

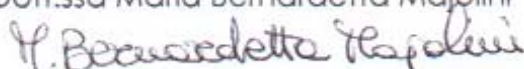
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in
GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE - XXV Ciclo.

**Applicazione di nuove metodologie alla diagnostica delle
infezioni da HPV: valutazione della performance clinica
dell'HPV OncoTect rispetto al Nuclisens EasyQ e del suo
potenziale ruolo nell'individuazione di lesioni
preneoplastiche della cervice uterina.**

(MED/05)

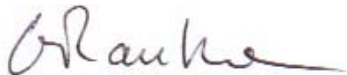
Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Maria Bernardetta Majolini


Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera

Firma



Tutore

Prof. Lello Zolla

Firma



31 maggio 2013

INDICE

INTRODUZIONE

Capitolo 1: I Papillomavirus	Pag 3
1.1 Caratteristiche generali	Pag 3
1.2 Struttura genomica dell'HPV	Pag 4
1.2.1 Proteine virali	Pag 5
1.3 Ciclo replicativo dell'HPV	Pag 10
1.3.1 Infezione latente	Pag 10
1.3.2 Infezione produttiva	Pag 11
1.3.3 Amplificazione genica	Pag 11
1.3.4 Assemblaggio delle particelle virale	Pag 12
1.4 Meccanismi Patogenetici	Pag 13
1.5 Storia naturale dell'infezione da HPV	Pag 14
Capitolo 2: Caratteristiche cliniche dell'infezione da HPV	Pag 16
2.1 Manifestazioni cliniche	Pag 16
2.2 Cofattori dell'infezione	Pag 17
2.2.1 Fattori appartenenti all'ospite	Pag 18
2.2.2 Fattori virali	Pag 18
2.3 Epidemiologia	Pag 19
2.4 Prevalenza	Pag 20
Capitolo 3: Metodiche diagnostiche dell'infezione da HPV	Pag 21
3.1 Pap-Test	Pag 21
3.2 Colposcopia	Pag 22
3.3 Esame istologico	Pag 23
3.4 Test molecolari	Pag 25
3.4.1 HPV DNA	Pag 26
3.4.2 HPV mRNA	Pag 29
3.4.3 HPV OncoTect®	Pag 29
3.5 Linee guida	Pag 30

OBIETTIVO DELLO STUDIO	Pag 33
Capitolo 4	
MATERIALI E METODI	
Capitolo 5	Pag 34
5.1 Pazienti e disegno dello studio	Pag 34
5.2 Pap-Test	Pag 34
5.3 Estrazione materiale genetico	Pag 35
5.4 Test DNA INNOLiPA HPV	Pag 37
5.5 Test NucliSENS EasyQ	Pag 38
5.6 Test HPV OncoTect®	Pag 41
5.7 Analisi statistica	Pag 43
RISULTATI	
Capitolo 6	Pag 44
CONCLUSIONE	
Capitolo 7	Pag 51
BIBLIOGRAFIA	Pag 57

INTRODUZIONE

Capitolo 1

I papillomavirus

1.1 Caratteristiche generali

I papillomavirus (PV) (Figura 1) sono un gruppo eterogeneo di virus appartenenti alla famiglia delle Papillomaviridae (*De Villiers EM et al, 2004*); sono piccoli virus nudi a simmetria icosaedrica con virioni di 45-55 nm, possiedono un DNA circolare a doppia elica di circa 8 kilobasi. Questi virus mostrano uno specifico tropismo per le cellule del tessuto epiteliale (epiteli cutanei e mucosi di tipo squamoso), la loro replicazione è ristretta a questo tipo di cellule, è condizionata dallo stadio di differenziamento cellulare e induce lesioni iperproliferative.

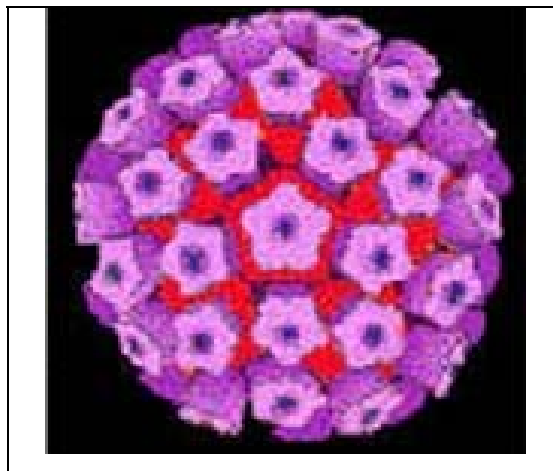


Figura 1: Rappresentazione schematica del virione degli HPV.

I PV sono stati rinvenuti in tantissime specie animali; e sono specie-specifici. Fino ad ora sono stati identificati circa 200 differenti tipi di papillomavirus umani ; il genoma di 100 tipi di questi virus è stato completamente sequenziato e caratterizzato e circa 35-40 infettano l'area ano-genitale. Alcuni di questi si associano quasi esclusivamente a lesioni benigne e vengono perciò detti “tipi a basso rischio oncogeno”, che attaccano prevalentemente la cute (genotipi 6, 11, 42, 43, 44) mentre altri si associano soprattutto a lesioni di alto grado e carcinoma invasivo e perciò sono detti “tipi ad alto rischio

oncogeno” i quali attaccano prevalentemente le mucose (genotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). (Zur Hausen H, 2002; Bosch FX et al, 2002; Bernard HU, 2005)

1.2 Struttura genomica dell'HPV

Il genoma è essenzialmente diviso in tre regioni:

- La prima è una regione non codificante chiamata Long Control Region (LCR), le cui dimensioni sono notevolmente diverse tra i genomi dei diversi tipi di HPV (in media rappresenta il 5% del genoma virale, con un peso molecolare che varia da 400 a 1000 paia di basi). All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e trascrizione virale.
- La seconda è la regione Early (E) codificante per proteine virali precoci. Rappresenta il 45% del DNA virale e contiene sei geni espressi nella fase iniziale del ciclo replicativo, che codificano proteine non strutturali, denominate da E1 a E8, è implicata nella replicazione virale e nell'oncogenesi (produce proteine ad azione trasformante in grado di indurre proliferazione e immortalizzazione delle cellule umane).
- La terza è la regione Late (L) codificante per proteine virali tardive. Corrisponde al 40% del DNA, è una regione molto conservata che codifica per la sintesi delle proteine strutturali capsidiche, denominate L1-L2 (Figura 2) (Doorbar J et al, 1991).

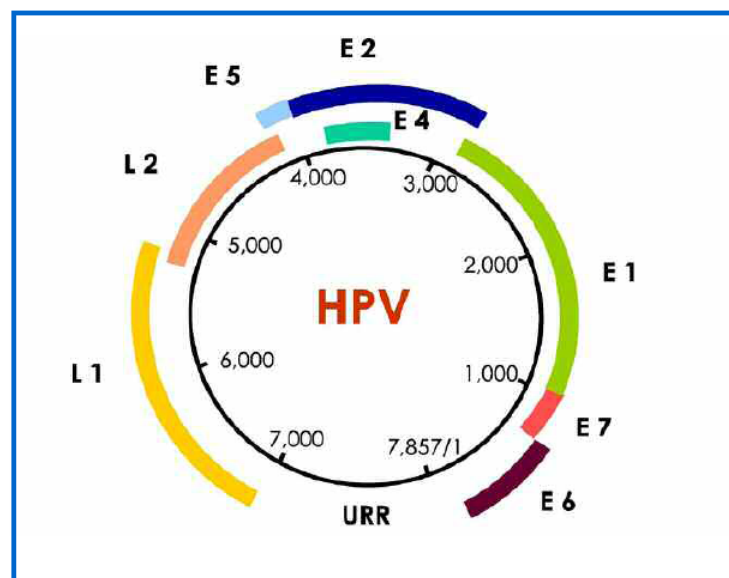


Figura 2. Organizzazione genomica del papillomavirus

1.2.1 Proteine virali

E1: Proteina di 73 kDa essenziale per la replicazione virale; svolge un ruolo importante nella fase iniziale della replicazione del genoma virale, in collaborazione con E2. Presenta un'attività elicastica ATP-dipendente necessaria per il riconoscimento e l'inizio della sintesi del DNA. (*Zur Hausen H, 2002*).

E2: Proteina di circa 50 kDa, regola sia la replicazione del DNA virale che la trascrizione dei geni virali. E2 è attiva solamente in forma dimerica. Tali dimeri legano sequenze consensus palindromiche (ACCN6GGT), denominate siti di legame per E2 (E2BS) (*Laimins LA, 1998*). Tre di questi siti fiancheggiano le sequenze di riconoscimento di E1 nell'origine di replicazione (*Howley PM, 1996*).

E2 regola la trascrizione virale a livello di promotori precoci; a bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre a concentrazioni elevate reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, le due principali oncoproteine virali e la sua perdita rappresenta il primo stadio di trasformazione neoplastica. (*Wilson R et al 2005*)

E4: Nonostante la sua inclusione tra le proteine precoci, è espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed è una delle proteine più abbondanti presenti durante il ciclo virale (*Wilson R et al 2005*). Il ruolo è legato all'infezione produttiva; sembra possa interagire con i filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio delle particelle virali.

E5: Proteina altamente idrofobica di circa 80 aminoacidi, localizzata a livello delle membrane endosomali, dell'apparato di Golgi e della membrana plasmatica. Essa può avere un ruolo trasformante nelle fasi iniziali dell'infezione, durante le quali il virus è presente in forma episomale, predisponendo la cellula a successivi stimoli mitogeni. E5 svolge molteplici funzioni: attiva la trasduzione del segnale per la mitosi tramite fattori di trascrizione come c-jun e c-fos, inattiva la p21 e previene inoltre l'apoptosi in seguito a danno al DNA. Tuttavia il suo ruolo nei processi di trasformazione è secondario, in quanto la sua espressione viene persa in seguito all'integrazione del genoma virale (*Zur Hausen H, 2002*).

E6: Il gene E6 è uno dei primi ad essere espresso durante l'infezione dei papilloma virus; codifica per una proteina, distribuita nel nucleo e nel citoplasma, costituita da 150 aminoacidi che presenta due domini Cys-X-X-Cys; tale proteina, priva di attività

enzimatica intrinseca, per esercitare la sua funzione, deve legarsi a diverse proteine cellulari (Zur Hausen H, 2002). L'attività più studiata di E6 è la sua abilità ad indurre la degradazione della proteina p53. E6 forma un complesso con un'altra proteina cellulare, la E6-AP (E6 associated protein). Questo complesso si comporta da ubiquitina-ligasi favorendo l'ubiquitinazione della p53 e la sua proteolisi a carico dei proteosomi. Poiché compito primario di questa antioncoproteina è bloccare il ciclo replicativo in fase G1 e promuovere l'apoptosi di cellule che abbiano subito lesioni genomiche, la sua proteolisi E6-indotta si traduce in una prolungata sopravvivenza delle cellule infettate e in una loro maggiore proliferazione (Huibregtse JM et al., 1993). E6 regola p53 anche indirettamente, associandosi a p300/CBP, un coattivatore di p53. In seguito all'inattivazione funzionale p53, vengono deregolati i principali meccanismi di controllo del ciclo cellulare in G1/S e G2/M, con conseguenti anomalie a livello della duplicazione e della struttura dei cromosomi. E' interessante notare che il legame di E6 a E6AP ha come conseguenza l'ubiquitinazione di E6AP stessa (Kao WH et al., 2000). Quindi E6 potrebbe regolare i livelli dei substrati naturali di E6AP attraverso la sua degradazione. Alcune delle proteine bersaglio di E6AP appartengono alla famiglia Src delle tirosine chinasi, che interagiscono con diverse cascate di trasduzione del segnale (Frame MC, 2002).

E6 presenta anche un'attività indipendente da p53, importante per l'immortalizzazione di cellule umane. Sono state identificate proteine E6 di HPV-16 incapaci di degradare p53, ma che immortalizzano cellule epiteliali mammarie umane. Viceversa, altri mutanti mantengono la capacità di degradare p53, ma non sono in grado di immortalizzare le cellule (Liu Y et al., 1999). Questi dati dimostrano che per l'immortalizzazione cellulare è importante l'interazione di E6 con altre proteine, oltre a p53.

Il ruolo primario di E6 nel ciclo degli HPV non è di per se indurre trasformazione o immortalizzazione, ma rendere più semplice alcune fasi del ciclo replicativo del virus. Usando un sistema genetico che permetta la trasfezione in cheratinociti del genoma dell'HPV clonato, è stato dimostrato che l'espressione della proteina E6 funzionale è necessaria per mantenere i genomi di HPV-31 e HPV-11 come episomi, in grado di replicarsi stabilmente (Thomas M et al., 1999).

E7: È una fosfoproteina acida di circa 100 aminoacidi, a localizzazione nucleare e citoplasmatica, e presenta tre domini: CR1, CR2, CR3. In particolare il dominio CR3 è caratterizzato da due domini zinc-finger Cys-X-X-Cys coinvolti nei processi di dimerizzazione della proteina (Clemens KE et al., 1995; McIntyre MC et al., 1993) e

nell'interazione con molte proteine cellulari dell'ospite, nonché essenziale per la stabilità della proteina stessa.

E7 è importante per l'immortalizzazione delle cellule, ma per stabilire un'efficiente immortalizzazione di cheratinociti umani si richiede l'azione combinata di E6 ed E7 (Felsani A et al, 2006). E7 interagisce con numerose proteine cellulari: fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina, regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata (Doorbar J et al, 1991). Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107 e p130. Normalmente nel nucleo delle cellule in fase G1 la proteina pRb forma complessi con l'eterodimero E2F e con altri fattori che attivano la trascrizione dei geni richiesti per l'avvio della fase S bloccandone l'azione. (Figura 3) Se la cellula riceve uno stimolo proliferativo, la pRb viene iperfosforilata da alcune chinasi ciclino-dipendenti (Cdk4/6- D) e si distacca dai fattori di trascrizione che, liberi di agire, promuovono la replicazione del DNA. Interagendo con la pRb ipofosforilata, la proteina E7 recluta Rb con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F; queste attivano la trascrizione consentendo alla cellula ospite di procedere lungo il ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni (Doorbar J et al, 2006). Gli altri due membri della famiglia del retinoblastoma, p107 e p130, sono coinvolti nel controllare diversi punti durante le fasi del ciclo cellulare. p130 esercita la sua funzione regolatoria durante la fase G0/G1, mentre p107 è attiva nella transizione G1/S. Analogamente a pRb, il polipeptide E7 si lega a p107 e p130, inattivando diversi punti del ciclo cellulare in cui queste proteine sono coinvolte; ma ancora non è chiaro se l'associazione tra E7 e p107 e p130 porti alla loro degradazione (Doorbar J et al, 2006). Altri meccanismi a cui E7 partecipa sono l'associazione con alcuni inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti, come p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, provocando la perdita dei loro effetti inibitori sul ciclo cellulare. Cellule che esprimono E7 ed alti livelli di p21^{Cip1} o p27^{Kip1} sono ancora in grado di entrare in fase S, mentre in assenza di E7 le cellule si arrestano nella fase G1.

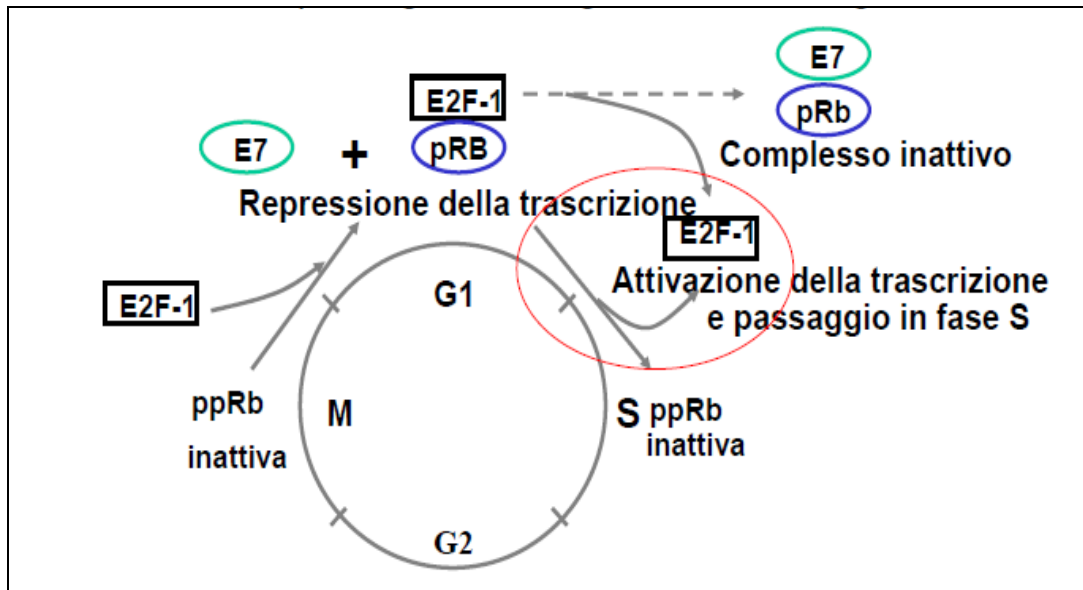


Figura 3. Interazione tra E7 e pRb (Doorbar J et al, 2006)

Le proteine E7 degli HPV ad alto e a basso rischio contengono aminoacidi simili, ma non identici, nel dominio CR2 che media il legame a pRb (Ciccolini F et al., 1994). Per questo motivo negli HPV a basso rischio la proteina E7 ha la capacità di associarsi con pRb, ma con un'affinità molto ridotta rispetto al legame tra E7 degli HPV ad alto rischio e pRb. Un singolo cambiamento aminoacidico nel sito di legame di pRb delle proteine E7 degli HPV a basso rischio può portare ad una maggiore affinità di legame per pRb e all'acquisizione della capacità di trasformare cellule di roditore (Heck DV et al., 1992; Schmitt A et al., 1994). Quindi la capacità di legare con affinità più o meno alta pRb è verosimilmente discriminante ai fini dell'oncogenicità di E7.

Un altro gruppo di proteine legate da E7 sono le istone-deacetilasi (HDAC): normalmente la proteina Rb lega le HDAC e le recluta a livello di promotori inducibili da E2F. Recentemente si è visto che E7 lega HDAC indipendentemente dal loro legame a RB (Figura 3) (Longworth & Laimins, 2004).

Una delle proprietà più particolari delle proteine E7 degli HPV ad alto rischio è la loro capacità di indurre instabilità genomica. Molti tipi di cancro positivi per il papillomavirus umano contengono diverse aneuploidie, ad indicare che variazioni nel numero di cromosomi sono eventi importanti nella progressione tumorale. L'espressione di E7 è sufficiente ad indurre un aumento anomalo nel numero di cromosomi in cheratinociti umani primari (Duensing S et al., 2004). Inoltre E7 si associa a IRF1 ("Interferon Regulatory Factor 1"), la cui espressione è importante per la

risposta del sistema immunitario e degli interferoni verso infezioni di papilloma virus persistenti (*Park JS et al., 2000*). Analogamente ad altri stimolatori della proliferazione, oltre alla capacità di alterare la regolazione del ciclo cellulare, E7 può promuovere l'apoptosi attraverso la via ubiquitina-dipendente. È interessante notare, inoltre, come la proteina E6 possa bloccare completamente l'attività pro-apoptotica di E7. Anche per questo motivo, per indurre la trasformazione completa delle cellule ospiti è necessaria l'attività sinergica di entrambe le proteine virali (*Zur Hausen H, 2002; Thomas M et al., 1999; Zwerschke & Jansen-Dürr, 2000*). (Figura 4)

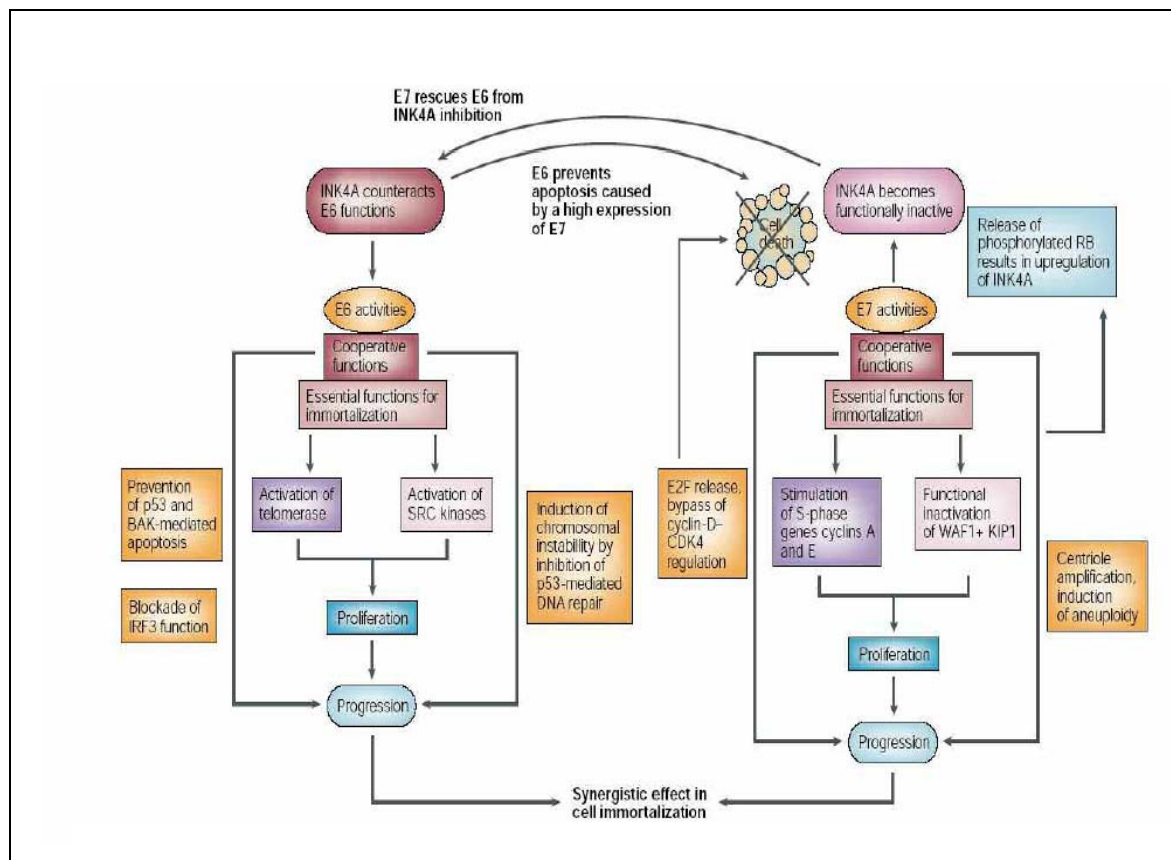


Figura 4. Funzioni delle oncoproteine E6/E7 (*Zur Hausen, 2002*).

L1/L2: I geni contenuti nella regione Late (L) codificano per proteine capsidiche. L1 è la proteina maggiore del capsido con peso molecolare 55-60 KDa, mentre L2 è la proteina minore con un peso di circa 70 KDa (*Knipe DM et al., 2007*). Il Capside è composto da 72 capsomeri. Ogni capsomero è un pentamero di 360 molecole di proteina L1 e da 12 a 36 molecole di proteina L2. La trascrizione di questi due geni dipende dallo stato di differenziazione del cheratinocita. L1 è la proteina maggiormente

antigenica di HPV, è scarsamente fosforilata e può essere glicosilata; è coinvolta principalmente nel legame al DNA virale. L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma anche diverse funzioni regolatorie, tra le quali legame a recettori secondari; questa interazione avviene dopo il legame del capsido. Partecipa nella determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido virale (*Doorbar J., 2006*).

1.3 Ciclo replicativo dell'HPV

L'infezione virale inizia con l'accesso delle particelle virali all'interno delle cellule dello strato basale; per alcuni tipi di papillomavirus umani (HPV) si pensa sia necessaria una soluzione di continuità dell'epitelio stratificato. Tale lesione può non essere visibile macroscopicamente e può crearsi quando la cute è esposta all'acqua, quando è abrasa o quando è sottoposta ad altre condizioni ambientali che favoriscono lo sviluppo di microtraumi (*Zur Hausen H, 2000*). Esistono forti controversie sulla natura dei recettori cellulari di superficie che permettono l'iniziale adesione del virus alla cellula ospite.

Alcune pubblicazioni scientifiche hanno suggerito che l'internalizzazione delle particelle virali sia un processo lento e che possa avvenire attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite di clatrina (*Culp TD et al., 2006*); altri autori sostengono che responsabile dell'ingresso del virus nella cellula infettata sia l'integrina $\alpha_4 \beta_6$ (*Howley & Lowy, 2001*).

La scapsidazione è facilitata dalla rottura dei legami disolfuro intracapsidici, permettendo al DNA virale di essere trasportato nel nucleo grazie a segnali di localizzazione nucleare, sebbene i processi di scapsidazione e di importazione nucleare del genoma virale rimangono tuttora ampiamente sconosciuti.

1.3.1 Infezione latente

Una volta penetrato all'interno della cellula, il genoma virale raggiunge il nucleo e viene mantenuto in forma episomale nelle cellule basali dell'epitelio che costituiscono l'unico strato in attiva divisione e replicazione. (Figura 5) L'infezione da HPV di queste cellule porta all'attivazione a cascata dell'espressione dei geni virali che determinano una

produzione di copie extracromosomiche di DNA virale (da 20 a 100 copie per cellula) (Sterling J et al., 1990). Questa replicazione dell'acido nucleico del virus avviene in media una volta, per divisione cellulare durante la fase "S" in sincronia con i cromosomi della cellula ospite ed è trasmesso alle cellule figlie. Ricerche mirate affermano che proteine virali E1-E2 sono espresse allo scopo di mantenere il DNA dell'HPV in forma episomale. L'espressione di E1, e probabilmente di E2, sembra essere sufficiente al mantenimento basale degli episomi virali (Doorbar J, 2006). Questo tipo di replicazione assicura un'infezione latente e persistente nelle cellule basali dell'epidermide.

1.3.2 Infezione produttiva

Nell'epitelio normale le cellule basali escono dal ciclo cellulare subito dopo aver migrato nello strato sopra basale, andando incontro al processo di differenziazione terminale; durante questo processo si verificano dei cambiamenti di struttura dei filamenti intermedi di cheratina e la secrezione di lipidi, fattori che permettono all'epitelio di superficie di creare una barriera fisica nei confronti dell'ambiente circostante (Frazer IH, 2004). Durante l'infezione da HPV in queste cellule viene espressa la proteina E7 (e forse anche la E6), viene abolito il blocco alla progressione del ciclo cellulare ed il processo di normale differenziazione terminale viene ritardato. Le proteine E6-E7 hanno entrambe alcune funzioni che stimolano la progressione del ciclo cellulare e sono associate ad alcuni regolatori di questo; E6 ed E7 lavorano in sinergia per raggiungere questi effetti e, nelle lesioni causate da HPV ad alto rischio come HPV 16, le due proteine sono prodotte da un mRNA espresso dal promotore virale precoce p97 (Zwerschke & Jansen-Dürr, 2000).

1.3.3 Amplificazione genica

Per la produzione dei virioni, l'HPV deve amplificare il suo genoma e inserirlo all'interno delle particelle infettanti. Il promotore tardivo è localizzato all'interno dell'ORF (open reading frame) di E7 e si pensa che l'up-regulation di esso porti ad un'aumentata espressione di proteine coinvolte nella replicazione del DNA virale,

tuttavia senza influenzare direttamente l'espressione delle proteine E6 ed E7, necessarie per l'entrata in fase S del ciclo cellulare. L'amplificazione del genoma virale inizia in un piccolo gruppo di cellule del compartimento proliferativo e richiede l'espressione di tutti i geni precoci, inclusi E4 (*Doorbar J, 2006; Zwerschke & Jansen-Dürr, 2000*) ed E5 il cui ruolo nella replicazione non è ancora completamente chiarito. Il legame di E2 all'upstream regulatory region del Papillomavirus è necessario per la replicazione del DNA virale, e la formazione del complesso E1/E2 può permettere il procedere della replicazione stessa anche in assenza di sintesi cellulare di DNA. Il meccanismo molecolare che porta all'attivazione del promotore tardivo e all'over-espressione del complesso E1/E2 non è ben conosciuto; sembra che questo promotore sia addirittura espresso in modo costitutivo in tutti gli stadi del ciclo virale.

Studi recenti suggeriscono che un modesto aumento dell'attività del promotore durante la differenziazione possa aumentare i livelli di E1 ed E2 (probabilmente anche di E4 ed E5), portando di conseguenza ad un incremento di copie geniche. Il genoma appena replicato servirà come modello per l'ulteriore espressione di E1 ed E2, espressione che faciliterà una amplificazione addizionale del genoma virale (*Middleton K et al., 2003*).

1.3.4 Assemblaggio delle particelle virali

Una volta completata l'amplificazione del genoma virale, l'HPV codifica per due proteine strutturali, espresse negli strati più superficiali del tessuto infettato. Le particelle di HPV sono costituite da un genoma di circa 8000 bp, posto all'interno di un capsido che contiene 360 copie della proteina maggiore L1 e da 12 a 36 copie della proteina minore L2. Quest'ultima si accumula attorno a strutture nucleari, conosciute come "PML bodies", durante l'assemblaggio del virus, attraverso l'associazione ad un particolare fattore di trascrizione (Daxx) (*Becker KA et al., 2004*); si pensa che i "PML bodies" siano i siti di replicazione del DNA virale e che le proteine L1/L2 vengano richiamate attorno ad essi per facilitare l'inserimento del DNA nel capsido (packaging). La proteina L2, inoltre, migliora l'efficienza del "packaging" e aumenta l'infettività virale. Infine, il virus deve uscire dalle cellule infettate e sopravvivere nell'ambiente extra-cellulare per un periodo di tempo variabile, prima di provocare una nuova infezione.

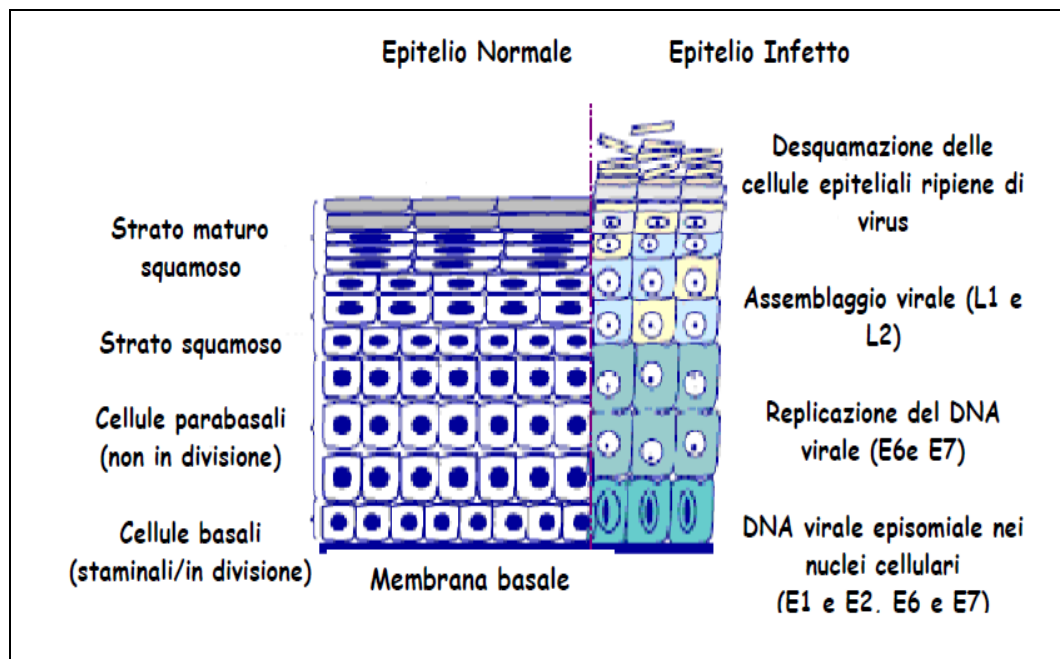


Figura 5: ciclo replicativo di HPV. (Frazer IH, 2004)

1.4 Meccanismi patogenetici

I meccanismi patogenetici degli HPV differiscono da quelli di altre famiglie virali in quanto l'infezione richiede cellule epiteliali proliferanti, situate nello strato basale dell'epidermide e delle mucose. In queste cellule l'espressione dei geni virali è limitata a specifici geni precoci, che inducono la cellula a proliferare. L'espressione di geni virali tardivi, con conseguente assemblaggio e rilascio del virione maturo, si verifica invece negli strati sovrastanti. Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di una progenie virale matura è tipica delle infezioni da HPV a basso o medio rischio, in cui il genoma permane in forma episomale.

Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte dall'infezione da HPV ad alto rischio, quali ad esempio infezioni da HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare, con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa (Figura 6).

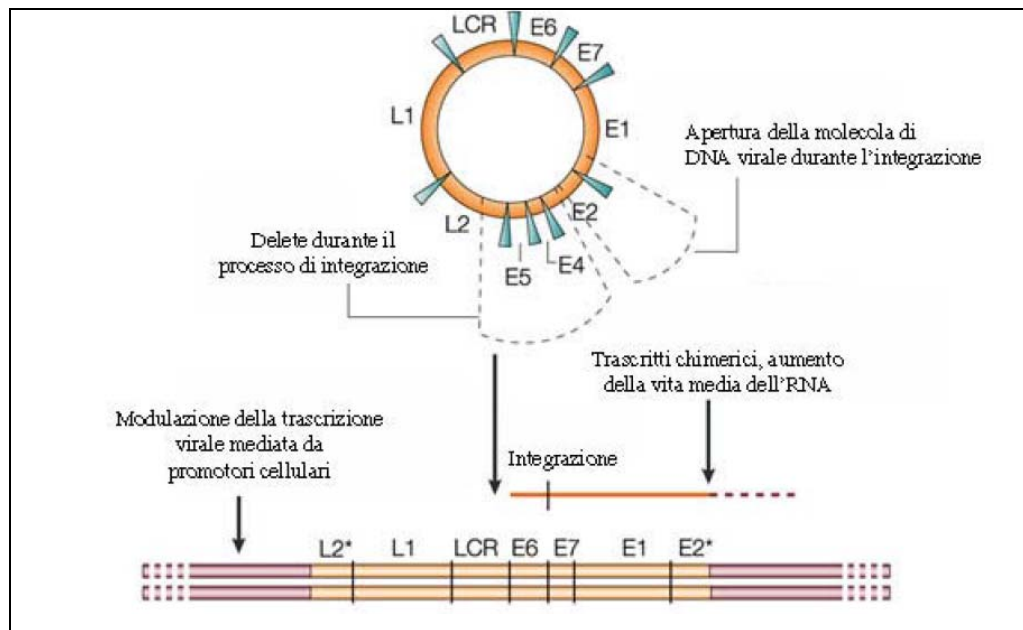


Figura 6: Meccanismo di integrazione del DNA virale in quello cellulare (Zur Hausen H, 2002).

Tale integrazione è determinante nei meccanismi di trasformazione ed immortalizzazione cellulare, poiché si verifica a livello della ORF E2, con conseguente perdita dell'azione repressiva di E2 sulle oncoproteine virali E6 e E7, che svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di tumorigenesi (Longworth & Laimins, 2004).

Pertanto nelle cellule dei tumori indotti da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 e E7 sono integrati e funzionali, con conseguente stimolo alla proliferazione cellulare, mentre i geni E2, E4 e E5 vengono persi o non sono trascritti.

1.5 Storia naturale dell'infezione da HPV

La storia naturale dell'infezione da HPV è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra virus – ospite.

Nella maggior parte dei casi, infatti, il virus viene eliminato dalla risposta immunitaria dell'ospite prima di sviluppare un effetto patogeno; in altri casi può restare latente o andare incontro a replicazione provocando una lesione a livello genitale che, se non regredisce spontaneamente, può manifestarsi attraverso diverse forme cliniche.

Circa l'80% delle infezioni sono transitorie e asintomatiche e guariscono spontaneamente grazie alla risposta immunitaria cellulo-mediata; il periodo medio di regressione di un'infezione da HPV è 6-18 mesi (*Bulkmans NW et al., 2007*).

La persistenza dell'infezione è invece la condizione necessaria per l'evoluzione verso il carcinoma; i genotipi di HPV ad alto rischio hanno una maggiore probabilità di infezione persistente; un altro fattore importante è l'età: la probabilità di infezione persistente aumenta dopo i 35 anni (*Schiffman M et al., 2007*). Il periodo che intercorre fra l'infezione e l'apparizione dei primi segni clinici varia da 1-10 anni; solo una piccola percentuale (<5%) delle donne che hanno acquisito un'infezione, sviluppa il tumore (*Walboomers JM et al., 1999; Schiffman M et al., 2007*). (Figura 7)

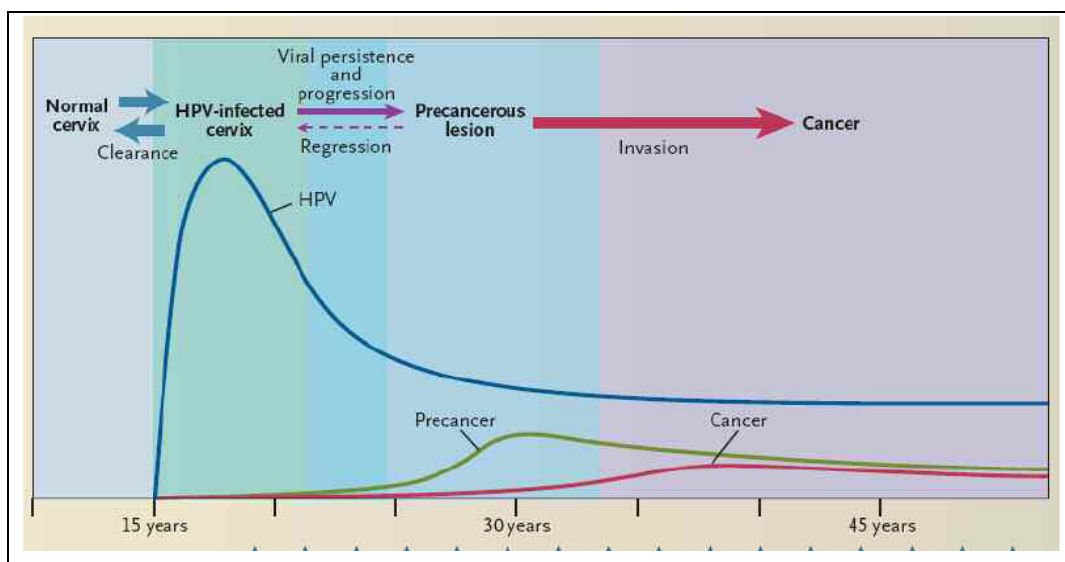


Figura 7: Storia Naturale dell'infezione da HPV (*Schiffman M et al., 2007*).

Capitolo 2

Caratteristiche cliniche delle infezioni da HPV

2.1 Manifestazioni cliniche

Gli HPV possono essere suddivisi in tre sottotipi: a basso, intermedio ed alto rischio, in base alla gravità della patologia ad essi associata. Gli HPV a basso rischio sono associati a lesioni proliferative cutanee e delle mucose, in genere benigne. Le manifestazioni cliniche comprendono verruche comuni, piane e plantari, condilomi acuminati genitali e anali, condilomi piani cervicali, lesioni maculari pitriasiformi in pazienti con epidermodisplasia verruciforme, papillomi laringei. Questi ultimi si presentano nell'infanzia e, nonostante siano benigni, possono causare ostruzione respiratoria acuta e sono spesso caratterizzati da recidive (Tabella 1) (*Dolei A, 2001*).

Gli HPV ad alto rischio sono solitamente associati a lesioni mucose maligne caratterizzate da lesioni squamose intraepiteliali (SIL) che si manifestano con grandi cellule arrotondate con atipie nucleari e alone perinucleare dette coilociti. Le SIL sono suddivise in SIL a basso grado (LGSIL) e SIL ad alto grado (HGSIL). Secondo la classificazione istologica si distinguono tre gradi di neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN): CIN1 (lieve, corrisponde a LGSIL), CIN2 (moderata, corrisponde ad HGSIL), CIN3 (grave, corrisponde ad HGSIL). Nelle LGSIL si riscontrano sia tipi di HPV a basso che ad alto rischio oncogeno. La maggior parte delle lesioni di basso grado mantiene il virus in forma episomale e sostiene un ciclo di replicazione completo: sono espressi anche geni tardivi e originano particelle virali complete. Le HGSIL sono prevalentemente associate ad HPV ad alto rischio, che non possono però compiere un ciclo di replicazione completo, a causa di difetti differenziativi tipici di queste lesioni (*IARC Working Group, 2007*).

<i>Tipi di lesioni</i>	<i>Genotipi di papillomavirus</i>
<u><i>Lesioni cutanee</i></u>	
Verruche volgari, piane e plantari	1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 41
Verruche in soggetti con EV	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49
Carcinomi cutanei in soggetti con EV	5, 8, 14, 17, 20, 47
<u><i>Lesioni mucose</i></u>	
Condilomi acuminati e piani	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55
Papulosi Bowenoide	16
Condiloma gigante	6, 11
Papillomi delle vie respiratorie	6, 11
Papillomi congiuntivali	6, 11
Lesioni della mucosa orale:	
Iperplasia focale epiteliale	13, 32
Infezioni con papillomavirus del tratto genitale	6, 11, 16,
Lesioni sulle labbra	2
Carcinomi della cervice uterina:	
- alta associazione	16, 18, 45, 56
- moderata associazione	31, 33, 35, 51, 52
- scarsa associazione	6, 11, 42, 43, 44
Cancro vulvare	16

Tabella 1: Associazioni prevalenti tra genotipi degli HPV e manifestazioni cliniche.
(Dolei A, 2001)

2.2 Cofattori dell'infezione

Ci sono diversi cofattori che contribuiscono ad aumentare il rischio di sviluppo del tumore della cervice in seguito ad infezione da HPV. E' possibile distinguere tali cofattori in fattori appartenenti all'ospite e fattori virali.

2.2.1 Fattori appartenenti all'ospite

- Attività sessuale: età precoce del primo rapporto sessuale, numero elevato di partner sessuali, elevata promiscuità sessuale del partner incrementano fino a dieci volte il rischio (*Muñoz N et al., 2006*).
- Contraccettivi orali: l'utilizzo a lungo termine (più di 5 anni) di progesterone e estrogeno è associato con lo sviluppo di lesioni preneoplasiche e cancro della cervice (*Castellsagué X et al., 2006*).
- Fumo di sigaretta: aumento di incidenza e persistenza delle infezioni da HPV in donne fumatrici (*Muñoz N et al., 2006; Castellsagué X et al., 2006*).
- Gravidanze multiple (*Castellsagué & Muñoz, 2003*).
- Co-infezione con altri virus a trasmissione sessuale come CMV, HHV- 6, HHV- 7 e HSV-2: modifica indirettamente le barriere dell'epitelio e influisce sul processo di infiammazione cervicale. (*Castellsagué & Muñoz, 2003*).
- Predisposizione genetica: la presenza di particolari antigeni leucocitari umani (HLA), come HLA-DQB1*03 (DQ3), conferisce maggiore rischio di sviluppo di cancro della cervice uterina. Allo stesso modo, pazienti con HLA-B7 tendono a sviluppare carcinomi più aggressivi con una prognosi peggiore. (*Madeleine MM et al., 2008*).
- Immunodepressione: in caso di infezione da HIV è stata evidenziata una maggiore prevalenza di infezione da HPV e di lesioni della cervice nelle donne sieropositive rispetto alle donne sieronegative. Tali lesioni presentano nelle pazienti HIV-positive una maggiore tendenza alla persistenza e alla progressione a carcinoma invasivo (*Palefsky J. 2007; Del Mistro & Chieco Bianchi, 2001*).
- Abitudini alimentari: acido folico, vitamine B, C, E e B12 α -carotene hanno un ruolo protettivo (*Castle & Giuliano, 2003*).

2.2.2 Fattori virali

- Genotipo: la maggioranza delle infezioni da HPV a basso rischio tendono a regredire spontaneamente senza causare lesioni, invece la presenza di tipi ad alto

rischio, come HPV 16 e HPV 18, è spesso associata a lesioni precancerose e ai carcinomi invasivi (*IARC Working Group, 2007*).

- Carica virale: pazienti con alta carica virale di HPV ad alto rischio presentano un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice. (*Lillo F et al., 2008*).
- Varianti virali: sulla base di variazioni di sequenza soprattutto della regione E6 del genoma virale è stato possibile individuare cinque varianti filogenetiche di HPV-16: europeo (E), asiatico (As), asiatico-americano (AA), africano-1 (Af1) e africano-2 (Af2) che presentano un differente potere oncogenico (*Sichero L et al., 2007*).
- Co-infezione con diversi genotipi di HPV (*Kleter B et al., 1999*).

2.3 Epidemiologia

I papillomavirus sono ampiamente distribuiti nella specie umana. La trasmissione avviene per contatto diretto con una persona infetta, prevalentemente per via sessuale.

Sono virus molto resistenti al calore e a condizioni di aridità, pertanto si può verificare anche un tipo di trasmissione non sessuale, ad esempio in seguito a prolungato contatto con abiti contaminati (*Roden RB et al., 1997*).

Si stima che circa l'80% delle persone contrae il virus almeno una volta nella vita: l'infezione interessa sia donne che maschi, soprattutto nella fascia giovanile, all'inizio dell'attività sessuale. Nella maggioranza dei casi l'infezione è di tipo transiente e il virus viene eliminato dal sistema immunitario senza provocare lesioni. L'infezione persistente da HPV, invece, è ormai stata definitivamente stabilita essere un fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma della cervice (*Zur Hausen H, 1991*).

Il carcinoma cervicale è il primo cancro a essere riconosciuto dall'organizzazione mondiale della sanità come totalmente riconducibile ad un'infezione virale da HPV (*Zur Hausen H, 1991*). Tale carcinoma continua a rappresentare un importante problema sanitario: a livello mondiale è il secondo tumore maligno della donna; nel 2008 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità sono stati stimati 529 mila nuovi casi/anno e 274.000 decessi dovuti a cancro della cervice uterina, l'85% dei quali nei Paesi in via di sviluppo (Africa, America latina e Asia). (www.who.int).

Esistono tuttavia rilevanti differenze geografiche di incidenza del carcinoma cervicale, legate soprattutto alla diversa diffusione di programmi di screening organizzati per la sua prevenzione. Infatti, nelle nazioni che hanno avviato programmi di screening organizzati basati sull'offerta del Pap-test alle donne di età compresa tra i 25 ed i 64 anni, si è assistito nelle ultime decadi a un importante decremento dell'incidenza di questa neoplasia (*Levi F et al., 2000*) che ora nei Paesi industrializzati ha un'incidenza pari a 18,7 casi su 100.000 donne l'anno. (www.who.int).

2.4 Prevalenza

La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina, in donne sessualmente attive, varia in relazione all'area geografica ed all'età: mostra un picco a 20-25 anni e decresce con l'età; si osserva una riattivazione dopo la menopausa per fattori ancora non chiari come: comportamento sessuale (nuovo partner), cambiamento ormonale, riattivazione di infezione latente (*Ammatuna P et al., 2008; Ronco G et al., 2005*).

La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina nelle donne con citologia normale è intorno al 10%; in donne con lesioni di basso grado è del 71,6%; la prevalenza aumenta nelle donne con lesioni di alto grado (84%) e con carcinoma della cervice (99,7%) (*Doorbar J, 2006*).

La prevalenza dei tipi di HPV nei carcinomi della cervice varia anche in base alle diverse aree geografiche analizzate: l'HPV 16 è il genotipo più comune in tutti i Paesi, l'HPV 18 rappresenta il secondo genotipo per frequenza (insieme sono responsabili del 70% dei casi di cancro della cervice), seguito dai tipi 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56 (*Tropè A et al., 2009*).

Capitolo 3

Metodiche diagnostiche delle infezioni da HPV

Attualmente la diagnosi di infezione da HPV si basa essenzialmente sull'utilizzo di metodiche citologiche, colposcopiche, istologiche, e molecolari (analisi di DNA e mRNA)

3.1 Pap-Test

L'esame citologico cervicovaginale, meglio conosciuto con il nome di Pap-test è un test di screening per il cancro del collo dell'utero e prende il nome dal Dottor George Papanicolau che per primo nel 1949 lo ha introdotto nella pratica clinica.

Il Pap-test consente di identificare le lesioni (displasie) precancerose che possono evolvere in tumore ed ha quindi anche una funzione di prevenzione. Grazie al pap-test il cancro del collo dell'utero, dagli anni '50 ad oggi, si è ridotto del 75%.

Il prelievo delle cellule cervicovaginali è un esame semplice e non invasivo, viene eseguito durante la visita ginecologica in maniera del tutto indolore. Si preleva dalla cervice uterina con spatola e cytobrush del materiale contenente cellule esfoliative che, strisciate su di un vetrino ed appositamente colorate, vengono poi osservate al microscopio. Le linee guida GISCI (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma), raccomandano che ogni donna cominci lo screening tre anni dopo il primo rapporto sessuale e mai oltre i 21 anni e continui ad eseguire il pap-test ogni anno (*GISCI, 2010*). Oggi la diagnosi citologica delle cellule cervico-vaginali viene fatta seguendo il Sistema Bethesda (TSB) del 2001 (*Solomon D et al., 2002*), che stabilisce una terminologia diagnostica uniforme e capace di favorire la comunicazione tra laboratorio e clinico (Tabella 2).

Normal cells	Cellule normali
LSIL Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Lesione squamosa intraepiteliale di basso grado
HSIL High-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Lesione squamosa intraepiteliale di alto grado
ASC-US Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance	Cellule squamose atipiche di significato indeterminato
ASC-H Atypical Squamous Cells can't rule out High-Grade Lesions	Cellule squamose atipiche, non esclude SIL di alto grado
Carcinoma	Carcinoma
Adenocarcinoma	Adenocarcinoma

Tabella 4. Terminologia del sistema Bethesda 2001 per le cellule squamose (*Solomon D et al., 2002*)

Anche se il pap-test rappresenta il prototipo diagnostico delle campagne di screening del carcinoma della cervice, tuttavia per la sensibilità non ottimale e per la scarsa accuratezza diagnostica nel discriminare le lesioni a basso rischio oncologico deve essere affiancato da una metodica di secondo livello (livello successivo di approfondimento diagnostico) come colposcopia, biopsia o ricerca del DNA/mRNA virale dell'HPV.

3.2 Colposcopia

E' un esame che consente di osservare a vari ingrandimenti la superficie della portio uterina, della vagina e della vulva. La colposcopia viene eseguita dopo che il Pap-test ha segnalato la presenza di atipie cellulari, o per seguire nel tempo delle pazienti già trattate o in follow-up. La colposcopia è sempre indispensabile prima della biopsia o di

qualsiasi trattamento perché consente di localizzare con la massima precisione eventuali lesioni. Per effettuare una colposcopia è necessario un colposcopio (apparecchiatura con una sorgente di luce e vari ingrandimenti), uno speculum per evidenziare il collo dell'utero e la vagina, e delle soluzioni specifiche (acido acetico al 3%, soluzione iodo-iodurata di Lugol). Perché una colposcopia possa essere definita adeguata deve essere identificata e descritta la giunzione squamo-colonnare a livello della quale si formano le lesioni displastiche. La colposcopia non deve essere considerata un esame di screening, bensì un esame per la localizzazione e la delimitazione dei precursori e del cancro invasivo e microinvasivo della cervice nelle pazienti con Pap-test anormale. Si tratta di un esame non doloroso, non invasivo, in grado di evidenziare le lesioni presenti, che permette di effettuare una biopsia mirata ed il cui risultato viene consegnato alla fine dell' esame (Tabella 3)

CLASSIFICAZIONE COLPOSCOPICA	
Giunzione squamo colonnare	non visualizzata
	visualizzata
Epitelio originario	trofico-distrofico
Ectopia	
Zona di trasformazione normale NTZ	iodochiara-iodoscura
Zona di trasformazione anormale ANTZ	
grado 0	area iodochiara muta
grado 1	epit.bianco sottile
	mosaico regolare
	puntato regolare
grado 2	epit.bianco ispessito
	mosaico irregolare
	puntato irregolare
	sbocchi ispessiti
	vasi atipici
Condilomatosi della portio, vagina, vulva	florida

Tabella 3: Classificazione colposcopia per la refertazione dell'esame

3.3 Esame istologico

Le alterazioni citopatiche virali sono state descritte per la prima volta nel 1956 con il termine di "atipia coilocitotica" per la loro somiglianza istologica alle comuni verruche cutanee. Solo venti anni dopo queste alterazioni cellulari sono state correlate ai

condilomi piatti della cervice e in stretta associazione con l'infezione da HPV e le lesioni precancerose della cervice uterina: le CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia). I coilociti sono cellule comunemente situate negli strati intermedi dell'epitelio con un ben definito e esagerato alone chiaro perinucleare con conseguente condensazione e marginalizzazione del citoplasma. I nuclei, non chiaramente displastici e privi di nucleoli, mostrano comunemente un ingrandimento nucleare di due o tre volte rispetto alle cellule intermedie, irregolarità della membrana, ipercromasia. Altre caratteristiche associate all'infezione da HPV sono le binucleazioni e i meganuclei presenti negli strati superficiali ed intermedi dell'epitelio della cervice.

I coilociti sono la norma delle CIN 1 diventando meno evidenti nelle lesioni di alto grado CIN2 e CIN3 (*Sherman ME et al., 2003*).

La nomenclatura usata per descrivere istologicamente le condizioni precancerose della cervice uterina sono sottoposte ad un continuo dibattito per una sempre migliore definizione degli eventi patogenetici trasformanti che da epitelio normale portano al carcinoma. Dal termine di displasia lieve, moderata e severa, introdotto negli anni '60 in cui displasia definiva tutti i cambiamenti dell'epitelio squamoso di tutti i gradi fino al carcinoma in situ, negli anni 1970/1980 sono state proposte numerose alternative per descrivere questo complesso di alterazioni displastiche.

La più accettata è stata quella di CIN ed è stata divisa in tre gradi CIN 1, CIN 2, CIN 3 (*Koss L, 2006*). La suddivisione dei vari gradi di CIN si basa essenzialmente sull'analisi delle anomalie nucleari, dell'attività mitotica e della differenziazione e stratificazione degli epiteli (Figura 8).

CIN 1: i due terzi della stratificazione dell'epitelio mostra una sostanziale differenziazione sebbene nuclei atipici possano essere presenti nello spessore dell'epitelio. In questa categoria le caratteristiche diagnostiche sono concentrate in una piccola porzione dell'epitelio vicino agli strati basali. Le mitosi sono rare e confinate nella parte basale dell'epitelio e le alterazioni cellulari sono concentrate nella parte inferiore dell'epitelio con alterazioni cellulari simili all'infezione da HPV o al condiloma piatto.

CIN 2: solo la metà dell'epitelio mostra differenziazione e maturazione, le anomalie nucleari sono più pronunciate rispetto alla CIN 1 sia quantitativamente che qualitativamente, con nuclei pleomorfi e irregolarità della membrana nucleare. Le figure mitotiche possono spingersi dallo strato basale fino ai 2/3 dell'epitelio.

CIN 3: è assente ogni differenziazione maturativa in quasi tutto lo strato dell'epitelio e se presente è focale e limitata agli strati più superficiali. I nuclei sono marcatamente ingranditi e pleomorfi con forme anche bizzarre, ipercromatici, mostrano un indice mitotico molto prominente, con mitosi atipiche anche localizzate nell'epitelio squamoso superficiale.

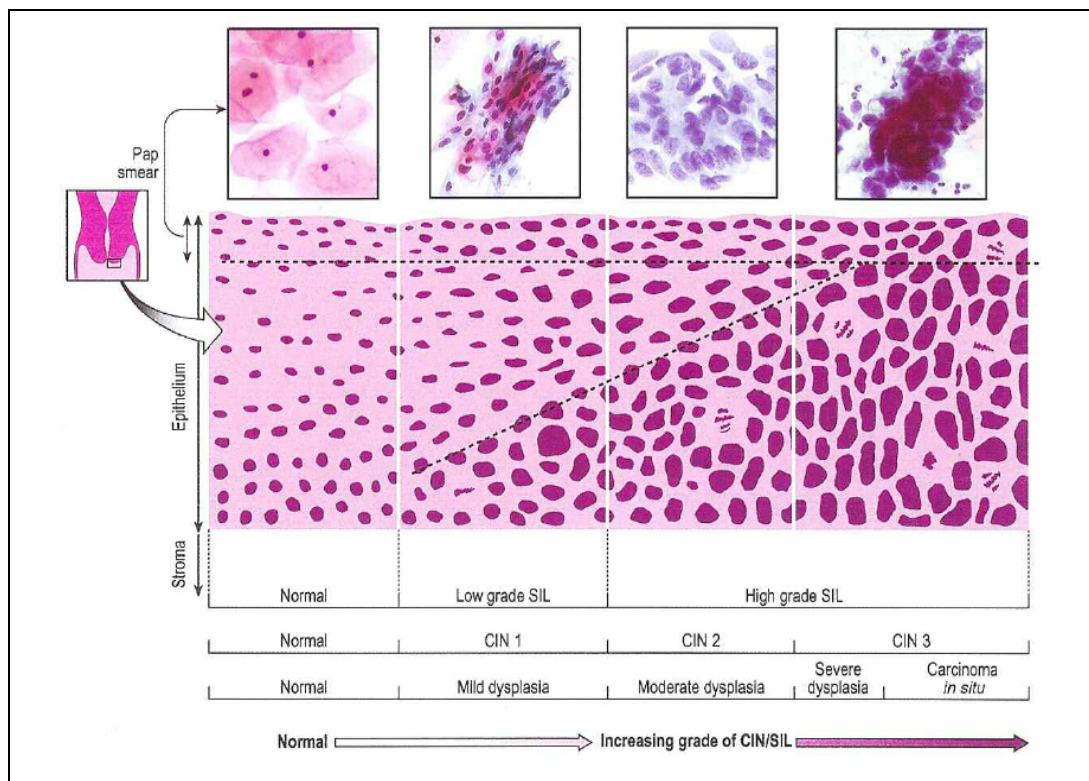


Figura 8. Vari stadi di lesione precancerosa della cervice uterina (Koss L, 2006).

3.4 Test molecolari

L' infezione da HPV scatena una risposta umorale diretta contro L1 (proteina maggiore del capsido). In conseguenza di ciò gli anticorpi in circolo saranno presenti per alcuni anni. Tale è la ragione per la quale l'analisi sierologica riveste scarso significato diagnostico; essa non permette di definire se la presenza di anticorpi sia dovuta ad un'infezione passata o presente.

La possibilità di traslare le conoscenze acquisite in anni recenti, relativamente alla patogenesi molecolare ed alla storia naturale del carcinoma cervicale nella pratica clinica, passa, quindi, attraverso l'utilizzo di metodiche di biologia molecolare.

Le tecnologie attualmente utilizzate per la ricerca e la tipizzazione virale sono molteplici e con caratteristiche estremamente varie per complessità di esecuzione, costo, applicabilità su materiale biologico, livello di automazione e sicurezza, ma tutte accomunate dalla rivelazione del DNA o dell'mRNA virale nella cellula ospite.

3.4.1 HPV DNA

La diagnostica per la ricerca e la tipizzazione degli HPV si basa principalmente sulla ricerca del DNA virale con metodiche di tipo molecolare. Tre principali metodiche possono essere utilizzate: ibridizzazione diretta, amplificazione del segnale, amplificazione del target (*Hubbard RA, 2003*).

1. L'ibridazione diretta utilizza sonde opportunamente marcate che si legano in modo specifico (in determinate condizioni di temperatura e concentrazione salina) a sequenze omologhe contenute nel campione da analizzare; la reazione può avvenire o su supporto solido (membrane di nylon) contenente DNA estratto dal campione o direttamente sul campione appoggiato su vetrino. Il legame sonda – DNA del campione viene poi rivelato in base al tipo di marcatore utilizzato per la sonda. Due sono le tecniche principali che sfruttano il principio dell'ibridizzazione diretta: il “Southern blot” e “l'ibridizzazione in situ”. Il Southern blot è stato il primo metodo nello studio degli HPV ed è stato considerato per lungo tempo il “metodo di riferimento”. La metodica del Southern blot prevede la digestione del DNA, estratto dal campione, con enzimi di restrizione, i frammenti ottenuti vengono separati mediante elettroforesi, denaturati in situ e trasferiti su filtro di nitrocellulosa (verso il quale il DNA presenta alta affinità). Successivamente si aggiunge al sistema una sonda marcata con traccianti radioattivi, ed in seguito alla reazione di ibridazione (nella quale la sonda legherà il frammento di DNA ad essa complementare presente sul filtro di nitrocellulosa), si procede alla visualizzazione mediante autoradiografia. Il metodo risulta lungo e laborioso, richiede l'impiego di una grande quantità di DNA ad alto peso molecolare ma soprattutto, implica l'uso di materiale radioattivo (*Molijn A et al., 2005*). L'ibridazione in situ permette la diretta determinazione del DNA virale nel materiale cellulare integro. I vantaggi di questa tecnica sono la precisa correlazione con la morfologia, la possibilità di studiare popolazioni cellulari eterogenee e di poter visualizzare anche una sola cellula infettata. La procedura di

rivelazione è analoga ad una reazione classica di immunocitochimica, come, ad esempio, in caso di probes biotilate la streptoavidina marcata con fosfatasi alcalina ed idoneo substrato per l'enzima.

2. L'amplificazione del segnale è una metodica non radioattiva molto nota per il kit commerciale Hybrid Capture II (HC2, Digene corp., USA) utilizzato solitamente nei programmi di screening per HPV. L'HC2 si basa su una ibridazione in soluzione con mix di sonde per diversi tipi di HPV; permette di evidenziare, a seconda della mix usata, 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39,45,51,52, 56, 58, 59, 68) e 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44). Il principio fondamentale di tale sistema è che il DNA di HPV, se presente, si lega con specifiche sonde a RNA, creando degli ibridi RNA:DNA molto stabili. Questi ibridi vengono catturati da anticorpi universali legati ad un fase solida (micropiastra). I complessi così formati vengono evidenziati con anticorpi monoclonali coniugati alla fosfatasi alcalina. Il segnale che ne risulta è amplificato di almeno 3000 volte e viene evidenziato con un substrato chemiluminescente e misurato da un luminometro. L'intensità di luce emessa, espressa in RLU (Relative Light Units), è proporzionale al quantitativo di DNA virale presente nel campione. Questa lettura fornisce un dato semiquantitativo sulla carica virale presente ma non consente la definizione dello specifico tipo di HPV presente (*Castle PE et al., 2002*). È l'unico test HPV approvato dalla FDA (Food and Drug Administration, USA).
3. L'amplificazione del target prevede l'uso della Polimerase Chain Reaction (PCR), una procedura estremamente sensibile che permette, in vitro, di moltiplicare virtualmente all'infinito, e in maniera esponenziale, sequenze specifiche di DNA o RNA. La PCR si basa su una reazione di polimerizzazione del DNA mediante l'utilizzo di:
 - due primer: corte sequenze di DNA complementari alle due estremità del frammento da amplificare (5' e 3');
 - una miscela di quattro nucleotidi precursori: dNTPs;
 - DNA stampo (template) contenente la sequenza bersaglio da amplificare;
 - enzima DNA polimerasi.

La reazione di PCR utilizza la ripetizione di tre fasi che si svolgono ognuna a temperature diverse: denaturazione al calore del DNA; ibridizzazione (annealing) in cui i due primer si legano in modo complementare alle estremità 3' e 5' del DNA da

amplificare; estensione del filamento con Taq polimerasi. Le tre fasi compongono un ciclo, che si ripete per una serie di 20-60 volte.

La PCR è una metodica molto sensibile, e permette di rivelare quantità minime di genoma virale. I primer possono riconoscere o sequenze conservate tra diversi tipi di HPV (primer consenso) o sequenze specifiche di singoli tipi che identificano i tipi HPV sulla base di polimorfismi generalmente presenti nelle regioni codificanti le proteine E6 e E7 (primers tipo-specifici) (*Manos MM et al., 1989; Jacobs MV et al., 1995; Kleter B et al., 1999*)

Una volta che la reazione di amplificazione è avvenuta con l'utilizzo di primers consenso, l'identificazione dei genotipi HPV può essere eseguita con vari metodi, quali RFLP (restriction fragment length polymorphism), ibridazione inversa o Sequenziamento nucleotidico. L'RFLP identifica il tipo di HPV sulla base del pattern di bande di restrizione genotipo-specifico che si genera dopo digestione enzimatica dell'amplificato. L'ibridazione inversa (LIPA, line probe assay) identifica i DNA amplificati mediante ibridazione selettiva con oligonucleotidi immobilizzati su membrana. Il Sequenziamento diretto degli acidi nucleici amplificati permette l'assegnazione del genotipo mediante comparazione delle sequenze con le sequenze HPV note.

Oltre alla PCR classica l'amplificazione del target può essere effettuata anche con la PCR Real-Time in grado di monitorare l'andamento della PCR in tempo reale ciò grazie all'impiego di combinazioni di coloranti fluorescenti "accoppiati" agli oligonucleotidi: la fluorescenza viene svelata quando gli stessi vengono incorporati nella catena di DNA neosintetizzata durante la reazione di amplificazione. Il segnale fluorescente emesso è rilevato in tempo reale mediante un computer che trasforma il segnale stesso in un grafico nel quale in ordinata viene rappresentato il valore di fluorescenza emessa da ciascuna molecola di DNA per ciclo di reazione (rappresentato in ascissa).

La tecnologia PCR in real-time prevede l'uso di:

- coloranti che, intercalandosi durante la sintesi della doppia elica, sono in grado di emettere fluorescenza se opportunamente eccitati; i più utilizzati sono: il Bromuro di etidio e il Sybr Green I;
- sonde ad ibridazione legate a molecole fluorescenti "reporter" e "quencher", per un approccio sequenza-specifico ("molecular beacons" e "sonde FRET").

Questa tecnica presenta un'elevata sensibilità ed è caratterizzata da alta riproducibilità (*Iftner & Villa, 2003*)

3.4.2 HPV mRNA

La Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) è una tecnica in grado di testare la presenza dell'mRNA virale attraverso un processo di retrotrascrizione innescato dall'enzima trascrittasi inversa (RT). L'analisi dell'RNA delle proteine virali E6/E7 e, quindi, la ricerca dell'espressione oncogenica dell'HPV, ha un valore clinico rilevante. Molti studi clinici, infatti, hanno dimostrato una diretta correlazione tra l'incremento dell'espressione di E6/E7 e la severità della lesione (*Lamarcq L et al., 2002*).

Il test commerciale NucliSENS EasyQ HPV (BioMerieux, Italia) è una metodica che individua in real-time e mediante l'incorporazione di sonde marcate con fluorescenza, i genotipi di HPV 16, 18, 31, 33 e 45. Diversi studi hanno concluso che il test è riproducibile e che ha una buona specificità nell'identificare le lesioni CIN2+ (*Molden T et al., 2005*). L'mRNA test (NucliSENS EasyQ HPV) ha dimostrato, inoltre, una maggiore specificità, rispetto agli HPV DNA test, nell'identificazione delle CIN2+ tra i pap test alterati (ASCUS+): specificità NucliSENS 63% vs 49% di HCII. La sensibilità è invece significativamente minore (76% vs 95% di HCII), pur rimanendo PPV e NPV paragonabili (*Halfon P et al., 2010; Cuschieri & Wentzensen, 2008*).

3.4.3 HPV OncoTect®

Una grande novità nel campo della diagnosi dell'HPV è rappresentata dal test HPV OncoTect® (IncellDx, CA) un saggio cellulare che utilizza l'ibridazione molecolare in situ come metodo di rilevamento dell'HPV E6, E7 mRNA in cellule umane intatte, fornendo informazioni specifiche sulla produzione virale a livello di ogni singola cellula. Il test, inoltre, consente di quantificare il numero di cellule che iper-esprimono E6, E7 mRNA. Questo test può essere applicato in qualunque sospensione di cellule singole adatta per la citometria a flusso o per l'analisi dell'immagine. I tipi di campioni possono comprendere: campioni citologici a base liquida, linee cellulari, tessuti dissociati e fluidi della produzione virale a livello cellulare.

Studi recenti (Ho CM et al., 2010) indicano che il rilevamento in situ dell'mRNA attivo virale precede e/o coincide con cambiamenti morfologici delle cellule della cervice uterina che denotano displasia o carcinoma. L'HPV OncoTect® E6, E7 mRNA si basa sul fatto che i genotipi oncogeni dell'HPV possono sovraesprimere E6 ed E7 mRNA a seguito dell'integrazione dell'HPV nel DNA genomico; un processo che causa la trasformazione cellulare e la progressione verso il carcinoma della cervice uterina.

Il saggio si compone di sei fasi (Figura 9):

1. Raccolta e conservazione del campione
2. Fissaggio e permeabilizzazione delle cellule
3. Lavaggi di pre-ibridazione.
4. Ibridazione.
5. Lavaggi post-ibridazione.
6. Acquisizione e analisi dei dati con l'uso di un citofluorimetro.

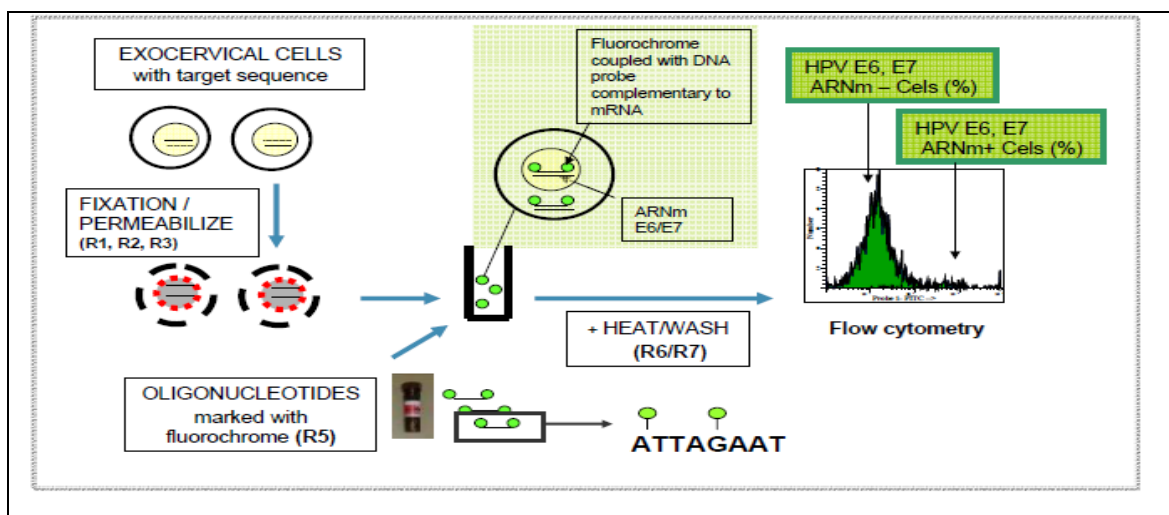


Figura 9: Fasi dell'esecuzione del test HPV OncoTect® E6, E7 mRNA

3.5 Linee guida

Il test per l'HPV DNA, eseguito unitamente al Pap test, sta diventando lo standard e viene riconosciuto nelle linee guida cliniche emesse dalle principali organizzazioni mediche, quali l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG),

l'American Cancer Society (ACS), l'Association of Reproductive Health Professionals (ARHP) e l'American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP).

In Italia non esistono ancora linee guida ufficiali relative al test HPV come strumento di screening primario, tuttavia il Ministero della Salute si sta muovendo in questa direzione attuando diversi progetti pilota in alcune Regioni Italiane.

In particolare in Italia in attesa di linee guida ufficiali, ci si attiene ai suggerimenti del GISCI (Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma) per quanto riguarda l'iter diagnostico da seguire nello screening per l'HPV. Nel 2010 il GISCI ha pubblicato un documento dal titolo "Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario e rivisitazione del ruolo del Pap test" in cui viene data principale importanza all'analisi dell'HPV DNA affiancandola dove necessario al Pap-Test e alla Colposcopia (Figura 10).

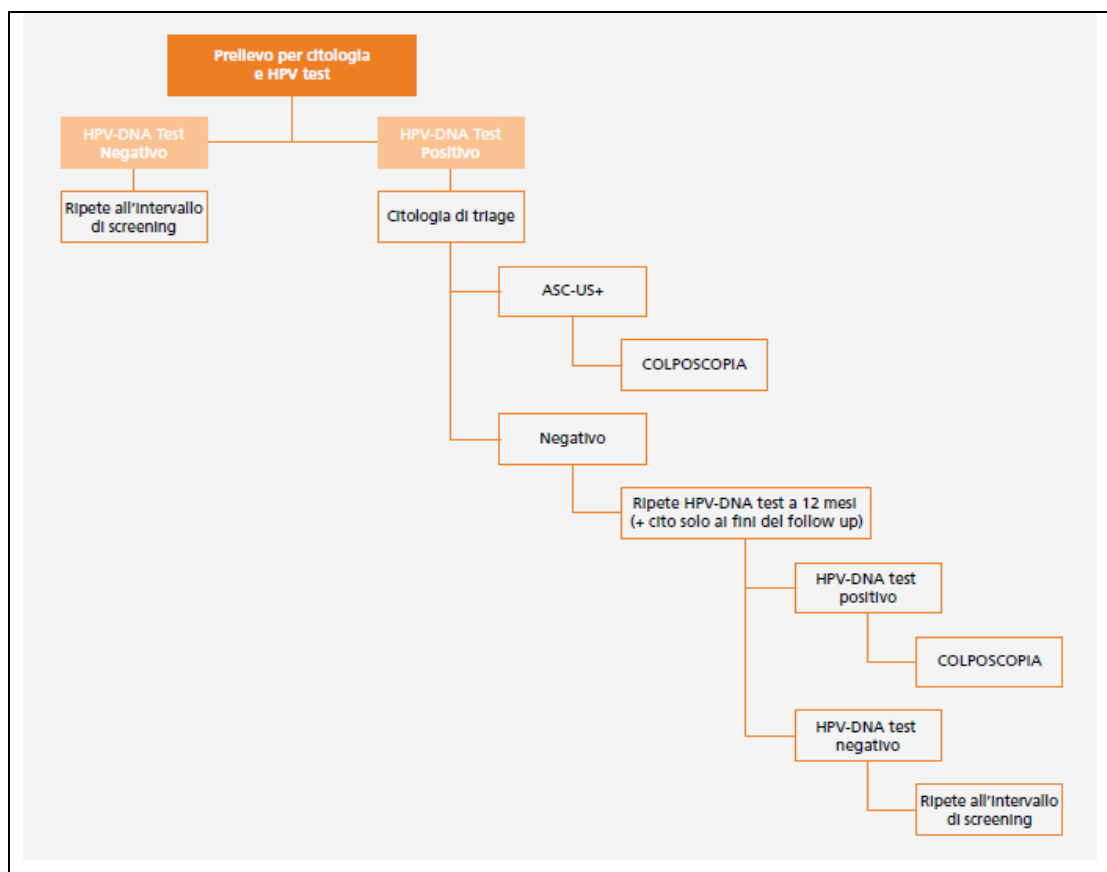


Figura 10: Algoritmo del triage citologico dopo esecuzione del test per l'HPV DNA (GISCI, 2010)

Tale algoritmo, è basato sul triage citologico dopo test HPV positivo. Come riportato nelle stesse raccomandazioni, allo stato attuale non sono previsti nell'algoritmo biomarcatori di specificità e progressione che, pur essendo estremamente promettenti, sono tuttora oggetto di specifici studi sperimentali (*GISCI, 2010*).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Capitolo 4

Obiettivo dello studio, condotto nella Sezione di Biologia Molecolare del Laboratorio di Patologia Clinica presso l'Ospedale Fatebenefratelli, San Giovanni Calibita di Roma, durante i tre anni di svolgimento del dottorato è stato prima di tutto quello di ricercare e individuare nuove metodiche che potessero essere inserite nella routine clinica della sezione di Biologia Molecolare, tali da consentire un miglioramento della performance analitica, l'esecuzione di test multiparametrici in tempi contenuti e una riduzione dei costi analitici.

Nell'ambito della diagnosi dell'HPV, tale ricerca ha portato all'individuazione del test HPV OncoTect[®] (IncellDx, CA) basato su una metodica di citofluorimetria e fluorescenza in situ per la rilevazione dell'mRNA delle oncoproteine virali E6 ed E7 nelle cellule della cervice uterina.

Obiettivo principale di questo studio e argomento di questa tesi, è stata, quindi, la valutazione della performance clinica dell'HPV OncoTect[®] rispetto al NucliSENS EasyQ (BioMerieux, Italia) che è il test ufficialmente in uso presso il nostro laboratorio per la rilevazione dell'mRNA delle oncoproteine virali su campioni cervico-vaginali in fase liquida.

MATERIALI E METODI

Capitolo 5

5.1 Pazienti e disegno dello studio

In questo studio sono state arruolate 173 pazienti afferenti al laboratorio analisi dell'Ospedale Fatebenefratelli, San Giovanni Calibita di Roma per l'esecuzione del test HPV. Criterio principale di arruolamento nello studio è stata la positività al test HPV DNA e/o al Pap-Test. Le donne arruolate sono state inoltre sottoposte a colposcopia e/o biopsia se necessario, secondo la normale pratica clinica. Inoltre per essere arruolate, tali pazienti non dovevano presentare storia precedente di patologie neoplastiche, epatiti o sindrome da immunodeficienza acquisita.

L'età delle donne arruolate è compresa tra 18 e 77 anni con un'età media di 36 anni. A tutte le pazienti è stato chiesto di firmare un consenso informato con il protocollo dello studio precedentemente approvato dal Comitato Etico dell'ospedale stesso.

Per il prelievo del materiale cervico-vaginale è stata utilizzata una spatola Cervex Brush e tale materiale trasferito in una bottigliina di liquido preservante (PreservCyt[®]) nel quale il materiale cellulare raccolto è stato meccanicamente disperso. I campioni così prelevati sono stati utilizzati entro due settimane dal prelievo per l'esecuzione del test DNA INNOLiPA HPV (Innogenetics N. V., Belgio) e la ricerca dell'mRNA delle oncoproteine virali E6 ed E7 mediante il kit NucliSENS EasyQ e il kit HPV OncoTect[®].

5.2 Pap-Test

In accordo con il protocollo internazionale, i campioni cervicovaginali per il Pap-test, sono stati raccolti nell'ambulatorio di ginecologia e letti da anatomo-patologi in base al sistema classificativo di Bethesda (vd paragrafo 3.1).

5.3 Estrazione acidi nucleici

L'esecuzione dei test per DNA INNOLiPA HPV e per mRNA NucliSENS EasyQ necessita che dal materiale cervico-vaginale prelevato in ambulatorio vengano estratti gli acidi nucleici. Tale estrazione è stata eseguita utilizzando il kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen per mezzo dell'estrattore automatico QIAasymphony SP (QIAGEN, Germania) (Figura 12).



Figura 12: Estrattore automatico QIAasymphony SP (www.qiagen.com).

Il kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen è studiato per la purificazione completamente automatizzata del DNA da prelievi citologici in liquido di stabilizzazione con il sistema QIAasymphony SP. Il kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen consente di ottenere il DNA eluito pronto per essere utilizzato direttamente in applicazioni a valle quali, ad esempio, test basati su ibridazione.

Il sistema QIAasymphony SP esegue tutte le fasi della procedura di preparazione dei campioni e in una singola sessione possono essere processati fino a 96 campioni, in lotti comprendenti massimo 24 campioni.

L'estrazione avviene effettuando una cromatografia a scambio ionico indotta dal pH su un campione in cui lo strumento stesso inserisce delle particelle magnetiche.

La procedura di purificazione, studiata in modo da garantire una processazione sicura e riproducibile dei campioni, comprende 4 fasi: lisi, legame, lavaggio ed eluizione (Figura

13). Per poter eseguire l'estrazione, 2 ml di materiale cervico-vaginale prelevato e sospeso in PreservCyt[®] vengono centrifugati (10' a 4000 rpm) e il pellet risospeso in 600 µl di lysis buffer ATL (Qiagen).

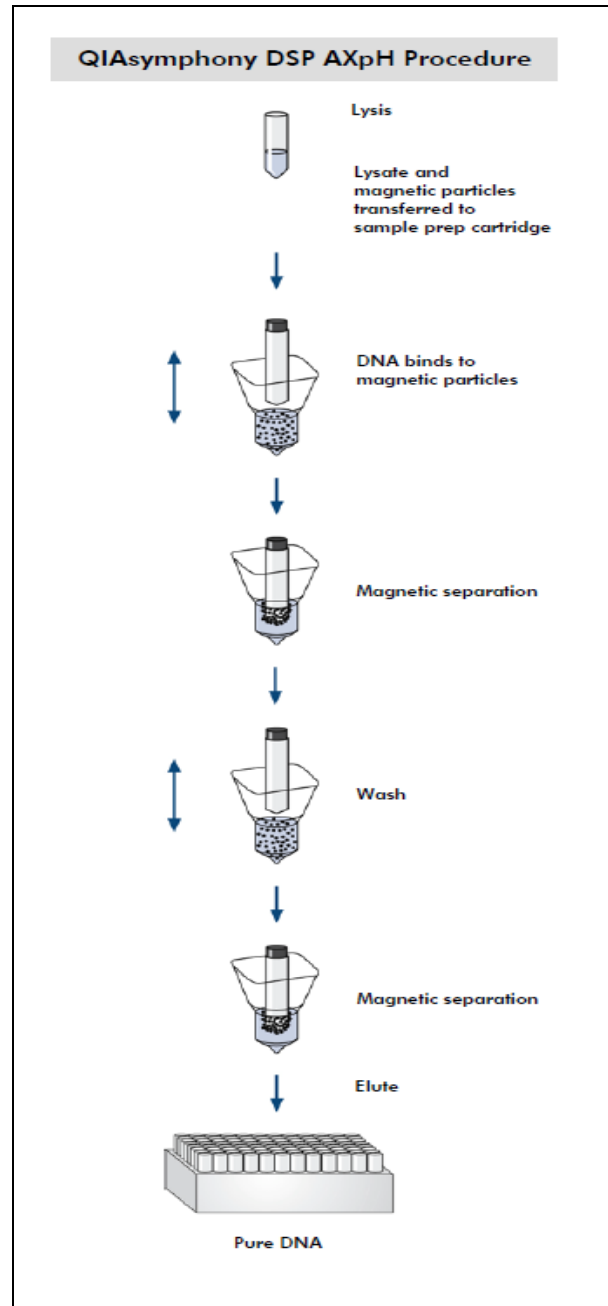


Figura 13: Fasi della procedura di estrazione effettuata dal QIAasympphony SP

Alla lisi delle cellule segue la fase di eliminazione di eventuale contaminazione proteica per mezzo della digestione enzimatica operata dalla proteinasi K. E' a questo punto che lo strumento QIAasympphony mette in atto la cromatografia a scambio ionico per mezzo

del legame del DNA/RNA alle particelle magnetiche. Poiché tale procedura è ripetuta più volte al fine di avere un'efficiente purificazione del DNA/RNA, vengono eseguiti altrettanti lavaggi con diversi buffer. Si ottiene, alla fine, un eluito di DNA/RNA di volume pari a 60 µl.

5.4 Test DNA INNOLiPA HPV

Il test DNA InnoLipa HPV Genotyping Extra è un saggio basato sul principio dell'ibridazione inversa in grado di identificare 28 differenti genotipi dell'HPV individuando sequenze specifiche nella regione L1 del genoma virale.

I genotipi individuati sono:

- Alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
- Probabile alto rischio: 26, 53, 66
- Basso rischio: 6, 11, 40, 43, 44, 54, 70
- Genotipi addizionali: 69, 71, 74

Per l'esecuzione del test INNO-LiPA HPV Genotyping extra, viene amplificata parte della regione L1 del genoma di HPV e gli ampliconi, denaturati e biotinilati, vengono ibridizzati con specifiche sonde oligonucleotidiche immobilizzate sulle strip. Il kit prevede inoltre, come controllo interno di qualità, l'amplificazione del gene umano HLA-DPB1.

Dopo l'ibridazione e un lavaggio di stringenza, viene aggiunta fosfatasi alcalina coniugata con la streptoavidina che lega tutti gli ibridi biotinilati precedentemente formati. L'incubazione con il cromogeno BCIP/NBT dà un precipitato viola/marrone che consente l'interpretazione visiva del risultato.

Tale metodica multi parametrica consiste di un'unica strip che permette la simultanea rilevazione di 28 genotipi differenti. Le sonde specifiche per ciascun genotipo, infatti, sono fissate e distribuite in linee parallele su una membrana di nitrocellulosa (Figura 11).

Nel nostro laboratorio l'esecuzione di tale metodica è completamente automatizzata mediante l'uso del preparatore automatizzato CAS-1200 Corbett Robotics Master Mix Preparator (Corbett Robotics, Belgio) per la preparazione della mix di reazione della PCR e la dispensazione della mix e del DNA estratto in una piastra da 96 pozzetti che

verrà successivamente posta nel Termociclatore 2770 Applied Biosystems per la fase di PCR che prevede l'esecuzione di 40 cicli alle temperature di 94°, 52° e 72° rispettivamente per le fasi di denaturazione, ibridazione e estensione.

Al termine della PCR, per far avvenire la denaturazione del campione, 10 µl di amplificato vengono incubati con 10 µl di denaturante per 5 min a temperatura ambiente nel vassoio dove poi verranno poste le strip su cui sono adese le sonde specifiche. A questo punto la fase di biotinilazione e rivelazione delle bande viene eseguita sullo strumento automatico Auto-LiPA 48 (Innogenetics N. V., Belgio) e la lettura e l'interpretazione dei risultati effettuata mediante l'utilizzo del software LiRAS® (Innogenetics N. V., Belgio).

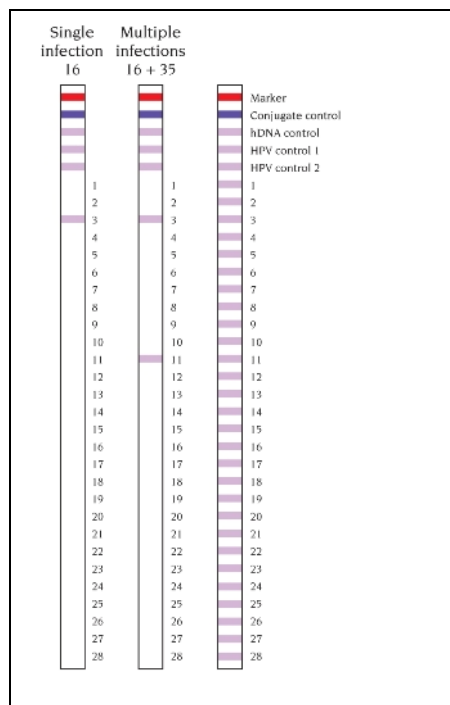


Figura 11: Esempio delle strip utilizzate nel kit INNO-LiPA HPV Genotyping extra.

5.5 Test NucliSENS EasyQ

Il Test NucliSENS EasyQ è un test qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici, da utilizzare insieme ad un lettore in fluorescenza per la determinazione in real-time dell'mRNA delle regioni E6/E7 di cinque differenti genotipi (16, 18, 31, 33 45) tra gli HPV ad alto rischio.

Tale test fornisce informazioni circa l'avvenuta integrazione virale e la relativa attività trascrizionale.

Il Test NucliSENS EasyQ partendo da RNA estratto da materiale in fase liquida (effettuata con l'estrattore automatico QIAasymphony SP; vd par. 5.3) si basa su una amplificazione NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) in real-time.

Il NASBA è un processo di amplificazione enzimatico in grado di amplificare l'RNA in condizioni isotermitiche mediante l'uso di:

- Due primer specifici: P1 che contiene una sequenza promotrice della T7 RNA polimerasi 5'-terminale in aggiunta a un tratto di nucleotidi complementari ad una sequenza dell' RNA target; P2 che comprende una breve sequenza identica al segmento dell'RNA target posizionata all'estremità opposta rispetto alla posizione di legame del primo oligonucleotide.
- Tre enzimi:
 - o Avian Myeloblastosis Virus Transcrittasi Inversa (AMV-RT);
 - o RNasi H di *Escherichia coli*;
 - o T7 RNA polimerasi.
- Nucleosidi Trifosfato;
- Tampone appropriato.

I primer specifici per l'RNA target determinano la specificità della reazione. Inoltre il Test NucliSENS EasyQ prevede anche numerosi controlli:

- controlli negativi per monitorare eventuali contaminazioni;
- controlli positivi distinti per tutti i genotipi di HPV detectati per monitorare le performance dei reagenti;
- controllo interno costituito dall'mRNA housekeeping U1A per monitorare l'intera procedura allo scopo di eliminare possibili falsi negativi.

I reagenti sono interamente forniti nel kit e la preparazione dei campioni è stata effettuata manualmente analizzando 8 campioni per ciascuna seduta di lavoro.

I tre enzimi necessari a dar luogo alla reazione di amplificazione sono forniti nel kit sotto forma di sfere liofilizzate. Con l'aggiunta di 170 µl di diluente per enzima le sfere liofilizzate vengono portate in soluzione lasciandole sciogliere per 20 minuti senza vortexare. I reagenti sono anch'essi ricostituiti aggiungendo 240µl di diluente per reagenti.

Occorre a questo punto preparare tre mix diverse per ciascuna reazione di amplificazione, ognuna per 8 campioni più due controlli, con: 80 µl di reagente, 16 µl di KCl, 14 µl di H₂O e 10 µl di sonde molecular beacon/primer (ISC/HPV16, HPV18/HPV31, HPV45/HPV33).

La piastra di lavoro viene divisa in tre parti e ciascun campione posto nel pozzetto corrispondente in ciascuna delle tre. Ad ogni pozzetto della piastra vengono aggiunti 15 µl della mix specifica e 5 µl dell'RNA estratto dai campioni, o 5 µl di controllo positivo o di H₂O per il negativo, secondo lo schema mostrato in figura 12.

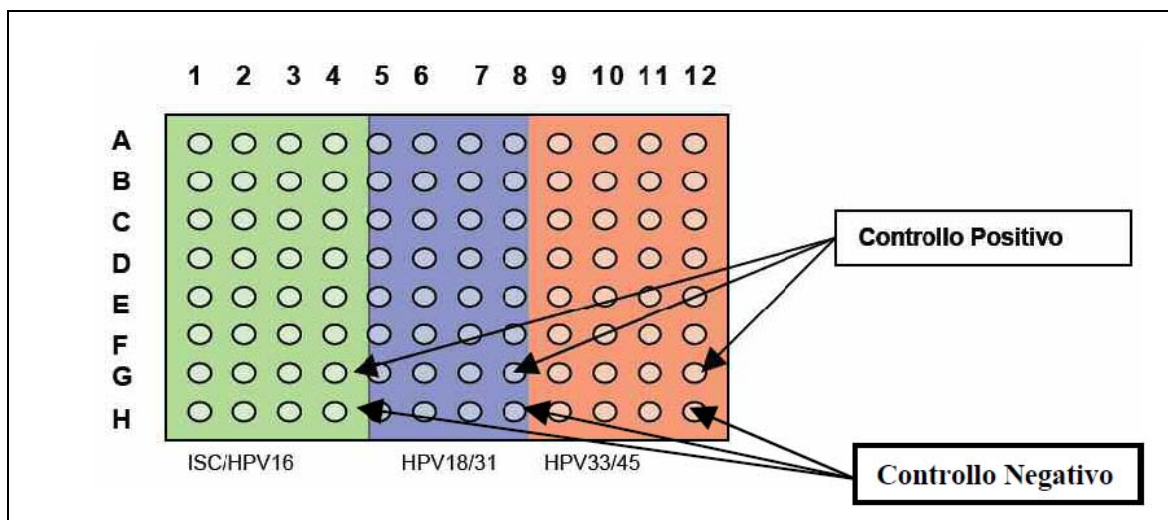


Figura 12: Schema della piastra per l'esecuzione del test NucliSENS EasyQ

La piastra viene denaturata e poi messa nel lettore fluorescente per l'amplificazione. Durante la fase di amplificazione avviene l'ibridazione del primer P1 (che contiene un promotore riconosciuto dall'enzima T7) con l'RNA target (Figura 13). L'enzima AMV-RT allunga il primer P1 creando una copia a cDNA dell'RNA stampo, formando un ibrido RNA/DNA. L'RNasi H riconosce l'ibrido RNA/DNA, degrada l'RNA lasciando un filamento singolo di DNA dove si lega il secondo primer (P2). Interviene un'altra volta l'enzima AMV-RT che allunga il primer P2 costruendo il doppio filamento di DNA. La T7 RNA Polimerasi, che riconosce il promotore presente nel primer, produce copie multiple dell'RNA trascritto rappresentanti la sequenza anti-senso dell'RNA target originale. L'RNA amplificato è rilevato in Real time attraverso l'uso delle sonde molecular beacons. Le molecular beacons sono delle sonde a stem-loop che contengono da un lato il quencher non fluorescente e dall'altro il fluoroforo. Quando si trova in

questa conformazione non emette fluorescenza poiché l'energia viene trasferita al quencher. Quando trova il target cambia conformazione portando ad una separazione fisica del quencher dal fluoroforo con l'emissione di fotoni della lunghezza d'onda specifica per il fluoroforo. Il fluoroforo utilizzato per ISC, HPV 18 e HPV 45 è il Texas Red mentre per HPV 16 e HPV 33 si usa FAM; questi fluorofori emettono fluorescenza in diverse lunghezze d'onda. Questo permette di rilevare i due genotipi di HPV nello stesso pozzetto. Si ottengono delle curve esponenziali dove l'intensità di fluorescenza è proporzionale alla concentrazione dell'amplicone.

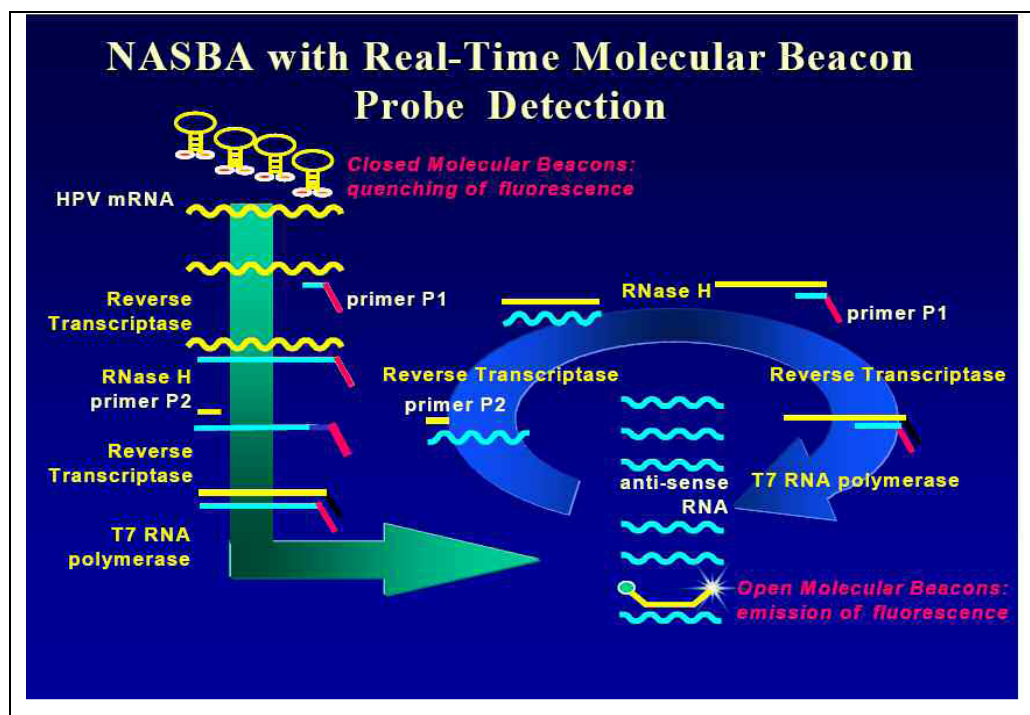


Figura 13: Principio di amplificazione NASBA

5.6 Test HPV OncoTect®

Il Test HPV OncoTect® è basato sul metodo della citometria a flusso unito alla FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) per la rivelazione dell'HPV mRNA E6/E7 nelle cellule della cervice uterina. L'esecuzione del test non necessita di estrazione degli acidi nucleici e, quindi, 1 ml di materiale cervico-vaginale prelevato dalla paziente e sospeso in PreservCyt® viene centrifugato a 3500 rpm per 5 min e il pellet lavato una volta con PBS. Successivamente le cellule contenute nel pellet vengono fissate e permeabilizzate

risospendendo il pellet in 300 µl di Reagente 1 e incubandole per 1 ora a temperatura ambiente; al termine si aggiunge 1 ml di Reagente 2 e si centrifuga a 3500 rpm per 5 min, si elimina il sovrantante e si risospende il pellet in 1 ml di Reagente 3 e si centrifuga nuovamente. A questo punto il campione viene quindi incubato a 43°C for 15 min. (Narimatsu R. et al., 2005; Conquillard G. et al., 2011) con 100 µl di una miscela contenente le sonde oligonucleotidiche fluorescenti. Al termine dell'incubazione le cellule vengono nuovamente lavate due volte in PBS e il pellet risospeso in 900 µl di PBS addizionato di siero bovino al 2% per l'analisi al citofluorimetro.

Il citofluorimetro IncellDx per l'analisi delle cellule è in grado di effettuare l'analisi in side e forward scatter e utilizza tre canali di fluorescenza (Figura 15 A).

Le cellule esocervicali vengono identificate mediante il side e il forward scatter, mentre la fluorescenza evidenzia la sovra-espressione dell'HPV mRNA E6/E7 (Figura 15 B).

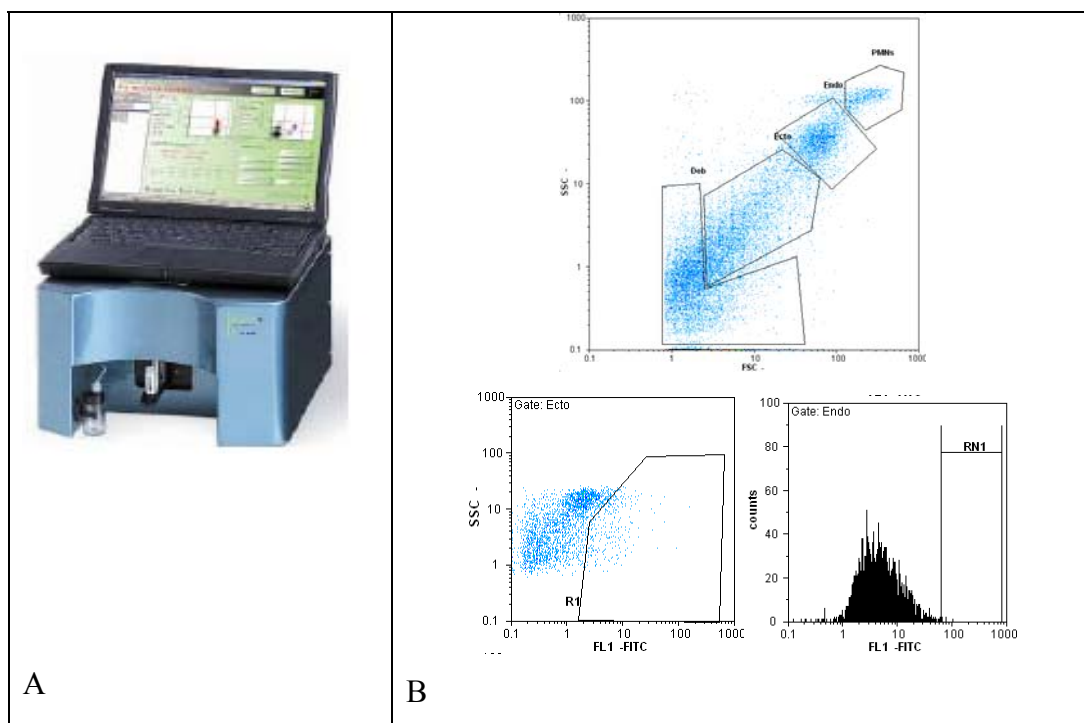


Figura 15: A: Citofluorimetro HPV OncoTect® e computer per l'analisi dei risultati; **B:** Esempio dei grafici per l'interpretazione dei risultati.

5.7 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'applicazione del software STATA 10.1. Per calcolare il grado di correlazione tra i differenti test diagnostici è stato usato il test del Chi-quadro o, dove possibile, il test esatto di Fisher. Per valutare la concordanza tra i test utilizzati è stato calcolato il coefficiente kappa di Cohen considerando che un valore inferiore a 0 indica nessuna concordanza, 1 indica perfetta concordanza e i valori intermedi interpretati sulla base alle linee guida di Landis e Koch: al di sotto di 0 concordanza scarsa; 0,00-0,20 lieve; 0,21-0,40 discreta; 0,41-0,60 moderata; 0,61-0,80 cospicua; 0,81-1,00 quasi perfetta. Sensibilità, specificità, accuratezza e PPV sono stati calcolati utilizzando le tabelle di contingenza convenzionali; gli intervalli di confidenza (IC) al 95% sono stati calcolati utilizzando il metodo binomiale. Un valore di $p=0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Capitolo 6

Nello studio sono state arruolate 173 pazienti afferenti al laboratorio analisi dell'Ospedale Fatebenefratelli, San Giovanni Calibita di Roma per l'esecuzione del test HPV, di età compresa tra i 18 e i 77 anni, e risultate positive al test HPV DNA stesso (Tabella 4) e/o al pap test (Tabella 5).

HPV DNA test		
	N°	%
Negativi	10	5,8
Positivi	63	94,2

Tabella 4: Distribuzione dei campioni rispetto al risultato dell'HPV DNA test

Pap-Test		
	N°	%
Negativi	54	31,2
ASCUS	64	37,0
LSIL	42	24,3
HSIL	13	7,5

Tabella 5: Distribuzione dei campioni rispetto al risultato ottenuto dal Pap-test

La distribuzione dei genotipi HPV evidenziati dall'esecuzione dell'HPV DNA test è stata calcolata e mostrata in figura 16. In accordo con la letteratura corrente (*Ammatuna P. et al., 2008*), è stata rilevata una prevalenza del genotipo 16 (42,2%).

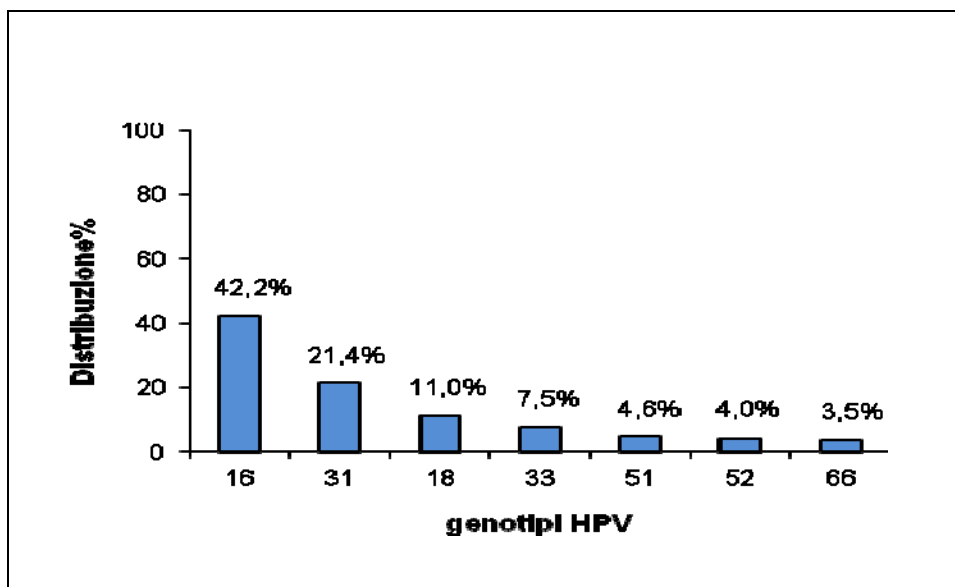


Figura 16: Frequenza dei genotipi HPV riscontrati nei campioni positivi all'HPV DNA test.

I campioni delle pazienti arruolate sono stati successivamente sottoposti ai test per la rivelazione dell'HPV mRNA E6/E7 con i test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTest®.

La distribuzione dei campioni negativi e positivi al test NucliSENS EasyQ è mostrata nella tabella 6.

Test NucliSENS EasyQ		
	N°	%
Negativi	57	32,5
Positivi	116	67,5

Tabella 6: Distribuzione dei campioni rispetto al risultato dell'HPV mRNA test NucliSENS EasyQ

Analizzando la frequenza dei genotipi nei campioni risultati positivi all'mRNA test NucliSENS EasyQ, possiamo osservare che tale frequenza presenta una distribuzione simile a quella riscontrata nei positivi all'HPV DNA, considerando però, come già precedentemente evidenziato, che il test NucliSENS EasyQ ad oggi può rilevare solo

cinque genotipi HPV tra quelli maggiormente ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 45) (Figura 17).

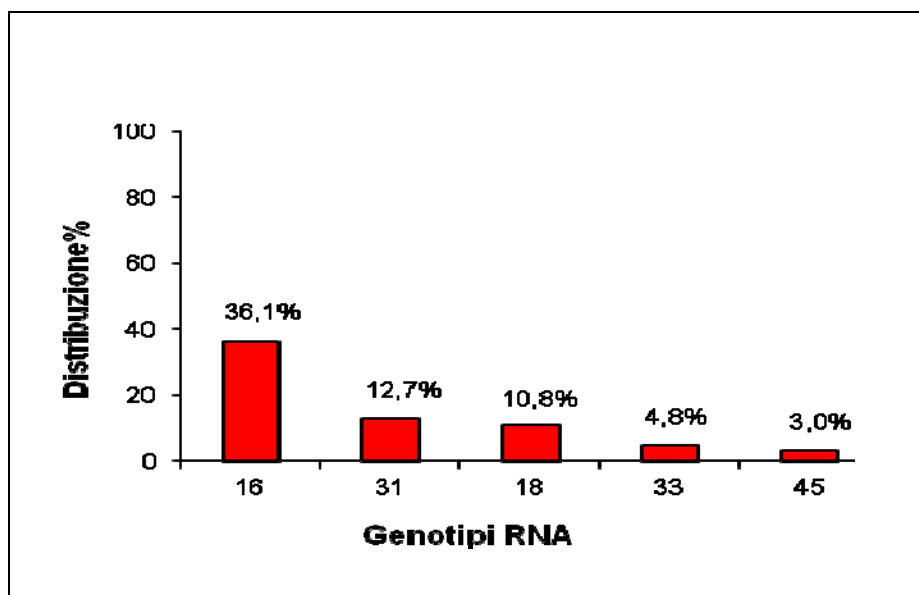


Figura 17: Frequenza dei genotipi HPV riscontrati nei campioni positivi all'HPV RNA test NucliSENS EasyQ.

Tra i campioni testati per l'iperespressione dell'E6/E7 mRNA con il saggio HPV OncoTect[®], 65/173 sono risultati positivi, 104/173 negativi e 4/173 campioni sono stati classificati come incerti in quanto i risultati rientravano in quella che, in accordo con quanto riportato dall'azienda produttrice del test, viene definita *zona grigia* (Figura 18).

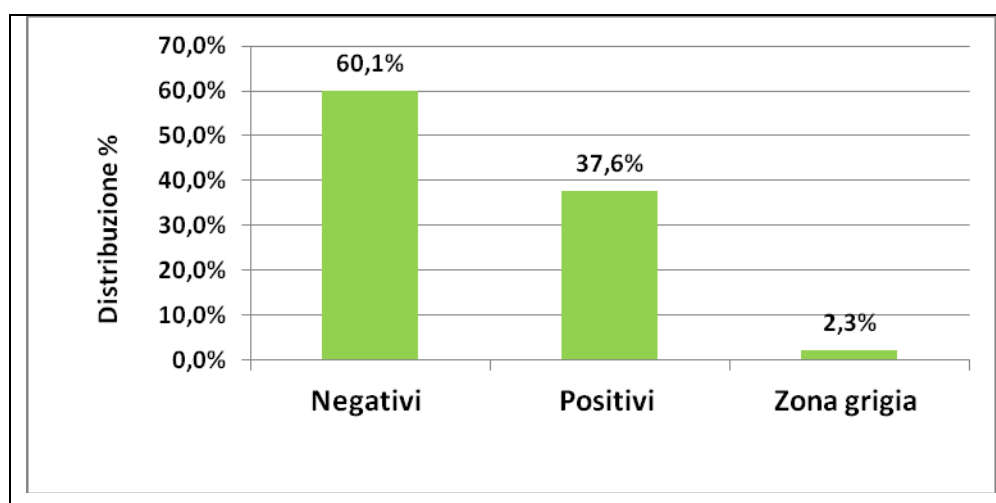


Figura 18: Distribuzione dei campioni rispetto al risultato saggio HPV OncoTect[®]

Tra le 173 pazienti arruolate, in seguito ai risultati del pap test e dei test HPV DNA e mRNA, solo ad 87 pazienti è stato consigliato di sottoporsi ad una valutazione istologica. L'analisi istologica ha identificato un totale di 23 casi con diagnosi CIN2+, comprendenti 22 casi di CIN2 e 1 di CIN3, e 29 con diagnosi CIN1. 35/87 pazienti tra quelle sottoposte ad analisi istologica, hanno riportato un esito di colposcopia normale in seguito alla quale o non hanno effettuato la biopsia o l'esito della biopsia è stato anch'esso negativo. Ne deriva che la prevalenza di lesioni cervicali (classificate come CIN2+) nella popolazione ristretta sottoposta a biopsia è pari al 26,4%.

Per entrambi i test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTect, la percentuale di campioni positivi è aumentata in maniera proporzionale alla gravità delle lesioni cellulari sia citologiche che istologiche (Figure 19 e 20).

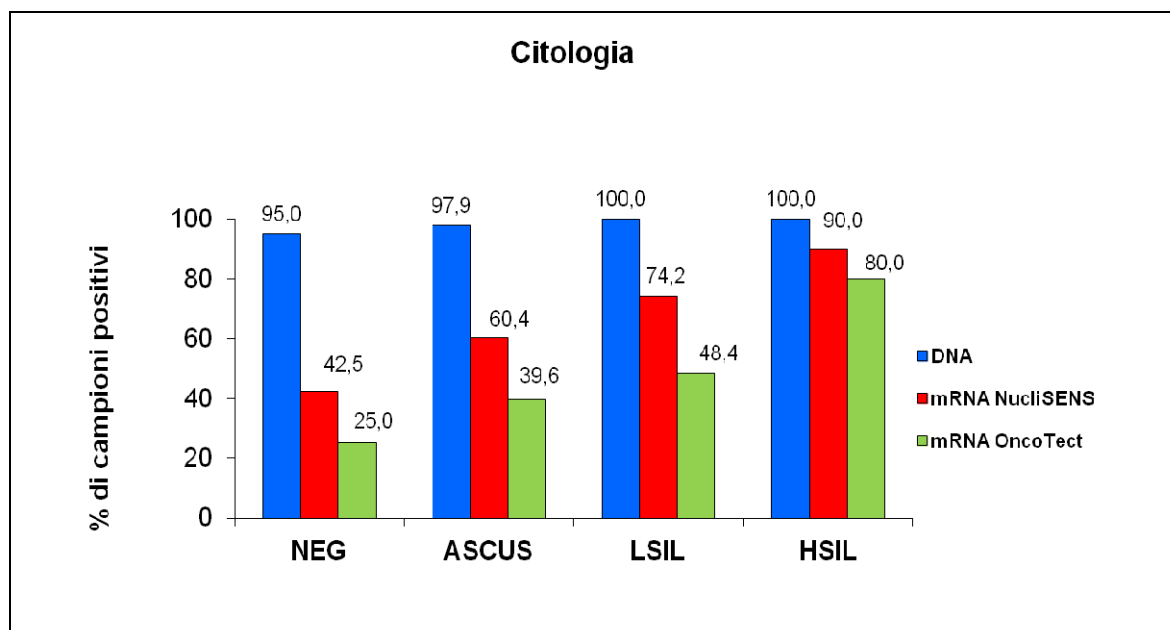


Figura 19: Campioni positivi ai test HPV DNA, NucliSENS EasyQ HPV e OncoTect stratificati in base ai risultati della citologia

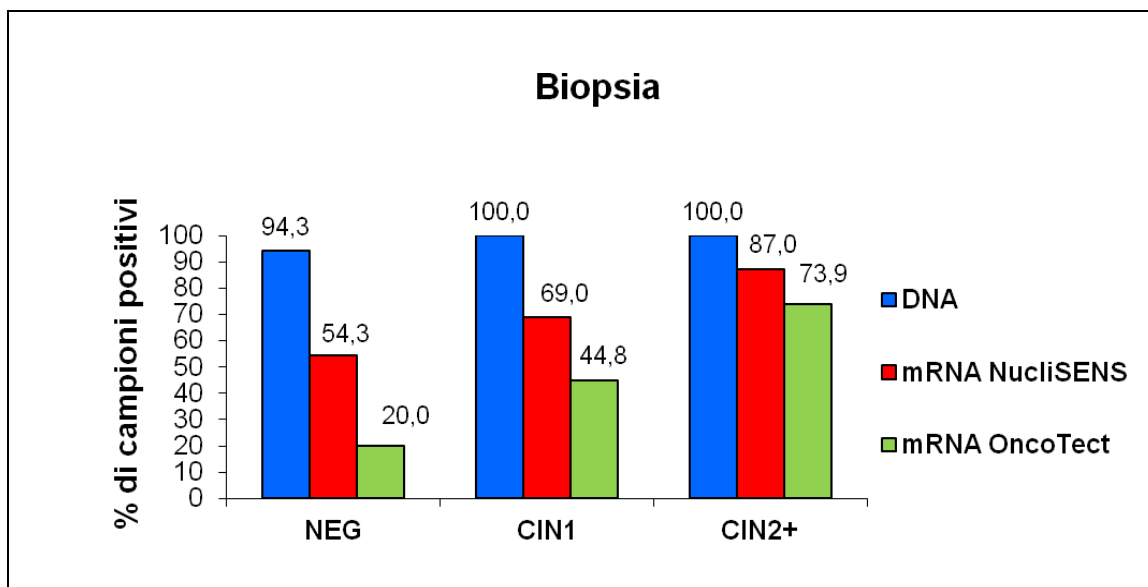


Figura 20: Campioni positivi ai test HPV DNA, NucliSENS EasyQ HPV e OncoTect stratificati in base ai risultati del risultato istologico

I due test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTect, nel complesso hanno mostrato concordanza nella classificazione dei pazienti in base ai risultati citologici ($k=0,232$ $p=0,004$) e istologici ($k=0,30$ $p=0,001$).

In seguito alla stratificazione sulla base dei risultati citologici, la percentuale di campioni positivi fra gli HSIL è stata paragonabile per entrambi i test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTect, 90,0% e 80,0% rispettivamente. La differenza più rilevante è stata osservata nei campioni negativi (42,5% per NucliSENS e 25,0% per OncoTect), ASCUS (60,4% per NucliSENS e 39,6% per OncoTect) e LSIL (74,2% per NucliSENS e 48,4% per OncoTect) (Figura 19). Per quanto riguarda i campioni risultati negativi alla citologia, le percentuali di campioni mRNA positivi osservate sono in linea con quanto recentemente pubblicato (*Rijkaart DC et al., 2012*).

Analizzando, invece, la stratificazione sulla base dei risultati istologici, è possibile osservare che l'HPV OncoTect ha mostrato una reattività inferiore rispetto al NucliSENS EasyQ nei campioni con istologia normale (20,0% versus 54,3% rispettivamente) e CIN1 (44,8% versus 69,0% rispettivamente). Così come per i campioni HSIL positivi, entrambi i test hanno mostrato una sensibilità paragonabile nei casi CIN2+, 87,0% (95%IC, 73-100) per il NucliSENS EasyQ e 73,9% (95%IC, 56-92) per l'HPV OncoTect.

Per comprendere meglio la differenza tra i due test in merito alla differente capacità di rivelazione delle oncoproteine virali, si consideri ad esempio il seguente caso corrispondente ad una della pazienti arruolate nello studio (Figura 21).

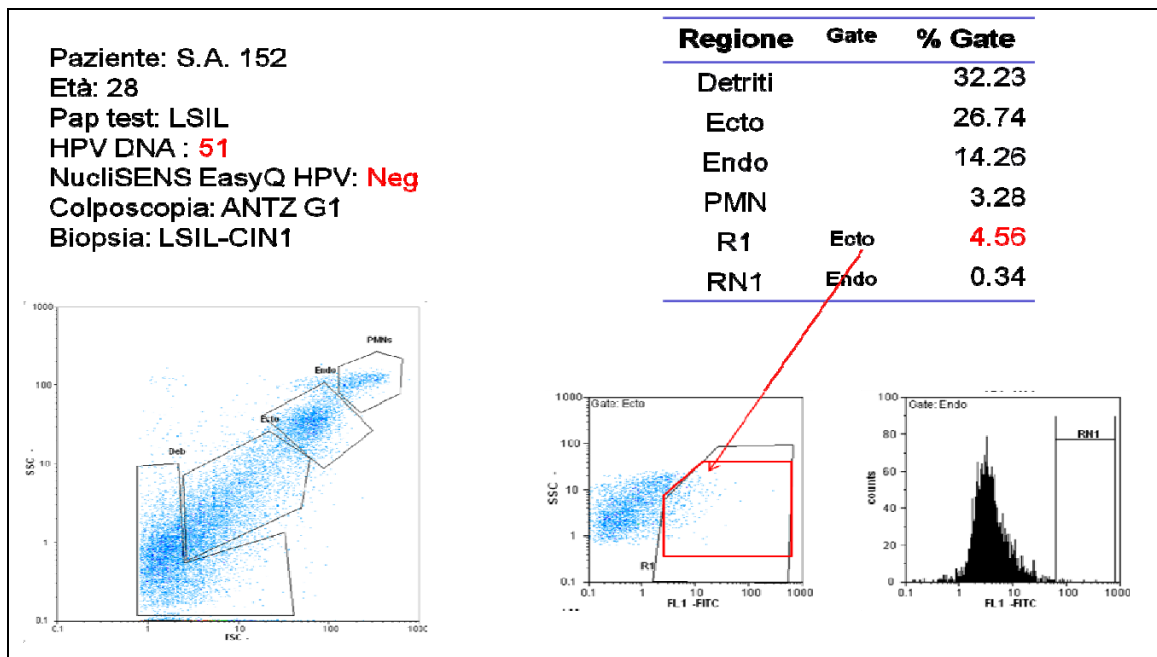


Figura 21: Quadro clinico di una paziente arruolata nello studio che evidenzia la differenza di diagnosi tra il test NucliSENS EasyQ e l'HPV OncoTect.

Nel caso di questa paziente citologia e istologia erano concordi nell'evidenziare la presenza di una lesione di basso grado, tale risultato concordava con l'infezione da HPV 51 rilevata dal test per l'HPV DNA ma effettuando solamente il test NucliSENS EasyQ non viene rilevata la presenza di mRNA E6/E7 dal momento che il 51 non è fra i genotipi osservati dal suddetto test. L'esecuzione del test HPV Oncotect evidenzia, invece, l'espressione di tali oncoproteine confermando la necessità di sottoporre la paziente ad un monitoraggio a tempi ravvicinati, così come previsto dalla linee guida.

A questo punto solamente sui campioni risultati CIN2+ all'esame istologico, e che presentavano risultati confrontabili con i due test, sono state calcolate sensibilità, specificità, accuratezza e PPV, i cui valori sono mostrati in tabella 7.

	NucliSENS EasyQ	HPV OncoTect
Sensibilità (%)	87,0	73,9
Specificità (%)	36,1	68,8
Accuratezza (%)	50,0	70,0
PPV (%)	33,9	45,9

Come si può osservare, in questi ristretto gruppo di pazienti, la sensibilità fra i due metodi si dimostra paragonabile, mentre l'HPV OncoTect risulta quasi due volte più specifico del NucliSENS EasyQ (68,8% versus 36,1%), sicuramente più accurato (70,1% versus 50,0%) e con un PPV pari a 45,9% versus 33,9%.

CONCLUSIONI

Capitolo 7

Il lavoro svolto nella Sezione di Biologia Molecolare del Laboratorio di Patologia Clinica presso l'Ospedale Fatebenefratelli, San Giovanni Calibita di Roma, durante i tre anni di svolgimento del dottorato ha portato per prima cosa all'individuazione di una nuova metodica innovativa nell'ambito della diagnosi dell'infezione da HPV, in grado di consentire in tale ambito, un miglioramento della performance analitica e la riduzione sia dei tempi diagnostici e sia dei costi analitici.

Tale metodica è rappresentata dal test HPV OncoTect[®] (IncellDx, CA) ed è basata sull'unione della citofluorimetria, per evidenziare eventuali alterazioni nelle cellule della cervice uterina, e della fluorescenza in situ, per la rilevazione dell'mRNA delle oncoproteine virali E6 ed E7 nelle stesse cellule.

Obiettivo principale di questo studio e argomento di questa tesi, è stata, quindi, la valutazione della performance clinica dell'HPV OncoTect[®] rispetto al NucliSENS EasyQ (BioMerieux, Italia) che è il test ufficialmente in uso presso il nostro laboratorio per la rilevazione delle oncoproteine virali su campioni cervico-vaginali in fase liquida.

Attualmente per eseguire lo screening primario dell'infezione da HPV le linee guida raccomandano l'uso dell'HPV DNA test unitamente al Pap-test (*Bhatla & Moda, 2009; Castle PE et al., 2002; Lorincz & Richart, 2003; Gisci, 2010*). Infatti, la combinazione di questi due esami diagnostici, consente di individuare quasi tutte le lesioni di tipo CIN2+, evitando di sottoporre inutilmente alcune pazienti all'esame colposcopico e alla biopsia, come accade quando si esegue solamente l'HPV DNA test a causa della relativamente bassa specificità e del basso valore predittivo positivo che caratterizzano questo test se usato come unico parametro di screening (*Sherman ME et al., 2003*).

D'altro canto, l'esame citologico mediante il pap-test può dare una discreta percentuale di falsi negativi dovuti a cause diverse (che vanno dal prelievo alla lettura), ma soprattutto non può rilevare le infezioni latenti, in quanto esse non hanno un preciso equivalente morfologico. In questo caso, le diagnosi false negative sono particolarmente dannose per le pazienti poiché portano al mancato trattamento. La situazione può essere peggiorata dal fatto che la donna ed il clinico possono sentirsi erroneamente più tranquilli e quindi sottovalutare eventuali sintomi. D'altro canto, le diagnosi false

positive possono essere causa di stress psicologico e portare ad un eccesso di trattamento.

Da studi recenti si evince, quindi, che la sensibilità del pap-test, che solitamente si attesta attorno al 70%, può essere migliorata con l'associazione alla tipizzazione virale, fino a raggiungere una percentuale del 98% di sensibilità (Gisci, 2010).

In questo studio sono state arruolate 173 pazienti afferenti al laboratorio analisi dell'Ospedale Fatebenefratelli, San Giovanni Calibita di Roma per l'esecuzione del test HPV, con un'età media di 36 anni; criterio di arruolamento è stata la positività all'HPV DNA test e/o al Pap-test.

In accordo con quanto riportato in letteratura (Ammatuna P et al., 2008), la distribuzione dei genotipi HPV rilevati ha evidenziato una prevalenza del genotipo 16, seguito dal 31 e dal 18, tutti genotipi definiti ad alto rischio per lo sviluppo di lesioni cervicali.

I campioni delle pazienti arruolate sono stati successivamente sottoposti ai test per la rivelazione dell'HPV mRNA E6/E7 con i test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTect®. Tali test sono stati effettuati su tutti i campioni e non solo su quelli positivi all'HPV DNA considerando che possono verificarsi casi in cui il genoma virale ormai integrato non è più visibile dal test per il DNA ma viene evidenziato mediante il rilevamento dell'mRNA delle oncoproteine virali.

La distribuzione dei genotipi nei campioni risultati positivi al test NucliSENS EasyQ ha confermato quanto già precedentemente visto nell'analisi del DNA sia come genotipi che come positività, considerando però che tale test è in grado di evidenziare solamente i 5 genotipi considerati più ad alto rischio quali 16, 18, 31, 33, e 45.

A sua volta il test HPV OncoTect® ha ulteriormente ridotto il numero di campioni positivi a 37,6% che rappresentano i campioni in cui realmente, secondo tale test, l'espressione delle oncoproteine virali si associa anche ad alterazioni cellulari.

Confrontando i risultati ottenuti per ciascuna paziente dal pap-test e dagli esami molecolari, solo ad 87/173 pazienti è stato consigliato di sottoporsi a colposcopia seguita da eventuale prelievo bioptico in base alla valutazione del ginecologo in fase di esecuzione dell'esame stesso. La valutazione istologica ha identificato 52 pazienti positive (tra lesioni CIN 1, CIN 2 e CIN 3) e 35 negative.

Per confrontare la performance clinica tra i test NucliSENS EasyQ e HPV OncoTect® e definirne la sensibilità e la specificità in relazione alla diagnosi citologica ed istologica,

i risultati ottenuti da ciascun test sono stati stratificati sulla base dei risultati ottenuti sugli stessi campioni sia citologicamente che istologicamente (Figure 19 e 20). In questo modo è stato possibile evidenziare che nella popolazione in esame, in entrambi i test per l'mRNA virale, la percentuale di campioni che esprime l'mRNA delle oncoproteine virali E6/E7 aumenta con l'aumentare della gravità delle lesioni cervicali. In accordo con i dati pubblicati dal dr Narimatsu e dal dr. Patterson nel 2005, la quantizzazione dell'mRNA di E6/E7 da parte dell'HPV OncoTect® rivela una sensibilità pari all'80,0% per le lesioni HSIL, paragonabile a quella evidenziata utilizzando il test NucliSENS EasyQ, pari al 90,0%. Allo stesso modo i due test sono risultati paragonabili per le lesioni definite CIN2+ dall'esame istologico, 73,9% e 87,0% rispettivamente.

Così come già pubblicato in altri studi simili (*Pierry D et al., 2012; Narimatsu & Patterson, 2005*) la differenza di specificità fra i due test, aumenta al diminuire della lesione rilevata: il test NucliSENS EasyQ ha evidenziato il 69,0% di positivi tra i pazienti CIN1, una lesione che generalmente regredisce spontaneamente e non richiede trattamento, rispetto al 44,8% di positivi evidenziati dall'HPV OncoTect. Ancora più sorprendente è la differenza che si evidenzia fra i due test in merito ai risultati nei pazienti negativi all'esame istologico: 20,0% di positivi per l'HPV OncoTect e 54,3% per il NucliSENS EasyQ.

In seguito a questi risultati, le pazienti corrispondenti a questo gruppo saranno inserite in uno studio di follow up per monitorare l'andamento dell'infezione e osservare l'eventuale sviluppo di una lesione della cervice uterina.

Per confrontare ulteriormente i due test, sui campioni risultati CIN2+ positivi, sono state calcolate sensibilità, specificità, accuratezza e valore predittivo positivo (Tabella 7) In maniera significativa, la specificità della quantizzazione dell'HPV mRNA con il test HPV OncoTect è risultata doppia rispetto al test NucliSENS EasyQ, 68,8% versus 36,1% rispettivamente. I risultati ottenuti sono paragonabili a quanto già pubblicato in altri studi di confronto tra l'HPV OncoTect e altri test per la rivelazione dell'HPV-RNA (*Pierry D et al., 2012; Narimatsu & Patterson, 2005*).

Entrambi i test HPV OncoTect e NucliSENS EasyQ risultano molto più vantaggiosi rispetto al test a DNA in quanto, come dimostra la loro correlazione con l'aumentare della gravità della lesione, sono in grado di distinguere tra un'infezione clinicamente

transiente (molto comune nelle donne sessualmente attive) che spesso dà origine ad una lesione di basso grado, e un'infezione persistentemente attiva da cui può derivare una lesione di alto grado e cui può far seguito un processo cancerogenico, infezione che in questo caso viene considerata, quindi, il vero precursore del cervicocarcinoma (*Mejer CJ et al., 2000; Zappacosta R., 2005; Cuschieri KS et al., 2004*).

Rispetto al test NucliSENS EasyQ, il test HPV OncoTect è in grado di apportare altri vantaggi nella pratica clinica quotidiana: un aspetto molto importante da considerare è che, in questo caso per l'esecuzione del test si parte direttamente dalle cellule prelevate in fase di esecuzione del tampone alla paziente. Ciò significa che le cellule non vengono lisate e non viene effettuata estrazione degli acidi nucleici riducendo di conseguenza la possibilità di contaminazione del campione, ma soprattutto consentendo anche l'analisi citofluorimetrica e la distinzione tra le cellule esocervicali ed endocervicali nonché la quantizzazione sia delle suddette cellule e sia di eventuali cellule infiammatorie (*Coquillard G et al., 2011*). A ciò si aggiunge anche che tale procedura consente un tempo di refertazione più rapido.

Inoltre, come evidenziato dall'esempio mostrato in figura 21, il grande vantaggio del test HPV OncoTect si riscontra nella capacità di rivelare la presenza delle oncoproteine virali indipendentemente dal genotipo cui il virus appartiene, a differenza di quanto avviene con il test NucliSENS EasyQ legato solo ai cinque genotipi per i quali i primer di amplificazione sono specifici.

I risultati di questo studio suggeriscono una grande potenzialità nell'utilizzo del test HPV OncoTect nello screening di pazienti HPV DNA positive in particolare per correlare tale positività ad eventuale sviluppo di lesioni della cervice uterina. D'altro canto, però, in particolare i risultati relativi ai pazienti con diagnosi citologica negativa, ASCUS o LSIL, suggeriscono che è necessario uno studio di follow up per seguire nel tempo lo sviluppo di eventuali lesioni nelle pazienti risultate positive al test e per migliorare la riproducibilità e il valore predittivo positivo del test stesso.

In conclusione, l'HPV OncoTect mostra nel complesso una maggiore specificità in particolare per quanto riguarda le lesioni di tipo più grave, e una sensibilità paragonabile al test NucliSENS EasyQ. Inoltre, l'utilizzo della citofluorimetria per la quantizzazione dell'mRNA delle oncoproteine virali E6/E7, rappresenta un importante vantaggio nello screening del cancro della cervice uterina associato anche ad una

diminuzione del tempo di lavoro e di ottenimento del risultato (2 ore invece di 4 ore con il test NucliSENS EasyQ), considerando che il fattore legato al tempo di refertazione è sempre uno degli aspetti più critici nei laboratori analisi.

Pur non trattandosi di uno studio prospettico, i risultati ottenuti in questo studio, in accordo con quanto recentemente pubblicato da altri gruppi (*Möckel J et al., 2011; Pierry D et al., 2012; Kottaridi C et al., 2011*), suggeriscono che la quantizzazione dell'mRNA delle oncoproteine virali E6/E7, utilizzata congiuntamente al pap-test, troverebbe nello screening dell'infezione da HPV una importante applicazione. In particolare, l'utilizzo del test HPV OncoTect con la sua elevata specificità, potrebbe contribuire a ridurre il numero delle pazienti che spesso vengono inviate ad effettuare la colposcopia e la biopsia senza una reale necessità, e potrebbe rappresentare un approccio di prima linea nello screening del cancro della cervice uterina.

E' evidente, infatti, che in alcune pazienti, l'individuazione precoce di lesioni iniziali che presentano una probabilità elevata di progredire in lesioni più gravi, permetterebbe di eseguire un monitoraggio costante e ravvicinato nel tempo della paziente stessa tale da consentire anche, in alcuni casi, di intervenire tempestivamente sulla lesione, evitando di arrivare allo sviluppo del tumore.

BIBLIOGRAFIA

- Ammatuna P, Giovannelli L, Matranga D, et al. Prevalence of Genital Human Papilloma Virus Infection and Genotypes among Young Women in Sicily, South Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):2002-2006.
- Becker KA, Florin L, Sapp C, et al. Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol.* 2004; 78 (3): 1121-8.
- Bernard HU: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32S:S1-S6.
- Bhatla N., Moda N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res.* 2009 Sep; 130 (3):261-5. Review
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244-265.
- Bulkman NW, Berkhof J, Bulk S, et al. POBASCAM Study Group. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer.* 2007; 96 (9): 1419-24.
- Castellsagué X, Muñoz N. Cofactors in human papilloma virus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 20-8. Review.
- Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, et al.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical
- adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98 (5): 303-15.
- Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I et al. Results of human papilloma virus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 1088-90.
- Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31: 29-34. Review.

- Ciccolini, F., G. Di Pasquale, F. Carlotti, L. Crawford, and M. Tommasino. 1994. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 9:2633–2638.
- Clemens K.E., Brent R., Gyuris J., Munger K. 1995. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 214: 289–293.
- Coquillard G., Palao B., Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. *Gynecol Oncol.* 2011 Jan; 120 (1):89-93. Epub 2010 Oct 14.
- Culp TD, Budgeon LR, Christensen ND. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology.* 2006; 347 (1): 147-59.
- Cuschieri K.S., Whitley M.J., and Cubie H.A. Human Papillomavirus Type Specific DNA and DNA Persistent-implication for Cervical Disease Progression and Monitoring. *Journal of Medical Virology* 2004; 73: 65-70.
- Cuschieri K, Wentzensen N. Human papilloma virus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Oct;17(10):2536-45.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324 (1): 17-27. Review.
- Del Mistro A, Chieco Bianchi L. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer.* 2001; (10): 1227-35. Review.
- Dolei, A., Papovavirus. *Manuale di Virologia Medica.* Seconda edizione. Ed. The McGraw-Hill Companies. 2001. 205-215. (a cura di: Ferdinando Dianzani, Guido Antonelli, Maria Rosaria Capobianchi, Antonina Dolei).
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991; 352 (6338): 824-7.
- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Clin Sci (Lond).* 2006; 110 (5): 525-41. Review.

- Duensing S, Duensing A, Lee DC et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene*. 2004; 23 (50): 8206-15.
- Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*. 2006; 25 (38): 5277-85. Review.
- Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1602:114–130.
- Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papilloma virus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4 (1): 46-54.
- Gruppo di lavoro Gisci: Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario e rivisitazione del ruolo del Pap test. Aprile 2010
- Halfon P, Benmoura D, et al. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ HPV assay. *J Clin Virol*. 2010 Feb;47(2):177-81.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4442–4446.
- Ho CM, Lee BH, Chang SF et al. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *Int.J.Cancer* 2010; 127(3): 622-32.
- Howley PM. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication,. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. p. 947–978 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Howley PM and Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology*, Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2001; 2197-2229.
- Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(8): 940-5. Review.
- Huibregtse JM, Scheffner M, and Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol*. 1993; 13:775–784.

- IARC Working Group. Human Papillomavirus. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon 2007; vol 90. International Agency for Research on Cancer
- Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; (31): 80-8. Review.
- Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol. 1995; 33 (4): 901-5.
- Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL, Huibregtse JM and Howley PM. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. J. Virol. 2000; 74:6408–6417.
- Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:2508–2517.
- Knipe DM, Roizman B, Howley PM, Griffin D. Fields Virology. Fifth edition Lippincott Williams& Wilkins. 2007; Vol 2 (62): 2299-2310.
- Koss Leopold G. Koss' diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. 2006; Fifth edition, volume 1: 282-394.
- Kottaridi C, Tsiodras S, Spathis A et al. Clinical performance of human papillomavirus E6, E7 mRNA flow cytometric assay compared to human papillomavirus DNA typing. Anal Quant Cytol Histol. 2011; 33(6):305-10.
- Laimins LA 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses,. In D. J. McCance (ed.) p. 201–223. Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lamarq L, Deeds J, Ginzinger D, Perry J, Padmanabba S, Smith-Mc Cune K. Measurements of human papillomavirus transcripts by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction amplification reaction in sample collected for cervical cancer screening. J Mol Diagn 2002; 4(2): 97-102.
- Levi F, Lucchini F, Negri E, Franceschi S, La Vecchia C. Cervical cancer mortality in young women in Europe: patterns and trends. Eur J Cancer 2000; 36 :2266-2271

- Lillo F, Galli L, Lodini S, Taccagni G, Ferrari A, Origoni M. Extralesional detection and load of human papillomavirus DNA: a possible marker of preclinical tumor spread in cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2008 ; 12 (3): 204-9.
- Liu, Y, Chen JJ, Gao Q et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* 1999; 73:7297–7307.
- Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2004; 78 (7): 3533-41.
- Lörincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Aug; 127(8):959-68. Review.
- Madeleine MM, Johnson LG, Smith AG et al. Comprehensive analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 loci and squamous cell cervical cancer risk. *Cancer Res.* 2008; 68 (9): 3532-9.
- Manos M, Ting M, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-214.
- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol.* 1993; 67: 3142–3150.
- Mejer CJ, Snijders PJ, Van Den Brule AJ. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high risk HPV? *CMAJ* 2000; 163: 535-538
- Middleton K, Peh W, Southern S et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003; 77 (19): 10186-201.
- Möckel J, Quaas J, Meisel H, Endres AS, Schneider V. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing has higher specificity than liquid-based DNA testing in the evaluation of cervical intraepithelial neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol.* 2011 Dec;33(6):311-5.

- Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygård JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Feb; 14 (2): 367-72.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1: S43-51. Review.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/1-10. Review.
- Narimatsu R., Patterson BK. High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2005 May; 123 (5):716-23.
- Palefsky J. Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med.* 2007; 15 (4): 130-3. Review.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000; 275 (10): 6764-9.
- Pierry D., Weiss G., Lack B., Chen V., Fusco J. Intracellular human papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in cervical biopsies better than Papanicolaou screening for women regardless of age. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Aug; 136(8):956-60.
- Rijkaart DC, Heideman DAM, Coupe VMH et al. High-Risk human papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA testing by the PreTect HPV-proofer for the detection of cervical high grade intraepithelial neoplasia and cancer among hrHPV DNA positive women with normal cytology. *J. Clinical Microbiology* 2012; 50(7):2390-2396.
- Roden RB, Lowy DR and Schiller JT. Papillomavirus is resistant to dessication. *J. Infect. Dis.* 1997; 176:1076–1079
- Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer.* 2005; 41(2):297-305.

- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370 (9590): 890-907. Review.
- Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, Iftner T. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb binding activity for the E7 protein of the low-risk human papilloma virus type 1. *J Virol*. 1994; 68: 7051–7059.
- Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM et al. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12 (10): 1038-44.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*. 2007; 120 (8): 1763-8.
- Solomon D, Davey D, Kurman R et al.; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002; 287 (16): 2114-9. Review.
- Sterling J, Stanley M, Gatward G, Minson T. Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J Virol*. 1990; 64 (12):6305-7.
- Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999; 18 (53): 7690-700. Review.
- Tropè A, Sjøborg K, Eskild A, et al. Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2458–2464
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-19.
- Wilson R, Fehrman F, Laimins LA. Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2005; 79 (11): 6732-40.
- Zappacosta R. Valutazione di un test innovativo per la ricerca dell'RNA messaggero nella diagnosi del Papillomavirus. *Pathologica* 2005; pag.214.

- Zur Hausen H. Human Papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991 Sep; 184(1):9-13. Review.
- Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9): 690-8.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (5): 342-50. Review.
- Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*. 2000; 78: 1-29. Review.