

Le infezioni da Papillomavirus



Evidenze epidemiologiche molecolari indicano che il DNA di almeno uno dei 15 tipi oncogeni di Papillomavirus umano (HPV) viene rilevato virtualmente in tutte le lesioni carcinomatose e che l'infezione persistente da HPV ad alto-rischio è la causa necessaria ma non sufficiente per il processo carcinogenico. Sebbene il rilevamento di DNA di HPV in tutte le lesioni cancerose non sia prova definitiva del suo ruolo causale nella carcinogenesi, è stato valutato che il rischio relativo di cancro associato con i genotipi oncogeni di HPV è addirittura più alto del rischio di carcinoma polmonare associato con il fumo. In natura sono stati identificati più di 120 genotipi di HPV, di cui circa 40 possono infettare il tratto genitale; di questi, 15 sono fortemente associati al cancro della cervice. Il meccanismo biologico di trasformazione maligna è stato ben caratterizzato. In sintesi, il potenziale oncogenico di questi virus è legato ai geni virali E6 e E7. La oncoproteina virale E6 inizia la degradazione della proteina anti-oncogenica (p53), mentre la oncoproteina virale E7 porta all'inattivazione di un'altra proteina di soppressione tumorale (RB). Questi effetti sinergici sono passaggi importanti della carcinogenesi in quanto danno luogo alla perdita del controllo del ciclo cellulare. Sulla base della loro presenza in lesioni benigne o maligne della cervice, questi virus sono stati definiti come HPV a basso, medio od alto rischio oncogeno. Gli HPV vengono tipicamente trasmessi nelle donne entro pochi anni dall'inizio della loro attività sessuale e, prevalentemente, sono causa di infezioni transitorie e clinicamente irrilevanti che nella maggior parte dei casi si risolvono spontaneamente senza alcuna conseguenza patologica e con cambiamenti citologici temporanei. Fortunatamente, a seguito dell'infezione primaria, soltanto una minoranza di donne mantiene una infezione persistente (circa il 10% dopo 5 anni) ed è questo gruppo più piccolo che

ha un sostanziale rischio (più del 50%) di sviluppare lesioni precancerose ad alta malignità (HSIL) o, in assenza di uno screening efficace, il carcinoma della cervice (CC) uterina.

2.1 I Papillomavirus

I Papillomavirus (dal latino “papilla”, pustola e dal Greco “oma”, tumore) sono classificati nella famiglia *Papillomaviridae*, di cui sono noti 118 tipi [43]. La famiglia dei Papillomavirus, *Papillomaviridae*, è stata ufficialmente riconosciuta dall'*International Council on Taxonomy of Viruses* (ICTV) solo alcuni anni fa. Infatti i Papillomavirus erano raggruppati con i Poliomavirus nella famiglia *Papovaviridae* (denominazione derivante da papilloma, polioma e virus vacuolizzante della scimmia), in quanto i virioni appartenenti alle due sottofamiglie sono caratterizzati da un genoma circolare costituito da una molecola di DNA a doppio filamento, dalla assenza di envelope e da un capsidico a simmetria icosaedrica. Questi due gruppi di virus erano in realtà considerati generi diversi della stessa famiglia, differendo per dimensioni del virione, organizzazione e dimensioni del genoma (5 kb e per i Poliomavirus, 8 kb per i Papillomavirus). Dal 1998 anche la distinzione in sottofamiglie è stata considerata non più rispondente all'evoluzione delle conoscenze sulla biologia molecolare di questi virus. Pertanto il comitato internazionale per la tassonomia virale ha definitivamente optato per la distinzione ufficiale delle famiglie *Papillomaviridae* e *Poliomaviridae*. I Papillomavirus che infettano l'uomo (Papillomavirus umani; HPV) hanno uno spiccato tropismo per i tessuti epiteliali e possono essere causa di lesioni proliferative della cute e delle mucose. Il gruppo degli HPV è estremamente eterogeneo e il numero di genotipi identificati è in continua crescita, sebbene un cospicuo gruppo di potenziali nuovi tipi rimangono ancora da caratterizzare. Attualmente 118 tipi di HPV [43] sono stati classificati in base alla loro sequenza nucleotidica, al potenziale oncogeno e alla posizione filogenetica.

Come già detto, il virione di HPV è privo di envelope ed ha simmetria icosaedrica. Il capsidico è costituito da 72 capsomeri (12 pentameri e 60 esameri) ed è formato da 2 proteine strutturali: la proteina capsidica maggiore (L1) di 55 kD costituente l'80% delle proteine virali totali e la proteina virale minore (L2) di 70 kD.

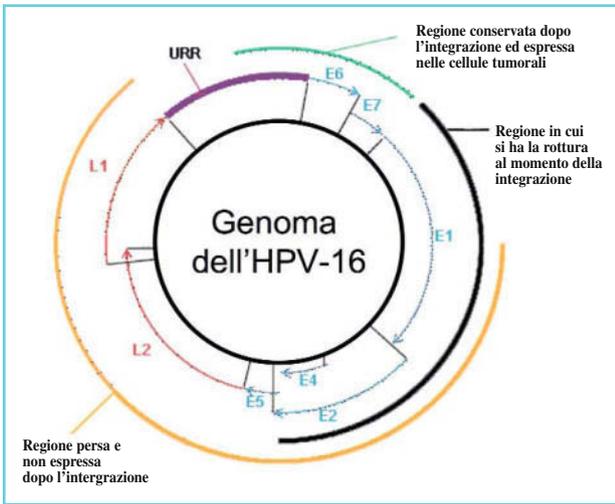


Fig. 2. Organizzazione del genoma degli HPV in forma episomale

2.2 Organizzazione del genoma virale

Il genoma virale è costituito da una singola molecola, di circa 7900 paia di basi, di DNA circolare covalentemente chiusa (Fig. 2); l'organizzazione del genoma di HVP lineare viene mostrata in Figura 3. Questa molecola di DNA, associata a proteine istoniche (di origine cellulare) va a formare un complesso simile alla cromatina. Nel genoma di alcuni HPV genitali sono state identificate delle regioni di attacco alle proteine istoniche, le *Scaffold Attachment Regions* (SARs) o "*Matrix Attachment Regions*" (MARs), molto simili a quelle presenti nel DNA eucariotico. Si è portati oggi a ritenere che questi elementi possano avere influenza sulla espressione genica e sulla replicazione virale. Il genoma dei diversi sottotipi di HPV è caratterizzato da un'organizzazione peculiare: la presenza di un genoma formato da otto sequenze codificanti (*Open Reading Frame*, ORF), localizzate su una singola elica di DNA virale, il quale rappresenta lo stampo per la trascrizione di messaggeri policistronici. Le ORFs, che rappresentano l'85% del DNA virale, vengono distinte, in funzione del tempo di intervento nel corso dell'infezione virale, in due regioni definite: *early*, ovvero precoci (costituenti il 45% del genoma virale) e *late*, ovvero tardive (rappresentanti il 40% del genoma virale). Tali regioni codificano rispettivamente per proteine precoci definite E1, E2, E4, E5, E6, E7, necessarie per la replicazione del DNA virale e per la trasformazione cellulare, per due ulteriori proteine definite E3 ed E8 con funzione ancora sconosciuta, e per proteine tardive

(L1, L2) facenti parte del capsid e aventi anche una funzione regolatoria. La ORF che codifica per L1 e L2 contiene l'origine di replicazione ed alcuni elementi di controllo per la trascrizione e la replicazione. Le funzioni delle otto ORFs della regione *Early* (da E1 a E8) e delle due ORFs delle regioni *Late* (L1, L2) sono descritte nella Tabella 2. Esiste inoltre una regione in cui non sono presenti ORF, chiamata *Long Control Region* (LCR), o *Upstream Regulatory Region* o *Noncoding Region* (URR); all'interno di questa regione sono concentrate sequenze regolatorie richieste per la replicazione e la trascrizione virale. I geni precoci vengono trascritti efficientemente nelle fasi non produttive delle infezioni e codificano per proteine funzionali necessarie alla replicazione del DNA e, in alcuni casi, importanti nella trasformazione cellulare. I geni tardivi sono espressi soprattutto nelle fasi produttive delle infezioni. Malgrado il genoma di HPV sia una molecola di dimensioni ridotte, la sovrapposizione dei geni e la possibilità di sfruttare *splicing* alternativi, conferisce ad esso la capacità di codificare per un numero relativamente ampio di proteine.

Nella regione URR è presente un *major late promoter*, che controlla l'espressione dei geni tardivi e del gene E4 e una sequenza "enhancer" che interagisce sia con prodotti genici virali, che con fattori cellulari.

I geni precoci, espressi sia in cellule infettate in modo non produttivo sia in cellule trasformate, sono trascritti in numerose sequenze codificanti parzialmente sovrapposte, che subiscono uno *splicing* alternativo e presentano una comune sequenza finale in 3', definita da un segnale di poliadenilazione. Le regioni precoci codificano per proteine virali regolatorie, tra le quali quelle necessarie per dare inizio alla replicazione del DNA virale [8].

Negli HPV oncogeni le proteine precoci sono codificate a partire da promotori precoci, quale, ad esempio, P97 in HPV-31, prima dell'inizio della replicazione virale.

La trascrizione di proteine tardive è sotto il controllo di promotori tardivi, quale, ad esempio, P742 in HPV-31, questa si verifica durante l'assemblaggio di nuovi virioni maturi.

Il capsid, che racchiude il genoma virale, presenta una simmetria icosaedrica ed è composto da 72 capsomeri. Ogni capsomero è un pentamero di L1 (55 kD), una proteina strutturale del capsid, che costituisce l'80% delle proteine virali totali. L1 è coinvolta principalmente nel legame al DNA virale, come dimostrano studi su virus mutanti per L1, i quali sono ancora in grado di formare il cap-

side, ma non possono incorporare il DNA. Il capsidite di ogni virione contiene inoltre circa 12 copie di L2 (70 kD), la proteina minore del capsidite [7]. L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma anche diverse funzioni regolatorie durante il ciclo vitale degli HPV, tra le quali il legame a recettori secondari, la determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsidite virale, aumentando così l'infettività dei virioni (Tabella 2).

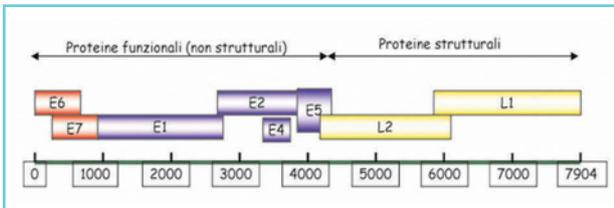


Fig. 3. Organizzazione del genoma degli HPV in forma lineare

Tabella 2. Elenco delle ORF di HPV e funzione delle proteine da esse codificate

ORF	Funzione
E1	<p>Mantiene il genoma virale in forma plasmidica.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ha attività ATPasica e 3'-5'-elicasica. - Lega sequenze ricche in AT situate all'origine della replicazione per iniziare la sintesi e l'allungamento del DNA virale. Il legame al DNA è debole e viene rafforzato da un legame con E2. - Interagisce con Ini 1/hSNF5 per innescare la replicazione virale. - Interagisce con RPA e hsp40 dell'ospite per far progredire la forca di replicazione. - Interagisce con E-Cdk2 per favorire un'efficiente replicazione virale.
E2	<p>Codifica per proteine chiave nella regolazione del genoma virale che svolgono sia funzione di attivazione che di repressione sulla trascrizione del DNA.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se espresso a bassi livelli attiva la trascrizione a partire dai promotori precoci. Se espresso, invece, ad alti livelli reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. - E2TA interagisce con Brd4 per favorire l'inclusione del genoma virale nel nucleo della cellula ospite, il quale si divide e si mantiene in forma episomale. - E2TA spiazza i fattori di trascrizione Sp1 e TFIID dal promotore di E6 se espresso a bassi livelli.

continua →

continua **Tabella 2**

	<ul style="list-style-type: none"> - E8E2 reprime la trascrizione a grandi distanze. - La perdita di E2 è uno step fondamentale della trasformazione neoplastica.
E3	Funzione sconosciuta
E4	Codifica per una proteina tardiva, il cui ruolo preciso è ignoto, ma che si ritiene causare le caratteristiche modificazioni citopatiche virali (induce il collasso della citocheratina citoplasmatica fino alla formazione dell'alone citoplasmatico: coilocitosi).
E5	Ruolo trasformante nelle fasi iniziali dell'infezione. <ul style="list-style-type: none"> - Predisporre la cellula a successivi stimoli mitogeni. - Associata ad EGFr determina un aumento del signalling recettoriale e dell'aumento dell'attività delle MAP chinasi. - In sua presenza le cellule mostrano bassi livelli di HLA A e B superficiali.
E6	Codifica per proteine in grado di degradare la p53, inducendo quindi la proliferazione e la trasformazione cellulare. <ul style="list-style-type: none"> - Si associa a diverse proteine cellulari per immortalizzare (PDZ e hTERT) e trasformare (p53) la cellula ospite. - Interferisce con la regolazione del ciclo cellulare mediata da p53. - Si associa con E6AP facilitando il rapido turnover di p53. - Interagisce con proteine contenenti domini PDZ alterando il signalling cellulare e l'adesione cellula-cellula. - Può attivare la telomerasi hTERT attraverso il legame a myc e Max causando instabilità cromosomica e senescenza cellulare.
E7	Codifica per una proteina trasformante dell'HPV, si lega alla proteina retinoblastoma (RB) determinando una disattivazione degli oncosoppressori a cui segue una eventuale trasformazione. <ul style="list-style-type: none"> - Ha soprattutto attività trasformante. - Lega e degrada proteine della famiglia Rb. - Lega Rb in forma ipofosforilata, causando il rilascio di E2F e modificando il normale controllo del ciclo cellulare. - Interagisce con HDAC (class I histone deacetylases) inducendo il rimodellamento della cromatina e l'ingresso della cellula in fase S. Questa interazione è fondamentale per il ciclo virale stesso. - Può legare direttamente E2F1 aumentando l'attività di trascrizione. - Può legare le cicline A/cdk2 ed E/cdk2 favorendo la fosforilazione di Rb. - Interagisce con p27kip1 e p21cip1 inibendo il loro ruolo inibitorio sul ciclo cellulare. - Induce instabilità genomica ed anomalie numeriche a livello dei centrosomi.

continua →

continua Tabella 2

E8	Funzione sconosciuta
L1	<p>Codifica per la proteina L1, proteina maggiore del capsido comune a tutti gli HPV, contro la quale viene prodotta la maggior parte degli anticorpi.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lega il DNA virale. - È espressa solo in cellule infettate in modo produttivo.
L2	<p>Codifica per la proteina L2, proteina minore del capsido, che presenta un'elevata variabilità tra i differenti tipi di HPV.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ha principalmente ruolo strutturale. - Può formare un complesso con le chaperonine Hsc70 e Hsp40 per la traslocazione nucleare del virus. - Recluta i genomi virali localizzandosi a livello del nucleo per interazione sui domini ND10. - Può esplicare alcune funzioni regolatorie come il legame a recettori secondari e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido, aumentando così l'infettività dei virioni.

2.3 Ciclo replicativo di HPV

Il ciclo replicativo di HPV è strettamente legato allo stato di differenziazione delle cellule infettate (Fig. 4).

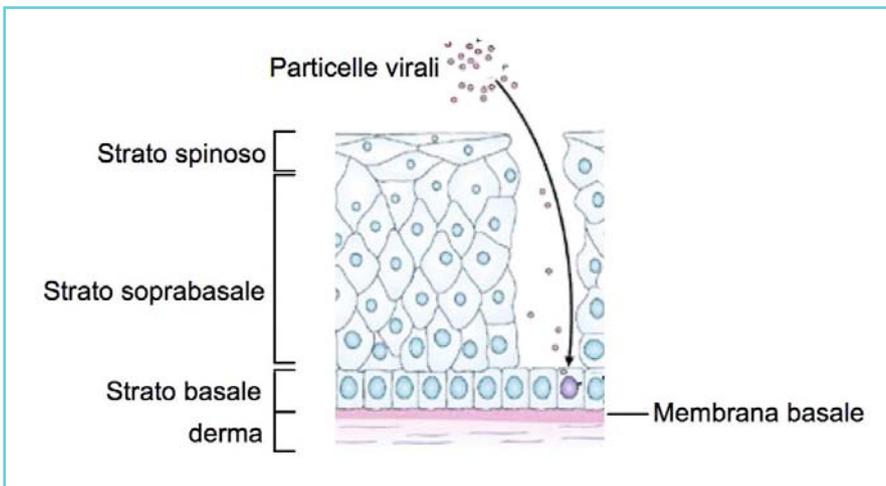


Fig. 4. Sezione della epitelio cervicale pluristratificato; l'infezione avviene nello strato basale dell'epitelio a seguito di microlesioni della mucosa

2.3.1 Stadi dell'infezione

L'infezione iniziale richiede l'ingresso di una particella virale in una cellula staminale epiteliale localizzata sulla membrana basale. La modalità d'ingresso del virus è ancora poco chiara: potrebbe esistere un recettore di superficie che ne favorisce l'attacco, oppure potrebbe essere indispensabile la presenza di eparina, un'altra ipotesi prevede un lento processo endocitotico mediato da vescicole rivestite di clatrina [44-46].

Il virus ha un tropismo molto ristretto per l'epitelio squamoso pluristratificato e si replica pertanto solo nelle cellule epiteliali in differenziamento della cute e delle mucose, come dimostra il fatto che le funzioni replicative del virus, come la sintesi del DNA virale, la produzione di proteine capsidiche e il montaggio dei virioni, hanno luogo unicamente a livello di cheratinociti in differenziamento terminale.

Le fasi iniziali della replicazione (adsorbimento a recettori cellulari, penetrazione e scapsidazione) sono poco conosciute, date le difficoltà di propagazione del virus, che avviene solo in colture organotipiche che mimano *in vitro* la struttura dell'epidermide. L'infezione virale inizia con il legame del virione alla superficie della cellula bersaglio, in seguito a piccole ferite o traumi che permettano l'esposizione dello strato basale dei cheratinociti al virus. I recettori utilizzati dal virus per prendere contatto con le cellule e penetrare all'interno di esse non sono stati ancora chiaramente identificati. Studi di legame con virioni marcati radioattivamente hanno dimostrato che gli HPV possono legarsi non solo a cellule epiteliali squamose, ma anche ad altri tipi di cellule. Questo indica che lo spiccato tropismo degli HPV per i cheratinociti non è dovuto alla specificità del recettore.

L'integrina $\alpha 6$ è stato il primo candidato come possibile recettore degli HPV, secondo studi che utilizzano le *Virus Like Particles* (VLP). Le VLP si legano all'integrina e l'uso di anticorpi diretti contro $\alpha 6$ blocca il legame del virus alla cellula. Il ruolo di questa integrina come recettore è stato confermato anche da studi in cui, su linee cellulari dove l'espressione recettoriale era stata soppressa, veniva fatta esprimere unicamente $\alpha 6$; questo era sufficiente per rendere possibile l'ingresso del virus nella cellula. L'integrina $\alpha 6$ coopera con le subunità $\beta 1$ e $\beta 4$ dell'integrina β , situate sulla superficie cellulare. L'integrina $\alpha 6\beta 1$ viene espressa su un'ampia varietà di cellule, tra cui piastrine, linfociti e cellule endoteliali; $\alpha 6\beta 4$, invece, si trova su

cellule epiteliali, mesenchimali e neuronali. Gli HPV si possono legare ad entrambi i tipi di cellule, ma preferenzialmente a quelle con profilo $\alpha 6\beta 4$. L'espressione di queste integrine non risulta però necessaria per l'ingresso del virus nelle cellule, come dimostra il fatto che alcuni HPV entrano in cellule prive di questi recettori. È stato osservato che tali virus, a livello di cheratinociti, si legano ad eparina e glicosaminoglicani, successivamente avviene il legame al recettore e l'internalizzazione.

Le particelle virali internalizzate sono trasportate in fagosomi, processo che può essere inibito da citoclasina B e taxolo; questo implica un possibile coinvolgimento di microtubuli e microfilamenti, inibiti da tali sostanze. Nonostante il legame alla membrana plasmatica e l'ingresso del virione in grandi vescicole citoplasmatiche possa essere monitorato con un microscopio elettronico, non si osservano virioni completi nel nucleo delle cellule infettate, mentre si riscontra un segnale molto forte per proteine L1 e L2. Questa osservazione indica che la scapsidazione del virione si verifica nel citoplasma e che le proteine L1 e L2 migrano nel nucleo grazie a segnali di localizzazione nucleare.

Il ciclo replicativo del virus può essere suddiviso in uno stadio non produttivo o precoce e uno produttivo, più tardivo, correlati allo stadio differenziativo della cellula ospite. La fase non produttiva implica lo stabilirsi del genoma virale come plasmide nucleare a livello delle cellule dello strato basale dell'epitelio. Le cellule appartenenti a questo strato sono costituite da cellule staminali in continua divisione, che rappresentano un serbatoio per gli strati superiori. Dato che la cellula basale è l'unica cellula dell'epitelio in grado di dividersi, il virus deve realizzare un'infezione a questo livello per indurre una lesione persistente, ma l'espressione dei geni tardivi, la sintesi del DNA e delle proteine capsidiche, avvengono solo nelle cellule in differenziamento terminale degli strati superiori. L'infezione delle cellule basali porta all'attivazione della cascata di espressione dei geni virali, che permette la produzione di 20-100 copie per cellula di DNA virale in forma episomale; questo viene mantenuto stabilmente, replicandosi in sincronia con il DNA cellulare. A livello basale l'espressione dei geni virali è limitata a specifici geni precoci; alcuni di questi, in particolare E5, E6, E7, stimolano la cellula infettata a proliferare e ad espandersi lateralmente. Un gruppo di cellule figlie (in cui le copie di DNA virale sono state equamente ripartite, assicurando l'infezione persistente delle cellule staminali dell'epidermide) abbandona la membrana

basale per stratificare e differenziare, rendendo possibile l'ingresso del virus negli strati superiori dell'epidermide. A questo livello inizia la fase tardiva del ciclo replicativo degli HPV, in assenza di replicazione del DNA virale, con l'espressione di geni virali tardivi e la traduzione di proteine strutturali. Successivamente, nelle cellule differenziate, viene completamente perso il controllo del numero di copie genomiche e il DNA è amplificato fino ad avere migliaia di copie per cellula. Infine, negli strati superiori dell'epitelio, si verifica l'assemblaggio e il rilascio nell'ambiente extracellulare di particelle virali mature (Fig. 5) [47, 48].

La trascrizione dei geni virali è un processo complesso per la presenza di promotori multipli, di meccanismi di "splicing" alternativi e per la produzione diversificata di mRNA nelle differenti linee cellulari. Come gli herpesvirus e gli adenovirus, gli HPV utilizzano, per la trascrizione, le RNA polimerasi DNA-dipendenti della cellula e pertanto devono iniziare la trascrizione nel nucleo della cellula ospite, dove si trovano gli enzimi necessari. Il genoma degli HPV viene trascritto in due tempi, precoce e tardivo, come riportato in Figura 6.

Nella produzione dei diversi tipi di mRNA sono coinvolti promotori multipli; in particolare si distingue un promotore precoce ed uno tardivo. Nel caso di HPV-31, P97 è il promotore maggiore, attivo in cellule differenziate in maniera non terminale; questo promotore dirige l'espressione di E6 e E7 e corrisponde a P97 di HPV-16 e P105 di HPV-18.

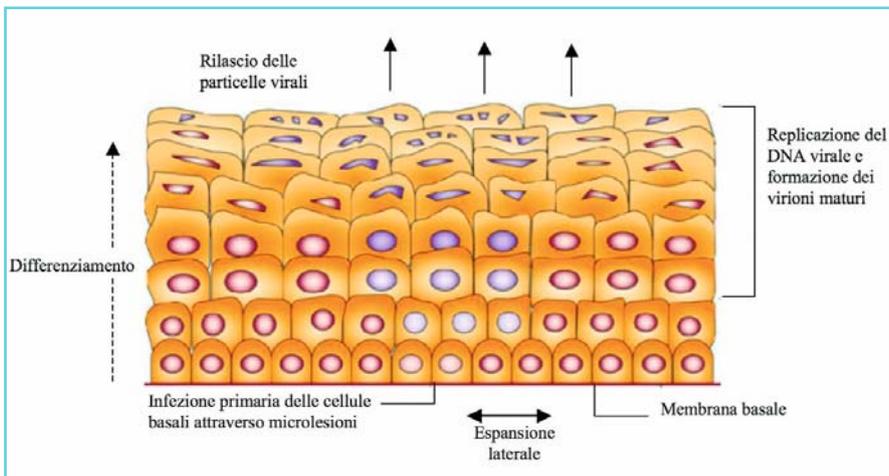


Fig. 5. Ciclo vitale degli HPV. Modificata da [45], con autorizzazione di Macmillan Publishers Ltd

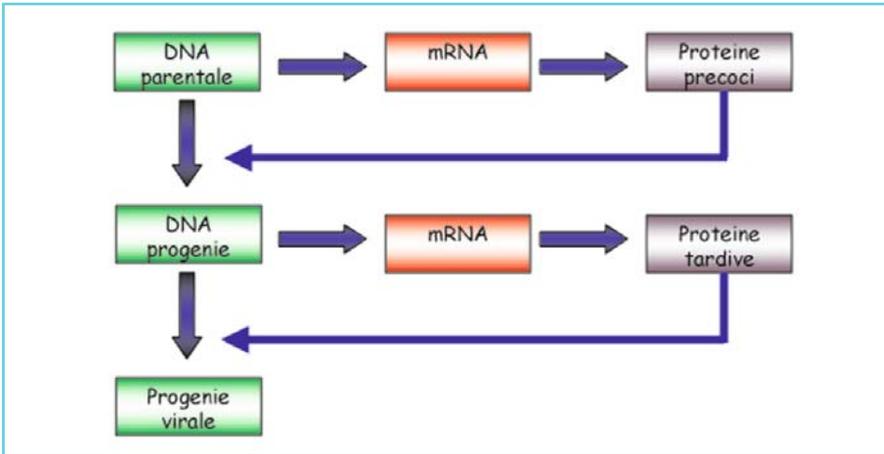


Fig. 6. Meccanismo di replicazione e trascrizione degli HPV

La regione regolatrice LCR contiene diversi “enhancer” costitutivi, con specificità di tessuto e di tipo cellulare che possono essere indotti da un’ampia varietà di molecole. Tali elementi sono essenziali per l’inizio dell’espressione genica virale e per il mantenimento della latenza. Un importante regolatore della trascrizione è il prodotto del gene E2, descritto successivamente. La regolazione dell’espressione dei geni virali è controllata da diversi fattori di trascrizione cellulari, che si legano all’LCR. Tra questi ricordiamo AP-1 (*activator protein-1*), YY1 (*yin yang-1*), alcuni membri della famiglia degli *octamer binding factor*, NF-1 (*nuclear factor-1*), elementi responsivi ai glucocorticoidi e Sp1 [49].

Le prime proteine virali ad essere espresse sono i fattori di replicazione E1 e E2; esse formano un complesso che si lega a sequenze all’origine della replicazione virale, che recluta la polimerasi cellulare e le proteine accessorie che mediano la replicazione [50].

La proteina E1 svolge un ruolo importante nella fase plasmidica dell’infezione. Le sue dimensioni variano dai 593 (HPV-48) ai 681 (HPV-10) aminoacidi, con un peso molecolare compreso tra 67,5 kD (HPV-47) a 76,2 kD (HPV-10). Viene codificata a partire dall’ORF E1, che è la più grande e meglio conservata ORF tra i diversi sottotipi degli HPV, a dimostrazione del suo ruolo cruciale durante la replicazione virale, svolto in collaborazione con E2. La proteina svolge un’attività ATPasica e 3’-5’elicasica ed è necessaria per l’inizio della sintesi e per l’allungamento del DNA virale, in quanto riconosce regioni ricche di AT situate all’origine della replicazione. Studi di

mutagenesi hanno dimostrato che E1 è indispensabile per il mantenimento del DNA in forma plasmidica e, in assenza di E1, il genoma virale può essere espresso solo in forma integrata.

E1 ha un'organizzazione strutturale tripartita: una regione N-terminale ad attività non ben definita, uno spaziatore di lunghezza variabile e una zona C-terminale correlata all'attività ATPasica ed elicasica. Il dominio di legame al DNA è stato caratterizzato attraverso studi di cristallizzazione: è costituito da un'estesa ansa e da una regione ad α -elica, importanti per il riconoscimento del DNA.

E1 interagisce, oltre che con E2, con numerose altre proteine cellulari, quali la subunità p180 della DNA polimerasi a cellulare e recluta il macchinario di replicazione cellulare a livello del sito di origine della replicazione del genoma virale. E1 lega inoltre il complesso ciclina E-Cdk2, specifico della fase S del ciclo cellulare, contribuendo a un'efficiente replicazione virale in associazione alla replicazione cellulare. L'interazione E1-Ubc9 è importante per l'accumulo intra nucleare di E1, dovuto all'aggiunta di un gruppo SUMO su E1 da parte di Ubc9.

La proteina E2 è un importante regolatore della replicazione e della trascrizione virale; la proteina è conservata tra le diverse sottofamiglie degli HPV, ha un peso molecolare di 50 kD ed è attiva sotto forma di dimeri. Presenta diversi domini: nella regione C-terminale si trova una sequenza che contiene specifici domini di legame al DNA; è inoltre presente una sequenza di legame a E1 [51]. Nella porzione N-terminale della proteina è situato un dominio di transattivazione, formato da una regione ad elica affacciata ad una zona a foglietti β ; questi due domini sono separati da una regione non strutturata interna che, al contrario, non è ben conservata tra i diversi HPV né per quanto riguarda le dimensioni né per la composizione aminoacidica.

E2, così come E1, è espressa a partire da un promotore precoce, svolgendo pertanto un ruolo attivo nel controllare il numero di copie di genoma virale nelle cellule indifferenziate. E2 lega il DNA come dimero in modo specifico a livello della sequenza consenso palindromica ACCN₆GGT. Quattro di queste sequenze sono presenti nella regione URR e tre fiancheggiano le regioni che riconoscono E2 presenti all'origine della replicazione. E2 è importante anche nel regolare la trascrizione virale a livello di promotori precoci ed esiste in due forme: a piena lunghezza, E2TA, con attività di attivatore o repressore della trascrizione, e troncata, E2TR e E8E2, repressori della trascrizione. Il ruolo di E2TA nel mantenimento dei plasmidi

virali è dovuto alla sua capacità di legare tali plasmidi ai cromosomi durante la mitosi cellulare, in modo tale che il genoma virale sia racchiuso nel nucleo cellulare quando questo si riforma durante la telofase. I siti di legame per E2 sono localizzati vicino ai siti di legame per i fattori di trascrizione cellulari che attivano i 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 [52]. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e di E7, le due principali oncoproteine virali; la sua perdita è il primo stadio di trasformazione neoplastica. Ci sono due principali meccanismi di repressione messi in atto da E2: E2TA spiazza i fattori Sp1 e TFIID dal promotore di E6, mentre E8E2 è in grado, attraverso meccanismi non ancora del tutto chiari, di reprimere la trascrizione a grandi distanze [53].

Le ultime fasi del ciclo replicativo degli HPV sono caratterizzate dalla trascrizione dei geni virali tardivi L1, L2 ed E4, anche se questo gene è localizzato all'interno della regione precoce. Questi geni sono sotto il controllo di un promotore specifico, situato all'interno dell'ORF di E7 degli HPV che danno infezioni a livello genitale, attivo solo in cheratinociti differenziati. Questo promotore, a differenza del precoce, non viene modulato negativamente da E2 e quindi presenta elevati livelli di espressione in cellule differenziate. Lo stretto legame tra l'espressione di geni tardivi e lo stadio di differenziazione degli epiteli indica che questo processo è controllato da diversi fattori cellulari specifici, la cui modalità d'azione non è ancora stata chiarita completamente [54].

Il ruolo della proteina E4 non è del tutto chiaro: infatti, nonostante sia espressa ad alti livelli in tessuti infettati e non sia rilevabile all'interno delle particelle virali mature, non si sa quale sia la sua funzione nel ciclo vitale del virus. Studi di mutagenesi effettuati sul gene E4 in BPV-1 evidenziano che E4 non è essenziale alla replicazione o alla trasformazione virale. È stato osservato che E4 di HPV-16 svolge un ruolo nell'infezione produttiva; la proteina si trova associata al citoscheletro di citocheratina, di cui induce il collasso, che presumibilmente contribuisce alla liberazione della progenie virale. Non si è tuttavia osservato il collasso di filamenti intermedi di cheratina in cellule esprimenti E4 di HPV-1, mettendo così in discussione la generalità di questi effetti. I dati attualmente disponibili sono compatibili con la possibilità che E4 potrebbe essere coinvolta nella replicazione del DNA virale, attraverso l'alterazione dell'ambiente

extracellulare in modo tale da favorire i processi di sintesi o il rilascio del virus [55].

Durante l'assemblaggio del virus, la proteina L2 si accumula in strutture nucleari dette corpi PML e recluta L1 in questi domini; è stato suggerito che i corpi PML possano essere i siti di replicazione del DNA del Papillomavirus e che le proteine di replicazione si accumulino presso questi siti per facilitare il packaging virale. Sebbene le *virus-like particle* possano assemblarsi anche in assenza di L2, si ritiene che la proteina L2 incrementi il packaging e l'infettività.

Per essere efficace, il virus deve fuoriuscire dalle cellule infettate e sopravvivere all'esterno della cellula prima della re-infezione. I Papillomavirus non hanno ciclo litico e non vengono rilasciati finché le cellule infettate non raggiungono la superficie epiteliale. Di conseguenza gli antigeni virali non vengono esposti sin quando le particelle virali non raggiungono lo strato superficiale [56]. Inoltre, l'espressione delle proteine virali può inibire l'espressione dei marker di differenziamento, prevenendo la formazione di un normale strato corneo; è stato anche suggerito che la proteina virale E4 possa contribuire direttamente all'uscita del virus negli strati superiori, disturbando l'integrità della cheratina e danneggiando l'assemblaggio dello strato corneo.

Per la produzione di virioni infettivi, il Papillomavirus deve amplificare il suo genoma e impaccarlo nelle particelle infettive; questo processo si verifica a seguito di un'incrementata attività del promotore tardivo, che è dipendente dallo stato differenziativo delle cellule epiteliali infettate. Si ritiene che il promotore *late*, localizzato all'interno dell'ORF di E7, quando up-regolato, incrementi l'espressione delle proteine coinvolte nella replicazione del DNA virale (E1, E2, E4, E5), senza direttamente modificare il livello di espressione di E6 ed E7, necessarie per l'ingresso in fase S. L'amplificazione del genoma virale inizia in un ristretto numero di cellule del compartimento proliferativo e richiede l'espressione di tutti i prodotti *early* compresi E4 ed E5, anche se il loro effettivo ruolo nella replicazione non è ancora completamente chiarito. Il legame di E2 alla regione URR è necessario per la replicazione del DNA virale e causa il reclutamento della DNA elicasi E1 all'origine di replicazione del DNA virale. Durante tutto il ciclo vitale del virus, il differente livello di proteine virali è controllato dall'uso dei promotori e dalla selezione dei diversi siti di splicing. Tuttavia il meccanismo molecolare che porta all'attivazione del promotore tardivo e all'up-regolazione dell'espressione di E1/E2 non è ancora chiaro; potrebbe

essere possibile che questo promotore sia costitutivamente attivo in tutte le fasi del ciclo produttivo. Il modello attuale suggerisce che un modesto incremento nell'attivazione del promotore durante la differenziazione possa portare ad un incremento nei livelli di E1 ed E2 (anche di E4 ed E5) e conseguentemente ad un aumento del numero di copie del genoma virale. I nuovi genomi sintetizzati potrebbero servire come templati per ulteriore espressione di E1 ed E2, che potrebbero facilitare un'addizionale amplificazione del genoma virale e in ciclo di ulteriore espressione di proteine di replicazione E1/E2. Poche informazioni sono note riguardo l'assemblaggio e il rilascio degli HPV. I virioni si osservano solo nello strato granuloso dell'epitelio, mai in strati inferiori e senza alcun effetto citolitico.

2.3.2 Mantenimento del genoma virale

Successivamente all'ingresso del virus nella cellula, facilitato dall'assenza di envelope e dalla rottura dei ponti disolfuro tra i capsomeri [57], il genoma dell'HPV si stabilizza in forma extracromosomiale all'interno del nucleo e si replica sino a raggiungere approssimativamente 10-200 copie per cellula. Quando la cellula infettata si divide, il DNA virale viene distribuito ad entrambe le cellule figlie, una delle quali migra verso lo strato spinoso e inizia un programma di differenziazione, mentre l'altra permane nello strato basale senza essere lisata, poichè la produzione di virioni dell'HPV è ristretta allo strato soprabasale, costituendo così il *reservoir* di DNA virale per ulteriori divisioni cellulari. Nelle cellule basali il pattern di espressione dei geni virali non è ben definito, tuttavia si ritiene che le proteine virali E1 ed E2 vengano espresse con la specifica funzione di mantenere il DNA virale in forma episomale [58] e di favorire la corretta segregazione dei genomi durante la divisione cellulare [59]. Per quanto concerne le proteine E6 ed E7, nelle cellule a livello della membrana basale, non è ancora del tutto chiara la loro funzione in questa fase del ciclo vitale del virus (Fig. 7).

2.3.3 Fase proliferativa

In un epitelio non infettato, le cellule basali migrano nello strato soprabasale e vanno incontro al processo di differenziazione termi-

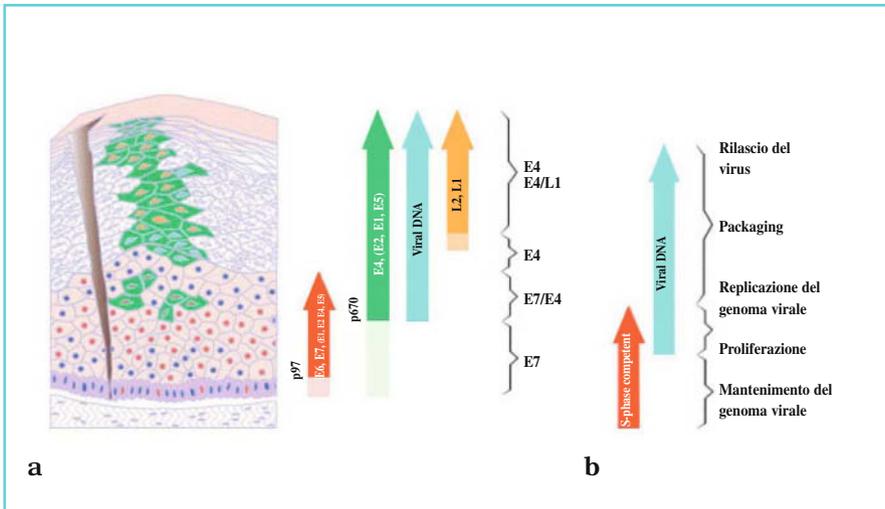


Fig. 7. Livello di espressione dei geni virali nei vari strati dell'epitelio pluri-stratificato della cervice uterina (a). In rosso viene indicata l'espressione dei geni necessari per l'ingresso in fase S; in verde l'incremento delle proteine di replicazione virale, che favoriscono l'amplificazione del genoma. Nello strato più superficiale lo splicing alternativo porta alla trascrizione delle proteine virali L1 e L2 (giallo) (b). Le cellule nello strato basale dell'epitelio ma cessano di essere in fase S. L'amplificazione del genoma virale inizia in queste cellule ma cessa quando queste perdono la capacità di esprimere le proteine di fase S. Sebbene il genoma virale si può rilevare per tutto lo strato superficiale dell'epitelio, le cellule che supportano attivamente l'amplificazione del genoma sembrano essere confinate alla regione in cui l'espressione di E7 coincide con elevati livelli di E4 e probabilmente con un incremento di E1 ed E2. Modificata da [56a], con autorizzazione di Elsevier

nale. Le modificazioni includono i cross-linking tra i filamenti intermedi di cheratina, la formazione di un rivestimento corneo, la secrezione di lipidi; tutte proprietà che permettono alla superficie epiteliale di formare una barriera [60]. Viceversa, durante un'infezione da HPV, le proteine oncogene E6 e E7 agiscono sul check point del ciclo cellulare legandosi alle proteine regolatorie del ciclo cellulare [61]; questo implica un ritardo della normale differenziazione terminale [62]. Le proteine E6 e E7, nelle lesioni cancerose, sono codificate, sotto un promotore virale precoce p97, in un messaggero bicistronico. L'associazione di E7 con le proteine della famiglia delle proteine pocket, quale pRb, è ben caratterizzata. pRb è un regolatore negativo del ciclo cellulare, che normalmente previene l'ingresso in fase S associandosi con la famiglia di fattori trascrizionali E2F. E7 legando-

si a pRb spiazza E2F, indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita esterni, e comincia l'espressione delle proteine necessarie alla replicazione del DNA. Inoltre E7 può associarsi con altre proteine coinvolte nella proliferazione cellulare, tra cui le deacetilasi istoniche, i componenti del complesso di trascrizione AP1 e le chinasi ciclina-dipendenti inibitorie di p21 e p27 (Fig. 8) [63].

Per l'ingresso della cellula in fase S è necessaria l'espressione della ciclina E, che è nelle cellule infettate il risultato dell'espressione di E7 e della distruzione del complesso pRb/E2F, tuttavia nelle cellule epiteliali in differenziamento possono essere presenti elevati livelli di chinasi ciclina-dipendenti inibitorie che portano alla formazione di complessi inattivi contenenti E7, ciclina E e p21/p27. Pertanto in un'infezione, la capacità di E7 di stimolare la progressione in fase S è limitata a quel sottogruppo di cellule differenziate con bassi livelli di p21/p27, oppure con un'espressione di E7 tanto elevata da superare il blocco di ingresso in fase S. L'azione di E6 si esplica con diversi meccanismi [64]. La proteina virale E6 complementa il ruolo di E7, si ritiene infatti che prevenga il processo apoptotico come risposta ad un ingresso in fase S mediato da E7 e quindi non programmato. E6 può inoltre associarsi con p53, determinandone l'ubiquitinazione [65] e la conseguente degradazione; pertanto comporta l'inattivazione della soppressione della crescita e/o dell'apoptosi mediata da p53. E6 può anche legarsi a proteine pro-apoptotiche quali Bak e Bax. Come conseguenza la presenza di E6 è considerata un fattore predisponente nello sviluppo di un carcinoma asso-

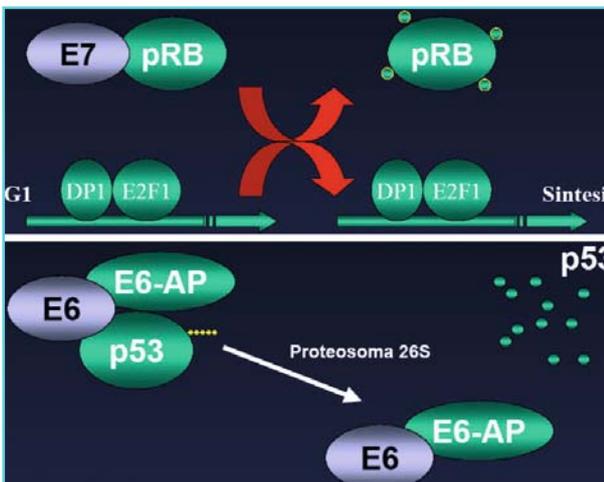


Fig. 8. Meccanismo d'azione delle proteine E6 e E7 sul ciclo cellulare. Il legame di E7 a pRB determina il rilascio del fattore E2F1 che attiva la trascrizione dei geni cellulari implicati nella sintesi del DNA e nella progressione del ciclo cellulare in fase S. E6 media tramite il legame con E6-AP l'ubiquitinazione di p53 che viene quindi degradata dal proteosoma 26S. Modificata da [63]

ciato ad HPV, poiché permette l'accumulo di errori casuali nel DNA della cellula ospite che non vengono riconosciuti. La proteina E6 dei genotipi di HPV ad alto rischio può anche stimolare la proliferazione cellulare indipendentemente da E7 attraverso il suo dominio carbossi-terminale che lega PDZ. Il legame E6-PDZ è sufficiente a mediare la proliferazione delle cellule soprabasali [66] e quindi contribuire allo sviluppo di tumori metastatici alterando la normale adesione cellulare.

2.3.4 Stato fisico del genoma virale

Il DNA virale può essere presente in una forma circolare libera extracromosomica, chiamata "episoma", o essere integrato nel genoma della cellula ospite. In alcuni casi sono stati ritrovati nello stesso campione di tessuto sia il DNA virale integrato sia la forma episomale. L'integrazione prevede che il DNA si linearizzi; questo processo avviene frequentemente a livello del gene E2. E2 è un regolatore negativo (inibitore) della trascrizione dei geni E6 ed E7. L'assenza del prodotto del gene E2 comporta un incremento di espressione proprio di quei geni precoci che sono i principali responsabili del potenziale oncogeno degli HPV.

L'interazione HPV-cellula realizza quadri diversi in funzione del differente stato replicativo virale:

- infezione allo stato latente;
- infezione produttiva;
- integrazione del DNA virale in quello cellulare.

Nella fase iniziale dell'infezione, ovvero quando il virus colonizza le cellule basali e parabasali dell'epitelio, il genoma virale va incontro alla replicazione in forma episomale essendo presente come frammento extracromosomico di DNA circolare; in tale fase, la replicazione episomale o precoce, responsabile dello stato latente dell'infezione, conduce alla formazione di una sola copia di DNA virale per cellula ospite, con conseguente impossibilità di rilevazione del virus, in quanto la quota risulta inferiore alla soglia di sensibilità dei test più comunemente utilizzati. Le cellule infette con virus funzionalmente inattivo (fase di latenza), non mostrano alcuno dei classici effetti citopatici virali caratteristici di uno stato replicativo virale in fase produttiva. Il significato dell'infezione latente è ancora poco conosciuto. Non è noto per quanto tempo l'HPV possa mantenere tale

stato o in quale percentuale di casi l'infezione latente possa progredire in infezione produttiva. Le condizioni che favoriscono tale viraggio sono ancora incerte; tuttavia, emerge con sempre maggiore chiarezza il ruolo che lo stato immunologico svolge sull'interazione virus-cellula (immunodepressione congenita o acquisita, terapie immunosoppressive, gravidanza).

Il passaggio dallo stato di latenza episomale a quello produttivo è favorito da una condizione di cosiddetta "permissività cellulare". Nella "cellula permissiva" il virus si moltiplica realizzando un ciclo litico-citopatico. Si assiste, quindi, alla penetrazione dell'HPV nel nucleo cellulare, laddove, una volta perso l'involucro capsulare, il suo DNA viene trascritto nei messaggeri, cui segue la produzione delle proteine precoci caratteristiche della trasformazione. In tali condizioni il virus si moltiplica come entità autonoma mentre l'attività del DNA cellulare viene inibita. La cellula, nonostante la presenza delle proteine trasformanti, non è in grado di svolgere alcuna attività di trasformazione e progressivamente si avvia alla morte.

Nella "cellula non permissiva" si realizzano le prime fasi del ciclo virale che conducono alla sintesi delle proteine precoci. Il virus diviene lineare, in quanto scisso in un punto preciso del DNA, e si integra stabilmente nel genoma della cellula ospite diventando un gene soprannumerario; la sintesi delle proteine precoci non è seguita da quella delle proteine tardive a causa di un'inibizione della loro espressione. Il virus non va incontro pertanto a replicazione e scompare come entità autonoma. Le cellule trasformabili si caratterizzano quindi per la capacità di inibire la sintesi delle proteine capsidiche o proteine tardive.

L'atto fisico dell'integrazione generalmente spezza il genoma di HPV a livello della regione E1/E2 mentre mantiene integra la regione E6/E7. La proteina E2 codificata dagli HPV oncogeni inibisce l'espressione dei geni E6 ed E7 *in vitro* e la proliferazione nelle cellule del carcinoma cervicale *in vivo*. Pertanto la perdita funzionale del gene E2 e della proteina da esso codificata sembra portare ad una incrementata trascrizione delle ORFs E6 ed E7, con una conseguente over-espressione delle proteine da esse prodotte.

Il sito cromosomico in cui si integra il DNA di HPV è altamente variabile e non è stato identificato nessun locus preferenziale specifico per l'integrazione. Comunque, in alcune linee cellulari infettate da HPV e nei cheratinociti umani immortalizzati, il DNA virale integrato è stato mappato entro "siti fragili", che sono regioni cromosomiche particolarmente suscettibili all'integrazione di DNA esogeno

o di agenti mutageni. L'integrazione del DNA di HPV può avvenire anche nelle immediate vicinanze di oncogeni cellulari, quali C-myc e N-myc. L'interruzione ed il riarrangiamento di queste regioni potrebbe portare ad una instabilità genomica o all'attivazione di oncogeni cellulari e potrebbe conseguentemente promuovere la progressione tumorale.

2.4 Meccanismi patogenetici associati allo stato fisico del genoma virale

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.

Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di una progenie virale matura è tipica delle infezioni da HPV a basso o medio rischio o delle lesioni a basso grado degli HPV ad alto rischio, in cui il genoma degli HPV permane in forma plasmidica.

Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte dall'infezione da HPV ad alto rischio, quali HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare, con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa (Fig. 9).

Tale integrazione è determinante nei meccanismi di trasformazione e 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 oncogenesi [67]. 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 ed E4 vengono persi o non sono trascritti. Oltre alle proteine E6 e E7, anche E5 è coinvolta, in misura minore, nei processi di stimolazione della proliferazione. Verranno ora descritte in modo maggiormente dettagliato queste proteine virali.

Il gene E5 degli HPV codifica per una 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 contrasta i mecca-

nismi di inibizione di crescita, formando un complesso con il recettore per EGF, per il fattore di crescita derivato dalle piastrine e per il CSF-1 (*Colony Stimulating Factor*); inoltre la proteina E5 si lega a una subunità di 16 kD dell'ATPasi vacuolare, interferendo con l'acidificazione degli endosomi. Vengono così inibite le variazioni di pH, con conseguente aumento del ricambio del recettore di EGF a livello della membrana plasmatica che porta ad un aumento del segnale dato dal complesso EGFR/EGF. 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 [47].

Un ruolo di primaria importanza nei processi di trasformazione è svolto dalle oncoproteine virali E6 e E7, grazie alla capacità di agire sui meccanismi di regolazione del ciclo cellulare. La sola espressione di E6 e E7, soprattutto se concomitante, degli HPV a elevato rischio è sufficiente a indurre l'immortalizzazione di cheratinociti

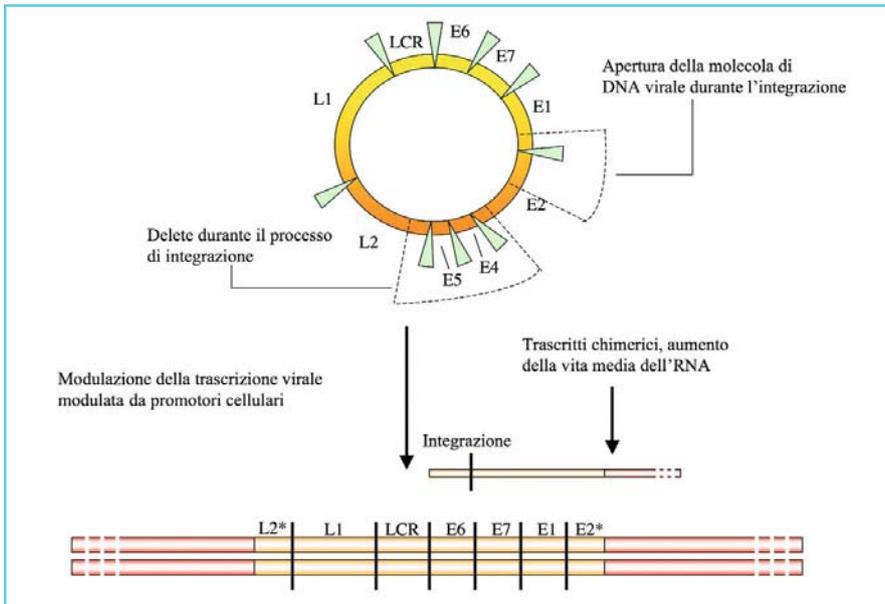


Fig. 9. Meccanismo di integrazione del DNA virale in quello cellulare. Modificata da [47], con autorizzazione di Macmillan Publishers Ltd

primari umani in coltura. Queste linee cellulari non sono tuttavia sufficienti per innescare il processo di tumorigenesi in topi nudi e richiedono altri eventi, come ad esempio la presenza dell'oncogene Ras attivato. Queste osservazioni testimoniano che, *in vivo*, è necessario un processo a più fasi per favorire la progressione tumorale indotta dagli HPV. A differenza degli HPV ad alto rischio, E6 e E7 dei Papillomavirus umani a basso rischio sono incapaci di immortalizzare cheratinociti *in vitro*, nonostante possano prolungarne il tempo di vita.

Il gene E6 è uno dei primi ad essere espresso durante l'infezione dei Papillomavirus. Codifica per una proteina costituita da 150 aminoacidi che presenta due domini Cys-X-X-Cys; la proteina E6 è distribuita nel nucleo e nel citoplasma, è priva di attività enzimatica intrinseca e, per esercitare la sua funzione, deve legarsi a diverse proteine cellulari [44]. La sua espressione porta alla trasformazione di cellule NHI 3T3 (fibroblasti murini) e all'immortalizzazione di cellule epiteliali umane della mammella [68]. L'efficiente immortalizzazione di cheratinociti umani richiede invece la coespressione di E6 e E7. I meccanismi d'azione di questa proteina virale sono stati chiariti soprattutto grazie a studi sull'interazione con p53.

p53 è uno dei primi geni oncosoppressori ad essere stato caratterizzato. Svolge un ruolo di primaria importanza nel regolare l'espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare; viene attivata in seguito a danno al DNA e induce l'espressione di p21, un inibitore delle chinasi dipendenti dalle cicline, con conseguente blocco del ciclo cellulare e induzione di apoptosi.

Generalmente uno dei meccanismi di risposta dell'organismo ad un'infezione virale è l'innescamento di apoptosi, utile a limitare la diffusione dell'infezione virale. Molti virus, tra i quali gli HPV, hanno evoluto un sistema di evasione dall'apoptosi, contribuendo così alla progressione tumorale. Per bloccare l'attività pro-apoptotica di p53 e rendere possibile la progressione del ciclo cellulare, E6 lega p53 attraverso l'ubiquitina ligasi E6AP, formando un complesso ternario. Questo porta all'ubiquitinazione di p53 da parte di E6AP e alla sua successiva degradazione attraverso il sistema del proteosoma 26S, con conseguente diminuzione della vita media di p53 nei cheratinociti, da diverse ore a meno di 20 minuti [69]. 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.

È interessante notare che il legame di E6 a E6AP ha come conseguenza l'ubiquitinazione di E6AP stessa [70]. 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.

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 immortalano cellule epiteliali mammarie umane. Viceversa, altri mutanti mantengono la capacità di degradare p53, ma non sono in grado di immortalare le cellule [71]. Questi dati dimostrano che per l'immortalizzazione cellulare è importante l'interazione di E6 con altre proteine, oltre a p53. Ad esempio E6 interagisce con proteine appartenenti alla famiglia delle PDZ; queste presentano un dominio conservato che si trova spesso in proteine situate nelle aree di contatto tra le cellule, come le giunzioni strette tra le cellule epiteliali o le giunzioni sinaptiche delle cellule neurali. Le proteine PDZ sono importanti per il mantenimento dell'architettura molecolare al fine di rendere possibile la trasmissione del segnale. Il legame dei membri della famiglia dei PDZ, MUPP-1, hDLG e hSCRIB, all'estremità C-terminale delle proteine E6 ad alto rischio, porta alla loro degradazione. L'importanza di questa interazione è stata confermata in esperimenti su topi transgenici esprimenti la proteina E6 priva del dominio di legame a PDZ. In questi topi viene mantenuta la capacità di inattivare p53, ma essi non sviluppano la iperdisplasia epidermica, che invece si osserva frequentemente in topi transgenici per E6 normale [66]. Non è chiaro quali siano i meccanismi attivati in seguito al legame di E6 alle proteine PDZ e quali membri di tale famiglia siano più importanti per questi fenotipi.

Un'altra funzione fondamentale della proteina E6 ad alto rischio nell'immortalizzazione cellulare è la capacità di attivare l'espressione della subunità catalitica della telomerasi, hTERT. Si tratta di un enzima formato da quattro subunità, che aggiunge ripetizioni esameriche all'estremità telomerica dei cromosomi. L'attività telomerica è solitamente limitata a cellule embrionali ed è assente in cellule somatiche. La perdita di questa attività porta ad accorciamento dei telomeri, con successive divisioni cellulari e induzione di senescenza [71]. E6 attiva la trascrizione di hTERT attraverso l'azione combinata di Myc e Sp1. E6 lega Myc e il suo cofattore Max, portando all'attivazione del promotore di hTERT [72]. Per determinare

l'immortalizzazione delle cellule è più importante l'azione su hTERT rispetto a quella su p53. Tuttavia l'immortalizzazione dei cheratinociti umani del derma (*Human Foreskin Keratinocyte*, HFK) richiede la presenza di E7, con conseguente inattivazione della proteina retinoblastoma, che porta a deregolazione del ciclo cellulare [73]. Quindi la degradazione di p53 è fondamentale per una completa trasformazione, mentre il legame a proteine PDZ e l'attivazione di hTERT è necessaria per l'immortalizzazione.

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.

La seconda oncoproteina degli HPV, importante per l'immortalizzazione delle cellule infettate e per la patogenesi virale, è E7. Le proteine E7 degli HPV ad alto e basso rischio si trovano prevalentemente nel nucleo e hanno una dimensione di 100 aminoacidi. L'espressione di E7 porta alla trasformazione di cellule NIH 3T3 murine immortalizzate e, meno frequentemente, di cheratinociti umani [74]. Un'efficiente immortalizzazione di cheratinociti umani richiede però l'azione concomitante di E6 e E7. Topi transgenici che esprimono solo E7 sviluppano lesioni a basso grado e displasie cervicali ad elevato grado che possono andare incontro a progressione maligna, mentre topi transgenici per E6 sviluppano solo lesioni iperproliferative a basso grado. La caratteristica peculiare di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb) [75]. Il legame a Rb si verifica a livello di una delle tre regioni conservate presenti in tutte le proteine E7 degli HPV a elevato rischio: CR1 nella porzione N-terminale; CR2, che contiene una sequenza LXCXE che lega Rb; CR3, in C-terminale, che contiene due domini a dita di zinco, importanti per la dimezzazione. I domini CR1 e CR2 di E7 presentano un'omologia di sequenza alle regioni CR1 e CR2 della proteina E1A di adenovirus, anch'essa capace di legare la proteina Rb [76].

La famiglia di proteine del retinoblastoma comprende Rb, p107 e p130, espresse in modo diverso durante il ciclo cellulare. Mentre Rb è espresso costitutivamente durante tutte le fasi del ciclo, p107 viene sintetizzato soprattutto durante la fase S, mentre p130 predomina durante la fase G0.

Rb, nella forma ipofosforilata, presente durante la fase G1 precoce, forma complessi con i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia E2F/DP1, che si legano ai promotori di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare verso la fase S (come la DNA polimerasi β , la timidina chinasi e la timidilato sintetasi) o nei meccanismi apoptotici; questo ha come conseguenza la repressione della trascrizione. Per rendere possibile la progressione dalla fase G1 a S, complessi ciclina chinasi fosforilano Rb, con conseguente rilascio di Rb dal complesso con E2F, che rende possibile la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi del DNA.

E7 recluta Rb lontano dal complesso E2F/DP1, con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F. Oltre a legare Rb, E7 ne media anche la degradazione attraverso il sistema del proteosoma. I membri della famiglia dei Rb sono i principali regolatori dell'uscita dal ciclo cellulare, che avviene durante la differenziazione degli epiteli. La perdita della funzione di Rb rende possibile la replicazione produttiva in cellule soprabasali differenziate [76]. Il legame di E7 a Rb è importante per il mantenimento di un adeguato numero di copie di HPV-31 in forma episomica in cellule indifferenziate [77]. Questo è legato alla perdita dei punti di controllo del ciclo cellulare, che bloccano il mantenimento di DNA in forma extracromosomale.

Il legame dei membri della famiglia di Rb a E7 non è limitato agli HPV ad elevato rischio, in quanto anche proteine E7 a basso rischio si associano a Rb, anche se con una ridotta affinità di legame. Le proteine E7 degli HPV ad alto e basso rischio presentano sequenze aminoacidiche simili, ma non identiche, a livello del dominio CR2, che media il legame a Rb. La mutazione di un singolo aminoacido a livello del dominio CR2 di E7 appartenenti agli HPV a basso rischio ha come conseguenza una maggiore affinità di legame di E7 e l'acquisizione della capacità di trasformare cellule di roditore. Inoltre, la proteina E7 di HPV-1 a basso rischio non è in grado di degradare Rb e questo spiega la sua incapacità di attivare geni regolati da E2F. Questo implica che, nonostante il legame tra E7 e Rb sia molto importante, altri fattori partecipano alla trasformazione e immortalizzazione cellulare [78]. E7 degli HPV ad elevato rischio induce inoltre la degradazione di Rb mediata da meccanismi di ubiquitinazione, importante per il superamento del blocco del ciclo cellulare, mentre gli HPV a basso rischio non presentano questa capacità.

Oltre a legare i membri della famiglia di Rb, le proteine E7 si associano alle cicline A ed E, così come gli inibitori dipendenti

dalle cicline chinasi, p21 e p27. Dato che le cicline e le chinasi ad esse associate guidano la progressione nel ciclo cellulare fosforilando la proteina Rb, non sorprende che E7 agisca aumentando l'attività di queste proteine. Le proteine E7 ad elevato rischio legano direttamente i complessi ciclina Acdk2 e E7 di HPV-18 lega anche la ciclina E indirettamente, attraverso p107. La proteina E7 ad elevato rischio aumenta i livelli delle cicline A ed E, mentre le E7 a basso rischio non hanno questo effetto. p21 e p27, due inibitori delle cicline chinasi, sono legate da E7, che ne blocca l'azione e aumenta ulteriormente l'attività delle cicline chinasi [79]. Questo punto è molto importante, in quanto chiarisce perché l'azione associata di E6 e E7 porta a un'immortalizzazione dei cheratinociti più efficiente rispetto a quando le due proteine agiscono separatamente. Infatti, come si è affermato precedentemente, E6 viene neutralizzato da INK4, mentre E7 supera questa inibizione attivando direttamente le cicline A ed E. E6, a sua volta, impedisce l'apoptosi indotta da E7 degradando proteine proapoptotiche.

Il terzo gruppo di proteine legate da E7 sono le istone-deacetilasi (HDAC).

Generalmente la repressione di promotori indotti da E2F è mediata non solo dal legame a Rb, ma anche dall'azione di HDAC (Fig. 10) [80].

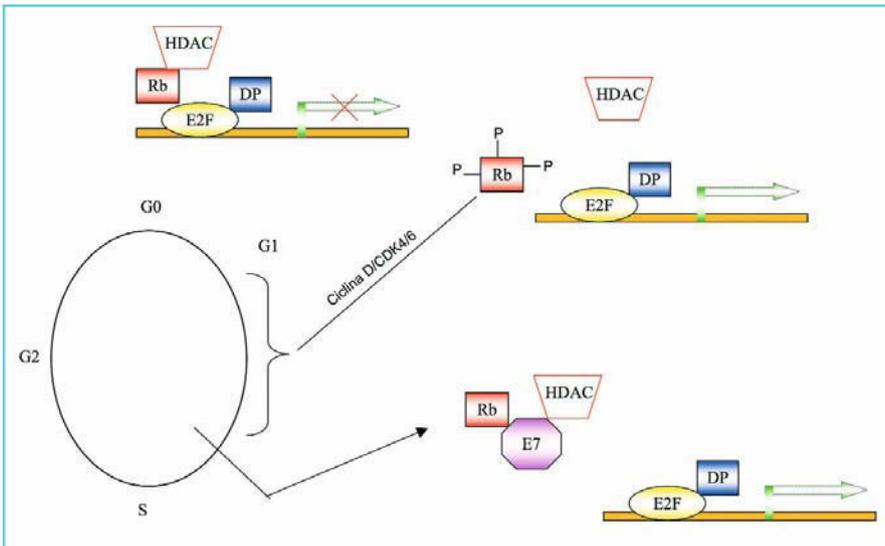


Fig. 10. Meccanismo di regolazione del ciclo cellulare mediato dalle proteine Rb, HDAC e E2F/DP1

In cellule che non presentano il Papillomavirus umano, Rb lega le HDAC e le recluta a livello di promotori inducibili da E2F. Recentemente si è visto che le proteine E7 legano HDAC indipendentemente dal loro legame a Rb e questa associazione è importante per permettere a E7 di svolgere un ruolo nell'immortalizzazione e nel mantenimento del virus in forma episomale. Le proteine HDAC sono espresse in tutti i tessuti e agiscono per rimuovere i gruppi acetile da code N-terminali degli istoni che formano i nucleosomi, bloccando così la replicazione. In più le HDAC deacetilano direttamente i fattori E2F, con conseguente perdita della loro funzione. Sono state identificate tre classi di HDAC, ma sono stati studiati principalmente i membri delle prime due classi. Le HDAC di classe I sono attive solo quando legate a cofattori che ne modulano l'attività o le dirigono al sito dove verranno deacetilate. Fanno parte di questa classe le HDAC umane 1, 2, 3, 8, localizzate esclusivamente nel nucleo. Le HDAC di classe II entrano ed escono dal nucleo. Le proteine E7 degli HPV ad elevato rischio si legano alle HDAC 1 e 2 attraverso MIP2, che si lega direttamente a E7 [81]. In particolare, la proteina E7 di HPV-16 e HPV-31 spiazza HDAC da Rb e lega questa proteina indipendentemente da Rb [80].

Nella proteina E7 di HPV-31, la mutazione del sito di legame per HDAC, porta all'incapacità di mantenere stabilmente il genoma virale in forma episomale e all'impossibilità di aumentare la vita media delle cellule trasfettate. Non è chiaro il motivo per cui il legame di HDAC a E7 sia necessario per il mantenimento del genoma virale, ma sono state formulate diverse ipotesi.

La prima di queste afferma che, poiché il legame di E7 alle HDAC impedisce a queste ultime di legare Rb, E7 potrebbe agire bloccando alcune importanti attività di Rb. Una seconda possibilità è che il legame di HDAC a E7 ne blocchi la capacità di deacetilare i fattori di trascrizione E2F, portando alla loro rilocalizzazione all'esterno del nucleo. La rimozione dell'attività di HDAC dai promotori ne rende possibile l'acetilazione e la successiva attivazione. In esperimenti di trasfezione transiente, si è visto che E7 trasattiva il promotore della fosfatasi *cdc25A*, attraverso i siti di legame a E2F presenti su tale promotore e questa attività dipende dal legame sia di Rb sia di HDAC [66]. *cdc25A* è importante per la defosforilazione e attivazione delle cdk ed è necessario per la progressione nel ciclo cellulare. Questo è un altro importante bersaglio di E7, necessario per lo svolgimento del suo ruolo nel contesto della patogenesi virale. Infine E7 silenzia i geni reclutando HDAC, come nel caso di IRF1 (*interferon regulatory factor 1*), la cui espressione è importante per la risposta

del sistema immunitario e degli interferoni verso infezioni di Papillomavirus persistenti [82]. La regione C-terminale di proteine E7 appartenenti a Papillomavirus ad alto e basso rischio presenta domini Cys-X-X-Cys, simili a domini a dita di zinco. La mutazione di una o di entrambe le cisteine in uno di questi domini porta alla perdita della capacità di immortalizzare cellule HFK e di trasformare cellule di roditore [74]. Inoltre la stabilità di E7 diminuisce notevolmente in seguito alla mutazione di queste cisteine, dimostrando la loro importanza nel mantenere l'integrità strutturale di E7 [77].

Una delle proprietà più particolari della proteina E7 degli HPV ad elevato 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 unicamente di E7 è sufficiente ad indurre un aumento anomalo nel numero di cromosomi in cheratinociti umani primari. I centrosomi sono i principali centri di organizzazione dei microtubuli e guidano la segregazione dei cromosomi in cellule figlie durante la divisione cellulare. Proteine E7 mutate che non legano o degradano Rb, ma si associano a p107, mantengono la capacità di indurre anomalie a livello dei centrosomi [83]. Tali anomalie si osservano anche in cellule prive di Rb e p53 e in fibroblasti embrionali di topi "knock out" per Rb, p130 e p107. È possibile che il legame di una combinazione di membri della famiglia di Rb o di altri fattori sia richiesta per mediare le anomalie del centrosoma [83].

Nella Tabella 3 sono riassunte le funzioni delle oncoproteine E6/E7.

Tabella 3. Funzioni delle oncoproteine E6 e E7

Oncoproteine virali	Funzioni identificate
E6	Immortalizzazione cellulare Degradazione di proteine specifiche della cellula ospite (p53) a seguito del legame alla proteina E6 Effetto anti-apoptotico Destabilizzazione cromosomiale Aumento della integrazione e mutagenesi del DNA Attivazione delle telomerasi Immortalizzazione cellulare Attivazione di cicline E e A
E7	Inattivazione di proteine pocket correlate al RB Induzione dell'apoptosi Inibizione delle chinasi inibitorie-ciclina dipendenti Aumento della integrazione e mutagenesi del DNA

2.5 Coltivazione del virus

Gli HPV sono difficilmente coltivabili *in vitro*, in quanto si replicano *in vivo* in epitelii squamosi stratificati, le cui condizioni non sono completamente riproducibili in coltura su monostrati cellulari. L'infezione di monostrati cellulari (fibroblasti o cellule epiteliali) con HPV, induce la replicazione del DNA virale in forma episomale e l'espressione di proteine non strutturali, ad eccezione di E4. Il principale limite di questa tecnica è la mancata espressione di proteine virali strutturali. In monostrati cellulari è possibile tuttavia produrre il virus in forma infettiva se i geni codificanti per le due proteine virali strutturali vengono forniti attraverso altri vettori virali attenuati. Date le difficoltà dell'isolamento dell'HPV da monostrati cellulari, per la diagnosi clinica di questo tipo di infezione, si utilizzano tecniche per la ricerca del DNA virale, quali PCR o ibridazione molecolare. Il tropismo specie-specifico di HPV ne ha limitato lo studio attraverso l'uso di modelli animali. Tuttavia un possibile approccio per la propagazione degli HPV è stato esporre colture di cellule epiteliali primarie all'azione del virus e in seguito porle sotto la capsula renale di topi nudi. Quest'ultimo è un sito anatomico immunologicamente protetto, che può sostenere la crescita di cellule eterologhe e la formazione di un epitelio pluristratificato, in grado di riprodurre le caratteristiche di un epitelio squamoso stratificato. Questo tipo di approccio ha reso possibile la propagazione in coltura di diversi tipi di HPV, ma non viene applicato abitualmente nella pratica clinica; infatti si tratta di un sistema non ottimizzabile per la produzione del virus su larga scala o per l'analisi della replicazione virale. Il ciclo replicativo completo del virus può essere riprodotto su colture cellulari utilizzando sistemi di colture "raft", formati da epitelii squamosi stratificati posti su un'interfaccia aria-acqua. Questa tecnica è più complicata rispetto alla coltivazione su monostrato cellulare e la replicazione virale completa avviene solo per una piccola percentuale di cellule. Tuttavia è possibile ricorrere a questo sistema per studiare aspetti biologici, genetici e biochimici del virus.

2.6 Epidemiologia

La prevalenza è correlata all'età della donna ed è direttamente proporzionale al numero di partner sessuali [84]. Circa la metà delle infezioni avviene fra i 15 e 25 anni [85-88] e l'80% delle donne ses-

sualmente attive contrae l'infezione entro i 50 anni. L'infezione in donne senza alterazioni citologiche varia dal 9% in Europa al 24% in Africa [89]; inoltre, la frequenza dell'infezione risente degli stili di vita e dei comportamenti delle popolazioni [90]. Una recente indagine negli Stati Uniti [91] mette in rilievo che un quarto delle donne fra i 14 e 59 anni risulta positivo per l'HPV. Va sottolineato che gli studi epidemiologici sottostimano la prevalenza dell'infezione da HPV, poiché questa può non essere diagnosticata in quanto di durata relativamente breve e non necessariamente si associa ad una risposta anticorpale. Studi epidemiologici hanno rilevato che in USA, il 75% della popolazione compresa tra i 15 e 50 anni viene infettata da HPV, di cui il 60% manifesta infezione di tipo transiente (rilevazione con anticorpi), il 10% infezione persistente (rilevazione del DNA virale), il 4% anomalie citologiche e l'1% lesioni cliniche. La prevalenza dell'infezione di HPV in donne sessualmente attive è del 18-25%, in particolare tra adolescenti. Queste donne possono trasmettere l'infezione al proprio compagno o ai loro bambini. In particolare la prevalenza degli HPV ad alto rischio è massima dopo la pubertà (30-50%), si riduce al 15% nelle donne di età compresa tra i 26 e i 30 anni e al 10% nelle donne di 31-35 anni, mentre mostra un secondo picco del 30% nelle donne ultracinquantenni. Nelle donne di età inferiore ai 25 anni il 20% delle infezioni da HPV ad alto rischio persiste, mentre il rischio di persistenza supera il 50% nelle donne di età superiore ai 55 anni. In particolare, nei neonati l'infezione da HPV può causare papillomi nella cavità orale e nel tratto respiratorio superiore. In individui infettati da HIV, l'infezione da HPV causa verruche estese e patologie rapidamente progressive. Evidenze epidemiologiche e molecolari hanno evidenziato che sequenze di HPV oncogeni sono presenti nella quasi totalità (99,7%) dei casi di carcinoma invasivo e soltanto nel 13,4% nel gruppo di controllo [86, 92]. L'estrema rarità di casi di carcinoma HPV-negativi implica che l'HPV è una causa necessaria per lo sviluppo della neoplasia cervicale invasiva nel mondo.

2.6.1 Classificazione epidemiologica degli HPV

Dei 120 genotipi rilevati in natura, almeno 40 possono infettare la mucosa genitale; di questi circa 15 sono oncogeni. Sono stati suddivisi in categorie di rischio differenti a seconda della loro diversa associazione con le lesioni preneoplastiche e neoplastiche [93]. Sono

stati classificati genotipi ad “alto rischio”, “probabili alto rischio” e “basso rischio” (Tabella 4). Esiste una buona correlazione fra la classificazione filogenetica ed epidemiologica. Nel comparare queste due classificazioni, infatti, si può osservare una discrepanza solamente per i tipi 70 e 73 (Tabella 4) [93]. È opportuno segnalare che le classificazioni in genotipi ad alto e basso rischio sono continuamente revisionate alla luce delle nuove conoscenze nel campo, e pertanto non è possibile dare indicazioni definitive riguardo l'oncogenicità soprattutto dei genotipi a classificazione intermedia.

Da studi epidemiologici emerge che, dei genotipi definiti “ad alto rischio”, il genotipo 16 è il più frequente (53-68%) nei vari paesi; segue il genotipo 18 (3-26%), ma con molta variabilità a seconda dei paesi, il genotipo 45 (4,4%), il 31 (3,4%), il 52 (2,2%) e il 33 (2%) (Fig. 11). Come evidenziato nella Figura 12 esistono, oltre ai ben noti 6 genotipi *high risk* più frequenti, altri meno frequenti (5-17%) [93].

Sono state descritte coinfezioni da genotipi maligni di HPV [93] (nel 8,1% delle donne con cancro e nel 13,9% dei controlli) che sono stati associati ad un maggior rischio di cancro cervicale rispetto all'infezione con un singolo genotipo (Figg. 11 e 12) [93].

I Papillomavirus sono classificati sulla base delle specie di origine (umana, bovina, ecc.) e il grado di relazione con altri HPV della stessa specie. I diversi tipi di HPV vengono definiti in base all'analisi della sequenza nucleotidica. Oggi è possibile disporre attraverso l'accesso a siti informatici, quali Gene-Bank, delle sequenze complete o parziali della maggior parte degli HPV identificati, di esaminare le relazioni tra i vari tipi di HPV mediante lo sviluppo di alberi filogenetici (Fig. 13). Un nuovo tipo di Papillomavirus per essere considerato tale deve presentare una divergenza maggiore del 10%

Tabella 4. Classificazione filogenetica e epidemiologica dei vari genotipi di HPV [93]

Classificazione filogenetica	Classificazione epidemiologica	
	Alto rischio	Basso rischio
Alto rischio	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26*, 53*, 66*	70
Basso rischio	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108
* Genotipi probabili alto rischio		



Fig. 11. Distribuzione nei vari paesi dei genotipi oncogeni di HPV associati al carcinoma cervicale rilevati più frequentemente

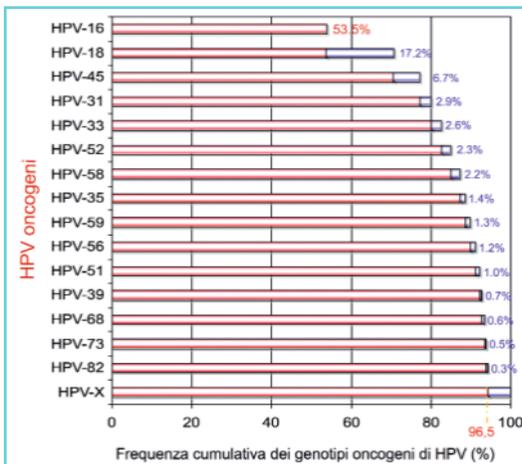


Fig. 12. Frequenze dei 15 genotipi oncogeni di HPV rilevati nelle lesioni cervicali secondo la classificazione di Munoz (2003)

rispetto alle sequenze delle regioni E6, E7 e L1 di tutti i tipi già noti. Differenze tra il 2 e il 10% definiscono i “sottotipi”, mentre le “varianti” sono caratterizzate da divergenze inferiori al 2%.

2.6.2 Cofattori legati all'HPV coinvolti nella carcinogenesi

Un altro fattore emergente nello sviluppo di neoplasie cervicali è il ruolo svolto dalle diverse varianti virali [94]. Le varianti virali differiscono per quanto riguarda proprietà chimiche e patogenicità. Sulla

pisce soprattutto donne aventi più di 35 anni, ad indicare che l'infezione è probabilmente contratta in giovane età e progredisce lentamente verso il cancro. La risposta immunitaria principale verso il virus è di tipo cellulare; pertanto situazioni di immunodepressione, come traipianti o sindrome da immunodeficienza acquisita, aumentano il rischio di contrarre l'infezione. La regione LCR del genoma virale presenta sequenze simili agli elementi responsivi agli ormoni glucocorticoidi e pertanto la loro attività è aumentata dagli ormoni steroidei, come il progesterone e il desametasone. Anche gravidanze multiple sono un fattore di rischio tra donne che presentano infezione da HPV, così come il consumo di alcol e le abitudini alimentari [47].

2.7 Modalità di trasmissione

Gli HPV sono patogeni ampiamente distribuiti nella specie umana, che si trasmettono prevalentemente in seguito a rapporti sessuali (vaginali o anali), talora anche non penetrativi [96-98]. L'infezione viene acquisita precocemente nel corso dei primi anni di attività sessuale ed è ritenuta l'infezione a trasmissione sessuale più frequente al mondo. Sono virus ubiquitari e si calcola che il 70% della popolazione sessualmente attiva venga in contatto con almeno un tipo di virus nel corso della vita. Sono virus molto resistenti al calore e a condizioni di aridità, pertanto si può verificare anche un tipo di trasmissione non sessuale, ad esempio per mezzo di fomite, in seguito a prolungato contatto con abiti contaminati. È stato dimostrato anche che l'acquisizione dell'infezione da HPV, rilevata mediante PCR, è altamente correlata con il numero di partners, soprattutto se recenti, e con la frequenza dei rapporti sessuali [85]. Tali evidenze sono state confermate in questi ultimi anni anche con test sierologici tipo-specifici. È possibile, anche se raramente (4,3/100000), la trasmissione verticale materno-fetale sia transplacentare che perinatale (attraverso il canale del parto) ed è stata ipotizzata (ma non dimostrata) la trasmissione indiretta attraverso oggetti. È stata dimostrata la sieroprevalenza in bambini tra 0 e 13 anni per i vari tipi oncogeni di HPV tra lo 0,6% e il 3% indicando che non c'è quasi alcuna evidenza di reattività sierologica specifica per l'HPV. Nel valutare la sieroprevalenza nei bambini, non è da trascurare la possibilità che la presenza degli anticorpi IgG nel neonato e nei bambini più piccoli possa riflettere il passaggio degli anti-

corpi attraverso la placenta. Non è certamente da escludere la possibilità che bambini più adulti tra 10 e 13 anni non abbiano ancora avuto esperienze sessuali.

Ci sono anche evidenze, sia da studi sierologici che da studi condotti sulla ricerca del DNA di HPV, che i genotipi genitali benigni di HPV possono essere trasmessi sessualmente; tuttavia la quantità di informazioni epidemiologiche su questi genotipi di HPV è inferiore e meno chiara. Saggi sierologici per i genotipi benigni di HPV hanno anche riportato che la sieropositività nelle donne monogame è superiore rispetto a quella rilevata per i tipi oncogeni di HPV [98]. Ciò potrebbe suggerire che gli HPV benigni hanno un'altra possibile via di trasmissione oltre a quella sessuale.

2.7.1 Profilassi: come prevenire l'infezione da HPV

L'uso del condom può ridurre il rischio di contrarre l'infezione da HPV. Il condom però protegge da infezioni procurate dal liquido seminale infetto e non da infezioni "epiteliali" di altre parti dell'area genitale non protette e quindi non offre una protezione assoluta sulle infezioni da HPV. È comunque fondamentale ribadire l'importanza dell'uso del condom nella prevenzione delle malattie a trasmissione sessuale. Esiste un numero limitato di studi prospettici a supporto di questa evidenza. Uno studio condotto tra le adolescenti che avevano appena iniziato l'attività sessuale in un college americano ha dimostrato una significativa riduzione dell'infezione da HPV quando i partners avevano fatto uso costante e corretto del condom. Anche la circoncisione maschile sembra avere un effetto protettivo nello sviluppo del carcinoma della cervice uterina.

La comprensione del fatto che le lesioni a livello cervicale, vulvare, vaginale e perianale sono di origine infettiva ha portato a notevoli miglioramenti in materia di prevenzione del cancro alla cervice uterina. In primo luogo sono state consigliate misure legate all'igiene, per evitare la trasmissione iatrogena tra i pazienti affetti da disturbi ginecologici. La prevenzione meccanica di infezioni anogenitali trasmesse sessualmente è invece impraticabile. Infatti, le infezioni da HPV sono molto diffuse all'interno della popolazione sessualmente attiva e l'uso del preservativo o di sostanze spermicide offre solo una protezione limitata, in quanto le infezioni possono essere trasmesse in seguito al contatto con altre parti del corpo, come labbra, ano, scroto, che non sono protetti dal preservativo [2, 7].

2.8 Patologie associate all'infezione da HPV

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 della pelle e delle mucose, in genere benigne. Le manifestazioni cliniche comprendono verruche comuni, piane e plantari, condilomi acuminati genitali e anali, condilomi piani cervicali (Fig. 7), lesioni maculari pitiriasiformi in pazienti con epidermodisplasia verruciforme (EV) e papillomi laringei. Questi ultimi si presentano nell'infanzia e, nonostante siano benigni, possono causare ostruzione respiratoria acuta e danno spesso recidive (Tabella 5).

Tabella 5. Principali patologie associate all'infezione da HPV

Tipi di lesione	Genotipi di HPV associati
Lesioni cutanee:	
- Verruche volgari, piane e plantari	1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 41, 2, 3,
- Epidermodisplasia verruciforme	5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Lesioni mucose:	
- Condilomi acuminati e piani	6, 11, 30, 42, 43, 44, 54, 55, 70
- Condiloma gigante	6, 11
- Papillomi delle vie respiratorie	6, 11
- Papillomi congiuntivali	6, 11
Lesioni della mucosa orale:	
- Papilloma laringeo	6, 11
- Papillomi orali ed iperplasia focale	2, 11, 13, 32
Carcinoma 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

2.8.1 Lesioni da HPV

I Papillomavirus umani sono abitualmente distinti in genotipi cutanei o mucosi, in relazione alla localizzazione delle lesioni in cui solitamente si rilevano (Tabella 5).

Tra le lesioni cutanee, le verruche comuni o volgari sono le forme più diffuse e si manifestano in forma di papule bianche-grigiastre o brune, piatte o rilevate, che si localizzano più frequentemente a livello delle mani, in particolare sulle superfici dorsali e nelle regioni periungueali. Vi sono inoltre verruche piane, che hanno l'aspetto di papule rosse, lievemente rilevate, che insorgono a livello del viso o delle mani e le verruche plantari e palmari, che si localizzano rispettivamente nella pianta dei piedi e nel palmo delle mani. I genotipi degli HPV più frequentemente riscontrati in verruche sono i tipi 1, 2, 3, 4 e 7. La maggior parte dei restanti tipi cutanei degli HPV (genotipi 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49) è stata ritrovata nelle lesioni della epidermodisplasia verruciforme (EV), un'affezione caratterizzata dalla diffusione delle lesioni da HPV disseminate in gran parte della superficie corporea, simili a verruche piane e macule rossastre, che si manifesta in soggetti con profonde alterazioni dell'immunità cellulare. Non è infrequente la degenerazione in carcinoma a cellule squamose. Tra gli HPV di tipo cutaneo, i genotipi 5 e 8 e meno frequentemente il 14, 17, 20 e 47, sono stati identificati in carcinomi a cellule squamose che possono insorgere in tali individui.

Le lesioni mucose benigne da HPV comprendono prevalentemente condilomi acuminati e piani, che sono conseguenti a trasmissione sessuale del virus e insorgono a livello del pene, dei genitali femminili, dell'uretra, dell'area perianale e del retto. Si manifestano come masse esofitiche verrucose di consistenza molle (condilomi piani) o modestamente rilevate (condilomi acuminati). Sono generalmente associati ad infezioni dei genotipi 6 e 11 di HPV a basso rischio e non portano a cancro. La maggior parte delle lesioni è asintomatica e si può risolvere spontaneamente in 3-4 mesi, rimanere invariata o aumentare di dimensione e numero. Quando le verruche sono di colore rosso-marrone devono essere sottoposte a biopsia, in quanto potrebbe trattarsi di papulosi Bowenoidi, causata da HPV-16 e HPV-18 e, dal punto di vista istologico, presentare la stessa configurazione delle neoplasie intraepiteliali. Queste lesioni potrebbero evolvere in carcinoma. Altre sedi mucose infettate dagli HPV, caratterizzate da lesioni benigne di tipo papillomatoso, si trovano a livello respiratorio, congiuntivale e orale. L'infezione può verificarsi in forma latente o inattiva, con andamento asintomatico, che presenta la zona epiteliale infettata citologicamente normale. Il DNA dei Papillomavirus umani (solitamente HPV-6 e 11) è riscontrabile generalmente nel 10% dei casi. L'infezione attiva, caratterizzata da SIL, si manifesta con grandi cellule arrotondate dette coilociti.

La maggior parte di queste lesioni è associata ad infezione da HPV. In particolare, nelle lesioni a cellule squamose intraepiteliali di basso grado (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*, LGSIL) si riscontrano soprattutto HPV ad alto rischio. La maggior parte delle lesioni mantiene il virus in forma episomica e sostiene un ciclo di replicazione completo: sono espressi anche geni tardivi e origina una particella virale completa. Le HSIL sono prevalentemente associate a HPV ad alto rischio, che non possono però compiere un ciclo di replicazione completo, a causa di difetti differenziativi tipici di queste lesioni. I geni tardivi non sono espressi, il DNA virale è integrato in quello cellulare e l'espressione degli oncogeni E6 e E7 è deregolata. CIN 3 è caratterizzata da aneuploidia e può presentare la stessa configurazione delle neoplasie intraepiteliali. Queste lesioni potrebbero evolvere in carcinoma.

L'HPV è anche associato, in proporzioni variabili, ad altri tumori, in particolare al 60% dei carcinomi vaginali, al 40-60% di quelli vulvari, al 45-95% di quelli anali, al 30% dei tumori della testa e del collo (45-47), oltre a quelli dell'uretra e del pene.

L'HPV 6 e 11 vennero inizialmente isolati da verruche genitali (dette anche verruche ano-genitali o condilomi acuminati) e successivamente dai papillomi laringei del bambino (Tabella 5). L'HPV 6 e 11 sono responsabili del 90% di tali verruche. La contagiosità è molto elevata (65% di trasmissione ai partner sessuali) e il periodo d'incubazione varia da 3 settimane a 8 mesi. Con il passare del tempo le lesioni tendono a diventare più numerose ed estese, anche se in circa un quarto dei casi regrediscono spontaneamente dopo 4 mesi. Le verruche vengono vissute come un elemento deturpante, si accompagnano a un senso di vergogna e hanno un elevato costo economico. Il papilloma laringeo è l'infezione da HPV più frequente nel bambino: esso si manifesta prevalentemente in bambini piccoli con un'età mediana alla diagnosi di 4 anni ed è dovuto a trasmissione per contatto in epoca peri- o post-natale. La presenza del condiloma genitale materno aumenta di 200 volte il rischio per il bambino. L'evoluzione clinica è variabile, ma spesso associata a frequenti recidive. Mediamente sono necessari ben 13 interventi chirurgici per mantenere pervie le vie aeree e rimuovere le verruche che provocano una sintomatologia ostruttiva. In rare circostanze il papilloma può evolvere verso forme carcinomatose.

2.8.2 HPV e cancro del collo dell'utero

L'infezione da HPV è la più diffusa infezione a trasmissione sessuale nel mondo occidentale, ed è causa necessaria, anche se non sufficien-

te, del carcinoma del collo dell'utero. Infatti studi accurati su biopsie di cancro provenienti da 22 Paesi diversi hanno dimostrato che la prevalenza dell'HPV DNA è stata del 99,7% [47]. Il CC è il primo cancro ad essere riconosciuto dall'OMS come totalmente riconducibile ad un'infezione: quella dei virus oncogeni HPV. I genotipi oncogeni (definiti *high-risk*) del Papillomavirus umano (HPV) sono il vero agente eziologici del cancro cervicale o sono soltanto degli innocui passeggeri? La correlazione causale o casuale può essere esaminata mediante i postulati di Koch modificati da Rivers per le malattie virali (Tabella 6). Molti di questi sei postulati non possono essere testati nei pazienti per problemi ovviamente etici. Pertanto, dobbiamo fare affidamento in gran parte su studi epidemiologici e di laboratorio per capire il ruolo dell'HPV nell'eziopatogenesi del cancro cervicale. Modelli di infezione in animali sono certamente di aiuto; in particolare, è stato visto che il Papillomavirus del coniglio (CRPV) può indurre il carcinoma a cellule squamose nei conigli. Studi epidemiologici e di laboratorio sostengono un necessario ma non sufficiente ruolo per l'infezione persistente di HPV nella carcinogenesi cervicale. Una riduzione dell'incidenza del cancro cervicale a seguito di una diminuzione delle infezioni da HPV (ad esempio mediante l'utilizzo di vaccini profilattici) sarebbe la prova definitiva del ruolo causale di HPV *high-risk* nel cancro del collo dell'utero (Tabella 6).

2.8.3 Storia naturale dell'infezione da HPV

La maggior parte delle infezioni da HPV, anche quelle dovute ai genotipi oncogeni, sono transitorie e si risolvono, o comunque non sono più rilevabili all'esame citologico dopo un anno o due [86]. Di solito l'infezione da HPV è quindi autolimitante: viene in genere superata nel corso di 4 mesi per i tipi a basso-rischio e di 8-12 mesi per quelli ad alto-rischio; di fatto, entro 2 anni il 90% delle donne supera l'infezione. Con il persistere dell'infezione il virus può provocare Low LSIL. L'infezione può altresì rimanere silente nelle cellule basali dell'epitelio cervicale per un periodo variabile da 8 mesi a 10 anni. In questa fase il virus è presente all'interno della cellula come episoma, non si replica e l'epitelio rimane normale. Esso può però riattivarsi ed il persistere della fase produttiva può condurre ad alterazioni dell'epitelio cervicale che variano a seconda del genotipo virale (alto o basso-rischio).

Alcune volte l'infezione persiste e, se il genotipo è oncogeno, la donna va incontro ad un alto rischio di sviluppare una lesione pre-

Tabella 6. Prove sperimentali che soddisfano i postulati di Koch modificati da Rivers per le malattie virali

Postulati	Prove sperimentali ed epidemiologiche
Isolamento virale da ospiti malati	DNA di HPV è rilevato nel 99,7% dei tumori cervicali
Coltivazione del virus nelle cellule ospite	HPV replica in colture di cheratinociti umani. Gli HPV oncogeni immortalizzano i cheratinociti primitivi e le cellule del cancro cervicale non possono sopravvivere dopo il blocco dell'espressione di E6 ed E7
Infettività dopo aver filtrato i batteri	Mostrata per il Papillomavirus (CRPV) nel coniglio
Riprodurre la malattia nell'ospite	La malattia viene riprodotta negli animali; il papillomavirus del coniglio (CRPV) può infatti indurre il cancro a cellule squamose
Re-isolamento del virus	La trasformazione è associata con l'assenza di differenziamento epiteliale e l'integrazione del genoma di HPV prevenendo la produzione di virioni e conseguentemente il "classico" re-isolamento. Sebbene l'infezione con CRVP non sia produttiva, il genoma di CRVP è presente nel carcinoma a cellule squamose
Rilevamento della risposta immuno-specifica al virus	Immunoglobuline G specifiche contro il capsido di HPV sono associate un rischio relativamente alto di cancro del collo dell'utero

cancerosa ed un cancro [99-101]. L'HPV 16 è quello maggiormente legato a questo tipo di evoluzione. Comunque, non tutte le infezioni persistenti evolvono verso lesioni precancerose di alto grado e non tutte queste evolvono verso il cancro. Le lesioni di basso grado risolvono senza alcun trattamento nel 90% nelle adolescenti e nel 75% delle donne adulte. Questo è un concetto da tener ben presente: infatti, uno degli obiettivi secondari della vaccinazione è appunto quello di evitare il sovratrattamento delle lesioni che non avrebbero avuto conseguenze. Si calcola che il tempo di sviluppo complessivo tra la prima infezione, la sua progressione e lo sviluppo di un cancro sia mediamente di circa 20 anni, anche se sono stati documentati alcuni casi con tempi di latenza più brevi [99-101].

Le giovani donne possono contrarre l'infezione da HPV non appena divengono sessualmente attive; sono comuni le infezioni multiple e sequenziali con differenti tipi oncogeni di HPV. Solitamente le infezioni sono transienti e clinicamente irrilevanti, sebbene esse producano delle alterazioni citologiche temporanee che si risolvono spontaneamente. Fortunatamente soltanto in poche donne l'infezione da HPV è persistente e attiva (soltanto nel 10% l'infezione permane dopo 5 anni) e diviene clinicamente rilevante con un aumentato rischio (superiore al 50%) di sviluppare lesioni precancerose o cancro della cervice (Figg. 14, 15) [86, 99-101].

Il modello di carcinogenesi cervicale segue un percorso plurifasico multifattoriale (Fig. 15). La causa necessaria (ma non sufficiente) è l'infezione persistente da HPV ad alto-rischio. All'infezione da HPV

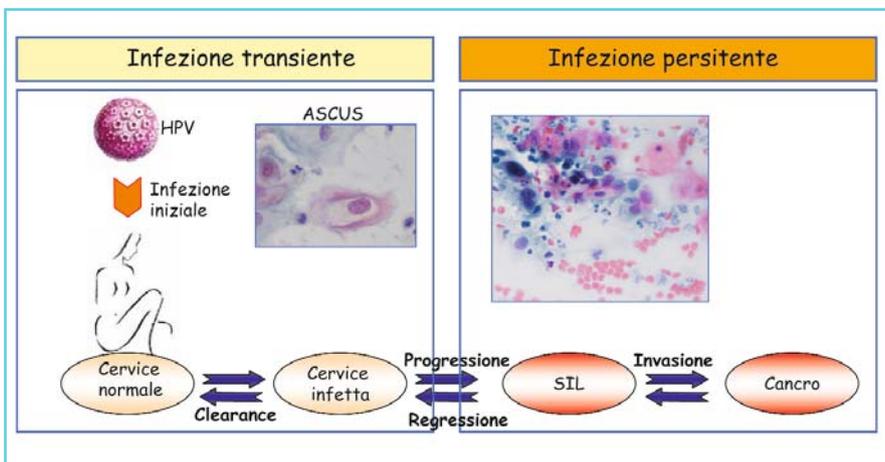


Fig. 14. Storia naturale della carcinogenesi della cervice uterina

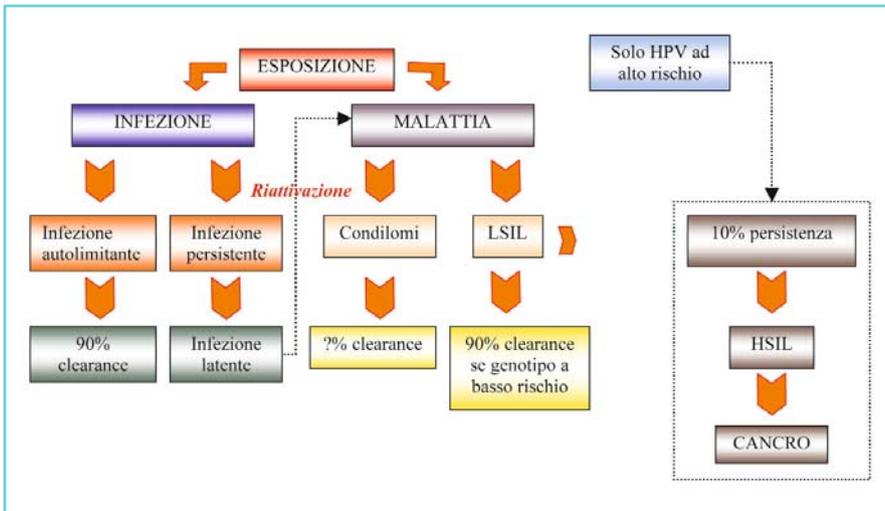


Fig. 15. Patogenesi del carcinoma cervicale

con genotipi a basso-rischio (LR) può fare seguito una lesione clinicamente rilevabile (LSIL), definita in passato come CIN 1 o displasia lieve (Fig. 15). Questa categoria corrisponde alla presenza di lesione displastica limitata al terzo inferiore dello strato epiteliale squamoso. La percentuale di regressione spontanea dell'LSIL è molto elevata specie nelle donne giovani (<30 anni). In termini oncologici l'infezione da HPV a basso-rischio non ha, quindi, risvolti clinici significativi. Anche l'infezione da HPV con genotipi ad alto-rischio (HR) può dar luogo a LSIL. Questa, in seguito al persistere dell'infezione, può però progredire verso HSIL (già definita come CIN 2-3). Si tratta di una lesione displastica estesa ai due terzi o all'intero strato epiteliale squamoso (laddove si identifica anche nel carcinoma in situ). L'HSIL è il precursore del cancro della cervice. Il tempo medio fra infezione primaria ed insorgenza di HSIL è di 7-12 anni e quello per il tumore invasivo è di 20 anni o più [86, 99-101]. Più raramente sono descritte lesioni ad andamento "esplosivo" che in 1-2 anni evolvono in HSIL e successivamente in carcinoma, senza la tappa intermedia dell'LSIL. Alcune di queste neoplasie fulminee sono responsabili dei carcinomi identificati a pochi mesi da un Pap test negativo. Non tutte le infezioni persistenti da genotipi HR evolvono in lesioni precancerose e queste non sempre progrediscono verso il tumore. D'altro canto, quanto più a lungo l'infezione persiste tanto meno facilmente sarà eliminata [86]. Poiché non tutte le donne infettate da virus oncogeni sviluppano il tumore, debbono esistere altri cofattori, fra cui quelli genetici legati alla risposta immune.

2.9 Terapia

Gli obiettivi delle terapie verso le patologie associate a HPV sono:

- l'eradicazione delle infezioni;
- la guarigione dei sintomi;
- la prevenzione delle malattie a lungo termine;
- la prevenzione delle infezioni.

Le terapie attualmente disponibili hanno raggiunto questi obiettivi solo in parte.

Infatti, non si tratta di terapie antivirali specifiche, ma di trattamenti ablativi che non risolvono l'infezione virale e il problema della trasmissione. È possibile suddividere le terapie disponibili in quattro categorie: 1) ablative (trattamenti chirurgici); 2) agenti citotossici; 3) terapia fotodinamica; 4) terapie immunomodulatorie.

2.9.1 Trattamenti chirurgici

Le lesioni non invasive intraepiteliali, identificabili solo utilizzando il microscopio, sono solitamente trattate con procedure ablative superficiali, come la crioterapia o la terapia laser. Sono procedure ambulatoriali che garantiscono il mantenimento della fertilità; sono efficaci, a breve termine, ma il tasso di ricorrenza è elevato, in quanto si rimuove unicamente la lesione superficiale, mentre persistono in profondità i cheratinociti infettati.

Con la crioterapia, il tessuto anomalo e cinque millimetri di tessuto circostante sono raffreddati con una sonda per diverse volte consecutive, al fine di indurre necrosi. Un'alternativa è la rimozione del tessuto attraverso un laser di biossido di carbonio: è efficace come la crioterapia e la zona cicatrizza più velocemente, subendo meno deformazioni, ma i costi sono più elevati. Le procedure di rimozione che sfruttano un'ansa elettronica sono attualmente considerate il trattamento più adatto per la cura di lesioni non invasive. Si utilizza un filo carico elettricamente per l'ablazione della zona alterata e del canale endocervicale distale. È meno cara rispetto alla terapia con il laser e preserva il tessuto rimosso per un successivo esame istologico.

I tumori di dimensione inferiore ai tre millimetri sono trattati utilizzando la biopsia conica. I tumori precocemente invasivi sono affrontati ricorrendo ad isterectomia o radioterapia. L'obiettivo è distruggere le cellule maligne della cervice, dei tessuti paracervicali e dei linfonodi regionali. I tumori in stadio già avanzato sono trat-

tati con radioterapia diretta verso il tumore primario e verso i potenziali siti di metastatizzazione [7].

2.9.2 Agenti citotossici

Gli agenti citotossici sono utilizzati per il trattamento delle verruche genitali. Si tratta di preparati ad uso topico, che distruggono le cellule al momento del contatto, indipendentemente dalla presenza di HPV. Sono caratterizzati da forti effetti collaterali e da un elevato tasso di ricorrenza della malattia.

Podofilina

Un esempio di tali agenti è costituito dalla podofilina, un derivato del *Podophyllum*, ad uso topico. Agisce legando le proteine dei microtubuli, con conseguente arresto della cellula in metafase. È controindicato in gravidanza.

Acido tricloroacetico

L'acido tricloroacetico è un altro agente utilizzato a livello topico, ma che può provocare effetti collaterali quali ulcerazioni, dermatiti, infezioni secondarie. Il vantaggio rispetto alla podofilina è che non dà effetti collaterali sistemici e pertanto può essere utilizzato in gravidanza. Questi farmaci sono stati analizzati in ristrette sperimentazioni cliniche, al fine di valutare la loro efficacia nel trattamento della CIN e della VIN, ma non sono abitualmente utilizzati per la cura di infezioni di HPV a livello mucosale.

5-fluorouracile

Il 5-fluorouracile, un antitumorale antimetabolita, è disponibile sotto forma di pomata, ma la sua applicazione sulle lesioni genitali esterne è limitata, in quanto provoca notevoli reazioni infiammatorie. Il meccanismo d'azione si basa sul blocco del trasporto della timidina extracellulare, inibendo la via di salvataggio della sintesi dei nucleotidi. Presenta rischio di teratogenesi e il suo uso è controindicato in gravidanza. È utilizzato per il trattamento della VIN, ma i risultati sono variabili.

2.9.3 Terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica presenta un'efficacia variabile nel trattamento delle infezioni da HPV. Il meccanismo d'azione si basa sull'at-

tivazione di un fotosensore (ad esempio l'acido aminolevulinico) da parte della luce, portando al rilascio di specie dell'ossigeno molto reattive. Questo provoca la distruzione dei tessuti, con conseguente attivazione del sistema immunitario dell'ospite. Il fotosensore è somministrato in modo sistemico o topico (nel caso di CIN, VIN e verruche genitali). Il fallimento della risposta alla terapia si associa ad una diminuzione dell'espressione di MHC di classe I su cellule neoplastiche, indicando che la terapia fotodinamica agisce come immunomodulatore [102].

2.9.4 Terapia immunomodulatoria

Una strategia per il controllo delle infezioni da HPV consiste nell'indurre o potenziare la risposta immunitaria, in particolare cellulo-mediata. Questo rende possibile il trattamento anche di infezioni silenti. Gli anticorpi sono invece scarsamente coinvolti nel controllo delle infezioni di HPV, ma potrebbero prevenire infezioni successive.

Interferone

La terapia con interferone (IFN), caratterizzato da attività antiproliferativa, antivirale e immunomodulatoria, è molto importante, soprattutto nella papillomatosi respiratoria ricorrente, ma anche in altre lesioni papillomatose, quali i condilomi genitali. Non sono bloccate le recidive anche se il trattamento ha il vantaggio di non danneggiare i tessuti e può inoltre aiutare a ridurre la massa delle lesioni prima dell'intervento di distruzione con mezzi fisici o chirurgici. L'efficacia terapeutica migliore si è osservata con IFN- β somministrato per via parenterale e con IFN- β intralesionale, che possono indurre remissione completa dei condilomi genitali recidivanti in gran parte dei pazienti trattati. Tuttavia si verificano effetti collaterali, quali febbre e mialgia. Il trattamento è costoso, di efficacia limitata e non è applicato nei trattamenti di routine di queste lesioni.

Imidazochinoloni

Sono particolarmente importanti gli imidazochinoloni, agenti farmacologici che modulano le cellule dendritiche e i macrofagi. Un esempio è l'Aldara (Imiquimod), che applicato in modo topico, agisce come ligando di recettori situati su macrofagi e cellule dendritiche, provocando il rilascio di citochine e IFN- α ; è efficace nel trattamento di verruche genitali. Non è ancora riconosciuto per il trattamento

della CIN, mentre è stato già realizzato un “trial” per la sua applicazione nella cura della VIN. Il suo utilizzo deve essere strettamente controllato, in quanto il rilascio di citochine può causare potenti effetti collaterali di tipo infiammatorio.

Cimetidina

La cimetidina, antagonista del recettore H₂ istaminico, è un altro farmaco ad azione immunomodulatoria. È stata somministrata per via orale, ad alte dosi, per il trattamento di verruche genitali e cutanee, papillomatosi respiratoria e congiuntivale, soprattutto nei bambini. La cimetidina è stata testata in trial clinici in doppio cieco e con il placebo, ma non è risultata efficace nel trattamento di patologie indotte da HPV [102].

2.9.5 Terapia antivirale

Attualmente non sono disponibili in commercio chemioterapici attivi contro HPV, ma il loro sviluppo è auspicabile per diverse ragioni. Una terapia antivirale ha le potenzialità di essere efficace verso infezioni sia inapparenti sia visibili clinicamente. Ci sono numerosi pazienti immunodepressi infettati da HPV, che non possono essere trattati con immunoterapia e per i quali i farmaci antivirali sarebbero l'unica alternativa. Inoltre, lesioni multifocali, come la VIN, che non possono essere sottoposte a terapie ablative e potrebbero essere resistenti a terapie immunomodulatorie, sarebbero trattate efficacemente con chemioterapici. Per queste motivazioni lo sviluppo di un antivirale attivo verso HPV è un obiettivo prioritario per aziende e gruppi di ricerca [102].

Retinoidi

I retinoidi sono composti naturali o sintetici simili alla vitamina A, che svolgono una funzione preventiva verso la CIN e il cancro cervicale. Presentano un effetto antiproliferativo, inducono differenziazione in cellule epiteliali legandosi ad un recettore nucleare, ma non presentano una specifica attività anti HPV. Tuttavia si è osservato che, *in vitro*, portano ad una diminuzione dei livelli di trascrizione di E6/E7 e delle molecole coinvolte nell'apoptosi. La potenzialità dei retinoidi come agenti preventivi verso le infezioni da HPV è discutibile: in studi sperimentali sono risultati efficaci solo in combinazione con agenti citotossici, come il cisplatino [102].

Indolo 3-carbinolo (I-3-C)

È un derivato vegetale che ha effetti chemiopreventivi, come dimostrano studi in fase pre-clinica. Presenta un'attività anti-estrogenica e induce apoptosi. Topi transgenici per E6/E7, esposti cronicamente a 17 β -estradiolo, sviluppano cancro cervicale; tuttavia, quando questi animali sono sottoposti ad una dieta supplementata con I-3-C, l'incidenza di cancro si riduce. Questi risultati sono senza dubbio importanti, ma necessitano di conferme su trial estesi a un maggior numero di pazienti.

Cidofovir

Tra i farmaci utilizzati per la cura delle infezioni degli HPV è necessario citare anche il Cidofovir, un analogo nucleosidico, che presenta un'attività ad ampio spettro verso i virus a DNA e in particolare il citomegalovirus. È relativamente efficace anche verso gli HPV, inducendo apoptosi quando è applicato localmente a livello delle cellule infettate. Durante una sperimentazione, è stato applicato un gel, costituito per l'1% da Cidofovir, in modo topico, per un mese su 15 donne affette da una grave forma di CIN. Nell'80% delle pazienti è stata osservata una risposta completa o parziale, che è stata in seguito verificata anche attraverso analisi istologiche e PCR.

2.10 HPV e modulazione del sistema immunitario

2.10.1 Meccanismi di difesa dell'ospite

Il sistema immunitario è importante nel controllo delle infezioni degli HPV. Questo concorda con il fatto che, in donne immunodepresse, la SIL presenta una maggiore incidenza e persistenza. In particolare si osserva l'intervento del sistema immunitario cellulare ed umorale. Le infezioni di HPV sono simili a quelle mediate da virus non litici, in quanto non causano distruzione cellulare, ma sono rilasciati dalle cellule infettate mediante desquamazione. La difesa ideale verso questo tipo di infezione è una combinazione di anticorpi neutralizzanti e lisi cellulare mediata dai linfociti T citotossici (CTL). I CTL agiscono su cheratinociti presenti negli strati intermedi degli epitelii squamosi, dove si verifica la trascrizione e replicazione del virus e dove le proteine precoci sono espresse abbondantemente. La neutralizzazione mediata da anticorpi coinvolge in particolare IgG

sieriche e IgA secretorie, rivolte verso antigeni di superficie del virus, al fine di bloccarne l'ingresso nelle mucose epiteliali.

Gli anticorpi circolanti e il complemento possono opsonizzare e agglutinare le particelle virali, facilitando la fagocitosi mediata dai recettori C3b e Fc. Non è chiaro se la risposta anticorpale sia sufficiente a proteggere le donne dall'infezione e se tale protezione sia duratura. La persistenza delle verruche, anche in individui immunocompetenti, indica che il sistema immunitario trova difficoltà nell'innescare una risposta effettiva, a causa di immunodepressione locale o mancato riconoscimento delle proteine virali. Gli anticorpi non sono sempre in grado di eliminare il virus, soprattutto quando entra nello stato di latenza, durante il quale il DNA virale è integrato in quello cellulare. Risulta particolarmente importante, a questo punto, l'intervento del sistema dell'immunità cellulare, mediato da linfociti T citotossici CD8+ e da linfociti T *helper* di tipo 1 (Th1) CD4+. Questo sistema mette in atto strategie di sorveglianza intercellulari e intracellulari, che impediscono l'accumulo di cellule tumorali, sia abolendo l'espressione degli oncogeni virali, sia eliminando le cellule infettate attraverso l'apoptosi (Fig. 16) [45].

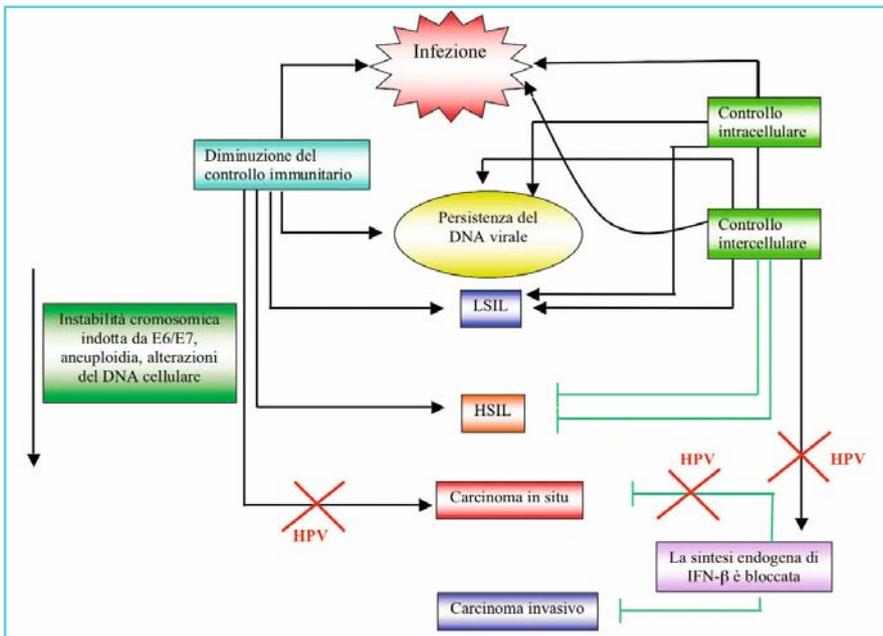


Fig. 16. Controllo intercellulare e intracellulare dell'ospite durante il processo di progressione tumorale causato dagli HPV. Modificata da [47], con autorizzazione di Macmillan Publishers Ltd

I meccanismi di regolazione intracellulari prevengono l'immortalizzazione di cellule infettate con HPV ad alto rischio. I meccanismi molecolari alla base di questo processo implicano la modificazione di oncoproteine virali, attraverso fosforilazione o defosforilazione. L'oncoproteina E7, ad esempio, è fosforilata dalla caseina chinasi II.

Un altro meccanismo di inibizione è mediato dall'interazione tra oncoproteine virali e proteine dell'ospite, quali gli inibitori delle cicline chinasi (p21 e p27), che solitamente sono inattivate da E7, ma la cui overespressione porta a risultati opposti, bloccando E7.

La regolazione intercellulare, invece, previene la conversione verso un fenotipo maligno di cellule immortalizzate (che dal punto di vista clinico equivalgono a lesioni epiteliali di basso grado) da HPV. Questo meccanismo è mediato principalmente dall'azione di citochine secrete dai Th1 e Th2. Specifiche citochine mediano la repressione della trascrizione di oncogeni virali, a differenza di quanto accade nel caso di IL-6 e IL-17, che potenziano la tumorigenicità di cellule di cancro alla cervice uterina in topi nudi.

TGF- β rientra tra le citochine che bloccano la trascrizione di geni precoci di HPV in cellule immortalizzate, mentre in cellule maligne l'attività trascrizionale rimane invariata. La resistenza all'inibizione di TGF- β è un evento tardivo nel corso dello sviluppo di carcinoma alla cervice. Altre citochine che bloccano la trascrizione di HPV in cellule immortalizzate sono IL-1 e TNF- α [103].

Alcuni studi hanno dimostrato che anche TNF- β , secreto dai macrofagi, agisce reprimendo la trascrizione dei geni di HPV in cellule immortalizzate, ma non in cellule maligne. Questo è dovuto principalmente a modificazioni del complesso trascrizionale AP-1. L'espressione di AP-1 nel corso della differenziazione cellulare determina l'espressione di E6 e E7 in epiteli stratificati. Mentre in cellule immortalizzate il complesso trascrizionale AP-1 a livello del promotore di HPV è costituito da omodimeri c-jun/c-jun, il trattamento con TNF- α porta invece alla formazione di eterodimeri c-jun/fra1 (quest'ultimo è anche attivato dall'acido retinoico, altro potente inibitore di HPV), in grado di sopprimere la trascrizione di HPV. In cellule maligne il complesso AP-1 è invece formato da eterodimeri c-jun/c-fos, che svolgono un ruolo importante nella conversione di cellule immortalizzate verso un fenotipo maligno [47].

Altre importanti citochine inibitorie sono gli interferoni e IL-2, prodotti da cellule Th1 attivate. IL-2 svolge un'azione indiretta, mediando l'attivazione dei precursori dei CTL. IL-2 e IFN- γ attivano le cellule NK, importanti nei primi giorni dell'infezione finché si svi-

luppa, in 3-4 giorni, una risposta specifica mediata da CTL. Questi distruggono le cellule infettate, eliminando potenziali fonti di infezione. Gli interferoni, soprattutto β e α (α è più specifico per alcune linee cellulari), agiscono sia su cellule immortalizzate sia su cellule maligne, eliminando il virus attraverso l'induzione di uno stato antivirale nelle cellule. Il tumore può presentare meccanismi di resistenza agli interferoni, attraverso l'azione di E6 e E7, che interagiscono con fattori coinvolti nella sintesi di IFN- γ , quali p48, bloccandone così la trascrizione.

La dimostrazione di un'inibizione selettiva, *in vivo*, mediata da IFN, della trascrizione di HPV in cellule immortalizzate, deriva da esperimenti di ibridazione *in situ*, in seguito al trapianto di cellule immortalizzate in topi nudi e trattamento con IFN. Dopo tre giorni la trascrizione di E6 e E7 si riduce maggiormente rispetto a quanto accade *in vitro*. Se lo stesso trattamento è realizzato su cellule maligne, non si ottengono gli stessi risultati. Questi dati concordano anche con le osservazioni cliniche, in cui si vede che, in lesioni a basso grado l'espressione di E6 e E7 è notevolmente inferiore rispetto alle lesioni ad alto grado. Da questi dati emerge un importante ruolo del controllo intercellulare di HPV mediato dalle citochine, che viene perso con la progressione maligna del tumore [47].

2.10.2 Infezioni da HPV in pazienti immunocompromessi

L'elevata prevalenza dell'infezione e della neoplasia in donne immunocompromesse suggeriscono quanto l'immunità sistemica e locale influenzino la storia naturale dell'infezione da HPV. Non è del tutto chiara la funzionalità di anticorpi contro proteine capsidiche (L1, L2) nel prevenire infezioni e re-infezioni, con lo stesso tipo virale o con altri virus strettamente correlati, e nel modificare la storia naturale sulle lesioni cervicali. Al contrario dell'immunità umorale, la risposta cellulo-mediata dei linfociti T non è tipo specifica ed è un importante meccanismo effettore per la "clearance" delle infezioni persistenti. L'importanza della risposta immunitaria cellulo-mediata è indirettamente dimostrata dall'aumento della prevalenza del CC nelle donne HIV positive e nei soggetti trapiantati. La riduzione dell'immunità cellulo-mediata che si osserva durante il decorso dell'infezione da HIV e che si accompagna ad una elevata prevalenza dell'infezione da HPV e della patologia correlata, si associa ad una progressiva riduzione del pattern citochinico di tipo Th-1 (IL-2, IFN, IL-12), mediatore dell'immunità cellu-

lo-mediata, e ad un aumento della sintesi di citochine di tipo Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10) che stimolano invece l'immunità umorale. La clearance virale e la scomparsa delle lesioni associate ad HPV è significativamente inferiore nei pazienti immunosoppressi, come nei pazienti trapiantati di organi o coinfectati da HIV. I pazienti che hanno subito trapianto di organo e pazienti con infezione da HIV hanno cariche virali più alte e genotipi di HPV insoliti, più una maggiore propensione a neoplasie maligne connesse ad HPV, soprattutto il cancro cervicale (nelle pazienti HIV positive c'è un rischio maggiore di otto volte) e cancro anale (negli uomini HIV positivi il rischio aumenta di 42 volte).

2.10.3 Meccanismi di evasione dal sistema immunitario

Gli HPV, in modo particolare i sottotipi ad alto rischio, hanno evoluto una serie di meccanismi per evadere dai sistemi di difesa della cellula bersaglio, i quali sono alla base della progressione dei tumori in cui è coinvolto HPV:

- portano a diminuzione dell'espressione cellulare del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) e della proteina di trasporto TAP-1, con conseguente alterazioni nella presentazione dell'antigene [104];
- modificano l'espressione di chemochine e citochine, bloccando i processi di comunicazione tra i cheratinociti infettati da HPV e gli effettori del sistema immunitario [105];
- guidano la cellula all'evasione dagli stimoli apoptotici mediati dai complessi CD95/TNF, TRAIL/TNF- α e i loro relativi meccanismi di trasmissione del segnale [106].

L'interazione tra HPV e il sistema immunitario si differenzia da quella di altri virus. Infatti, mentre patogeni quali il citomegalovirus producono specifici antigeni che interferiscono con i meccanismi di processazione dell'antigene, nessuna proteina di HPV svolge questa funzione come scopo primario. È la concomitanza di più fattori a minimizzare la presentazione del virus al sistema immunitario. Diverse alterazioni del sistema di presentazione dell'antigene, che coinvolgono i meccanismi di trasporto al proteosoma (i recettori HLA e i sistemi cellulari di riconoscimento dell'antigene) si verificano, ad esempio, nel corso di lesioni squamose intraepiteliali a elevato grado e carcinoma *in situ*. Questo insieme di meccanismi di evasione dal sistema immunitario è determinante per la progressione delle infezioni verso la malignità.

Un altro meccanismo coinvolge le cellule presentanti l'antigene. Infatti, per essere riconosciute dai CTL, gli antigeni virali devono essere rilasciati dalla cellula infettata e presentati da cellule presentanti l'antigene (APC), tra le quali sono importanti le cellule di Langerhans. In seguito all'infezione, si osserva una diminuzione e un'alterazione morfologica di queste cellule, fenomeno che potrebbe spiegare la lunga persistenza del virus nelle cellule. La causa potrebbe essere una diminuzione di TNF- α , che è un potente attivatore delle cellule di Langerhans, o l'espressione dell'oncoproteina E7, che interferisce con la loro differenziazione. Inoltre, poiché l'infezione degli HPV non comprende una fase viremica, diminuisce la possibilità di un'efficace presentazione antigenica da parte delle APC.

Anche l'evasione dai meccanismi apoptotici è particolarmente importante nel corso della patogenesi virale. Per definizione, l'apoptosi è un programma geneticamente determinato che porta all'attivazione di deossiribonucleasi attivate da caspasi. Di conseguenza, non solo viene degradato il DNA a elevato peso molecolare, ma anche il genoma virale che non è ancora stato incapsidato. Quindi è un processo importante nel limitare la diffusione della progenie virale nell'organismo e nel mantenere un adeguato rapporto tra il numero di cellule perse e acquisite; l'alterazione di questo equilibrio può favorire la progressione tumorale.

Gli oncogeni di alcuni tipi di HPV interferiscono con la capacità della cellula di andare incontro a morte cellulare programmata, come è stato dimostrato utilizzando la tecnica "TUNEL" (che misura il livello di frammentazione del DNA direttamente su sezioni di tessuto primario) [107].

L'apoptosi è generalmente innescata nelle cellule da un'ampia gamma di diversi segnali intrinseci, come mancanza di nutrienti, ipossia o agenti chemioterapici. Tuttavia il principale evento fisiologico che rende possibile l'accensione del macchinario che porta a morte cellulare programmata è il legame tra i ligandi naturali in grado di attivare l'apoptosi (CD95L, TRAIL, TNF- β) ai recettori suicidi corrispondenti presenti sulla superficie cellulare, che appartengono alla famiglia dei recettori transmembrana TNF. In seguito al legame con il ligando, si verifica l'oligomerizzazione del recettore, seguita dal reclutamento del dominio FADD (*Fas-associated-death domain*) e della procaspasi 8, in modo tale da realizzare il complesso DISC (*Death-inducing signaling complex*).