

**LA DISPLASIA CERVICALE: FOLLOW UP ...FOLLOW
UP ...FOLLOW UP ...**

IN RICORDO DI GIOIA MONTANARI

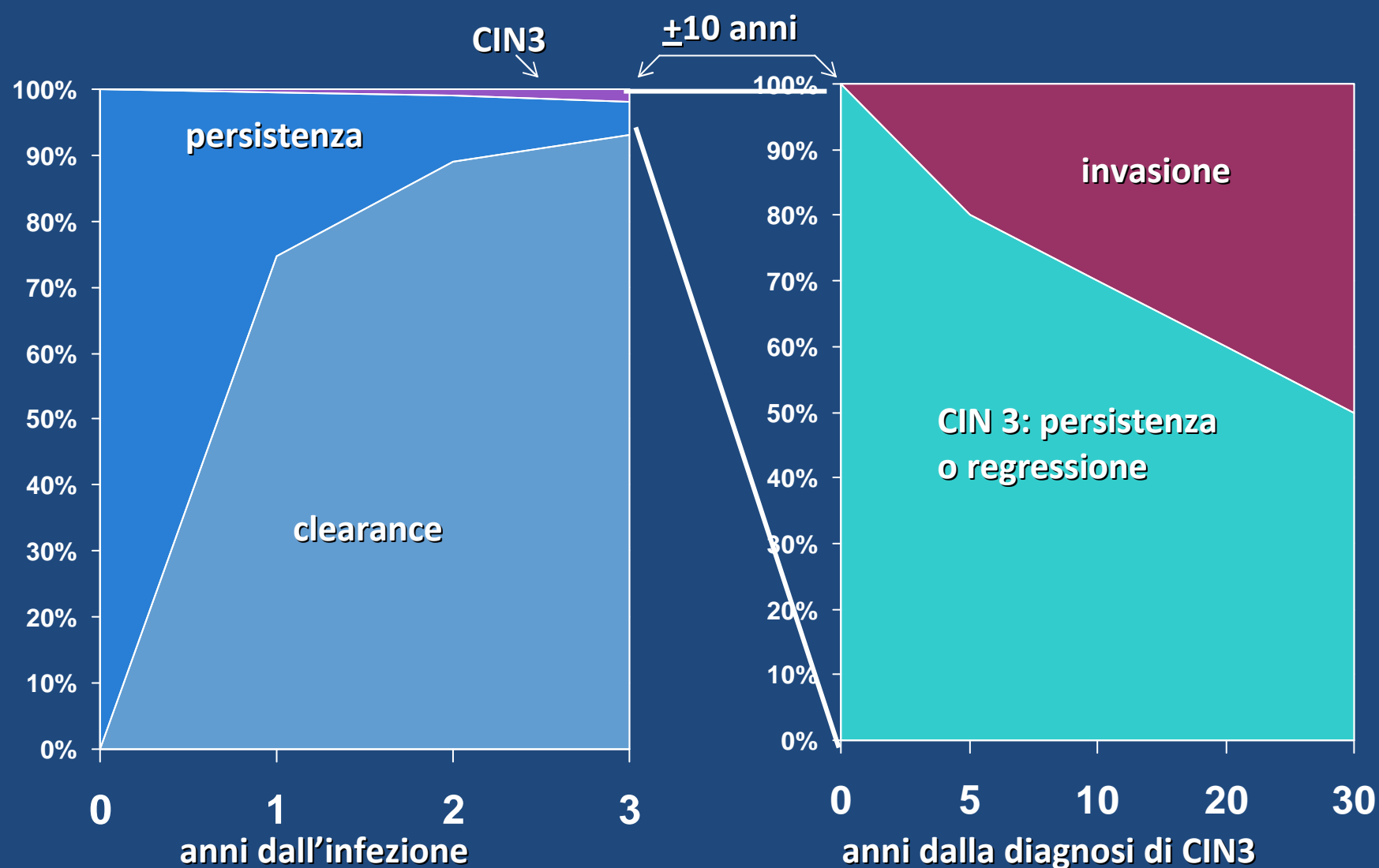
Istologia: ha un valore prognostico?

D. Minucci

Torino 17 giugno 2013

hrHPV: rischio di persistenza e progressione

(modificato da Schiffman M JNCI,103,5,2011)



Obiettivo dello screening

- L'obiettivo è distinguere tra le donne screen positive quelle che hanno lesioni con potenziale maligno da quelle che hanno solo lesioni HPV associate benigne, capaci di regredire spontaneamente
- L'accuratezza di questa distinzione, in termini di sensibilità e specificità presenta molte difficoltà sia nel momento dello screening e del triage che nel secondo livello

Il potenziale di progressione

La progressione è un evento complesso legato in ogni sua fase a fattori diversi e diversamente intrecciati tra loro:

- **Genetico**

- caratteristiche specifiche di ogni soggetto
- danno provocato dagli agenti oncogeni

- **Virale**

- **Altri agenti oncogeni**

- **Immunologico**

-

Diagnosi istopatologica

- Ha un ruolo rilevante, spesso determinante, nelle decisioni di management clinico nelle pazienti con test di screening anormale
- Per convenzione si utilizza spesso come *gold standard*
- Identifica su basi morfologiche una lesione in dinamica evoluzione/regressione ad un tempo determinato
- Per una valutazione prognostica possiamo riferirci solo ai dati statistici relativi al tipo di lesione osservata
- Potrebbe dare valutazioni prognostiche personalizzate?

Cosa chiediamo all'istopatologia?

- CIN o non CIN?
- Che grado di CIN?
- E' una lesione con potenziale malignità?

La risposta ad ognuna di queste domande ha dei limiti ed errori possibili

La classificazione CIN

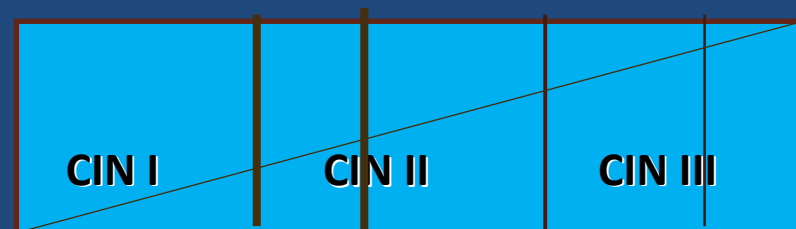
La classificazione CIN con il suo grading non definisce uno spettro progressivo della medesima lesione, ma piuttosto comprende due entità patologiche diverse:

1. infezione da HPV, benigna, capace di regredire
2. lesione «precancerosa» con potenziale di progressione

- *Un'unica entità biologica in continua progressione?*



- *Due entità biologiche distinte? dov'è il confine?*



La classificazione CIN nel management

- CIN I: manifestazione istopatologica dell'infezione da HPV carcinogeni e non (transiente)
- CIN II e CIN III: considerate lesioni precancerose
- **CIN II è ritenuta la soglia per decidere un trattamento**

CIN II

- *diagnosi equivoca che comprende CIN I con effetti citopatici da HPV (transiente) e lesioni precancerose (potenziale progressione)*
- **↑** *Variabilità interosservatore nella diagnostica*

E' possibile andare oltre la pura morfologia, identificando le alterazioni proprie della carcinogenesi cervicale, ed avere risposte più precise?

L'istochimica con marcatori appropriati può rispondere ai quesiti se c'è una lesione e nel caso se ha una potenziale malignità?

How to evaluate emerging technologies in cervical cancer screening?

Arbyn M et al Int. J. Cancer 125, 2489-2496, 2009

Sensibilit , Valore Predittivo Positivo, Valore Predittivo Negativo..... longitudinali

- L'aumento della sensibilit  di un test non necessariamente implica che l'introduzione dello stesso test in un programma di screening contribuisca a ridurre la mortalit  per carcinoma del collo dell'utero
- Se argomenti biologici ed epidemiologici giustificano l'assunto che la lesione diagnosticata in eccesso con il nuovo metodo abbia una sostanziale chance di progressione (VPP longitudinale accettabile) e che i soggetti screen negativi abbiano una sostanziale diminuzione della probabilit  di sviluppare cancro in futuro (VPN longitudinale pi  alto), si pu  considerare di fare un trial randomizzato su popolazione con il nuovo test.

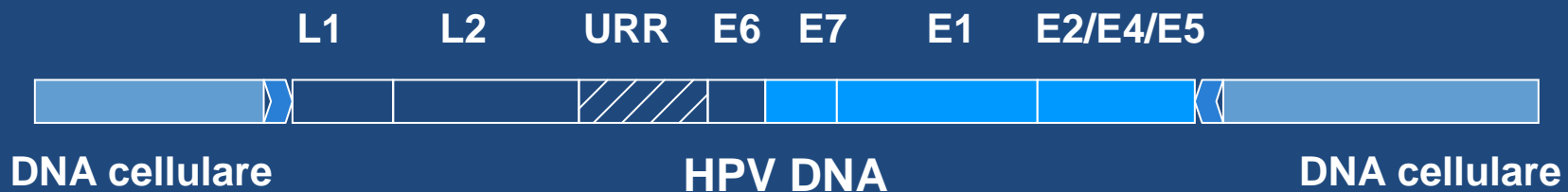
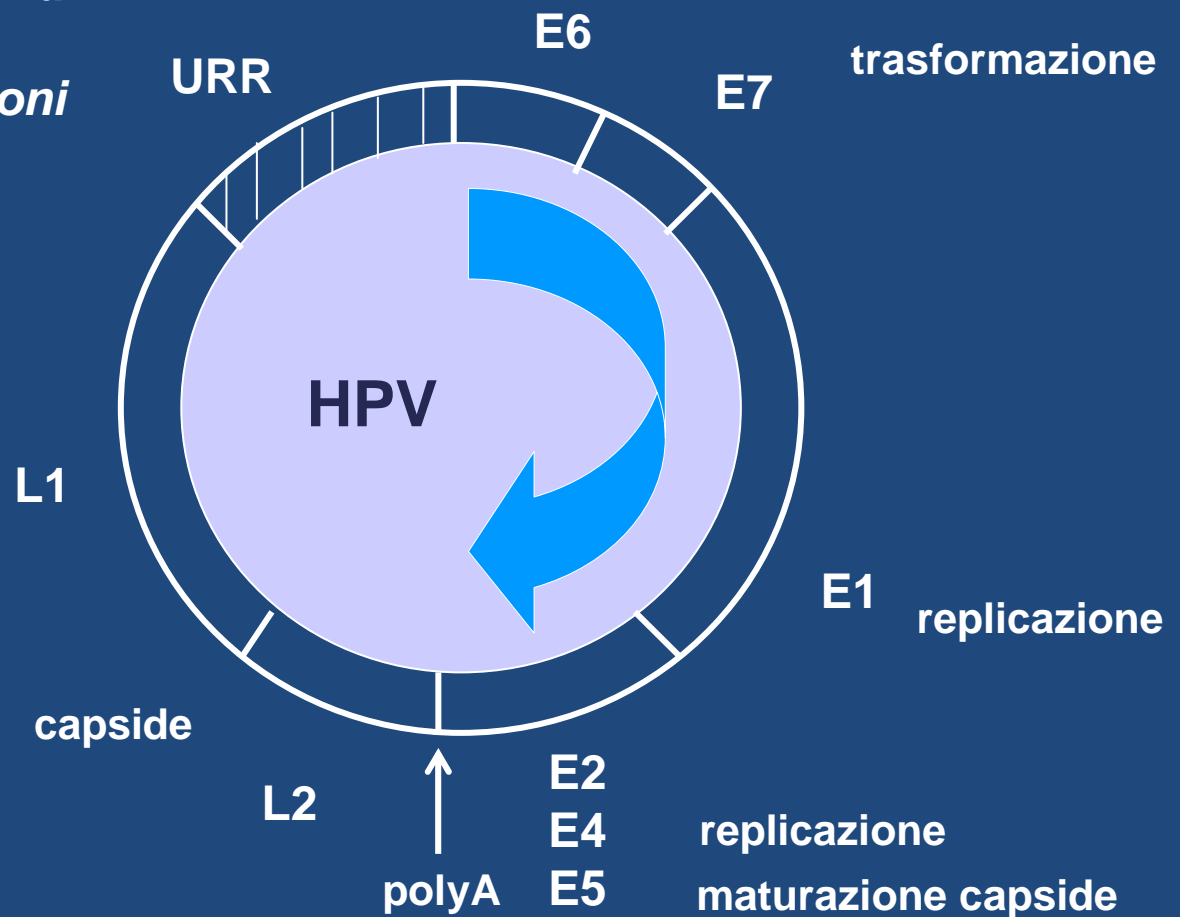
hrHPV

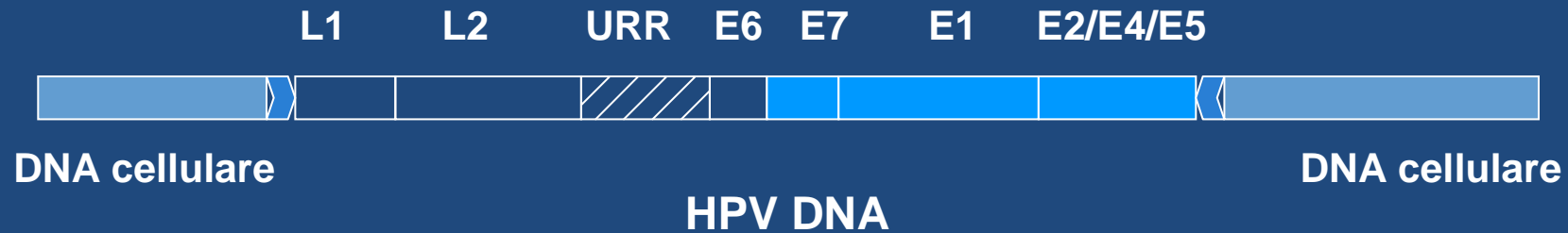
infezioni transienti ed **infezioni trasformanti**

- **Markers di presenza di HPV (HPVDNA test)**
 - infezioni transienti ed infezioni trasformanti
- **Markers di trasformazione HPV-associata**
 - aumentata espressione degli oncogeni HPV
 - aumentata proliferazione cellulare
 - instabilità cromosomica

Normale vita virale: sono trascritte molecole episomiali:
 ↑ trascritti geni E, tra cui oncogeni E6 ed E7 (infezioni transienti)

Genoma virale integrato (cancro): geni E6 ed E7 trascritti come trascritti di fusione (infezioni trasformanti)





Genoma virale integrato
(cancro): geni E6 ed E7
trascritti come trascritti di
fusione (infezioni trasformanti)

↑ espressione oncogeni HPV:
proteine e mRNA, rRNA degli
oncogeni HPV

Genoma virale integrato

Overespressione non
regolata di E6 ed E7

↑ E6: promuove degradazione della
proteina p53 che regola il ciclo
cellulare

↑ E7: si lega al gene del
retinoblastoma (Rb)
promuovendone la degradazione
ed interrompendo la via Rb Cyclin
D/p16 INK 4a regolatoria del ciclo
cellulare

Markers di **trasformazione** HPV associata

- **aumentata espressione degli oncogeni dell' HPV:**
 - Proteine, mRNA, rRNA degli oncogeni HPV E6 E7
- **aumentata proliferazione cellulare:**
 - Ki 67, MCM2, TOP2a, p16
- **instabilità cromosomica:**
 - Gain of chromosome arm 3q ed integrazione HPVDNA

Aumentata espressione degli oncogeni E6 E7 proteine e mRNA

- **Trascritti di E6 E7**
 - Difficoltà del dosaggio quantitativo
 - Immunoistochimica poco sensibile e specifica per la breve emivita e la rapida degradazione

- Arbor vitae
- Cytoimmun

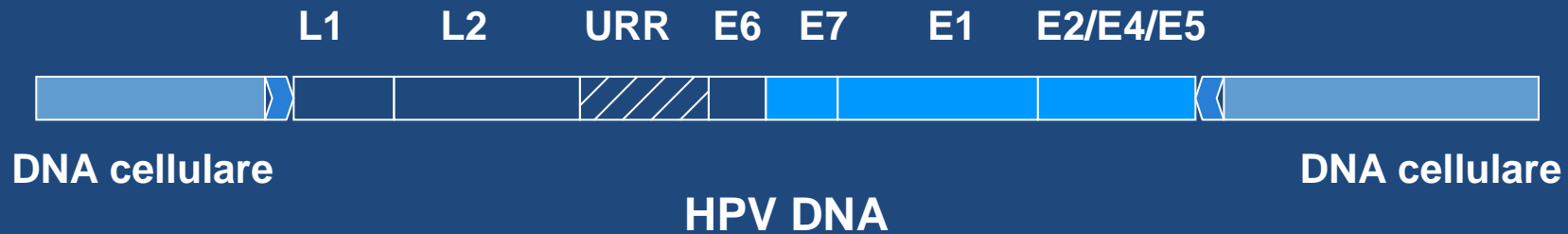
(non approvati)

- **E6-E7 mRNA**
 - PreTect HPV-Proofer assay
 - NucliSENS EasyQ HPV
 - APTIMA
 - Onco tect

(approvati CE)

Studi sui Markers di **trasformazione** nelle lesioni cervicali

- P16, Ki67, Cyclin D1, p53, ProExC (tissue microarray study) *Conesa-Zamora P, et al Am J Pathol, 2009*
- HPV L1 , p16(INKK4a) *Huang MZ, Diagn. Cytopathol, 2009*
- p16(INKK4a), CEA, Ki67, p53, ER/PR (glandular lesions) *Liang J, Int.J Gynecol Pathol, 2007*
- COX-2, Ki67 *Sarian LO Gynecol Oncol, 2006*
-



Studi dell'espressione genica (microarray) hanno identificato 240 geni regolati più di 2 volte sopra nei tumori cervicali

Tra quelli a che avevano i più alti livelli di sovraespressione:

➔ -p16INK4a

➔ -proteine 2,4,5 di mantenimento dei cromosomi

Ciclina D1 prostaglandin E sintetasi

➔ Topoisomerasi 2 alpha (TOP2a)

Fattore 1 di E2F trascrizione

Sovraespressione della telomerasi

➔ p16INK4a

L'overespressione è legata all'inattivazione funzionale di pRb da parte di HPV E7 , indica quindi la rottura del meccanismo che controlla la proliferazione cellulare

p16INK4a

- In studi immunoistochimici p16INK4a è altamente espressa in quasi il 100% dei casi di CIN2, CIN3, SCC, ma si trova raramente anche nelle lesioni benigne (*Klaes R 2001,2002,2003*)
- È altamente espressa nel 100% dei casi di AIS (*Murphy N,2003; Cameron RI, 2002; Negri G,2003*)
- Immunoistochimica con p16INK4a riduce la variabilità interosservatore nella diagnosi di CIN (*Murphy N,2003*)
- Aiuta ad identificare tra le lesioni di basso grado quelle a maggior rischio di progressione
- Può essere utilizzata anche in citologia come marker di displasia cervicale. E' positiva in:
Normali 11%; ASCUS 45%; LSIL 46%; HSIL 96%; SCC 99%

p16INK4a in citologia vs test HPV DNA

- ASCUS: sensibilità 95 vs 86; specificità 64 vs 31 per l'identificazione di CIN2+ (*Nieh S, 2005*)
- LSIL: VPP 33 vs 23 per l'identificazione di CIN2+ (*Guo M, 2004*)
- In uno studio di popolazione (*Wang SS, 2004*)
 - sensibilità 81,1%; specificità 95,4%; VPP 20,4%; VPN 99,7% per CIN 2+
 - Sensibilità 100%; VPP 13,9% per CIN3+
- Donne affette da CIN 1, follow-up 7 anni:
 - P16 positive: VPP per lo sviluppo di CIN2/3: 39%
 - P16 negative: VPN per lo sviluppo di CIN 2-3: 85%

Necessita la validazione per lo screening!!!

Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnostic of Cervical Biopsies

(Galgano MT et al, Am J Surg Pathol, 2010)

- Markers: p16INK4a, Ki67, HPV L1
- Valutazione di 1455 biopsie consecutive (studio di popolazione)
- Review delle diagnosi e formazione di una diagnosi di consenso (standard di riferimento non gold standard)
- Valutazione dei biomarkers indipendente da quella istopatologica su ematossilina-eosina

Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnostic of Cervical Biopsies

(Galgano MT et al, Am J Surg Pathol, 2010)

SCORING IMMUNOISTOCHIMICO P16 *(citoplasma e nucleo):*

- 0 = nessuna colorazione
- 1 = colorazione di rare cellule disperse
- 2 = colorazione intensa ma a chiazze, non in continuità dalla membrana basale
- 3 = colorazione forte e diffusa generalmente in continuità dalla membrana basale

Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnostic of Cervical Biopsies

(Galgano MT et al, Am J Surg Pathol, 2010)

SCORING IMMUNOISTOCHIMICO Ki67 (nucleo):

- 0 = nessuna colorazione
- 1 = colorazione di uno due strati di cellule basali, parabasali
- 2 = colorazione diffusa confinata al terzo superiore o agli strati superficiali ma con aree saltate tra gli strati parabasali ed i superiori
- 3 = colorazione continua estesa a più del terzo inferiore dell'epitelio

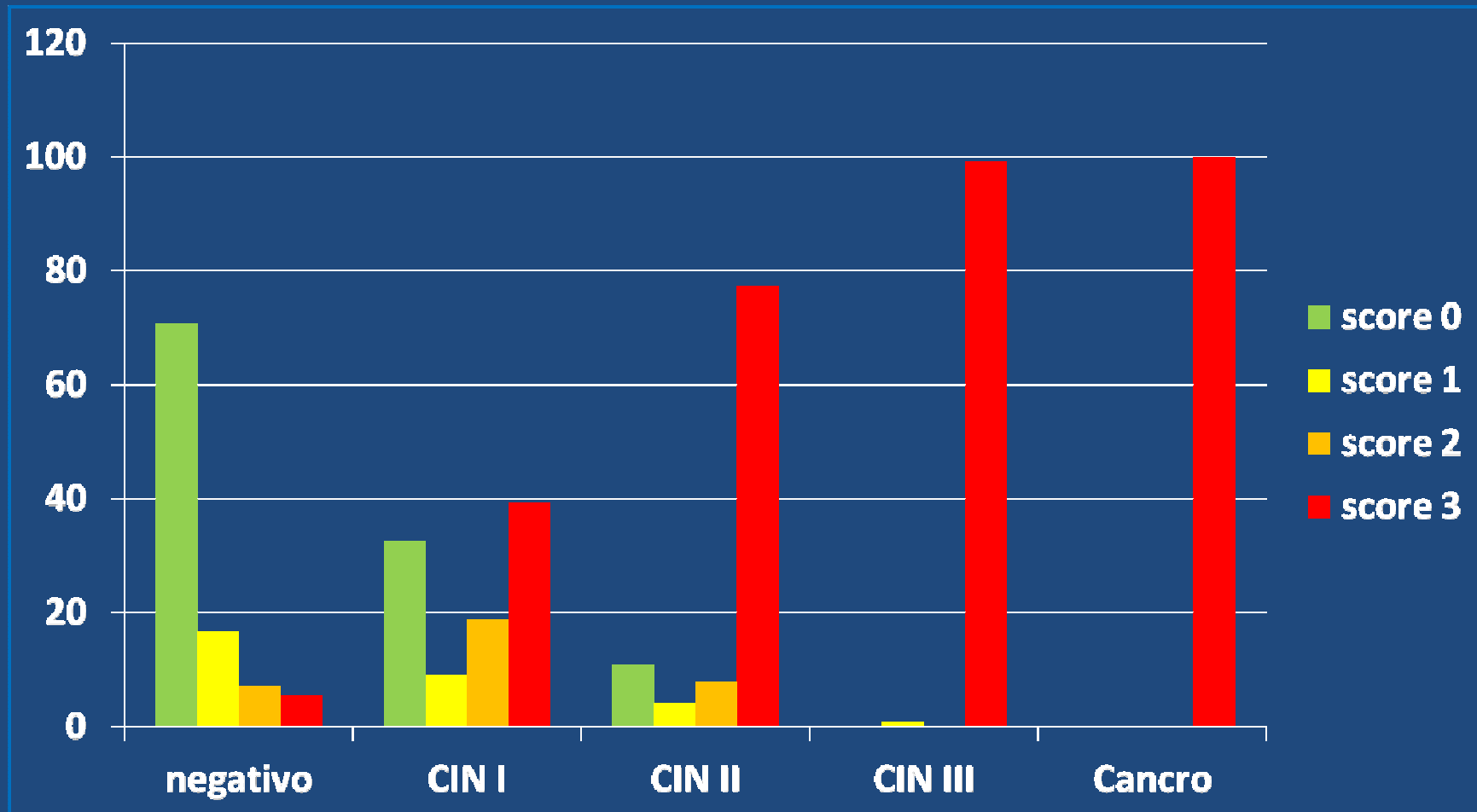
• **SCORING IMMUNOISTOCHIMICO L1** : almeno una cellula con discreta colorazione nucleare

Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnostic of Cervical Biopsies

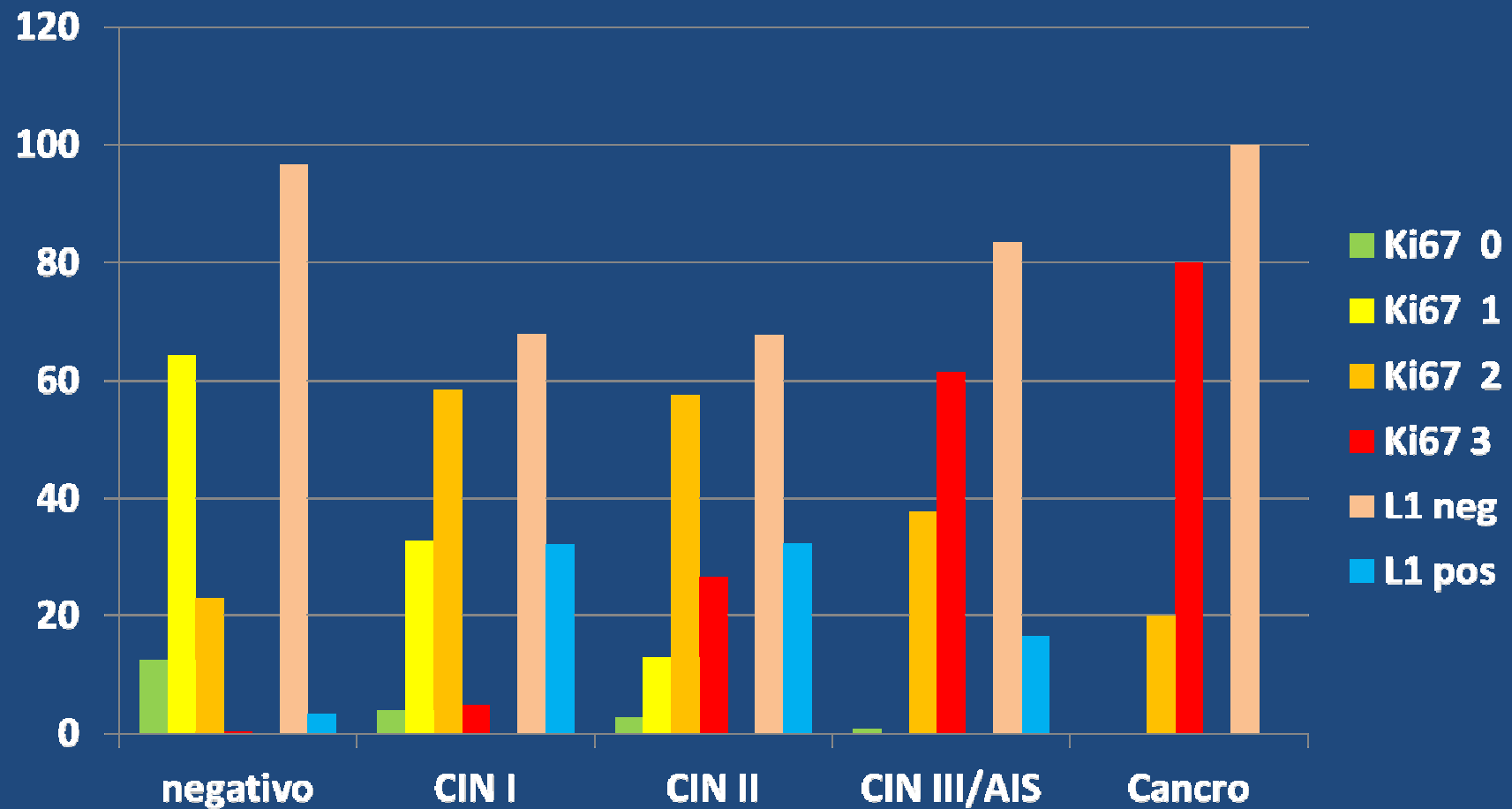
(Galgano MT et al, Am J Surg Pathol, 2010)

diagnosi	Diagnosi iniziale	Diagnosi di consenso
Negativo	755	748
CIN I	451	394
CIN II	147	177
CIN III	92	127
Cancro	6	5
Totale	1451	1451

Intensità della colorazione immunoistochimica p16INK4a vs diagnosi di consenso



Intensità della colorazione immunoistochimica Ki67 e HPV L1 vs diagnosi di consenso



Performance clinica dell'immunoistochimica con p16INK4a e Ki 67 vs diagnosi di consenso

	CIN 3 +			CIN 2+			CIN1+		
cutpoint	Se	Sp	YI	Se	SP	YI	Se	Sp	YI
P16 = 3	99,2	74,8	74,0	86,7	82,8	69,5	60,2	94,5	54,7
P16 = 3 Ki \geq 2	98,5	78,1	76,6	83,5	85,9	69,4	55,7	96,3	52,0
P16 = 3 Ki = 3	99,2	73,9	73,1	88,7	82,4	71,1	61,8	94,5	56,3

Riproducibilità del grading della colorazione immunoistochimica

	Accordo grezzo	Kappa	Kappa pesato
L1	96,9%	0,88	
Ki67	73,6	0,55	0,67
p16INK4a	76,5	0,64	0,80
P16 score 3	95,1%	0,87	
P16 score 3 - Ki67 2+	95%	0,86	
patologi diagnosi consenso	88,3-91,9	0,67-0,72	

alcune conclusioni....

- p16INK4a score 3 è altamente sensibile per CIN 3+ e CIN 2+, ma probabilmente non utile per distinguere CIN 1 non CIN
- Ki67 è ugualmente sensibile, ma meno specifica di p16 per CIN3+ e CIN2+, e non sembra aumentarne l'accuratezza
- L1 che dovrebbe correlare con una infezione HPV produttiva non è né sensibile né specifica per nessuna classe di CIN e non aiuta a distinguere CIN e non CIN . La sua presenza negli strati superficiali (30%) del Cin 3 potrebbe indicare la progressione da low grade a precancro.

....alcune conclusioni

- CIN 1 p16INK4a positivi sono a rischio di sviluppare in seguito CIN 2+, ma non è ancora possibile quantificare questo rischio
-le colorazioni istochimiche sono utili per migliorare l'accuratezza diagnostica dell'interpretazione clinica dell'istologia...
- possono essere molto utili nell'addestramento e nei luoghi dove non ci sono patologi esperti di riferimento
-per l'obiettivo di avere tests dirimenti occorrono molti altri studi non solo in quest'ambito ma anche in tutti gli altri ambiti coinvolti, perché la progressione verso la malignità è un evento multifattoriale non ancora completamente noto