

"INFEZIONI DA HPV: DALLA DIAGNOSI PRECOCE ALLA PREVENZIONE PRIMARIA". Workshop presso l'Istituto Superiore di Sanità

Colomba Giorgi

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

RIASSUNTO - L'associazione del cancro della cervice con l'infezione dai cosiddetti HPV (papillomavirus umani) "ad alto rischio" ha favorito lo sviluppo di nuove tecnologie diagnostiche e di vaccini per la prevenzione e per la cura delle lesioni precancerose. In questo workshop sono stati discussi i vantaggi delle nuove strategie, la loro armonizzazione con quelle attualmente in atto e i riflessi della loro applicazione sulla sanità pubblica.

Parole chiave: Papillomavirus umano, tumore della cervice, vaccini, diagnosi ,

SUMMARY - (HPV infections: from early diagnosis to primary prevention. A workshop at the Italian National Institute of Health) - Cervical cancer association with infection with "high risk" HPV types creates a unique opportunity to develop new diagnostic technologies for the detection of the virus and to prevent or treat cervical cancer through anti-viral vaccination strategies. In this workshop the advantages of these new strategies, how to correlate them to those available and their effects on public health were discussed.

Keywords: Human Papillomavirus, cervical cancer, vaccines, diagnosis

giorgi@iss.it

Nei giorni 9 e 10 novembre 2005 si è tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità il workshop "Infezioni da HPV: dalla diagnosi precoce alla prevenzione primaria", in collaborazione con la Fondazione SmithKline e con il patrocinio della Società Italiana di Virologia. Le infezioni da papillomavirus umani (HPV) sono una importante causa di tumori a livello dell'epitelio anogenitale, orofaringeo (HPV mucosali) e cutaneo (HPV cutanei). Alcuni HPV mucosali, detti "ad alto rischio", sono riconosciuti come agenti causali del cancro del collo dell'utero e sono coinvolti nel 25% dei tumori cosiddetti testa-collo. L'associazione invece tra gli HPV cutanei e i tumori cutanei è meno chiara.

Il cancro della cervice costituisce la seconda causa di morte per cancro nel mondo, secondo solo al cancro della mammella. Lo screening per il cancro della cervice effettuato utilizzando il Pap test e l'esame pelvico ha ridotto l'incidenza di questa patologia nei paesi industrializzati ma nei paesi in via di sviluppo l'incidenza e la mortalità rimangono molto alte.

Con lo sviluppo di un vaccino profilattico contro l'infezione da due tipi di virus "ad alto rischio" (HR), HPV16 e 18, si stanno profilando nuovi scenari per la prevenzione del cancro alla cervice. Questa grande opportunità non deve però far passare sotto silenzio tutte le problematiche ancora irrisolte riguardanti la patogenesi virale ed i meccanismi di carcinogenesi legati all'infezione virale. Lo scopo del workshop è stato di illustrare lo stato

dell'arte nella ricerca nel campo dell'infezione da HPV e di aprire una discussione sulle problematiche di carattere sanitario legate all'avvento del vaccino.

Nella prima sessione del workshop le relazioni presentate da Massimo Tommasino, da Santo Landolfo e da Aldo Venuti hanno messo in evidenza la differenza nei meccanismi molecolari degli HPV cutanei rispetto a quelli mucosali. Per questi ultimi l'associazione causale virus-tumore è stata ormai stabilita e i meccanismi molecolari coinvolti ben definiti. Questi sono principalmente associati alla capacità delle due proteine E6 ed E7, riconosciute come oncoproteine virali, di legare due oncosoppressori cellulari, p53 e pRb rispettivamente, neutralizzando la loro normale funzione. Queste interazioni portano alla completa perdita del controllo del ciclo cellulare e del meccanismo apoptotico, inducendo la trasformazione neoplastica. Le corrispondenti proteine degli HPV cutanei sembrano invece avere una bassa affinità per le due proteine cellulari e non sono in grado di inibire la loro funzione. Gli studi riguardanti l'associazione tra gli HPV ed i tumori cutanei *in vivo* sono di difficile interpretazione essendo questi virus normali commensali della cute ed essendo il loro genoma rilevabile anche in minima quantità con tecniche molto sensibili quali la PCR. I dati ottenuti in sistemi diversi (topi transgenici per l'HPV mucosale 38, studi *in vitro* delle proteine E6 ed E7, di HPV5 ed HPV8, HPV cutanei, trovati in tumori non-melanoma della pelle) hanno evidenziato l'attivazione ►

dei meccanismi di oncogenesi virale sotto lo stimolo dei raggi ultravioletti indicando questi virus quali cofattori nella carcinogenesi cutanea.

Un importante meccanismo mediato dalle proteine trasformanti (E5, E6, E7) degli HPV-HR mucosali è quello di promuovere l'evasione della risposta immunitaria dell'ospite sia innata che acquisita attraverso meccanismi diversi, discussi da Maria Saveria Campo.

L'HPV-16 è il virus a più alto rischio, essendo presente nel 50% dei tumori della cervice. Diverse varianti del virus sono state identificate, ciascuna con una specifica distribuzione geografica, proprietà biologiche e biochimiche e rischio associato alla progressione neoplastica. Franco Maria Buonaguro ha riportato i risultati di uno studio che rilevano la circolazione in Italia di varianti HPV16 sia europee che non europee. Il rischio di sviluppare lesioni intraepiteliali e invasive è risultato maggiore nelle donne infettate da varianti europee, suggerendo la necessità di una diagnosi virale più appropriata con l'identificazione non solo del tipo virale ma anche della variante.

Un altro aspetto importante nella gestione del paziente affetto da lesioni cancerose è la determinazione di fattori prognostici della progressione; uno di questi fattori, negativo riguardo alla sopravvivenza della paziente, è la presenza di metastasi linfonodali. Flavia Lillo ha riportato uno studio i cui risultati mostrano che il tipo di HPV e la carica virale nei linfonodi possono rappresentare marcatori di disseminazione del virus con evidenti ricadute sul trattamento del paziente.

L'esame di tre marker di progressione tumorale associata ad HPV, p16INK4a, survivina e ERK1, è stata riportata da Marco Ciotti. I risultati dello studio hanno mostrato che essi possono essere considerati marker precoci di cancerogenesi cervicale. L'aumentata espressione di p16INK4a e survivina risulta strettamente correlata alla presenza

di HPV-HR nelle lesioni, mentre alcuna correlazione è stata evidenziata per ERK1.

La diagnosi morfologica delle lesioni HPV-associate e dell'infezione virale sono state affrontate in due relazioni tenute da Amina Vocaturo e Anna Marta Degener. La prima ha illustrato il nuovo sistema di refertazione della citologia cervico-vaginale che ha introdotto il concetto di "Lesione Squamosa Intraepiteliale" (SIL) graduandola in due classi diagnostiche, rispetto alle tre individuate precedentemente: 1) SIL di basso grado, comprendente alterazioni displastiche di grado lieve; 2) SIL di alto grado, comprendente displasia di grado moderato e grave.

Le tecniche di laboratorio per rilevare la presenza del virus HPV in cellule esfoliative e biopsie e la loro tipizzazione sono in continuo sviluppo e diventano sempre più sofisticate (PCR, sequenza nucleotidica, microarray). Finora solo un test basato sulla cattura dell'ibrido è stato approvato dalla Food and Drug Administration. È stata auspicata una maggiore collaborazione tra i laboratori con la messa in atto di sistemi di qualità inter-laboratori per poter confrontare i dati ottenuti nei diversi programmi di screening.

Un argomento attualmente molto dibattuto è l'utilizzo della ricerca molecolare dell'HPV come test primario nello screening del cancro della cervice uterina. Francesca Carozzi ha riportato i risultati preliminari di uno studio italiano effettuato su 50.000 donne. Esse sono state assegnate casualmente a due bracci previsti dallo studio: convenzionale, che prevedeva solo l'esame citologico, e sperimentale, che prevedeva l'esame citologico e la ricerca dell'HPV-HR. Circa il 10% delle donne sono risultate positive al test HPV-HR. Un primo risultato dello studio indica che il test HPV aumenta fortemente la sensibilità dello screening ma ne riduce il valore predittivo positivo.

Una tecnica diagnostica molto usata nel campo delle malattie infettive è quella del rilevamento degli anticorpi specifici nel siero. Questa tecnica è stata poco sviluppata per l'infezione da HPV a causa dell'impossibilità di coltivare *in vitro* i virus. Paola Di Bonito ha riportato lo sviluppo di un sistema ELISA basato sull'uso di 5 delle 8 proteine virali ricombinanti dell'HPV16, prodotte in un sistema procariota e denaturate. Con tale sistema è stata valutata la risposta anticorpale nel siero di donne infettate da HPV di diversi tipi. I risultati dimostrano la validità di tale test per rilevare anticorpi HPV16 specifici e sorprendentemente anche anticorpi contro tipi di HPV non-16.

Due relazioni sono state improntate sullo sviluppo di metodi alternativi alla chirurgia per la

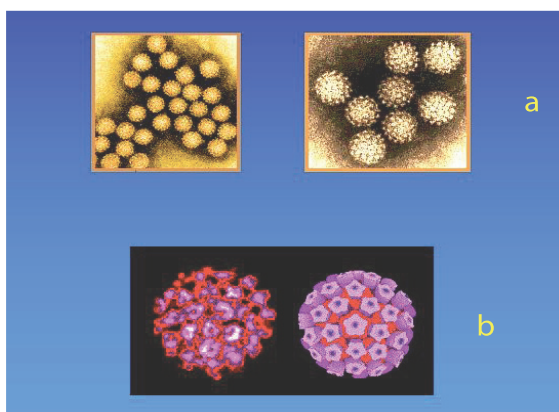


Figura 1 - Immagini al microscopio elettronico (a) e ricostruzione del virus del papilloma umano (b)

cura di lesioni cancerose HPV-correlate. Luisa Accardi ha riportato l'uso di anticorpi monoclonali ricombinanti in formato a singola catena (scFv) come strumenti efficaci nell'immunizzazione intracellulare per contrastare specificatamente l'azione di proteine oncogene. ScFv specifici per la proteina oncogena E7 di HPV16, espressi intracellularmente in linee cellulari derivanti da carcinoma della cervice uterina, hanno mostrato la loro efficacia bloccando la proliferazione cellulare favorita da E7.

Giovanna Romeo ha illustrato i promettenti risultati ottenuti in cellule di carcinoma della cervice HPV16-positive, silenziate nell'espressione delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV con la tecnica dell'RNA interfering, nell'ambito dello studio di nuove strategie terapeutiche e per l'uso razionale dell'IFN nel trattamento del carcinoma cervicale HPV-indotto.

L'ampia acquisizione della ricerca scientifica sull'interazione dell'HPV con l'ospite in ambito virologico, immunologico, epidemiologico e ginecologico ha portato allo sviluppo di un vaccino preventivo rendendo concreta l'idea di prevenzione primaria del cervicocarcinoma e ponendo così le basi per una vera rivoluzione nell'approccio a questa patologia oncologica. Lucio Mariani ha riportato i dati degli studi di fase III di un vaccino preventivo anti-HPV 16 e 18 basato sulle cosiddette "virus-like particles" (VLPs), costituite dall'involucro virale ricostituito in vitro. Queste VLPs, oltre ad essere non pericolose, essendo prive del genoma virale, si sono rivelate altamente immunogeniche, inducendo una copertura protettiva tra il 90 ed il 100% nelle donne vaccinate con nessun effetto collaterale degno di nota. Il relatore ha evidenziato come, a fronte di una alta efficacia della vaccinazione, rimangano aperti molti problemi clinici e metodologici quali la modalità di vaccinazione, l'identificazione del target della vaccinazione, la scelta dell'area geografica dove pianificare i trial post-marketing e l'integrazione con i programmi di screening sul territorio. Essendo lo sviluppo del cancro molto lento dal momento dell'infezione da HPV (15-20 anni), gli effetti di una vaccinazione preventiva potranno essere evidenti tra decenni, da qui la necessità di sviluppare vaccini terapeutici utili nella cura di lesioni già acquisite.

L'autore di questo articolo ha riportato dati riguardanti lo sviluppo di un vaccino terapeutico basato sulle proteina oncogena E7 espressa in pianta. Il preparato vaccinale costituito da estratti di foglia contenenti E7 si è rivelato efficace contro tumori HPV-correlati indotti in topi, riducendo l'insorgenza del tumore nell'80% dei topi e ridu-

cendone il volume negli altri. Il vaccino inoltre è stato in grado di attivare linfociti T citotossici specifici quando testato su un sistema preclinico costituito da cellule dendriche umane.

Nella sessione finale del workshop si è tenuta la tavola rotonda "Infezione da HPV e carcinoma della cervice uterina. Nuovi strumenti di prevenzione: criticità e opportunità nel contesto sanitario italiano". La Tavola rotonda, moderata da Nicola Falcitelli, ha visto la partecipazione di ginecologi, esponenti della politica sanitaria e operatori sanitari, tra i quali Sergio Pecorelli, Donato Greco, Marco Rosselli Del Turco, Francesco Raspagliesi, Giovanni Renga e Antonio Ferro.

Dalla discussione è emersa la convinzione che il vaccino profilattico tra breve in commercio rappresenta una grande possibilità per il controllo futuro del carcinoma della cervice, anche se la sua efficacia è ristretta a due soli tipi di HPV ad alto rischio, i tipi 16 e 18, che comunque coprono il 60-70% dei tumori. Il vaccino contiene inoltre gli antigeni di due tipi di HPV a basso rischio, l'11 ed il 6, associati ai condilomi per promuovere la vaccinazione anche presso gli uomini. Opinione comune dei relatori è che questo vaccino potrebbe essere molto utile nei paesi in via di sviluppo, dove manca una politica di screening preventivo, ma l'alto costo ne impedirà l'applicazione. Anche in Italia sarà necessaria un'armonizzazione della vaccinazione con gli screening attuati nella maggior parte delle regioni. Per evitare una corsa al vaccino da parte di singoli, sarà necessaria un'ampia campagna di informazione e la creazione di centri pubblici a cui richiedere la vaccinazione in ambito controllato. L'esigenza di una maggiore e corretta informazione alle donne riguardo l'infezione da HPV, la sua possibile progressione, le campagne di screening per un approccio, anche psicologico, corretto verso queste problematiche, è stata sottolineata da tutti i partecipanti. ■



Gruppo di lavoro ISS sulle infezioni da HPV (da sinistra, in alto: Felicia Grasso, Maria Gabriella Donà, Luisa Accardi, Paola Di Bonito; in basso: Stefania Mochi, Colomba Giorgi)