

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

Rendiconto

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 al finanziamento ottenuto dalla Fondazione "Istituto di Ricerca Virologica Oretta Bartolomei Corsi".

L'obiettivo dello studio è stato quello di approfondire le conoscenze sul ruolo dei papillomavirus umani (HPV) nei tumori cutanei di origine epiteliale (*non melanoma skin cancer*, NMSC). Le fasi principali dello studio prevedevano: (1) la raccolta dei campioni cutanei, (2) la messa a punto delle metodiche per la ricerca e tipizzazione degli HPV in campioni bioptici, (3) la ricerca e la tipizzazione degli HPV nei campioni raccolti, (4) la valutazione del comportamento biologico degli HPV individuati nei campioni.

Raccolta dei campioni cutanei

Nello studio preliminare sono state analizzate 106 biopsie cutanee prelevate da 53 pazienti immunocompetenti sottoposti ad intervento chirurgico per carcinomi a cellule basali, BCC (n pazienti = 43) o per carcinomi a cellule squamose, SCC (n pazienti = 10). La diagnosi clinica del tumore è stata confermata mediante l'esame istologico. Da ciascun paziente è stata prelevata una biopsia dal tessuto neoplastico ed una dal tessuto sano perilesionale. Il motivo per cui abbiamo deciso di analizzare due biopsie cutanee (tumorale e cute sana) prelevate dallo stesso paziente è legato all'esigenza di ridurre al massimo le differenze individuali che possono insorgere nel caso di biopsie prelevate da soggetti diversi. Per ciascun paziente è stata predisposta una scheda contenente le informazioni relative ad alcuni fattori, riconosciuti come fattori di rischio per questo tipo di tumori, quali l'età, il fototipo, l'esposizione a radiazioni solari.

Allestimento del protocollo

Uno degli obiettivi principali del presente studio è stato quello di allestire reazioni di amplificazione sensibili, capaci di evidenziare un elevato numero di tipi virali ed idonee per essere utilizzate nello *screening* dei campioni cutanei.

Sono state allestite due *nested* PCR con *primer* degenerati, posizionati in due regioni differenti del gene codificante per la proteina capsidica L1. Prendendo come riferimento la mappa genetica dell'HPV8, la FAP-PCR amplifica una sequenza di 480 pb compresa tra i nucleotidi 5981 e 6458 (*primer* esterni) e successivamente un frammento di 235 pb compreso tra i nucleotidi 6085 e 6319 (*primer* interni) (Forslund et al., 2003). La CP-PCR amplifica un frammento, con dimensioni che variano da 452 a 468 pb, a seconda del tipo virale, compreso tra i nucleotidi 6832 e 7298 (*primer* esterni) e successivamente un frammento da 374 a 389 pb compreso tra i nucleotidi 6862 e 7250 (*primer* interni).

Le prove effettuate su diluizioni seriali del DNA di alcuni tipi virali clonato nei plasmidi hanno dimostrato, che le due PCR sono in grado di individuare da 100 a 10 copie gnomiche. Inoltre l'analisi delle sequenze amplificate ha confermato l'elevata specificità di entrambe le reazioni.

Le due reazioni permettono di amplificare 40 tipi virali tra cui i principali beta-HPV, 7 tipi appartenenti al genere alfa (HPV6, 11, 13, 16, 18, 31, 33), gli HPV4, 48, 50, 60 e 65 che appartenenti al genere gamma, gli HPV2 e 63 appartenenti al genere mu e l'HPV41 appartenente al genere nu.

Analisi delle biopsie cutanee

a) CARCINOMI A CELLULE BASALI (BCC)

Dal confronto della prevalenza dell'infezione nel BCC con quella nella cute sana non è emersa una differenza statisticamente significativa anche se il DNA virale risultava più frequente nei tumori che nella cute perilesionale (58,1% vs 44,2%). Questi risultati concordano con quelli ottenuti in altri studi. Infatti la prevalenza del DNA virale nella cute di soggetti immunocompetenti riportata in letteratura varia dal 20% al 50% (Pfister et al, 2003; Meyer et al., 2001) e non sembra di differire in maniera sostanziale dalla prevalenza riscontrata nella cute sana.

La prevalenza dell'infezione nei pazienti inclusi nello studio è stata messa a confronto con alcuni fattori, riconosciuti come fattori di rischio per questo tipo di tumore, quali l'età, il fototipo, l'esposizione a radiazioni solari. Questa analisi ha rivelato una differenza statisticamente significativa tra la prevalenza del virus nel BCC dei soggetti di età avanzata e quella individuata nei soggetti più giovani ($p = 0,01$). Una ulteriore differenza significativa è emersa dal confronto della prevalenza degli HPV nel tessuto tumorale e quella riscontrata nella cute sana di pazienti di sesso femminile ($p = 0,01$). Nei pazienti di sesso maschile il virus è risultato invece presente con uguale frequenza in entrambi i tipi di campioni.

Non è stata invece rivelata alcuna differenza significativa tra la prevalenza dell'infezione e il fototipo, anche se i soggetti con il fototipo 2, caratterizzati da una cute più chiara, sembrano essere più suscettibili all'infezione rispetto a quelli con il fototipo 3.

Sorprendentemente non è emersa nessuna associazione tra l'infezione e il grado di esposizione solare. I raggi UV rappresentano il principale fattore di rischio per BCC. Infatti nel 90% dei casi il carcinoma basocellulare compare sulle zone della cute maggiormente esposte alla luce, come il volto, il capillizio per i calvi, le orecchie, le spalle ed il dorso. Inoltre diversi studi epidemiologici riportano una più frequente presenza degli HPV nelle regioni anatomiche maggiormente esposte alla luce, come la testa, il collo, il palmo delle mani. Tale osservazione viene rafforzata da alcuni studi molecolari da cui risulta che i raggi UV influenzano l'attività dei promotori di alcuni tipi di HPV residenti nella cute stimolando la replicazione virale. Tuttavia in alcuni studi riportati in letteratura ed anche nel presente studio questa associazione non è stata osservata.

Tipizzazione degli HPV

Gli HPV mucosali sono stati divisi, in base al loro potere patogeno e alla frequenza con la quale vengono individuati nelle lesioni maligne e benigne in tipi ad alto ed a basso rischio oncogeno. Questo tipo di distinzione non è stata finora possibile per i papillomavirus cutanei.

Alcuni beta-HPV, specialmente gli HPV5 e 8 sono stati frequentemente individuati nei tumori dei pazienti con Epidermodisplasia Verruciforme (EV) e dei pazienti trapiantati (Orth et al, 1978) e, con minor frequenza, anche nella cute sana. Mancano ancora dati sufficienti circa la distribuzione dei vari tipi virali nei tumori cutanei in soggetti immunocompetenti.

Uno studio recente ha dimostrato una forte associazione tra l'infezione dai beta-HPV e il tipo di lesione (Forslund et al 2007). In particolare i virus appartenenti alla specie 2 sono stati individuati più frequentemente nell'SCC che nella cute sana [OR, 4,40 (95% CL, 1,92-10,06)], mentre quelli appartenenti alla specie 1 erano più comuni nelle lesioni benigne rispetto alla cute sana [OR, 3,47 (95% CL, 1,72-6,99)]. In uno studio successivo (Patel et al 2008) la prevalenza dei virus appartenenti alla specie 1 è risultata superiore nell'SCC rispetto al BCC [OR, 2,6 (95% CL, 1,4-5,1)].

Per individuare i tipi virali presenti con maggiore frequenza nei due tipi di biopsie cutanee analizzate nel presente studio, i prodotti di amplificazione sono stati purificati, clonati e sequenziati. Per ogni campione è stato analizzato il DNA ottenuto da 2 cloni. Le sequenze virali sono state confrontate con le sequenze depositate nella GenBank utilizzando il programma BLAST. L'identificazione tassonomica dei virus individuati nei campioni è stata effettuata in base ai criteri stabiliti al *Workshop* dedicato al tema della classificazione dei papillomavirus tenutosi durante l'*International Papillomavirus Conference* a Barcellona nel 2000.

Tra i 40 tipi di HPV identificabili con la PCR utilizzata nel presente studio gli HPV 5, 8 e 21 sono risultati maggiormente presenti nei BCC (27,9%) mentre l'HPV5 era il più frequente nella cute sana (14%). Inoltre i virus più frequentemente individuati in entrambi i tipi di biopsie appartenevano alla specie 1 dei beta-

papillomavirus (51,2% per il BCC e 32,6% per la cute perilesionale). In nessuno dei campioni sono stati individuati gli HPV mucosali.

Analisi dell'espressione degli oncogeni virali

Nel 1996 zur Hausen (zur Hausen et al 1996) ha proposto una serie di criteri per valutare il coinvolgimento causale di un virus nello sviluppo di un tumore. Uno di questi criteri concerne la dimostrazione dell'espressione delle oncoproteine virali nel tessuto tumorale infetto. In letteratura sono riportati solo due studi dedicati all'attività trascrizionale degli HPV a livello cutaneo. Il primo (Purdie et al 2005), condotto mediante un test di ibridazione *in situ*, ha dimostrato l'espressione di proteine precoci E2 ed E4 nel 20% delle lesioni benigne ed nel 38% dei tumori a cellule squamose. Gli mRNA per le oncoproteine E6/E7 sono stati individuati soltanto nel 5,6% (1/18) degli SCC e in nessuna delle 17 lesioni benigne. Uno studio successivo di campioni ottenuti da pazienti trapiantati (Dang et al 2006), effettuato con un metodo più sensibile, la *real time* PCR, ha dimostrato la presenza di messaggeri per le oncoproteine degli HPV5, 9 e/o 15 nel 40% (4/10) dei casi di AK e di SCC.

Nello studio preliminare da noi effettuato l'espressione dei geni codificanti per le oncoproteine E6 ed E7 dell'HPV5 è stata valutata mediante una *real-time* PCR. In tutti i 4 BCC contenenti il DNA dell'HPV5 sono stati individuati messaggeri per la proteina E7 mentre in 4/6 (66,7%) delle biopsie della cute sana erano presenti messaggeri sia per la E6 che per la E7. Questa è la prima dimostrazione dell'espressione di oncoproteine virali nei tumori a cellule basali. Il significato del differente profilo dell'espressione nei due tipi di biopsie deve essere ancora indagato. Dalle prove effettuate non sembra che questo risultato possa essere dovuto ad una lieve differenza nella sensibilità delle due reazioni. Il differente profilo dell'espressione delle proteine E6 ed E7 potrebbe invece indicare un comportamento diverso dello stesso virus nel tumore e nella cute sana.

b) CARCINOMI A CELLULE SCAMOSE (SCC)

Il numero di campioni raccolti finora da pazienti con SCC è molto limitato quindi non si possono trarre delle conclusioni definitive dai risultati ottenuti dall'analisi di questi campioni. Tuttavia la prevalenza degli HPV in pazienti con SCC risulta superiore a quella osservata nei pazienti con BCC. Gli HPV sono stati individuati con la stessa frequenza (70%) in entrambi i tipi di biopsie. Come nel caso del BCC, nelle pazienti di sesso femminile i campioni tumorali sono risultati più frequentemente positivi per gli HPV rispetto a quelli da cute sana (66,7% vs 33,3%). E' stata inoltre osservata una maggiore frequenza dell'infezione nei soggetti con il fototipo 2 (50%) rispetto a quelli con il fototipo 3 (33,3%). Anche in soggetti con SSC la maggiore esposizione a raggi solari non sembra favorire l'infezione. Contrariamente a quanto è stato osservato per il BCC, nei pazienti con l'SCC la prevalenza dell'infezione dagli HPV non sembra aumentare con l'età.

Per quanto riguarda i virus identificati nei due tipi di biopsie è da sottolineare la frequente presenza dell'HPV5 (4/10, 40% di tumori e 3/10, 30% di campioni da cute sana). I messaggeri per le oncoproteine E6/E7 sono stati individuati in 4/4 dei campioni tumorali ed in 2/3 dei campioni della cute perilesionale.

Bibliografia

- Dang C., Koehler T., Forschner P., et al (2006) Br J Dermatol; 155: 129-136
Forslund O., Ifner T., Andersson K., et al (2007) J Infect Dis; 196: 876-883
Meyer T., Arndt R., Christopher E., Nindi I., et al (2001) Cancer detect Prev; 25: 533-547
Orth J., Jablonska S., Favre M., et al (1978) Proc Natl Acad Sci. USA ; 75: 1537-1541
Patel A.S., Karagas M.R., Perry A.E., et al (2008) J Invest Dermatol; 128 (12): 2888-2893
Purdie K.J., Surentheran T., Sterling J.C., et al (2005) J Invest Dermatol; 125: 98-107
Pfister H., Schegget J (1997) Clin Dermatol; 15: 335-347
Zur Hhausen H. (2002) Nat Rev; 2: 342-50