 80.000,00

Costo complessivo del progetto (se co-
finanziato):

€ 160.000

Responsabile del Progetto con indicazione espressa dell’indirizzo di posta elettronica

Prof. Giancarlo Pruneri (giancarlo.pruneri@istitutotumori.mi.it)

Sinossi del Progetto / Premesse e razionalità

Il carcinoma squamoso dell’orofaringe (OSCC) HPV-positivo rappresenta un’entità clinicopatologica specifica [1,2]. L’OSCC HPV-positivo differisce significativamente dall’OSCC HPV-negativo in termini di profili di fattori di rischio [3], caratteristiche molecolari [4,5] e clinico-patologiche [1,6-8]. Inoltre, la presenza di infezione da HPV è un robusto e indipendente indicatore di prognosi nei pazienti con OSCC [1,2,7-12]: il rischio di morte per i pazienti con OSCC localmente avanzato HPV-positivo è inferiore al 60%, con un

vantaggio assoluto in termini di sopravvivenza pari al 20-30% [7-9, 13-18].-La valutazione di HPV nelle cellule tumorali rappresenta pertanto un potenziale biomarcatore nei pazienti con OSCC per la selezione dei trattamenti, la sorveglianza epidemiologica e la stadiazione del tumore. Ad oggi non è stato identificato un approccio standard per il rilevamento di HPV in campioni clinici; per l'identificazione accurata dello stato di HPV sono stati proposti diversi algoritmi: presso la Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano è stato sviluppato un algoritmo efficace [14], che prevede i) valutazione immunohistochimica per p16 ed ibridizzazione in situ (ISH) in campo chiaro per il DNA di HPV ad alto rischio (HR); ii) ISH per E6/E7 mRNA di HR-HPV nei casi p16-positivi/HR-HPV DNA negativi. In questo contesto, è importante notare che i pazienti con OSCC p16-positivi e HPV-DNA negativi, hanno una sopravvivenza significativamente inferiori rispetto ai pazienti con tumori p16 e HPV-DNA-positivi [17]. I trattamenti sviluppati per i tumori del distretto testa/collo sono associati ad un rischio significativo di tossicità acuta e tardiva [15] e molti studi clinici sono attualmente in corso per identificare strategie di de-intensificazione per i pazienti con OSCC HPV-positivo [7,16,19]. Tuttavia, ad oggi, nessuna decisione di modifica del trattamento nei pazienti con OSCC HPV-positivo può essere presa se non nel contesto di una sperimentazione clinica. L'incidenza dell'OSCC HPV-positivo, principalmente della regione tonsillare e della base della lingua, è aumentata negli ultimi due decenni e si prevede che supererà quella del carcinoma della cervice in alcuni paesi ad alto reddito [20-22]. Sono stati riscontrati nei Paesi occidentali una crescente incidenza e un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con OSCC HPV-correlato [23]. È stato dimostrato che gli aumenti dell'incidenza a livello di popolazione e della sopravvivenza dei tumori orofaringei negli Stati Uniti dal 1984 ai nostri giorni sono causati dall'infezione da HPV [23]. Nel nostro Paese i dati di incidenza di OSCC HPV-positivi sono relativamente pochi e frammentari e ulteriori studi sull'epidemiologia dei pazienti con OSCC HPV-positivo sono di fondamentale importanza per lo sviluppo e l'implementazione di interventi sulla salute pubblica, allo scopo di affrontare al meglio la tendenza globale di aumento dell'incidenza di infezione. Il presente progetto ha lo scopo di tracciare nel periodo 1995-2019 la variazione di incidenza dell'infezione da HPV nei pazienti con OSCC, utilizzando un nuovo algoritmo sviluppato presso l'INT di Milano.

Referenze

01. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papilloma virus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(6):407-420.
02. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre color study. *Lancet Oncol.* 2016;17(4):440-451.
03. Chaturvedi AK, D'Souza G, Gillison ML, Katki HA. Burden of HPV-positive oropharynx cancers among ever and never smokers in the U.S. population. *Oral Oncol.* 2016;60:61-67.
04. Perrone F, Suardi S, Pastore E, et al. Molecular and cytogenetic subgroups of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(22):6643-6651.
05. Wagner S, Sharma SJ, Wuerdemann N, et al. Human Papillomavirus-related head and neck cancer. *Oncol Res Treat.* 2017;40:334-340.
06. Huang SH, Perez-Ordóñez B, Liu FF, et al. Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82(1):276-278.
07. Psyrri A, Rampias T, Vermorken JB. The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* 2014;25(11):2101-2115.
08. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA,

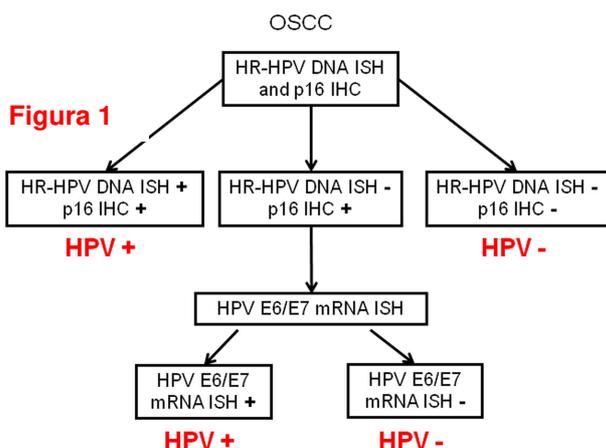
- Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 ;2:16086. .
09. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Eng J Med*. 2010;363:24–35.
 10. Cleary C, Leeman JE, Higginson DS, et al. Biological features of Human Papillomavirus-related head and neck cancers contributing to improved response. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2016;28(7):467-474.
 11. Lim MY, Dahlstrom KR, Sturgis EM, Li G. Human papillomavirus integration pattern and demographic, clinical, and survival characteristics of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;38(8):1139-1144.
 12. Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, et al. Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *Int J Cancer*. 2016;138(2):386–395.
 13. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:7–16.
 14. Volpi CC, Ciniselli CM, Gualeni AV, Plebani M, Alfieri S, Verderio P, Locati L, Perrone F, Quattrone P, Carbone A, Pilotti S, Gloghini A. In situ hybridization detection methods for HPV16 E6/E7 mRNA in identifying transcriptionally active HPV infection of oropharyngeal carcinoma: an updating. *Hum Pathol*. 2018;74:32-42
 15. Rieger JM, Zalmanowitz JG, Wolfaardt JF. Functional outcomes after organ preservation treatment in head and neck cancer: a critical review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(7):581–587.
 16. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol*. 2013; 31(5):543–550.
 17. Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, et al. Human papillomavirus detection and comorbidity: Critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol*. 2013;24(11):2740–2745.
 18. Mirghani H, Amen F, Blanchard P, et al. Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer*. 2015;136(7):1494-1503.
 19. Marur S, Li S, Cmelak AJ, Gillison ML, et al. E1308: phase II trial of induction chemotherapy followed by reduced-dose radiation and weekly Cetuximab in patients with HPV-associated resectable squamous cell carcinoma of the oropharynx- ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *J Clin Oncol*. 2016;35:490-497.
 20. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):607–615.
 21. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550–4559.
 22. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3235–3242.
 23. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294-301

Piano di lavoro progettuale - articolazione del progetto con dettaglio relativo a:

Piano di lavoro progettuale

Pazienti. L'archivio del Dipartimento di Patologia della Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano Italia, verrà interrogato per il periodo compreso fra il 1990 e il 2019 allo scopo di selezionare i casi diagnosticati come OSCC. I termini di ricerca includeranno "orofaringe", "tonsilla", "pilastro tonsillare", "capanna tonsillare", "vallecula", "tonsilla linguale", "base della lingua" e "carcinoma a cellule squamose". Le informazioni cliniche saranno rilevate dai referti patologici: età, sesso, sede del tumore e tipo di intervento dei pazienti (biopsia o resezione chirurgica). Le diagnosi

saranno confermate rivalutando i preparati istologici originali e saranno valutati la risposta alla terapia e l'overall survival (follow-up medio superiore a 5 anni). Per i pazienti diagnosticati e osservati in istituto fra il 2013 e il 2019, lo studio sarà limitato all'osservazione dell'incidenza dell'HPV e alla comparazione con i casi diagnosticati prima del 2013.



Valutazione dell'infezione da HPV. Tutti i casi saranno testati per l'infezione da HPV, utilizzando l'algoritmo precedentemente descritto (14), sinteticamente illustrato nella Figura 1.

ISH per HPV-HR DNA. Sarà utilizzato un cocktail di sonde che riconosce i tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 70 (Inform HPV III, Ventana Roche), utilizzando un dispositivo automatizzato (BenchMark Ultra, Ventana Roche). Per ogni caso sarà registrato il pattern di infezione (integrato rispetto a integrato e episodico).

P16. L'immunoreattività per p16 sarà valutata utilizzando il kit CIN tec p16INK4a (Roche Diagnostics), utilizzando un dispositivo automatizzato (BenchMark Ultra, Ventana Roche). Un tumore sarà considerato positivo nel caso di una intensa colorazione nucleare e citoplasmatica in >50% delle cellule tumorali.

Ibridazione in situ per E6 / E7 mRNA di HR-HPV. Sarà eseguita utilizzando il kit RNAscope HPV (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, CA) secondo le istruzioni del produttore. Saranno utilizzate sonde per i seguenti target: mRNA E6/E7 per HPV 16 e mRNA di 18 sottotipi di HPV-HR [16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82]. La colorazione positiva sarà identificata a livello nucleare o citoplasmatico. Saranno utilizzate sonde di controllo negativo (gene batterico 4-idrossi-tetraidrodipicolinato riduttasi – DapB), e positivo (gene housekeeping ubiquitina C – UbC).

Ruolo della sezione LILT capofila e dell'Istituto Nazionale tumori

Lo studio sarà condotto dal Laboratorio di Patologia Molecolare in situ in campo chiaro e la Struttura Semplice di Surgical Pathology dei Tumori del Distretto Testa-Collo, strutture del Dipartimento di Patologia dell'Istituto Nazionale Tumori. Sarà inoltre coinvolta la S.O.C. di Oncologia dei Tumori della testa e collo, Direttore Dott.ssa Lisa Licitra. Il ruolo della LILT capofila sarà di organizzare seminari in collaborazione con la Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, rivolti a Medici di Medicina Generale, Medici specializzandi in Anatomia Patologica e ORL, infermieri professionali, così come allo staff degli uffici territoriali del Dipartimento di Prevenzione delle ASL del Comune di Milano. Questi seminari divulgativi illustreranno il ruolo carcinogenetico di HPV, l'incidenza dell'infezione da HPV nel carcinoma dell'orofaringe e il ruolo di screening nella prevenzione secondaria nel carcinoma del distretto testa-collo.

Ruolo delle sezioni LILT coinvolte

Tempi di realizzazione

Il progetto sarà realizzato in due anni:

Primo semestre del 2020: completamento della selezione dei casi in studio con esecuzione del test per l'analisi di HPV.

Secondo semestre del 2020: completamento del test per l'analisi di HPV, revisione dei casi dubbi con valutazione dei preparati ed eventuale ripetizione dei test. Digitalizzazione e correlazione clinico patologica dei casi dubbi o discutibili. Si prevede quindi che entro il secondo semestre del 2020 sia caratterizzata l'intera serie dei pazienti

Primo semestre del 2021: completamento della raccolta delle informazioni cliniche

Secondo semestre 2021: completamento delle correlazioni clinico patologiche e virologico prognostiche con la stesura di un rapporto scientifico da consegnare alla sede centrale LILT. Si prevede che i dati raccolti genereranno pubblicazioni scientifiche e programmi di divulgazione nelle sedi appropriate.

Gantt chart

Attività	Primo anno	Secondo anno
Completamento selezione dei casi in studio con esecuzione del test per l'analisi di HPV	■ ■ ■ ■	
Completamento del test per l'analisi di HPV		■ ■ ■ ■
Revisione dei casi dubbi con valutazione dei preparati ed eventuale ripetizione dei test		■ ■ ■ ■
Digitalizzazione e correlazione clinico-patologica dei casi dubbi		■ ■ ■ ■
Completamento della raccolta delle informazioni cliniche		■ ■ ■ ■
Completamento delle correlazioni clinico-patologiche e virologiche prognostiche		■ ■ ■ ■
Organizzazione di seminari divulgativi		■ ■ ■ ■
Stesura di rapporto scientifico		■ ■ ■ ■

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza agli approcci con elevato livello di trasferibilità sociale, in particolare all'interno del SSN

Studio di epidemiologia molecolare della variazione dell'incidenza dell'infezione da HPV nei carcinomi dell'orofaringe (1995-2019), con importanti ricadute sullo sviluppo e l'implementazione di interventi di salute pubblica

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza riguardo lo sviluppo di reti collaborative fra le Sezioni LILT e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca

Il progetto presentato rappresenta un modello di integrazione fra sezioni LILT e IRCCS oncologici per la definizione dell'epidemiologia dell'infezione da HPV nella tumorigenesi del distretto testa-collo e la creazione di progetti di screening nel contesto del SSN.

Sezioni LILT

Coinvolgimento delle sezioni LILT Nazionali collegate ad istituti oncologici (es. LILT Napoli e Fondazione Pascale, LILT Pordenone, CRO di Aviano, LILT Milano e INT)

Altre Strutture

Enti (partner) coinvolti nel progetto (specificando ruolo ente e relativo responsabile - esempio Mario Bianchi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, unità operativa):

Fondazione IRCCS Istituto Nazionale (vedi sopra)

Indicazione delle modalità di coinvolgimento dei giovani, del loro numero e della loro retribuzione

I giovani ricercatori possono trarre vantaggio da questo progetto sia nella formazione epidemiologica statistica che in quella di laboratorio. In particolare, l'ampia serie di casi che saranno sottoposti al test HPV costituirà un'opportunità di addestramento su tecnologie sofisticate e di ampio impiego clinico e scientifico.

In particolare, due giovani ricercatori saranno coinvolti rispettivamente nell'attività di statistica, di laboratorio e di analisi di correlazione clinico-patologica.

Saranno rese disponibili dalla LILT di Milano e/o dalla Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano due borse di studio dell'importo di 23.500 euro ciascuna a sostegno del progetto e delle sue finalità socio-sanitarie.

Estremi per ricevere il finanziamento

UBI Banca S.p.A.

Viale Lombardia 14/16 - Milano

IBAN IT83V0311101622000000018213

Intestato a Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sezione Provinciale di Milano

Costo complessivo del Progetto articolato per voci di spesa

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	47.000	23.500
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	83.000	41.500
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	10.000	5.000
Elaborazione dati	10.000	5.000
Spese amministrative	10.000	5.000
Altro (indicare quali)		

TOTALE	160.000	80.000

Alla presente proposta deve essere allegato:

- il curriculum vitae del Responsabile del progetto di ricerca e dei Responsabili di eventuali enti partecipanti al medesimo;
- la complessiva documentazione di progetto.

In fede,

Il Presidente della Sezione Provinciale

Prof. Marco Alloisio



Il Responsabile del Progetto

Prof. Giancarlo Pruneri



Milano, 26 novembre 2019