

## Studio dell'associazione tra papilloma virus umani (HPV) e tumori cutanei epiteliali (*non-melanoma skin cancer*, NMSC)

### **Resoconto finale dell'attività svolta**

Questo studio è stato condotto nel laboratorio di Virologia "Oretta Bartolomei Corsi" del Dipartimento di Sanità Pubblica, dell'Università di Firenze, la sua realizzazione è stata resa possibile grazie ai finanziamenti ottenuti dalla Fondazione "Istituto di Ricerca Virologica Oretta Bartolomei Corsi"

Obiettivo dello studio era quello di approfondire le conoscenze sul ruolo dei papillomavirus umani (HPV) nei tumori di origine epiteliale (*non-melanoma skin cancer*, NMSC). Le fasi principali prevedevano (1) la raccolta dei campioni cutanei, (2) la ricerca e la tipizzazione degli HPV nei campioni cutanei, (3) la valutazione del comportamento biologico degli HPV individuati nei campioni cutanei.

### **Background.**

L'infezione persistente da alcuni papillomavirus mucosali è un prerequisito dello sviluppo del carcinoma della cervice uterina e di altri tumori della regione ano-genitale mentre l'associazione tra gli HPV e tumori cutanei epiteliali (NMSC), come il carcinoma a cellule squamose (SCC) e carcinoma a cellule basali (BCC) rimane ancora poco chiara. Studi epidemiologici hanno dimostrato l'associazione tra i marker dell'infezione dai beta-HPV e SCC nei pazienti con epidermodisplasia verruciforme (EV) e nei pazienti sottoposti al trapianto d'organo. Tuttavia sono in aumento i dati relativi al coinvolgimento dei beta-HPVs nella patogenesi dei NMSCs anche nella popolazione generale, immunocompetente. La maggior parte degli studi su questo argomento si è focalizzata sui carcinomi a cellule squamose e sulle lesioni che lo precedono, mentre sono ancora pochi gli studi relativi all'infezione da HPV nel carcinoma a cellule basali. La patogenesi del BCC, il più comune tipo di tumore umano, non è stata ancora descritta in dettaglio. Sembra che BCC origina dai follicoli piliferi i quali vengono considerati anche un eventuale serbatoio del virus. Solo un numero limitato di studi finora condotti ha confrontato la prevalenza e la distribuzione dell'infezione da HPV in campioni tumorali e in campioni della cute perilesionale prelevati dagli stessi pazienti

### **Raccolta dei campioni**

Nello studio sono stati inclusi 59 pazienti immunocompetenti sottoposti ad interventi chirurgici per carcinomi a cellule basali (BCC; n° pazienti: 50) o carcinomi a cellule squamose (SCC; n° pazienti: 9). A ciascun paziente sono stati effettuati 2 prelievi: una biopsia proveniente dal tumore ed una dalla cute istologicamente e clinicamente sana, distante circa 4 mm dal tumore (cute perilesionale). Nessuno dei pazienti inclusi nello studio risultava sottoposto a terapie con farmaci immunostimolanti o immunosoppressori. I pazienti sono stati raggruppati in base a sesso, età, fototipo e grado di esposizione ai raggi UV della zona da cui è stato effettuato il prelievo.

### **Ricerca e tipizzazione degli HPV nei campioni cutanei**

Per la ricerca e la tipizzazione degli HPV nei campioni bioptici sono state utilizzate le seguenti metodiche

1. PCR-nested per la regione L1 del genoma virale (FAP-PCR) seguita da clonaggio e sequenziamento dei prodotti di amplificazione. Questa metodica, allestita e messa a punto nell'ambito del progetto finanziato dalla Fondazione nell'anno 2009, permette di identificare circa 33 tipi virali: 26 beta-HPV, 5 gamma-HPV, 1 mu-HPV ed 1 nu-HPV.
2. RHA Kit Skin (beta) HPV (Diassay, Rijswijk, The Netherlands) gentilmente fornito dal Dr Jufferman. Questo metodo consiste in una PCR generica che amplifica una sequenza localizzata nella regione E1 del genoma virale, seguita dall'ibridazione dei prodotti di amplificazione con 25 sonde specifiche per i 25 principali tipi appartenenti al genere beta-HPV.
3. Inno-LiPa HPV Genotype System (Innogenetics), un kit commerciale in grado di individuare 28 principali HPV mucosali/genitali

## **Risultati**

### **L'infezione da HPV in pazienti con NMSC**

L'infezione da beta-HPV è stata individuata in 69/118 (58%) campioni da pazienti con NMSCs, [55/100 (55%) campioni da pazienti con BCC e 14/18 (78%) campioni da pazienti con SCC ( $p=0,06$ ). Le biopsie negative per il DNA virale risultavano positive per il gene della beta-globina umana indicando che il DNA estratto da campioni di tessuto era quantitativamente e qualitativamente adeguato per l'amplificazione. Tutti i campioni sono risultati negativi alla presenza degli HPV mucosali.

In totale, 44/ 59 (75%) pazienti presentavano il DNA dei beta-HPV nel tumore e/o nella cute perilesionale. La prevalenza dell'infezione era più elevata nei pazienti con SCC rispetto ai pazienti con BCC [9/9 (100%) vs 35/50 (70%)  $p= 0,06$ ].

Nei 44 pazienti risultati HPV DNA-positivi sono stati individuati 23 tipi di beta-HPV e 9 HPV putativi precedentemente descritti. I tipi maggiormente prevalenti sono risultati HPV5 (18%), HPV24 (15%), HPV8 (10%) e HPV93 (10%).

I tipi virali più comuni sono risultati quelli appartenenti alla specie 1, presenti in 60/118 (51%) biopsie, mentre i beta-HPV appartenenti ad altre specie (2, 3 e 4) sono stati individuati in 40/118 (34%) biopsie ( $p=0,006$ ). In pazienti con BCC i beta-HPV della specie 1 sono stati individuati in 49/100 (49%) campioni e quelli delle specie 2, 3 e 4 in 33/100 (33%) campioni ( $p= 0,02$ ). In pazienti con SCC 12/18 (67%) biopsie sono risultate positive ai beta-HPV della specie 1 e in 7/18 (39%) delle specie 2, 3 and 4 ( $p= 0,09$ ).

Nelle 69 biopsie complessivamente ottenute da 44 pazienti sono state evidenziate 165 infezioni dai beta-HPV dato che 44/118 (37%) campioni [34/100 (34%) BCC e 10/18 (56%) SCC ( $p= 0,1$ )] erano infettati con più di un genotipo virale. In totale il 64 % (44/69) campioni positivi presentavano infezioni miste.

La frequenza dell'infezione da beta-HPV nei pazienti con NMSCs aumentava con l'età (OR=4,88; 95%CI 1,29-18,38). Non è stata trovata una correlazione significativa tra la frequenza dell'infezione e sesso, fototipo o grado di esposizione agli UV.

### **Confronto tra NMSCs e cute perilesionale**

L'infezione virale è risultata più frequente nei NMSCs che nella cute perilesionale [39/59 (66%) vs 30/ 59 (51%) ( $p=0,07$ )]. Il numero di tipi virali individuati nei singoli campioni variava da 1 a 9 sia nei tumori che nella cute perilesionale.

In particolare 31/50 (62%) dei campioni di BCC e 24/50 (48%) dei campioni di cute perilesionale ( $p=0,1$ ) e 8/9 (89%) dei campioni di SCC e 6/9 (67%) ( $p=0,3$ ) di cute perilesionale sono risultati beta-HPV positivi.

Tra 59 coppie di biopsie (tumore/cute perilesionale) provenienti dagli stessi pazienti, 15 (25%) sono risultate beta-HPV negative, 25 (42%) pazienti avevano beta-HPV-DNA in entrambe le biopsie (NMSC e la corrispondente cute perilesionale) mentre 19 (32%) sono risultati positivi solo nel tumore (14 campioni; 24%) o solo nella cute perilesionale (5 campioni, 8%). Nelle coppie con entrambe le biopsie positive è stata osservata una elevata corrispondenza tra i tipi virali infettanti. Solo in due casi i tipi virali individuati nel tumore erano completamente differenti da quelli presenti nella cute perilesionale degli stessi pazienti, in altri tre, i tipi virali individuati nel tumore erano identici a quelli trovati nella cute perilesionale e in 20 casi le due biopsie contenevano da 1 a 6 tipi virali comuni

I tipi virali più frequenti (HPV 5, 8 and 93) risultavano distribuiti con la stessa frequenza nei tumori e nella cute perilesionale mentre l'HPV24 era due volte più frequente in BCC che nella corrispondente cute perilesionale. Nessuno dei tipi virali risultava significativamente associato ai tumori o alla cute normale.

I tipi appartenenti alla specie 1 dei beta-HPV erano più frequenti di quelli appartenenti alle specie 2, 3 e 4, sia in NMSC [36 of 59 (61%) vs 23 of 59 (39%) ( $p=0,01$ )] che nella cute perilesionale [24 of 59 (41%) vs 17 of 59 (29%) biopsie ( $p=0,1$ )].

La frequenza delle infezioni miste nei tumori era statisticamente più elevata nei tumori (28/59 campioni, 47%) che nella cute perilesionale (16/59 campioni, 27%) ( $p=0,02$ ).

La determinazione della carica virale mediante *real-time* PCR per l'HPV5 e l'HPV24 ha dimostrato che la quantità del DNA virale sia nei tumori che nella cute perilesionale è molto bassa (1 genoma/10 000 cellule – 100 genomi/cellula). Tuttavia la determinazione della carica virale nelle coppie di campioni (tumore/cute perilesionale) ha rivelato che la carica virale nei campioni positivi per l'HPV5 è risultata più elevata nei tumori che nella cute perilesionale. Un risultato inverso è stato osservato nelle coppie di campioni positivi per l'HPV24 (la carica virale nella cute perilesionale è risultata superiore a quella riscontrata nei tumori).

## Conclusioni

### L'infezione da HPV in pazienti con NMSC

Per quanto riguarda l'infezione da papilloma virus nei pazienti con NMSC i dati ottenuti dal presente studio indicano che

1. Gli HPV appartenenti al genere beta-papillomavirus sono molto diffusi nei tumori e nella cute perilesionale dei pazienti con BCC e si trovano con una frequenza analoga, anche se leggermente inferiore, a quella riscontrata nei soggetti con SCC. Infatti l'analisi da noi effettuata ha rivelato la presenza del DNA virale in almeno uno dei due campioni bioptici nel 70% dei soggetti con BCC e nel 100% dei soggetti con SCC. La seconda percentuale supera le percentuali riportate in letteratura e potrebbe essere sovrastimata a causa del basso numero di pazienti inclusi nello studio.
2. Gli HPV mucosali non sono stati individuati in nessuno dei campioni esaminati confermando che determinati tipi virali infettano preferenzialmente o l'epitelio cutaneo o quello mucosale.
3. Nei pazienti analizzati i tipi virali appartenenti alla specie 1 risultavano più comuni rispetto alle altre specie (2, 3 e 4). Questo tipo di distribuzione è risultato statisticamente significativo nei pazienti con BCC ma non nei pazienti con SCC.

4. Le infezioni miste rappresentavano un evento frequente nei pazienti analizzati dato che nel 64% dei campioni beta-HPV positivi sono stati individuati più di un tipo virale.
5. La prevalenza dell'infezione dagli HPV risultava aumentare con l'età dei mentre non è stata rivelata nessuna associazione tra l'infezione e sesso, fototipo, o grado di fotoesposizione.

### **Confronto tra NMSCs e cute perilesionale**

1. Il confronto fra 59 coppie di campioni costituite ciascuna da una biopsia tumorale ed una corrispondente biopsia di cute perilesionale, prelevate dagli stessi pazienti, non ha rivelato differenze significative sia nella prevalenza dell'infezione che nel numero di tipi virali identificati nei due tipi di tessuto. nella maggior parte dei casi (68%) entrambe le biopsie concordavano per la presenza o l'assenza dell'infezione. Nel 32% dei casi solo tumore o solo la cute perilesionale sono risultati positivi per il DNA virale. Nelle coppie con entrambe le biopsie positive è stata osservata una elevata corrispondenza tra i tipi virali infettanti. Solo in due casi i tipi virali individuati nel tumore erano completamente differenti da quelli presenti nella cute perilesionale degli stessi pazienti, in altri tre casi, i tipi virali individuati nel tumore erano identici a quelli trovati nella cute perilesionale e in 20 casi le due biopsie contenevano da 1 a 6 tipi virali comuni.
2. I tipi virali appartenenti alla specie 1 sono risultati più frequenti dei tipi appartenenti alle altre specie (2, 3 e 4) sia nei tumori che nella cute perilesionale. Tuttavia tale differenza è risultata statisticamente significativa soltanto nel caso dei tumori. Anche il numero di infezioni miste rivelato nei tumori è risultato statisticamente più elevato che nella cute perilesionale.
3. Diversi studi riportano dati relativi alla prevalenza e alla distribuzione degli HPV in tumori cutanei, nelle lesioni benigne e nella cute normale, mancano invece dati concreti sull'attività biologica dei virus presenti in questi campioni. Non si può escludere che lo stesso virus possa comportarsi diversamente (differente ritmo di replicazione e/o differente profilo dell'espressione genica) a seconda che sia presente nel tumore o nella cute perilesionale. La determinazione della carica virale nelle coppie di campioni (tumore/cute perilesionale) effettuata nel presente studio suggerisce la validità di tale ipotesi. Infatti la carica virale nei campioni positivi per l'HPV5 è risultata più elevata nei tumori che nella cute perilesionale. Un risultato inverso è stato osservato nelle coppie di campioni positivi per l'HPV24 (la carica virale nella cute perilesionale è risultata superiore a quella riscontrata nei tumori).