GISCi
Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma

Biomarcatori di progressione nel II livello

Maria Benevolo
IRCCS Istituto Nazionale Tumori Regina Elena - Roma

27 • 28 ottobre, Verona
CONVEGNO NAZIONALE GISCi 2022

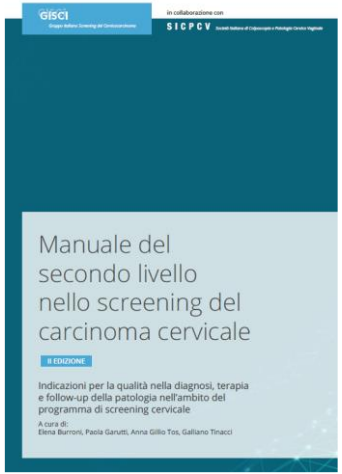
IRE
ISTITUTO NAZIONALE TUMORI
REGINA ELENA
ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO

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

dichiara

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

- *Roche Diagnostics: rapporti non finanziari*
- *Hologic S.r.l.: rapporti non finanziari*
- *Becton & Dickinson: rapporti finanziari e non finanziari*
- *Arrow S.r.l.: rapporti finanziari e non finanziari*



Il trattamento delle lesioni precancerose della portio ha ridotto in modo significativo sia l'incidenza che la mortalità per carcinoma cervicale (1).
L'introduzione della classificazione SIL anche per quanto riguarda la portio (WHO 2014) ha associato CIN2 e 3 in un'unica entità (HSIL) presupponendo un comune comportamento biologico.
Una recente metanalisi della letteratura sulla storia naturale del CIN2 ha dimostrato la bassa frequenza di progressione verso la forma invasiva (0,5%) rispetto ai dati storici di Ostor AG et al (Int J Gynecol Pathol 1993) che riportavano un 5% circa, e una percentuale di regressione spontanea del 50% in media fino al 60% nelle donne giovani (< di 30 anni) nell'arco di 24 mesi (2).
Queste osservazioni evidenziano gli aspetti ancora discutibili sul considerare CIN2 e CIN3 una stessa condizione (HSIL), il che potrebbe portare ad un over-treatment in alcuni casi.

Indice

Parte 1 | La Diagnosi

Capitolo 1 I criteri di invio in colposcopia ... 7
Capitolo 2 Formazione e requisiti del colposcopista nello screening organizzato ... 15
Capitolo 3 L'unità di colposcopia e presidi di chirurgia ambulatoriale ... 22
Capitolo 4 L'esame colposcopico ... 31
Capitolo 5 Lo studio del canale cervicale ... 38
Capitolo 6 Esame istologico: la biopsia e il cono cervicale ... 45
Capitolo 7 Il consenso informato in colposcopia ... 52

Parte 2 | La Gestione

Capitolo 8 Gestione della LSIL istologica cervicale (CIN1) ... 61
Capitolo 9 Gestione dell'HSIL istologica cervicale (CIN2-3) ... 65
Capitolo 10 Gestione dell'AIS istologico ... 69
Capitolo 11 Gestione della LSIL e della HSIL vaginale (VaIN) ... 75
Capitolo 12 Gestione del carcinoma squamoso e dell'adenocarcinoma microinvasivi ... 80
Capitolo 13 Complicanze dei trattamenti conservativi ... 85
Capitolo 14.a Gestione di casi particolari: la donna in gravidanza ... 89
Capitolo 14.b Gestione di casi particolari: la donna con immunodepressione ... 93
Capitolo 15 La patologia vulvare oncologica nello screening cervicale ... 98
Capitolo 16 Requisiti clinico-strutturali dei Centri di Riferimento per il trattamento del carcinoma invasivo ... 105

Biomarcatori di progressione nella definizione dell'outcome delle lesioni CIN2
(al fine di assicurare il trattamento più appropriato di queste lesioni)

LA CIN2 NON ESISTE

L'infezione da HPV può essere:

Produttiva: spesso transiente, porta alla produzione di nuove particelle virali, ed è istologicamente caratterizzata da alterazioni cellulari minori, diagnosticata come CIN1, con un basso rischio di progressione. Trattamento conservativo.

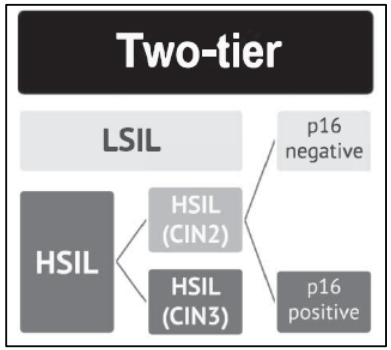
Trasformante: spesso persistente, da luogo da lesioni con atipie cellulari più marcate diagnosticate come CIN di alto grado, con più alto rischio di progressione. Trattamento escissionale.

LSIL e HSIL avrebbero una diversa origine: Le lesioni HG originerebbero da SCJ mentre le lesioni LG da altre cellule cervicali

2012 LAST Project (Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization):

A 2-tier system: low- and high-grade intraepithelial lesions
CIN should be reclassified in two-tiered system using p16 immunohistochemistry

(Darragh TM, Arch Pathol Lab Med 2012; Darragh TM, Int J GynecolPathol 2013)



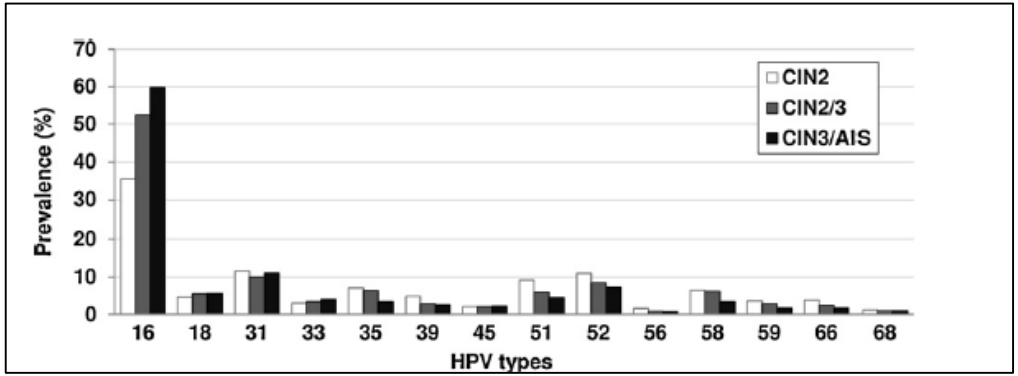
Lycke KD, Obstet Gynecol 2022)

LA CIN2 ESISTE

Due tipi di lesioni HG: una che origina da infezioni trasformanti della SCJ, e una che origina da infezioni produttive persistenti e deregolate, di epitelio metaplasico o esocervicale, con decorso clinico e comportamento biologico differenti (Herfs M. IJC 2015)

Il tasso di regressione delle CIN2 è più basso di quello delle CIN1 e più alto di quello delle CIN3 suggerendo che la CIN2 ha caratteristiche biologiche distinte (Loopik DL, J Low Genit Tract Dis 2021)

La prevalenza dei diversi genotipi è diversa tra le lesioni CIN2 e quelle CIN3 (Hariri S. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2015)



PREVALENZA DEI DIVERSI GENOTIPI DI HPV TRA LE DONNE CON CIN2, CIN2/3, E CIN3/AIS

WHO classification of tumours of the uterine cervix

2014

Epithelial tumours	
Squamous cell tumours and precursors	
Squamous intraepithelial lesions	
Low-grade squamous intraepithelial lesion	8077/0
High-grade squamous intraepithelial lesion	8077/2
Squamous cell carcinoma, NOS	8070/3

2020

Squamous epithelial tumours	
	Squamous metaplasia
	Atrophy
	Condyloma acuminatum
8077/0	Low-grade squamous intraepithelial lesion
8077/0	Cervical intraepithelial neoplasia, grade 1
8077/2	High-grade squamous intraepithelial lesion
8077/2	Cervical intraepithelial neoplasia, grade 2
8077/2	Cervical intraepithelial neoplasia, grade 3
8085/3	Squamous cell carcinoma, HPV-associated
8086/3	Squamous cell carcinoma, HPV-independent
8070/3	Squamous cell carcinoma NOS

Concordanza interosservatore: CIN2 19-53% vs CIN3 48-62% (Koeneman MM 2019)
Utilizzo di p16 per migliorare accuratezza diagnostica e ridurre variabilità interosservatore (Castle PE, ArchPatholLabMed 2020)

CIN2 regression/progression

1993 Ostor AG, Int J Gynecol Pathol:
regression=40%, persistence=40%, progression to CIN3=20%, progression to invasion 5%
(include anche studi con solo cito al baseline, molti studi pubblicati prima del grading system delle CIN)

2018 Tainio K, et al. BMJ:
36 studi, 3160 CIN2; median FU=16 months (range 3-72); adherence to FU around 90%; pooled 24-month-regression=50%; persistence=32%; progression to CIN3=18%; progression to invasion 0.5%
Women<30 years: regression=60%; persistence=23%; progression=11%

2021 Loopik DL, et al. J Low Genit Tract Dis:
42 studi, 3830 CIN2; 24 month-regression=57% (significantly higher in women 30 years or younger=66%) persistence=19%, and progression to CIN3=22%; progression to invasion 0.3%

CIN2

Escissione

Risoluzione «rapida» del problema (meno ansia)
Diminuzione del rischio di progressione

Overtreatment (lesioni non confermate: CIN1 o meno)
Complicazioni in gravidanza, parti pretermine, aborti spontanei
Ansia

Trattamento conservativo (sorveglianza attiva)

Minimo impatto su gravidanze future
alta probabilità di regressione spontanea

Ansia, numerose visite, rinvio di future gravidanze
Non aderenza al Follow-up
Costo di ripetute visite ed esami

Giudizio clinico, valutazione colposcopica, adeguatezza di tutti i referti, età, preferenza e storia clinica (vaccinazione) e riproduttiva della donna

Table 1. National Guidelines on Active Surveillance of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2

Country	Year of Initiation	Age Group (y)	Eligibility Criteria
United States[14,15]	2012	Younger than 25	Fully visualized SCJ or upper limit of the lesion • Endocervical sampling less than CIN 2 or worse
		25 or older	Fully visualized SCJ or upper limit of the lesion • Endocervical sampling less than CIN 2 or worse • Concerns on future pregnancy outcome
Australia[17]	2018	Not specified	Not completed childbearing • Cytology with ASCUS or LSIL • Focal minor changes on colposcopy • Recently treated for CIN 2 • Supervised by experienced colposcopist or at a tertiary care center
England[21]	2020	Not specified	Adequate colposcopy with exclusion of CIN 3 and invasive lesion • Lesion 2 quadrants or less • Patient agrees to follow-up every 6 mo • All cases must be discussed at MDT
Denmark[16]	2012	Not specified	Fertile with childbearing desire
Finland[18]	2019	Younger than 30	Nonsmoker • Lesion 2 quadrants or less Patient agrees to follow-up every 6 mo
Norway[20]	2020	Younger than 30	Small and well-defined lesion • Without inclusion of the cervical canal, ie, transformation zone type 1 and 2 • Non–HPV 16
Sweden[19]	2016	Younger than 25	Cytology less than HSIL • Colposcopy graded less than HSIL

Giovani (<25 o di 30 anni), immunocompetenti, lesioni piccole, zona di trasformazione ben visualizzata, no fumo, no contraccettivi orali
FU per 24 mesi con controlli ogni 4/6 mesi (cito, colpo, isto)
Al termine se persistenti o a progressione: trattamento chirurgico

Lycke KD, Obstet Gynecol 2022

- Solo un subset di CIN2 progredisce, la regressione si verifica circa nel 50% dei casi
- L'istopatologia non è in grado di distinguere tra lesione che progrediranno e che regrediranno.

I Biomarcatori ci possono aiutare a prevederne il comportamento?

Biomarcatore prognostico: caratteristica clinica o biologica obiettivamente misurabile che da informazioni sull'outcome più probabile (Koeneman MM, Expert Rev Mol Diagn 2015)
Valutato secondo 2 principi: deve avere un ruolo chiaro nella storia naturale della lesione, il valore prognostico e l'applicabilità clinica devono essere valutati secondo criteri standardizzati

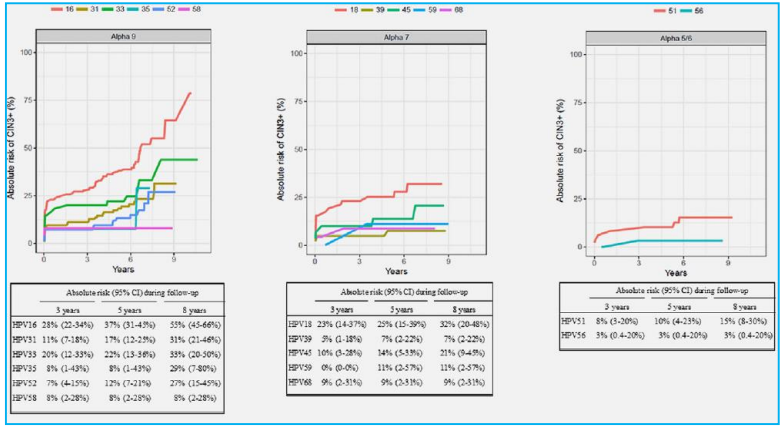
- La storia naturale di una HG-CIN è determinata da una complessa interazione tra sistema immunitario, fattori virali, processi cellulari e caratteristiche dell'ospite.
- Potenziali fattori prognostici devono essere individuati in queste aree

Marcatori legati all'infezione da HPV: genotipizzazione
Marcatori dell'espressione degli oncogeni virali: overespressione di $p16^{INK4a}$, metilazione
Marcatori legati a caratteristiche dell'ospite: microbioma vaginale

Genotipizzazione - razionale

CARCINOGENIC	**16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59**
PROB.CARCINOGENIC	68
POSS. CARCINOGENIC	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
LOW-RISK	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108
undetermined	55, 62, 64, 71, 83, 84

- ✓ Ogni genotipo di HPV ad alto rischio ha un differente potenziale oncogeno che è determinato da differenze nell'interazione con le funzioni cellulari e nell'abilità di evadere o deprimere il sistema immunitario dell'ospite
- ✓ Il rischio trasversale e longitudinale per lesione di alto grado è genotipo-dipendente ed è massimo per HPV16



Sand IJC 2019

hrHPV genotype	No. of infections	No. of ≥CIN3 cases	Absolute risk Estimate, %	95% CI
16	431	83	19.3	(15.8–23.3)
18	179	18	10.1	(6.5–15.3)
31	228	17	7.5	(4.7–11.6)
33	62	6	9.7	(4.5–19.6)
35	125	6	4.8	(2.2–10.1)
39	202	9	4.5	(2.4–8.3)
45	151	7	4.6	(2.3–9.3)
51	137	1	0.7	(0.1–4.0)
52	187	17	9.1	(5.8–14.1)
56	118	1	0.9	(0.2–4.6)
58	106	3	2.8	(1.0–8.0)
59	139	0	0.0	
66	157	1	0.6	(0.1–3.5)
68	117	2	1.7	(0.5–6.0)
Total	2,339	171		

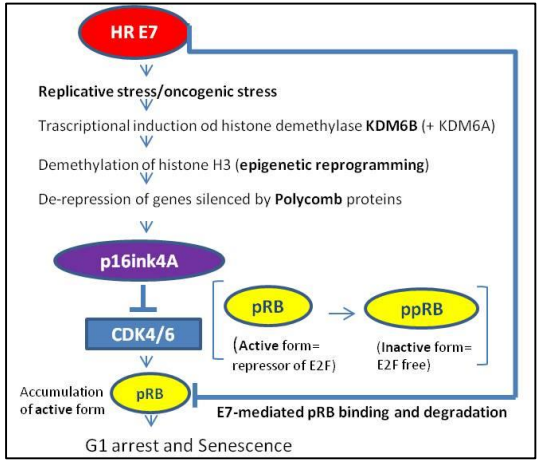
Stoler M., Int J cancer 2020

Genotipizzazione e CIN2

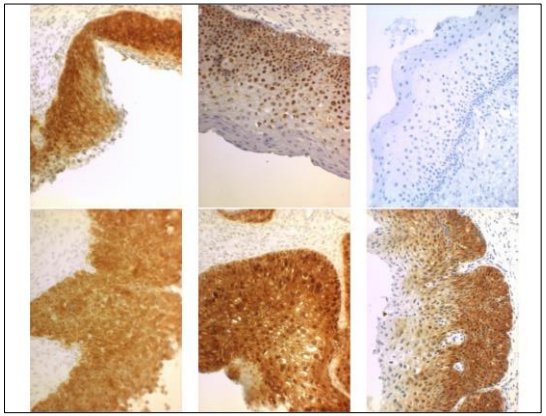
Moscicki AB, Obstet Gynecol 2010: 95 CIN2 <25 ys. HPV-persistence (in particular HPV16/18) associated with non-regression but HPV16/18 at entry not significant at multivariate analysis: high rate of clearance in young women
Tainio K, BMJ 2018: women HR-HPV negative and HPV16/18 negative at baseline had lower risk of progression at 24 months than HR-HPV or HPV16/18 positive. However, most of both HR or HPV16/18 positive and HPV negative experienced regression within two years.
Koeneman MM, Int J Gynecol Cancer 2019: 56 CIN2 all HR-HPV positive. HPV16/18 negativity was not predictive of regression/not significantly related to disease outcome
Castle PE, Obstet Gynecol 2009: CIN2 caused by HPV16 may be less likely to regress than those caused by other HR-HPV genotypes
Trimble CI, Clin Cancer Res 2005: 100 CIN2/3, regression rate > in non-HPV16 positive vs HPV16-positive (36.4% vs 20.5%)
Loopik DE, J Low Genit Tract Dis 2021: CIN2 regression was significantly higher in women 30 years or younger and HR-HPV–negative women
Ovestad IT, J Clin Pathol 2011: 55 CIN2/3, for 12 weeks: regression in 0 % of HPV16-positive vs 18% of non-HPV16 positive
Kremer WW., JCO 2022 (CONSERVE study): 80 CIN2+34 CIN3, 24-53 ys (median=30), HPV16 is an independent predictor of non-regression

La non-regressione della CIN2 è associata con la positività per HR-HPV e per HPV16.
Sebbene molte lesioni di alto grado siano causate da HPV16/18, molte regrediscono soprattutto nelle donne giovani, e il potenziale prognostico di questi genotipi rimane incerto.
La genotipizzazione di HPV non sembra avere sufficiente potenziale predittivo sull'outcome

Proteina p16 - razionale



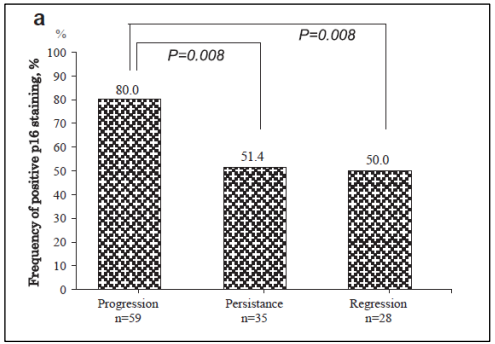
Inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti con funzione di regolazione della proliferazione cellulare
Over-espressa per interazione dell'oncoproteina virale E7 con pRB
Marker surrogato di infezione attiva da HR-HPV
Espressione direttamente correlata con severità della lesione
Biomarcatore per il triage della positività di HPV nello screening
In istologia marcatore diagnostico nel distinguere LSIL e HSIL (Darragh TM, J Low Genit Tract Dis 2012)

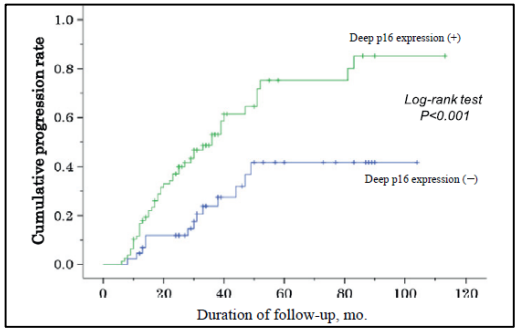


TEST p16:
Immunoistochimica
L'overespressione è indipendente dal genotipo HR
Interpretazione soggettiva
Cut-off non definito riguardo a intensità di colorazione

Overespressione di p16 e CIN2

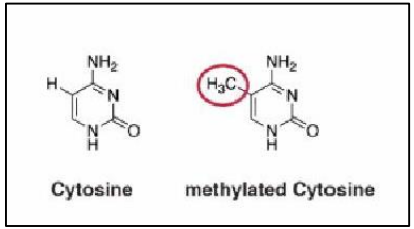
Guedes int j gynecol cancer 2007: p16 no predictive value of the outcome of CIN2: no significant difference in regression between p16INK4a-negative and -positive CIN2 lesions
Omori M. Am J Clin Pathol 2007: 52 CIN FU 2 ys. risk of progression greater only in strongly positive
Koeneman MM 2019: 56 CIN2 all HR-HPV positive. p16 not predictive of regression (weak vs strong staining)
Baak JP. Am J Surg Pathol 2005: 28 HSIL FU 8.2 months. No association between p16 and disease persistence or regression
Myiamoto S. et al, Int J Gynecol Obst 2016: 122 CIN2, FU 2 ys; CINTec Plus kit. Deep p16 expression is significantly more common among women with progression than those with regression, and is a risk factor for progression of CIN2

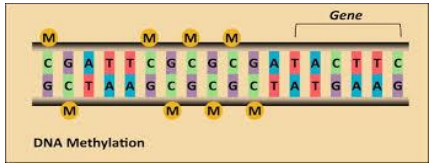




Risultati contrastanti
Ampia variabilità di anticorpi primari e di interpretazione della colorazione
Aumento della positività con l'aumentare della severità della lesione
Il valore prognostico non è stato dimostrato

Metilazione - razionale





Processo fisiologico di regolazione della trascrizione genica.
Aggiunta di un gruppo metile –CH3 alla citosina nei siti CpG del DNA
Aberrazioni nei processi di metilazione sono stati riconosciuti in tutti i tumori umani e risultano nel silenziamento di tumor-suppressor genes e nell'attivazione/overespressione di oncogeni
L'HPV induce modificazioni dello stato di metilazione del DNA dell'ospite e può contribuire alla carcinogenesi cervicale
Anche lo stato di metilazione dei geni virali è alterato e significativamente più alto nelle CIN2+ vs CIN1 (Bowden SJ. EBioMed 2019)
Il livello di metilazione di molti geni, dell'ospite e virali, aumenta con la severità della lesione ed è massimo nel cancro (Kelly H. BJC 2019; Kremer WW. BJOG 2020)

TEST METILAZIONE

L'interpretazione non è soggettiva
Test di metilazione di combinazioni di geni umani e/o virali hanno mostrato miglior accuratezza vs test di metilazione di singoli geni
Cut-off non ben stabiliti
Molti tests in commercio

NECESSARI MIGLIORAMENTI TECNICI E STANDARDIZZAZIONE

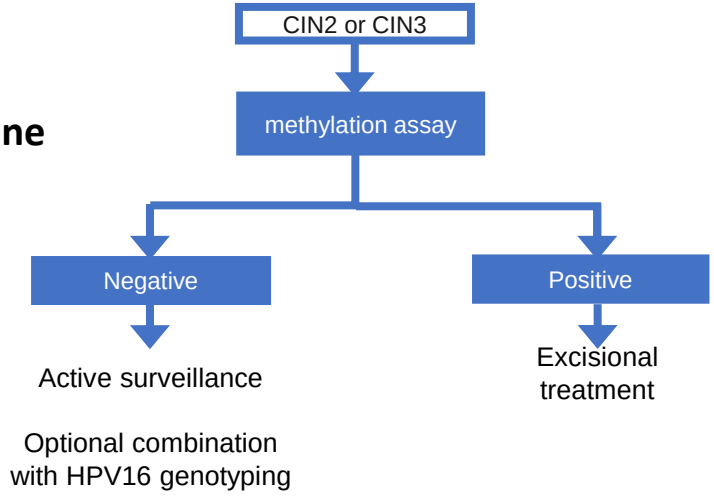
Applicazioni cliniche della metilazione

nello screening:

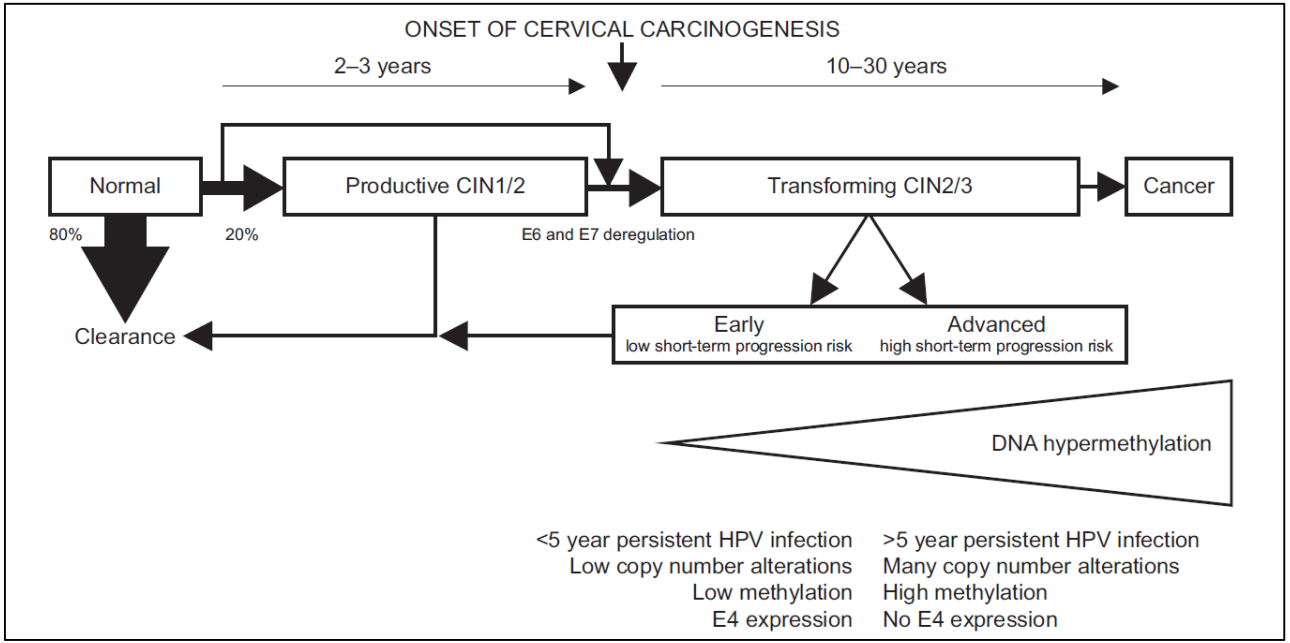
- come test di triage della positività ad HPV
- Nell'identificazione delle donne a maggior rischio di progressione tra quelle ASC-US/LSIL

- **nella gestione delle donne con CIN2/3:**

Stratificazione del rischio di non-regressione/progressione



Kremer WW., BJOG 2020



CIN2/3 associate con un'infezione persistente da almeno 5 anni hanno un alto tasso di metilazione con pattern simile a quello del cancro, suggerendo un alto rischio di progressione a breve termine (De Strooper LMA, Cancer Prev Res 2014; Verlaat W., Clin Cancer Res 2017)

Kremer BJOG 2020

Clinical Infectious Diseases
MAJOR ARTICLE
IDSA Infectious Diseases Society of America
hivma hiv medicine association
OXFORD

Methylation in Predicting Progression of Untreated High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia

Karolina Louvanto,[1,2,3,a,©] Karoliina Aro,[3,a] Belinda Nedjai,[2] Ralf Bützow,[4] Maija Jakobsson,[3] Ilkka Kalliala,[3,5] Joakim Dillner,[6] Pekka Nieminen,[3,b] and Attila Lorincz[2,b]

	Odds Ratio (95% Confidence Interval)			
Clinical Outcome	S5 Classifier	Papanicolaou Cytology Less than or Equal to Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance vs Greater than or Equal to Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion	HPV16/18 Genotyping	HPV16/18/31/33 Genotyping
Regression	1.00	1.00	1.00	1.00
Persistence	1.39 (.58, 3.37)	1.00 (.43, 2.33)	1.99 (.91, 4.35)	**3.50 (1.44, 8.52)**
Progression	**3.39 (1.35, 8.50)**	2.32 (.73, 7.42)	2.38 (.96, 5.91)	**3.17 (1.15, 8.68)**

Prospective cohort study 149 CIN2, mean age=26 ys (18-30), 2 ys FU, regression=59%
S5 Classifier (viral and host DNA methylation panel; non CE-IVD, user-defined cut-off)

Methylation shows high potential as a prognostic biomarker to identify progressive CIN2 and is the strongest biomarker associated with progression, compared to cytology, HPV16/18 or HPV16/18/31/33 genotype

Metilazione e CIN2

CONCERVE study:

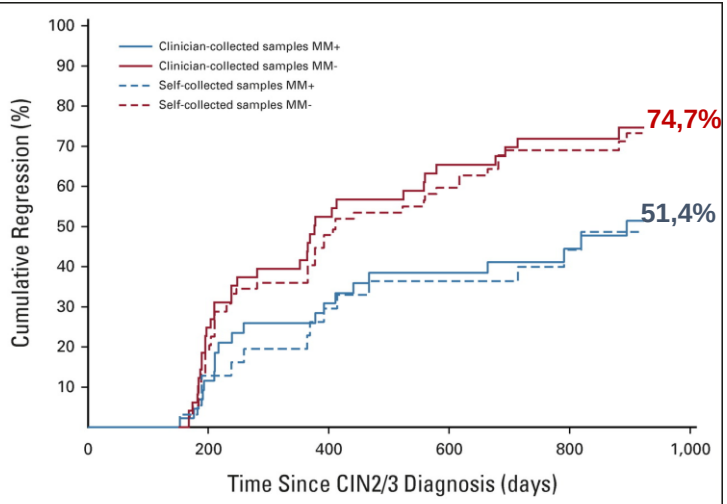
Multicentrico, prospettico, 2 anni di sorveglianza attiva; outcome=regressione clinica (non intervento chirurgico)

80 CIN2+34 CIN3, 24-53 ys (median=30)

75 donne (65,8%) non hanno ricevuto trattamento chirurgico dopo 2 anni di follow-up.

FAM19A4/miR124-2 QIAsure (CE-IVD), cut-off predefinito

- **La regressione clinica delle lesioni CIN2/3 era significativamente associata con l'assenza di metilazione di FAM19A4/miR124-2**



No. at risk:

Clinician-collected samples MM+	44	39	29	24	18
Clinician-collected samples MM-	49	37	23	17	11
Self-collected samples MM+	32	28	22	19	14
Self-collected samples MM-	74	60	37	27	15

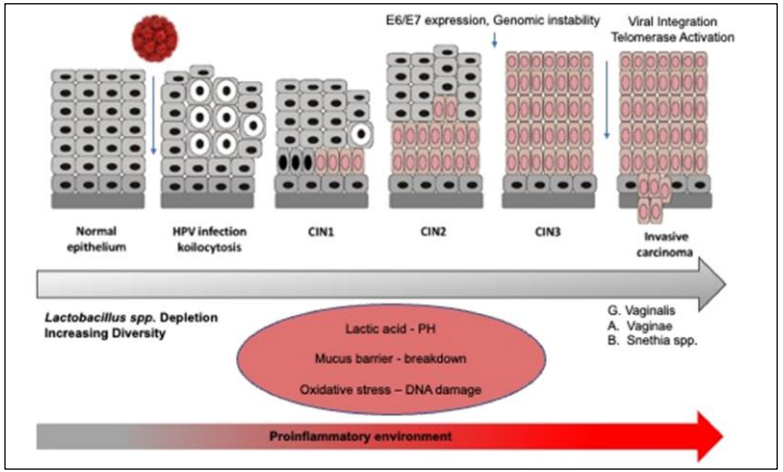
Kremer WW, JCO 2022

Microbioma vaginale - razionale

MICROBIOMA NORMALE:
- dominato da Lattobacilli (ruolo protettivo contro patogeni esogeni: mantenimento di pH basso, produzione di molecole antimicrobiche)
- Bassa diversità di specie

VAGINOSI BATTERICA:
- Carenza di Lattobacilli, predominanza di batteri non-Lactobacillus (in particolare anaerobi), aumento del pH
- Ampia diversità biologica

Microbioma vaginale suddiviso in categorie generali (**COMMUNITY STATE TYPES)** definiti dalla relativa abbondanza e diversità delle specie microbiche identificate



Kyrgiou M. and Moscicki B., Seminars in Cancer Biology 2022

Microbioma vaginale, infezione da HPV e patologia cervicale

Mitra A., Sc. Rep. 2015: l'aumento della biodiversità e la relativa minor abbondanza di Lattobacilli del MV è associato ad aumento della severità delle lesioni (normal<LSIL<HSIL<ICC)

Norenhag J et al. BJOG 2019 (meta-analisi 11 studi):
Maggior biodiversità e minor abbondanza di Lattobacilli tra le donne HPV-positive
Associazione tra vaginosi batterica (genericamente definita) e incidenza e persistenza di infezione da HPV
Minor rischio di HPV nelle donne con pH vaginale <5 vs >5
Associazione tra alcuni community state types del MV (soprattutto con specie anaerobiche), infezione da HPV e patologia HPV-relata

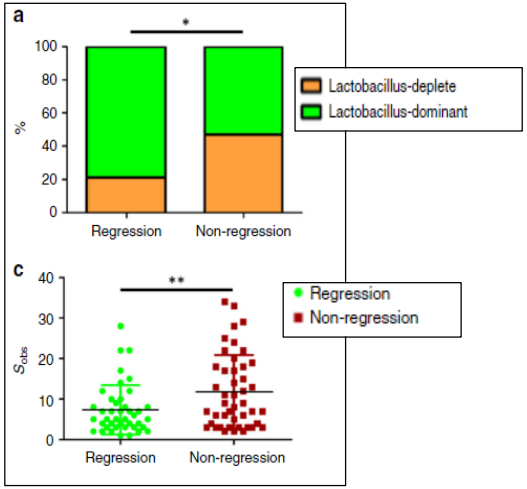
Test per analisi del microbiota vaginale

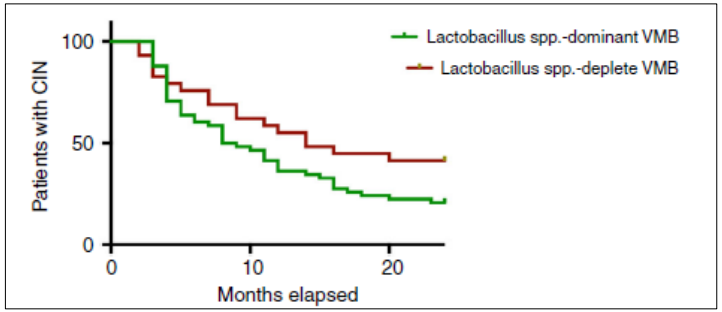
Nessuna standardizzazione metodologica
Molti e diversi metodi per campionare e analizzare il MV
Il numero e la composizione dei Community State Types (CST) differisce tra gli studi

Microbioma vaginale e CIN2

87 donne di età 16-26 anni; Valutazione del VM al momento della diagnosi di CIN2; FU=24 mesi; regression rate= 72.4% a 24 mesi

- Le donne con un MV dominato da lattobacilli mostravano maggior tasso di regressione rispetto a quelle con MV carente di lattobacilli (70% vs 42%)
- Le donne che non regredivano avevano una più alta abbondanza di specie diverse
- La clearance della CIN2 era più lenta nelle donne con carenza di lattobacilli





La composizione del MV può influenzare la storia naturale della lesione e può rappresentare un valido biomarcatore nel predirre l'outcome

Mitra A et al., Nature Communic 2020; Kyrgiou M. Sem in Cancer Biol 2022)

CONCLUSIONI

- Le lesioni CIN2 regrediscono in un'alta percentuale di casi
- Le lesioni di alto grado dovrebbero essere sempre classificate in un sistema a tre gradi, distinguendo CIN2 da CIN3, per ottimizzare le strategie di gestione
- La sorveglianza attiva dovrebbe essere offerta alle donne che potrebbero beneficiarne pesando attentamente rischi e benefici
- Elementi di valutazione nella scelta del trattamento sono l'età, la storia clinica e riproduttiva, le preferenze della donna, e i dati clinici (in alcuni paesi le gravidanze tendono a spostarsi in età più tardive)
- Ad oggi nessun biomarcatore permette di predirre con sicurezza il reale potenziale regressivo di una lesione CIN2 ed quindi nessuno è disponibile per essere immesso nella pratica clinica
- Tuttavia alcuni potenziali biomarcatori sono in studio e alcuni hanno mostrato un potenziale prognostico (metilazione)
- Le evidenze sono per ora limitate e sono necessari ulteriori studi per valutare la possibilità di un'applicazione clinica

Grazie per l'attenzione