

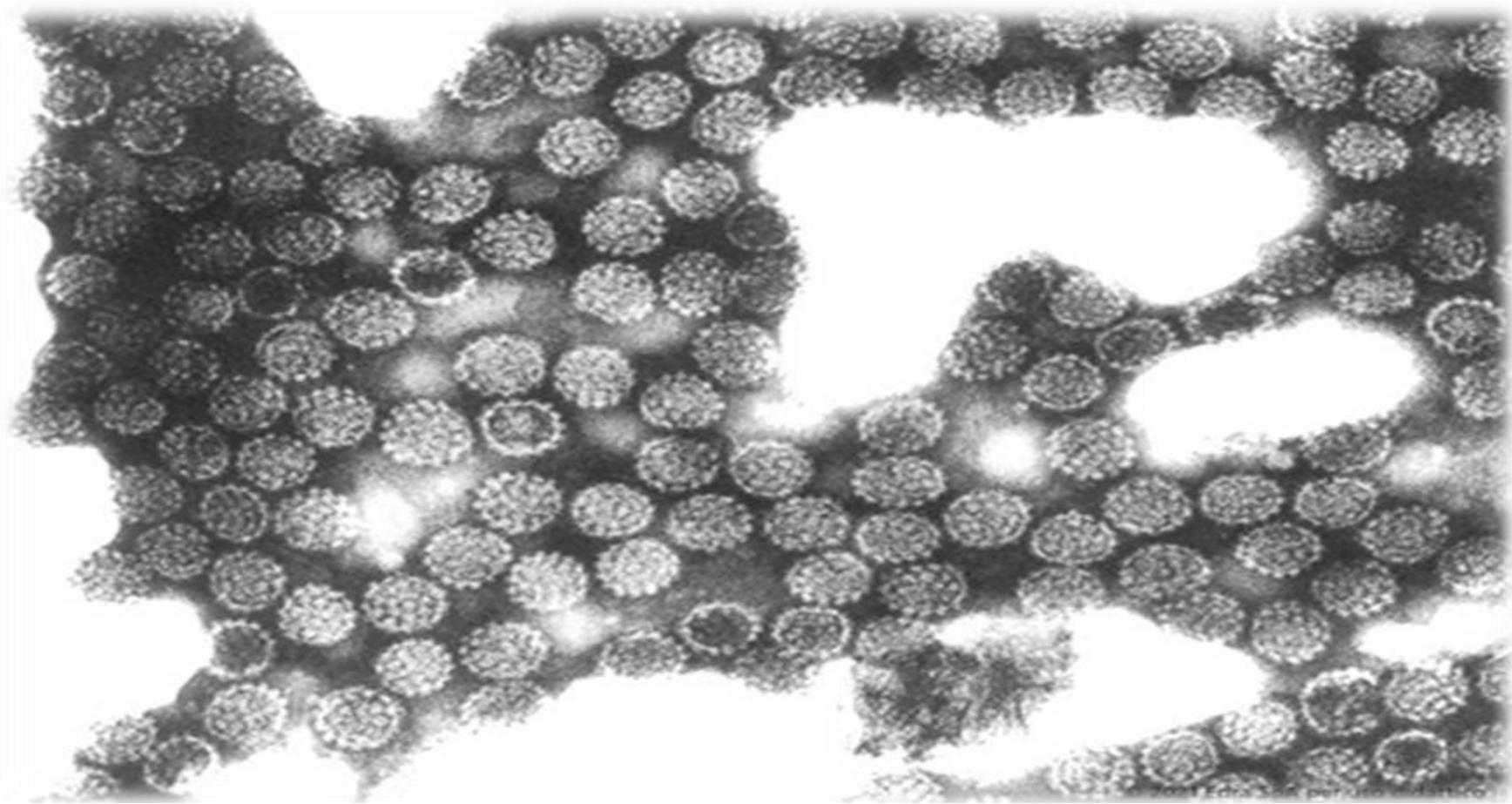
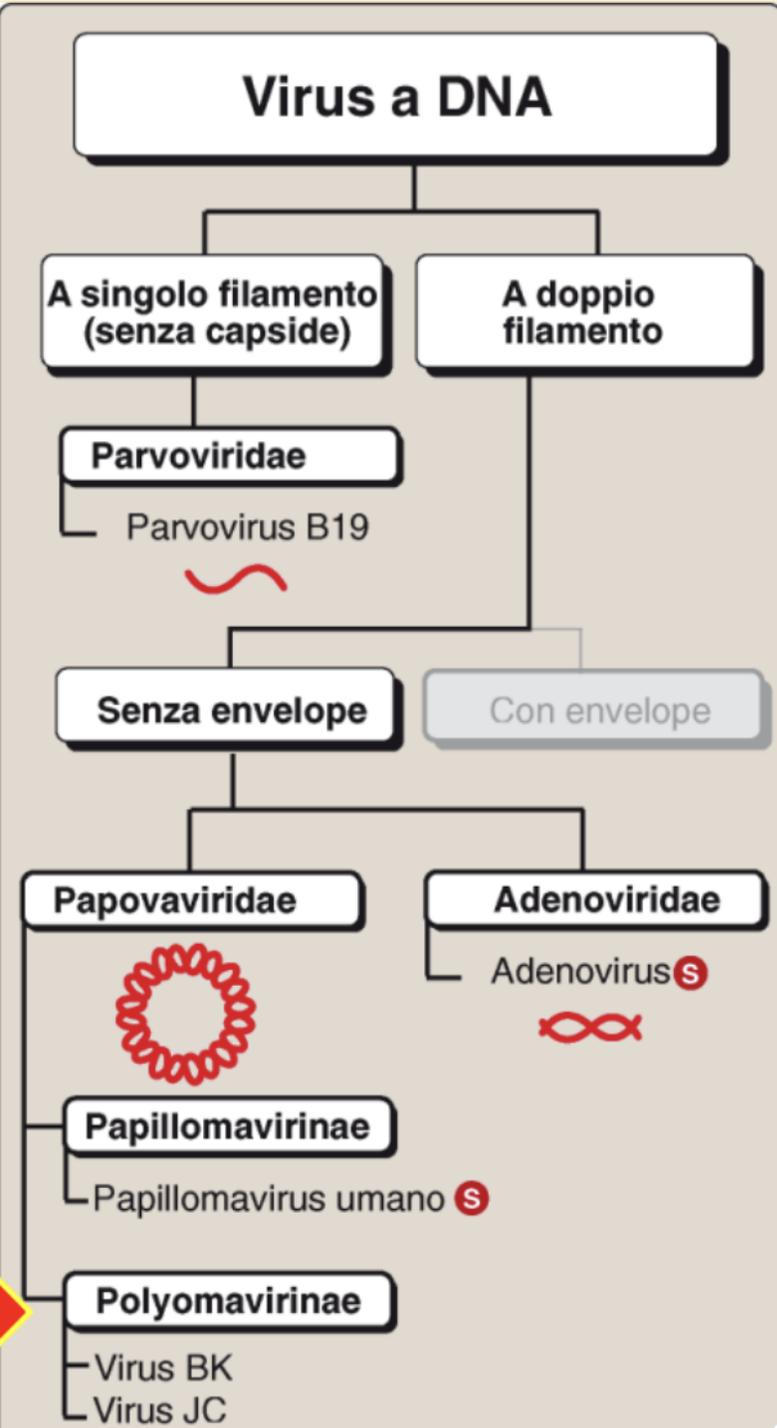


SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Papillomaviridae

PAPILLOMAVIRIDAE

- Virus nudo
- Genoma: dsDNA circolare, 7900 bps
- Capside: icosaedrico, 52-55 nm



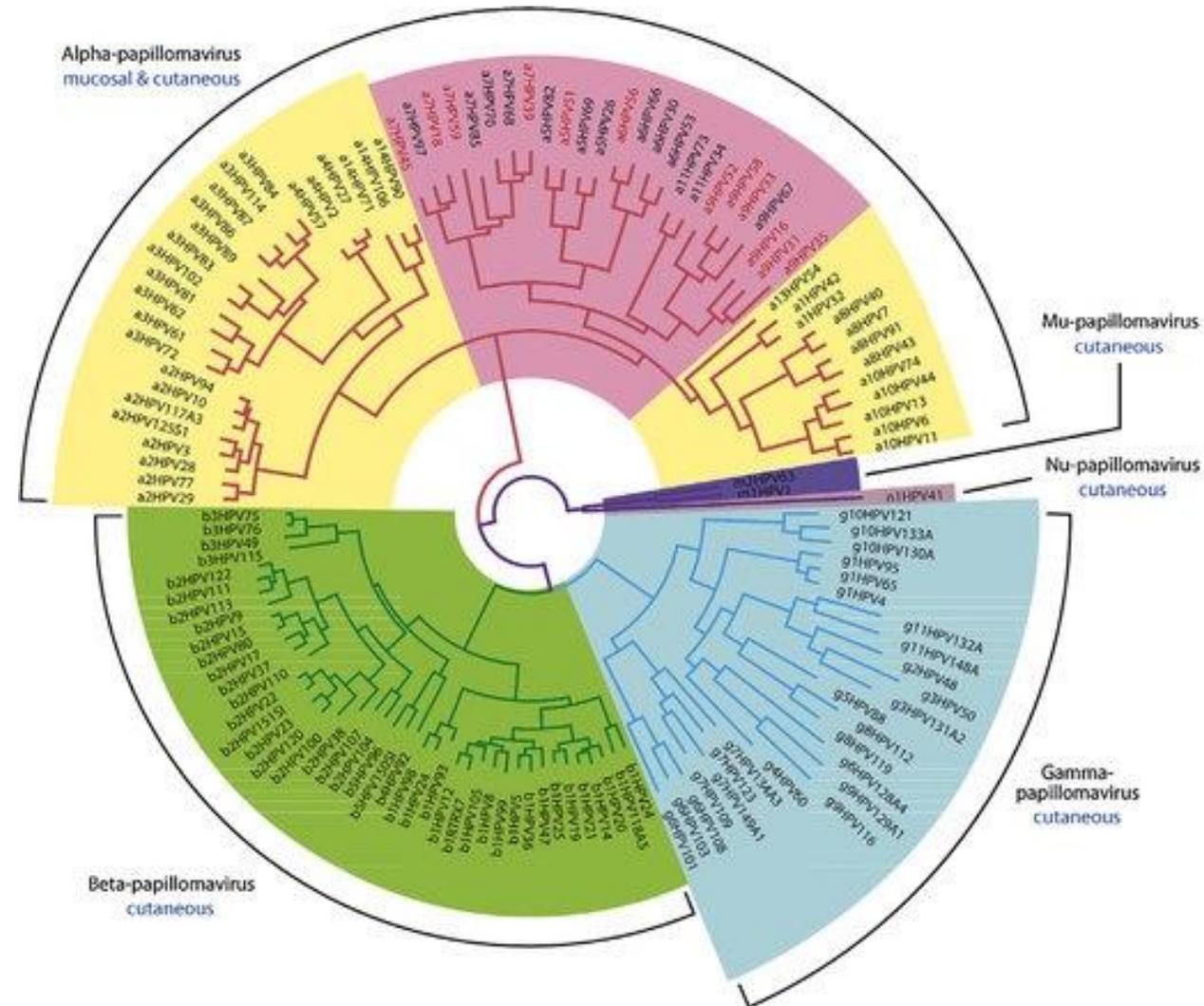
La proteina **L1** è codificata dal gene più conservato dell'intero genoma di Papillomavirus (PV) e per questo la sequenza di L1 è utilizzata per identificare nuovi tipi di Papillomavirus

Il **GENERE α** è il più esteso, include circa 64 genotipi ed è ulteriormente categorizzato in relazione al tropismo specifico per:

- la superficie cheratinizzata della pelle
- le mucose della bocca, del tratto respiratorio e di quello anogenitale

I **GENERI $\beta/\gamma/\mu/v$** presentano un tropismo specifico per:

- l'epitelio cutaneo

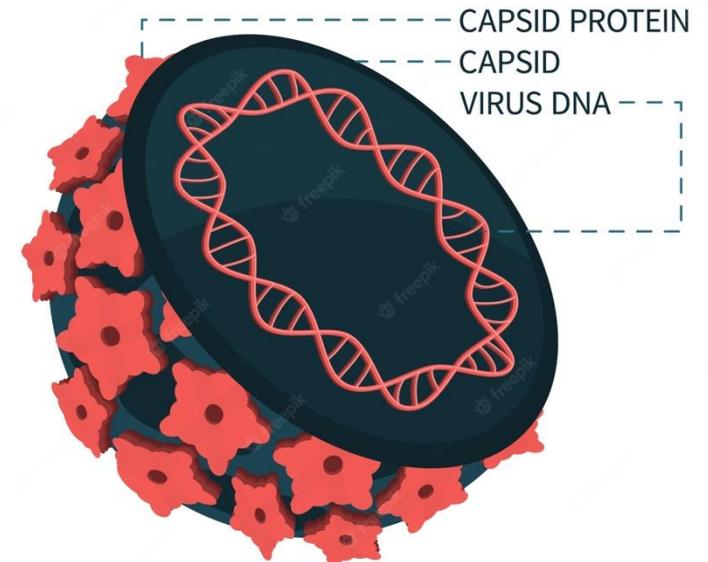


GENERE α : CLASSIFICAZIONE IARC

(International Agency for Research on Cancer)

Gli **ALPHAPAPILLOMAVIRUS**, in grado di infettare l'epitelio mucosale, sono classificati come ad **alto rischio oncogeno (HR, high risk)**, associati a lesioni ano-genitali maligne e pre-maligne, o a **basso rischio oncogeno (LR, Low-risk)**, associati, diversamente, a lesioni genitali benigne (condilomi) e lesioni iper-proliferative con una limitata tendenza alla progressione maligna. Inoltre, alcuni HR-Papillomavirus come HPV16, infettano la mucosa orofaringea e sono accostati al crescente numero di tumori della testa e del collo.

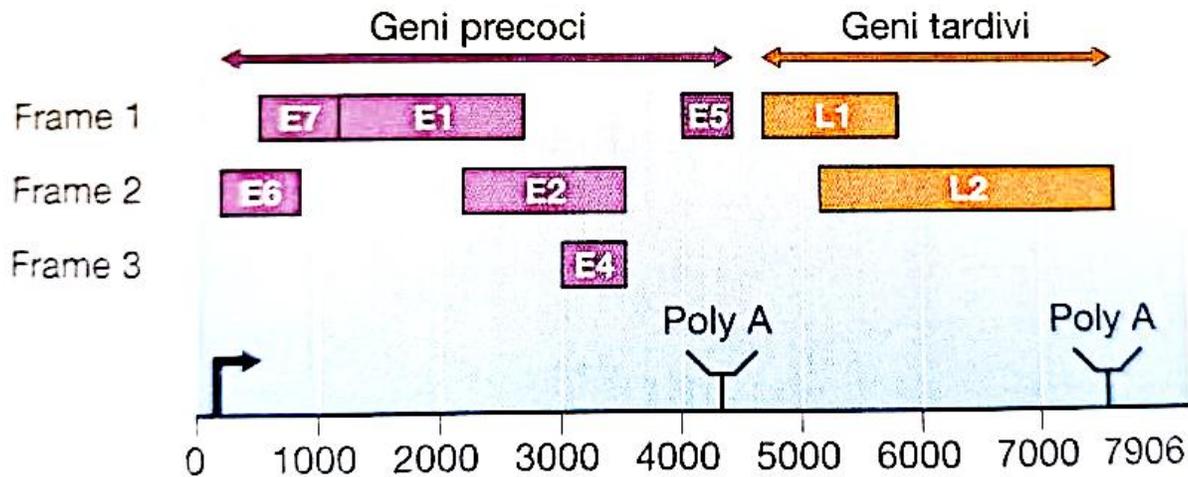
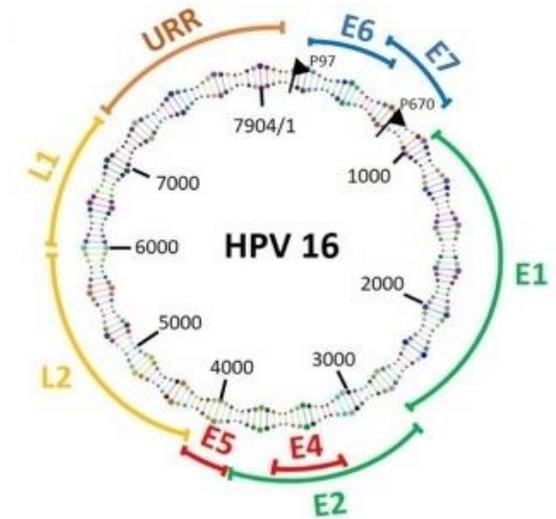
HPV: Nuova classificazione (IARC 2011)			
HR - clade	Gruppo 1	Cancerogeni per l'uomo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	Gruppo 2A	Probabilmente cancerogeni per l'uomo	68
	Gruppo 2B	Possibilmente cancerogeni per l'uomo	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97
LR	Gruppo 3	Non classificabili come cancerogeni per l'uomo	6, 11, 28, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 86, 87, 89



- ❖ Tra gli alto rischio si collocano gli HPV 16 e 18 soprattutto, ma anche 45 56 e 31
- ❖ Gli HPV ad alto rischio sono associati al 90% dei tumori della cervice uterina HPV+
 - ❖ Il 99% dei tumori della cervice uterina sono associati ad HPV

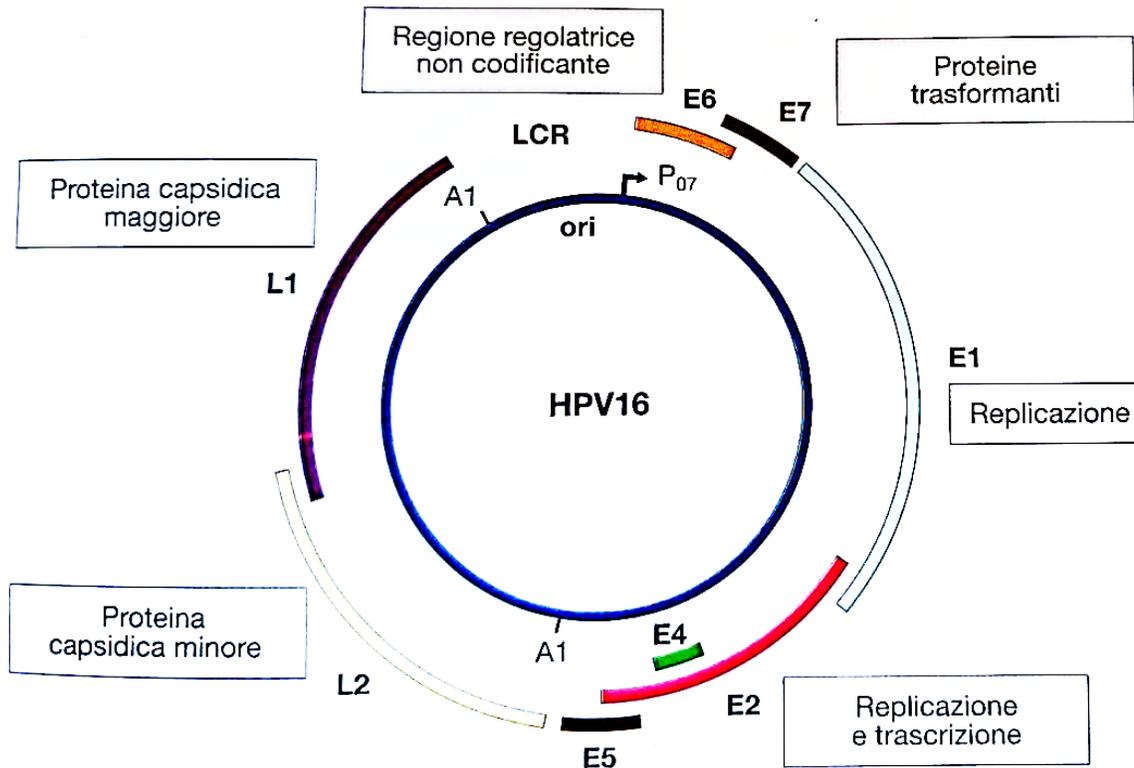
GENOMA DI HPV

- Virus nudo (privo di rivestimento)
- Diametro compreso tra 45 e 55 nm
- Il nucleocapside contiene il genoma costituito da un filamento di DNA a doppia elica circolare di circa 8000 paia di basi.
- Il genoma è suddiviso in 6 geni designati E (da early, ovvero precoci) e 2 geni designati L (da late, ovvero tardivi). Il segmento di DNA situato tra i geni E e L contiene le sequenze regolatrici della trascrizione dei vari geni virali ed è stato definito LCR (Long Control Region) o URR (Upstream Regulatory Region)



GENES	ACTIVITY
L1	Major Capsid protein
L2	Minor Capsid protein
E1	Replication of Viral genome and its maintenance
E2	Initiation of viral DNA replication; regulates transcription of E6 and E7
E4	Release of viral particles
E5	Enhances growth factor signaling pathways
E6	Inhibits p53 and causes loss in cell cycle regulation
E7	pRb mediated deregulation of cell cycle

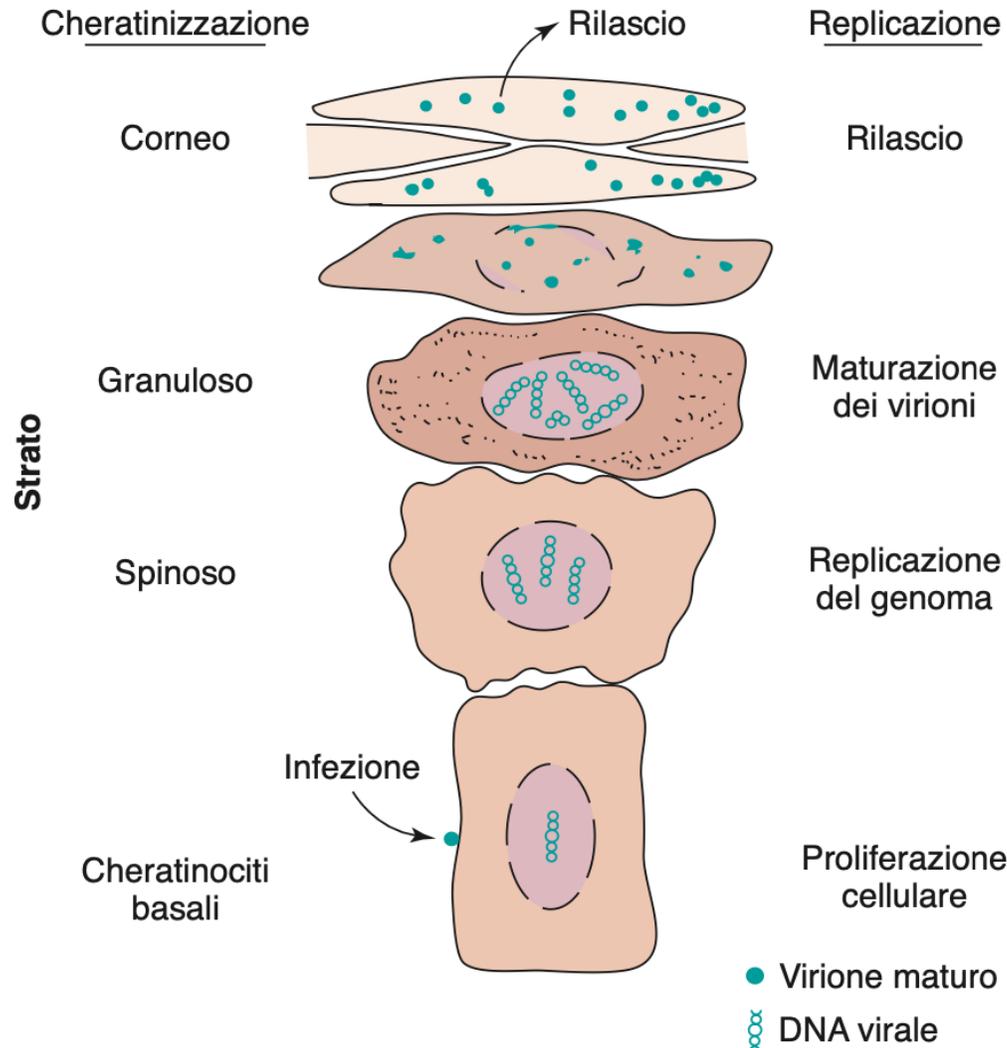
FUNZIONI BIOLOGICHE ATTRIBUITE ALLE VARIE REGIONI GENOMICHE DI HPV



PV contengono tre proteine con attività oncogena: E5, E6 ed E7.

- La proteina E5 interagisce con i recettori per fattori di crescita cellulare, attivandoli.
- La proteina E6 dei genotipi oncogeni induce la degradazione ubiquitina-dipendente della proteina "tumor suppressor" **p53**.
- La proteina E7 lega e inattiva la forma ipofosforilata della proteina "tumor suppressor" **pRb**.

CICLO REPLICATIVO DI HPV

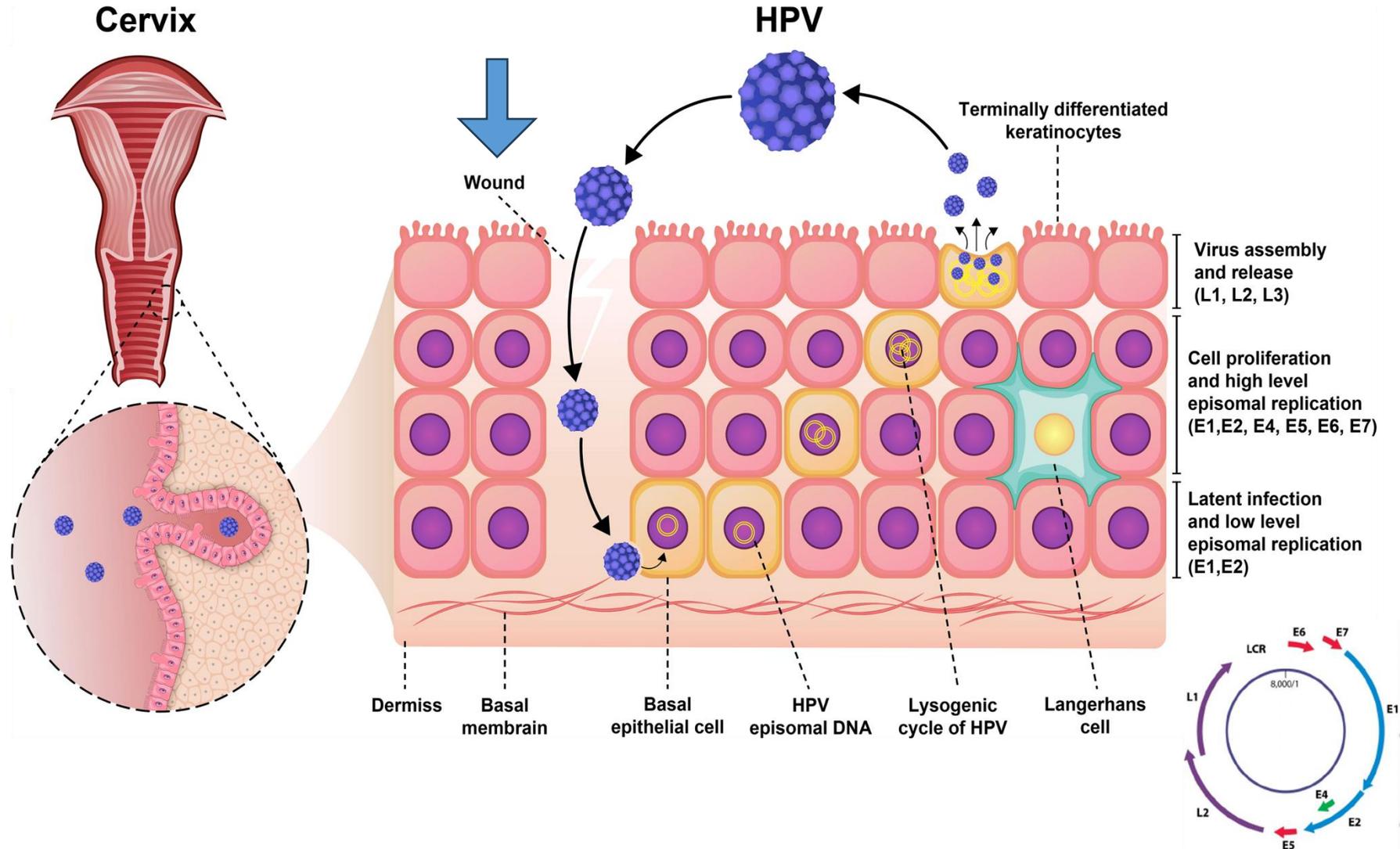


LA REPLICAZIONE DI HPV È STRETTAMENTE DIPENDENTE DALLE FASI DI DIFFERENZIAMENTO DEGLI EPITELI PLURISTRATIFICATI

- Le cellule bersaglio sono quelle dello **strato basale** in attiva divisione, non permissive per la produzione di progenie virale (cellule indifferenziate **non esprimono i geni tardivi** necessari al rilascio del virus)
- Sono, invece, permissive le **cellule differenziate dell'epitelio di rivestimento della mucosa/pelle**, che non sostengono la replicazione virale
- Quindi per poter produrre progenie virale, HPV deve viaggiare fino agli strati superiori (l'espressione del Papillomavirus è guidata dalle **caratteristiche differenziate della cellula** che contiene l'informazione genetica del virus)

	SINTESI DNA	SINTESI CAPSIDE
Strato corneo	-	+
Granuloso	+++	+++
Spinoso	+/-	-
Basale	+/-	-

CICLO REPLICATIVO DI HPV



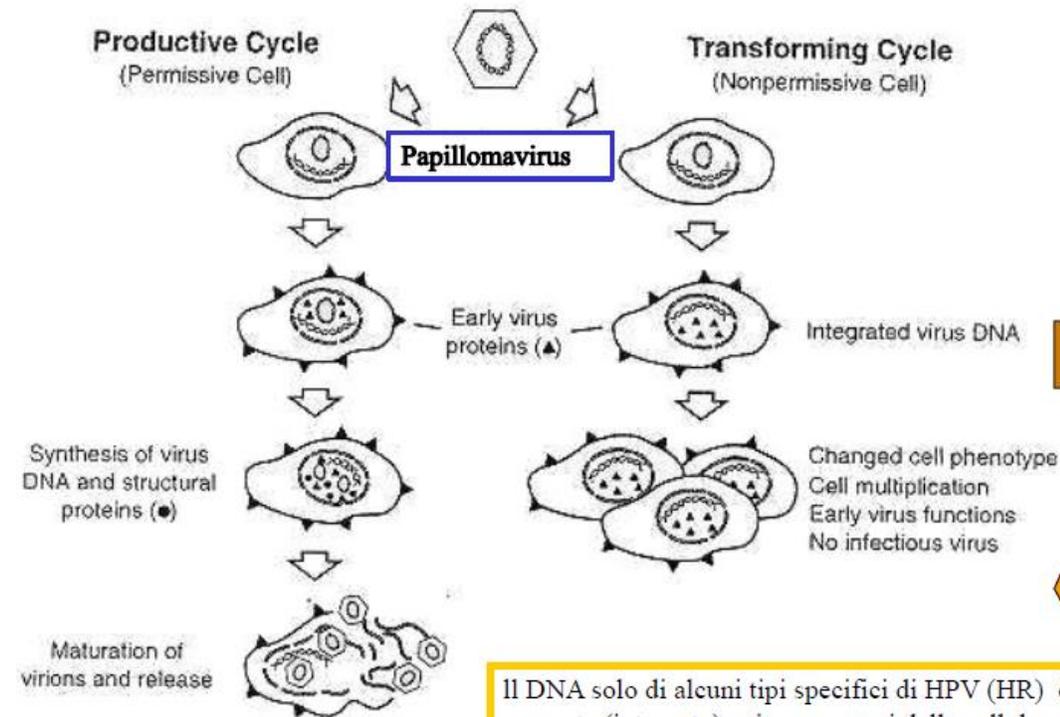
L'aumento del numero di cellule indotto dal virus, causa l'ispessimento dello strato basale e dello strato spinoso, promuovendo la produzione di cheratina (ipercheratosi) con formazione della verruca o papilloma

HPV RITARDA O IMPEDISCE LA RISPOSTA IMMUNITARIA

Nella maggior parte dei casi la risposta dell'ospite garantisce l'eliminazione spontanea del virus (6-18 mesi)

Ci sono casi in cui HPV riesce ad eludere la risposta e attiva **un'infezione persistente**

E6/E7 bloccano l'immunità innata
Scarsa risposta infiammatoria
Risposta adattativa ritardata



Il genoma è presente come episoma nel 100% dei casi di infezione basale ma anche nel 100% dei casi di lesione benigna

Il DNA solo di alcuni tipi specifici di HPV (HR) è presente (integrato) nei cromosomi delle cellule tumorali

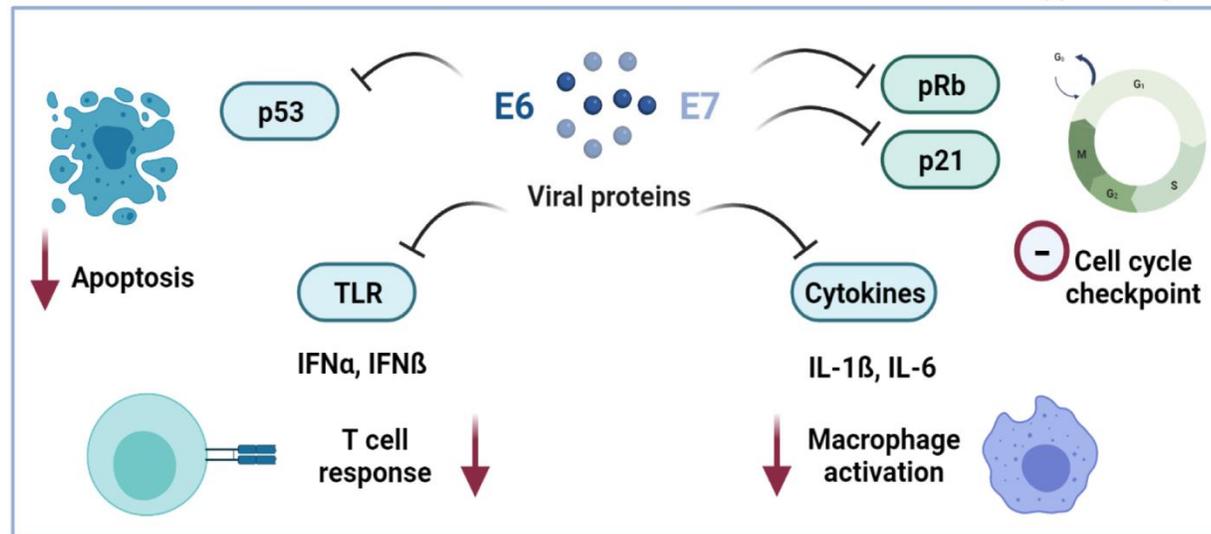
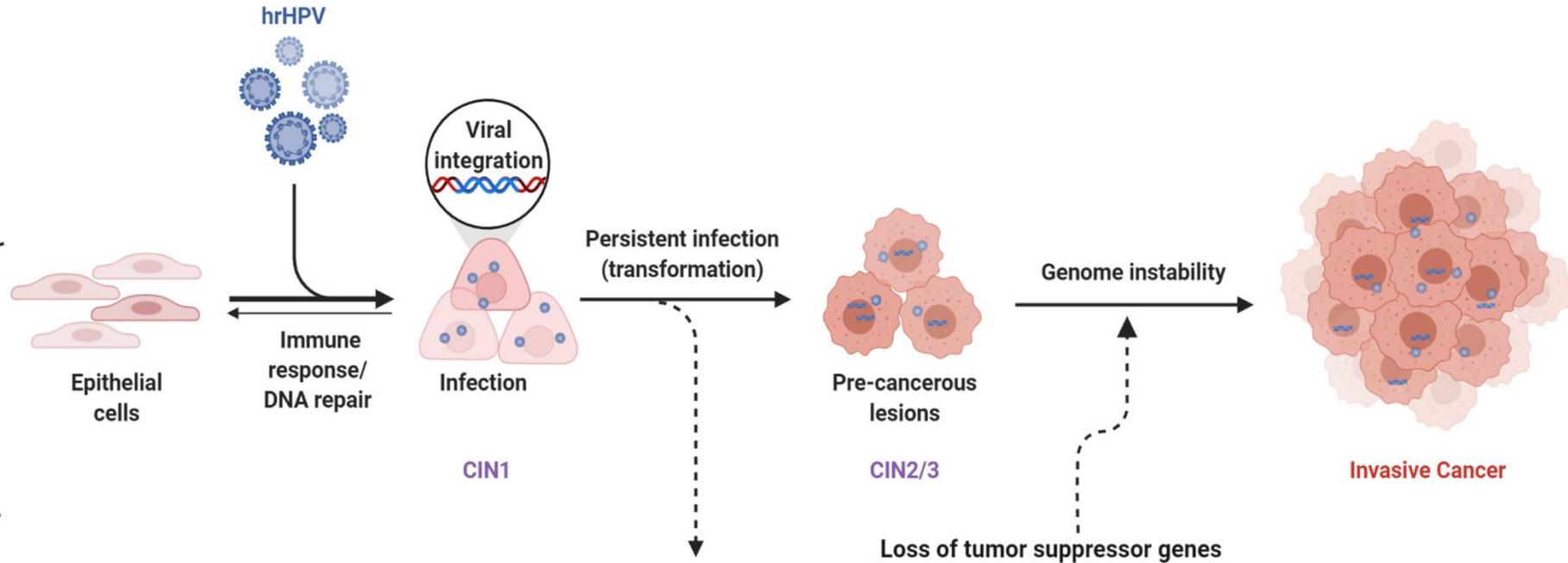
PERCHÉ HPV PERSISTE?

- IL VIRUS STABILISCE LATENZA
- IL VIRUS REPLICA NELL'EPITELIO, LONTANO DALLE CELLULE IMMUNITARIE
- IL VIRUS COMBATTE ATTIVAMENTE IL SISTEMA IMMUNITARIO

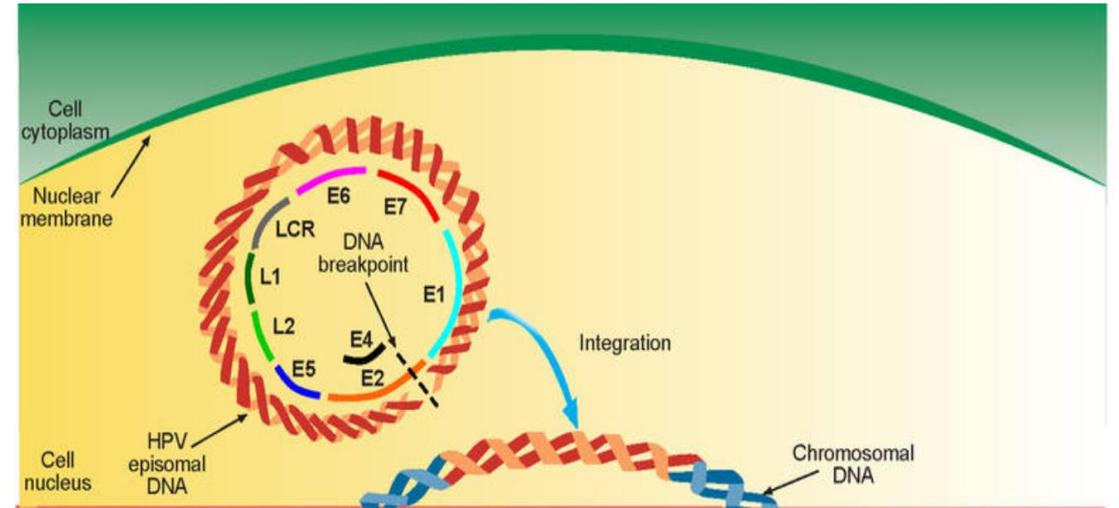
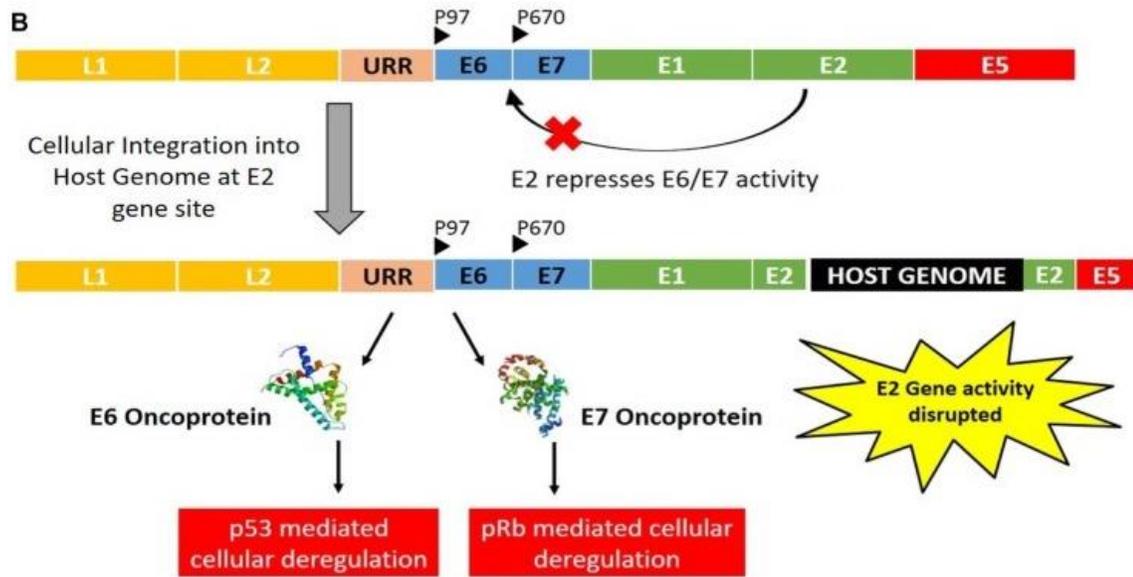
IL DNA VIRALE È PRESENTE IN POCHE COPIE IN:

- INDIVIDUI ASINTOMATICI
- TESSUTO NORMALE ADIACENTE ALLA LESIONE
- TESSUTO NORMALE DISTANTE DALLA LESIONE

INFEZIONE PERSISTENTE



INTEGRAZIONE DELL'HR HPV: EVENTO CHIAVE NELLA CARCINOGENESI



Gli **HPV AD ALTO RISCHIO** hanno la capacità di integrare il proprio genoma nel genoma della cellula ospite. Una volta integrato, non si ha produzione di progenie virale e vengono meno una serie di controlli della replicazione

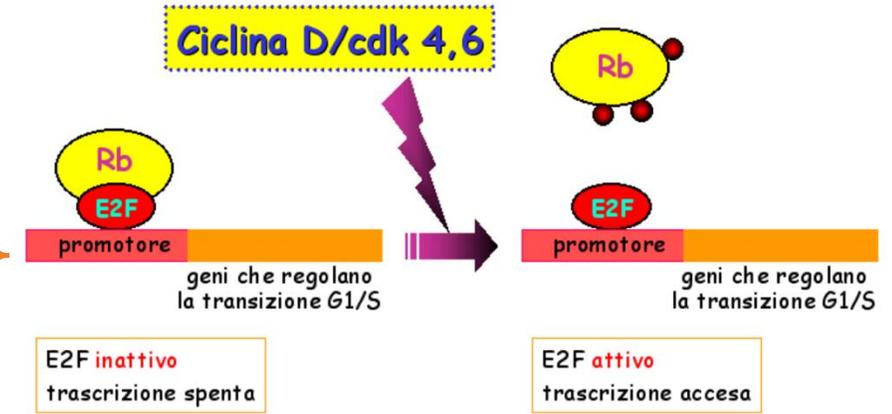


diminuisce l'espressione di E2, il regolatore negativo della trascrizione degli oncogeni, e aumenta l'espressione degli oncogeni E6/E7

ONCOSOPPRESSORI

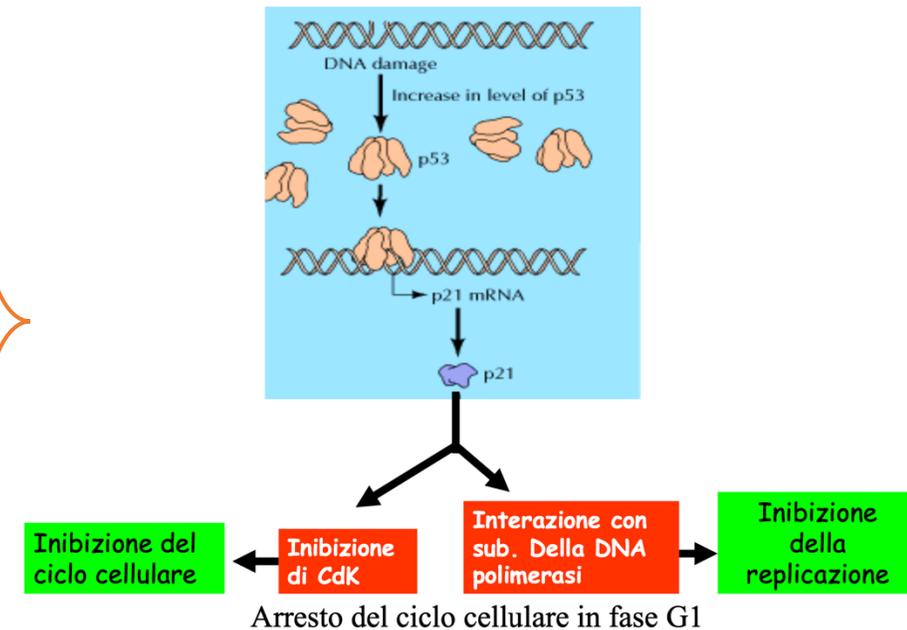
pRB (retinoblastoma): controlla la trascrizione

- Forma ipofosforilata è in grado di legare il fattore di trascrizione E2F-1 inibendone l'attività
- Forma fosforilata (presente nelle fasi G2-S-M) non lega E2F-1 che è in grado di trascrivere attivamente

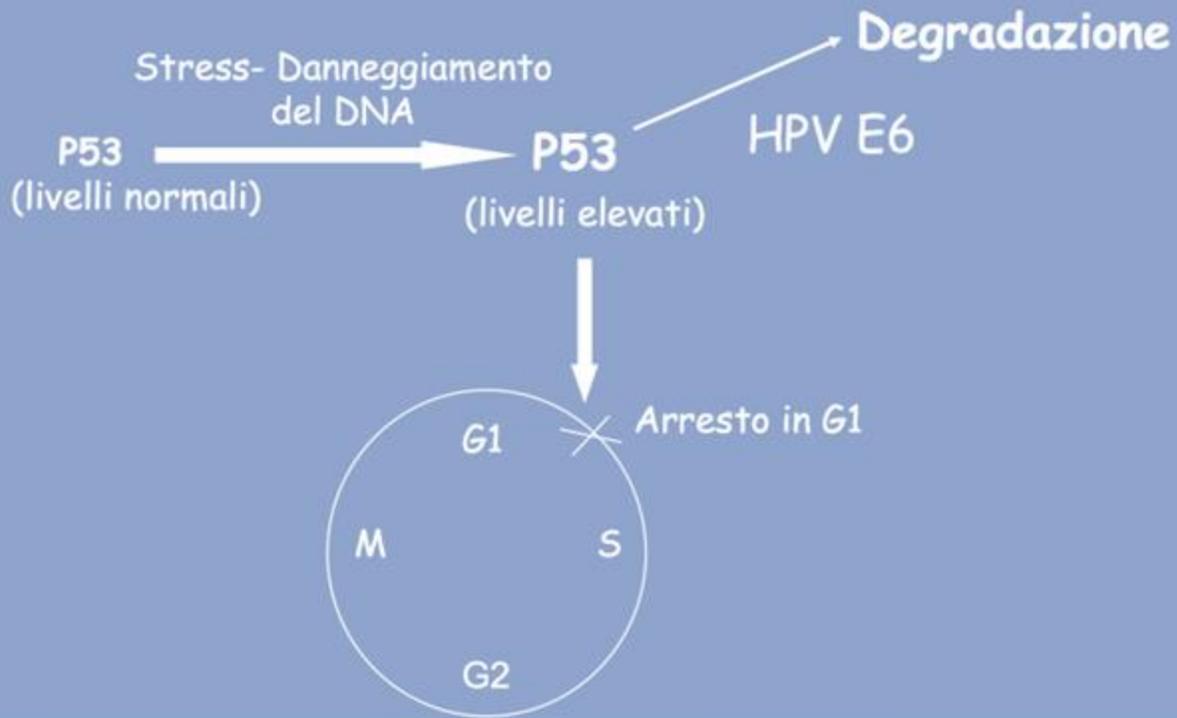


P53: ruolo chiave nell'arresto del ciclo cellulare in G1

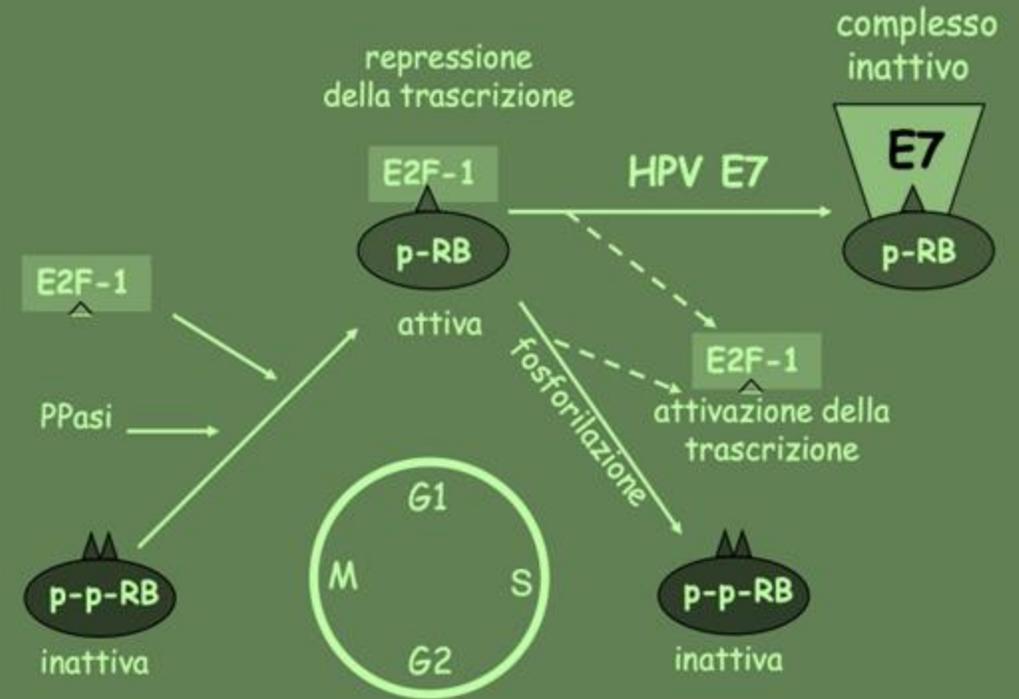
- Regola l'attività della p21 che è responsabile della transizione da G1 a S



Schema della possibile interazione di oncoproteine prodotte da HPV

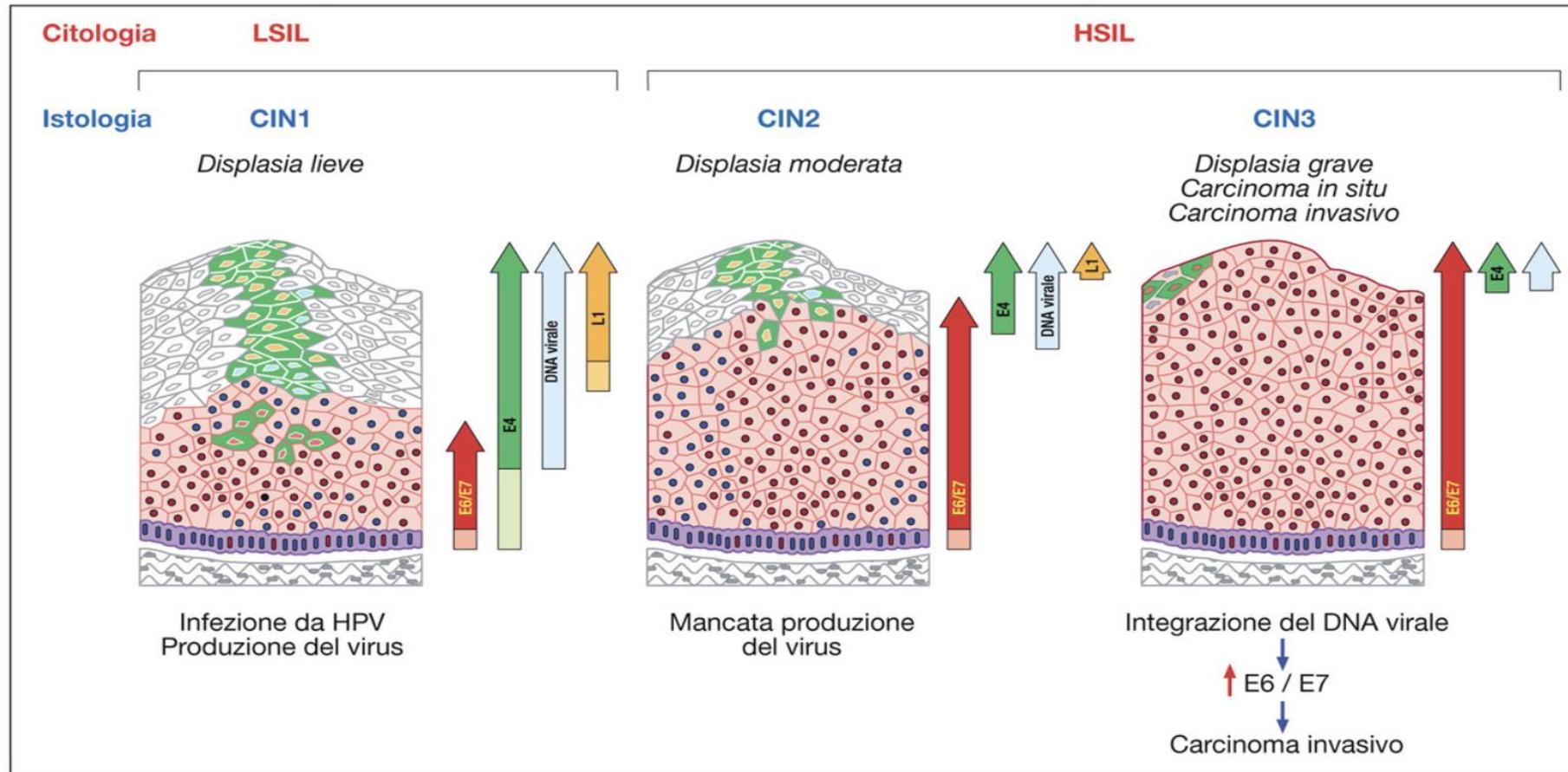


Schema della possibile azione di E7 prodotta da HPV sulla proteina pRB



LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS

HIGH.GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS

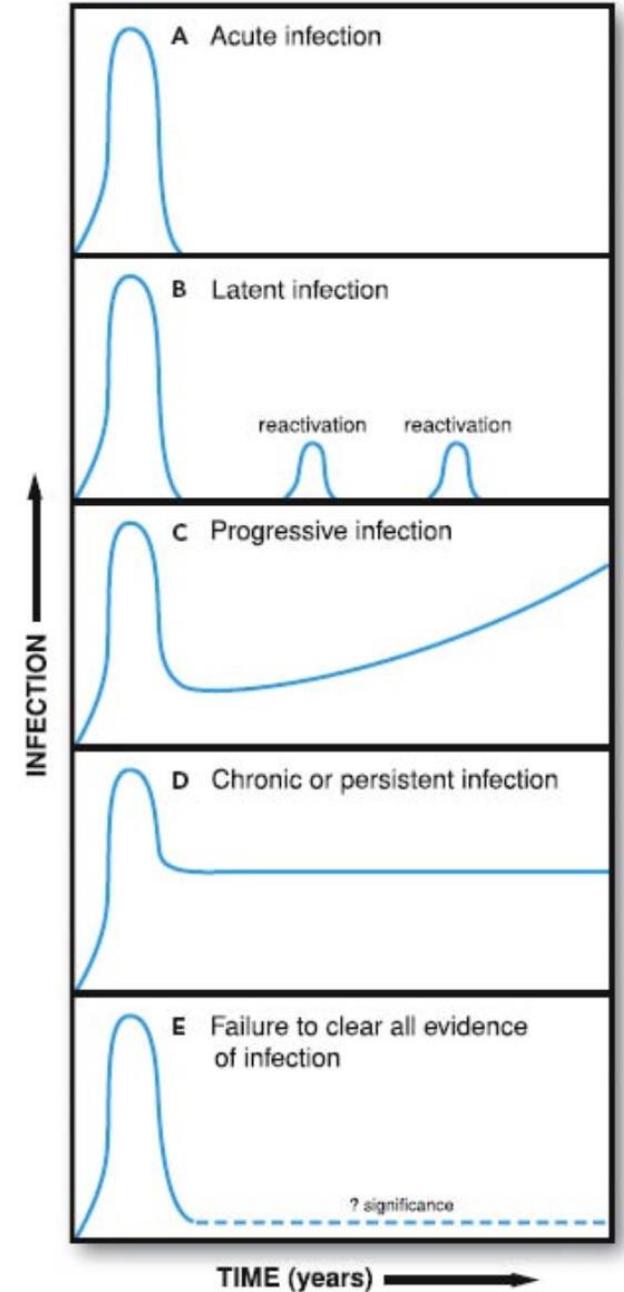
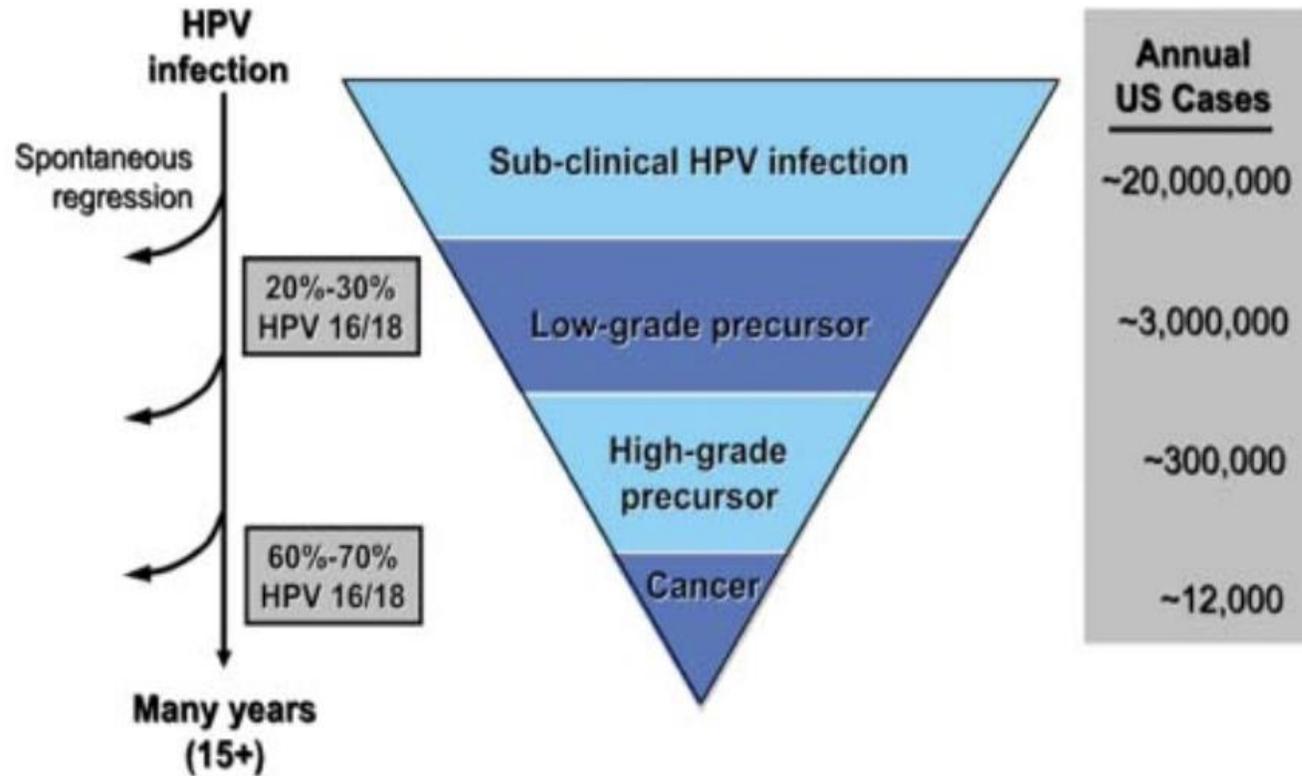


Le lesioni CIN, che generalmente insorgono a causa di un'infezione da HPV, sono classificate come CIN1 nel caso di lievi modificazioni cellulari, CIN2 nel caso di modificazioni cellulari moderate e CIN3 nel caso di modificazioni cellulari gravi.

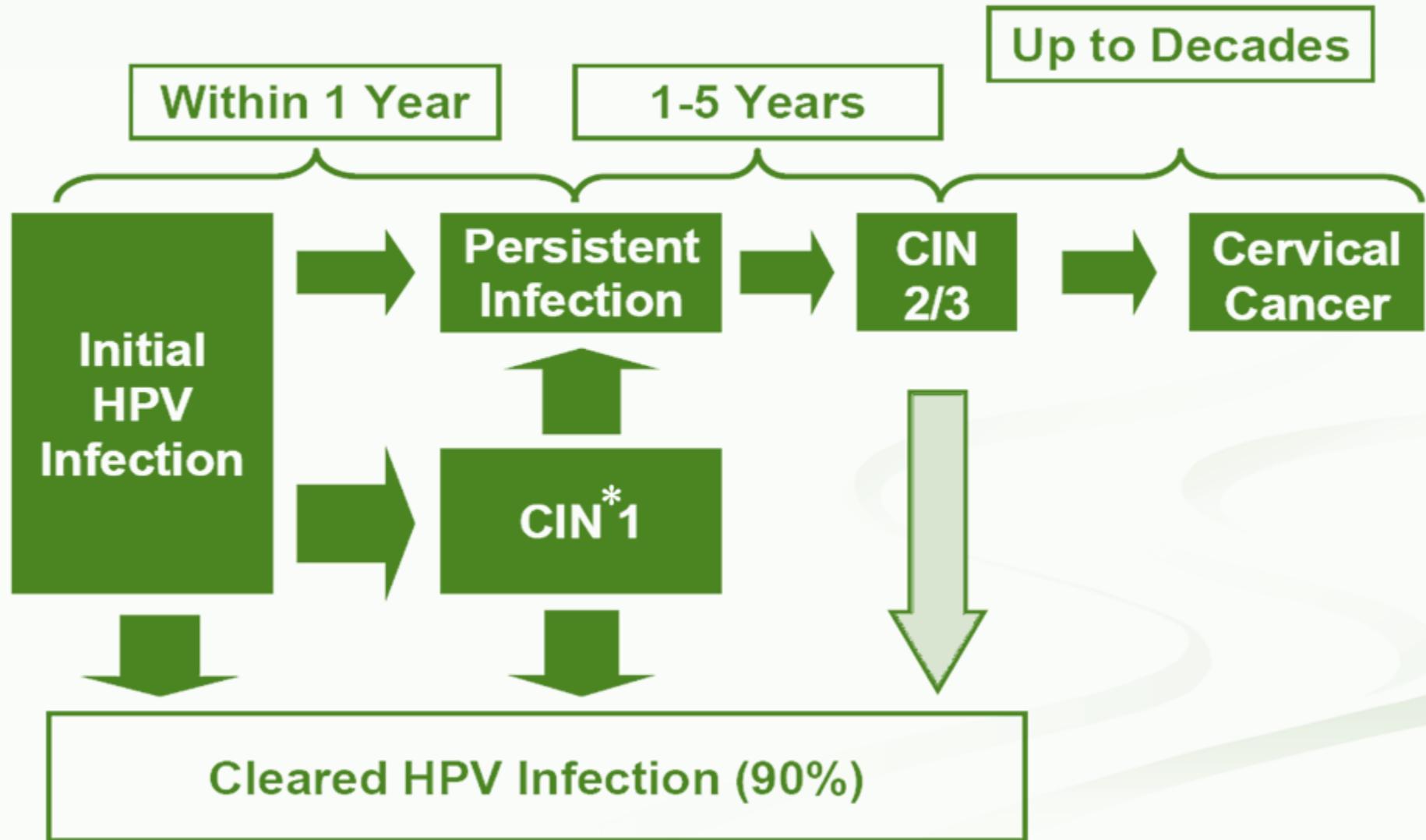
TABLE 2. The Bethesda Classification System for cervical squamous cell dysplasia

Bethesda System 1999	Bethesda System 1991	CIN System	Interpretation
Negative for intraepithelial lesions or malignancy	Within normal limits	Normal	No abnormal cells
ASC ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance)	ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance)		Squamous cells with abnormalities greater than those attributed to reactive changes but that do not meet the criteria for a squamous intraepithelial lesion
ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude HSIL)			
LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions)	LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions)	CIN 1	Mildly abnormal cells; changes are almost always due to HPV
HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions) with features suspicious for invasion (if invasion is suspected)	HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions)	CIN2/3	Moderately to severely abnormal squamous cells
Carcinoma	Carcinoma	Invasive squamous cell carcinoma Invasive glandular cell carcinoma (adenocarcinoma)	The possibility of cancer is high enough to warrant immediate evaluation but does not mean that the patient definitely has cancer

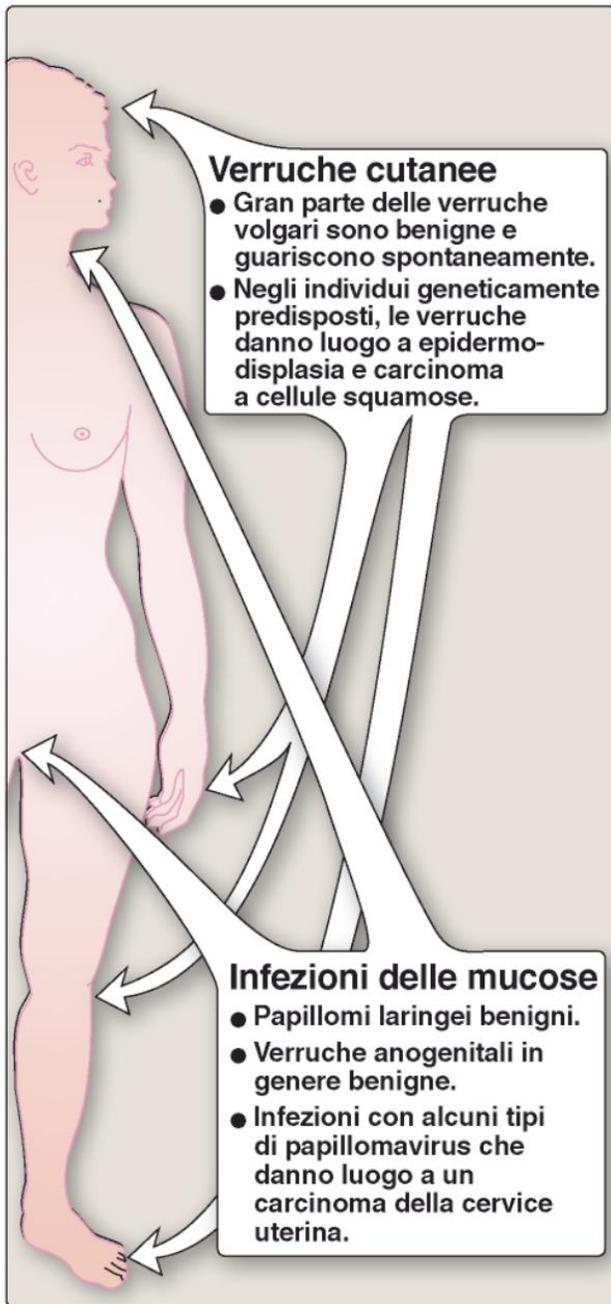
MODELLO DI INFEZIONE VIRALE



Natural History of HPV Infection

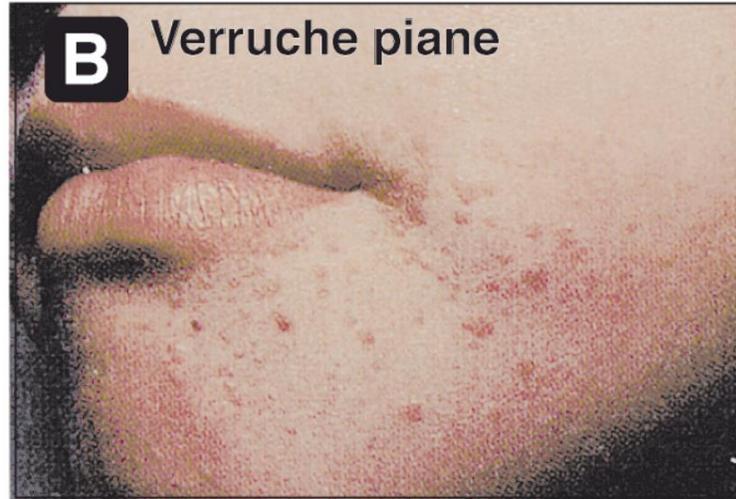


*Cervical intraepithelial neoplasia



Sindromi cliniche associate ai papillomavirus		
SINDROMI	TIPI DI HPV	
	Comuni	Non comuni
Sindromi cutanee		
Verruche cutanee		
Verruche plantari	1	2,4
Verruche comuni	2,4	1,7,26,29
Verruche piane	3,10	27,28,41
Epidermodisplasia verruciforme	5,8,17,20,36 25,38,46	9,12,14,15,19,21-
Sindromi mucose		
Tumori benigni della testa e del collo		
Papilloma laringeo	6,11	-
Papilloma orale	6,11	2,16
Papilloma congiuntivale	11	-
Verruche anogenitali		
Condiloma acuminato	6,11	1,2,10,16,30,44,45
Neoplasia intraepiteliale cervicale,cancro	16,18	

(Modificato da Balows A, et al (eds):Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice, vol 2. New York,Springer-Verlag,1988)



TUMORI ASSOCIATI ALL'INFEZIONE DA HPV NELL'UOMO

ANAL CANCER: Over 90% of anal cancer is caused by HPV. Both new cases and deaths from anal cancer are increasing.

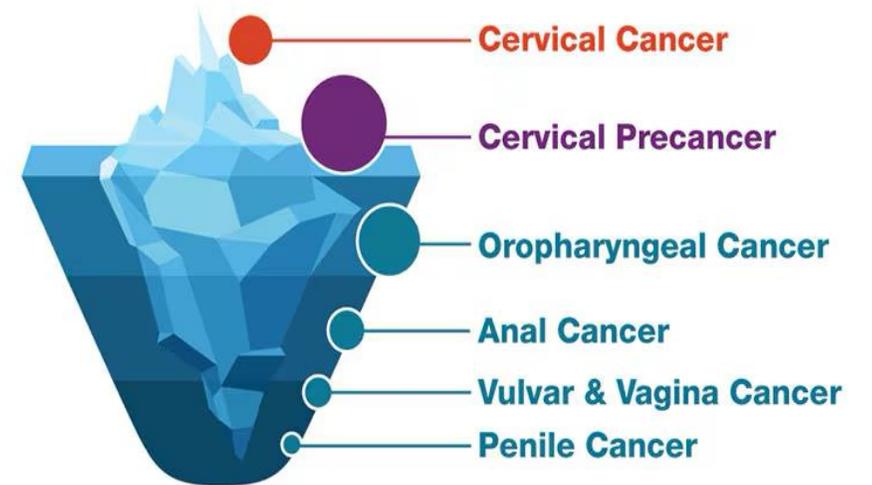
CERVICAL CANCER: Virtually all cervical cancer is caused by HPV. Routine screening with an HPV test or Pap test can prevent most cervical cancer by allowing health care providers to find and remove precancerous cells before they develop into cervical cancer. Cervical cancer is most common in rarely or never screened women.

OROPHARYNGEAL CANCERS: (also called throat cancer) This cancer forms in tissues of the oropharynx (the middle part of the throat, behind the mouth). Most oropharyngeal cancer (70%) is caused by HPV. Oropharyngeal cancer is different than oral cavity cancer, which forms in the mouth; both are types of head and neck cancer.

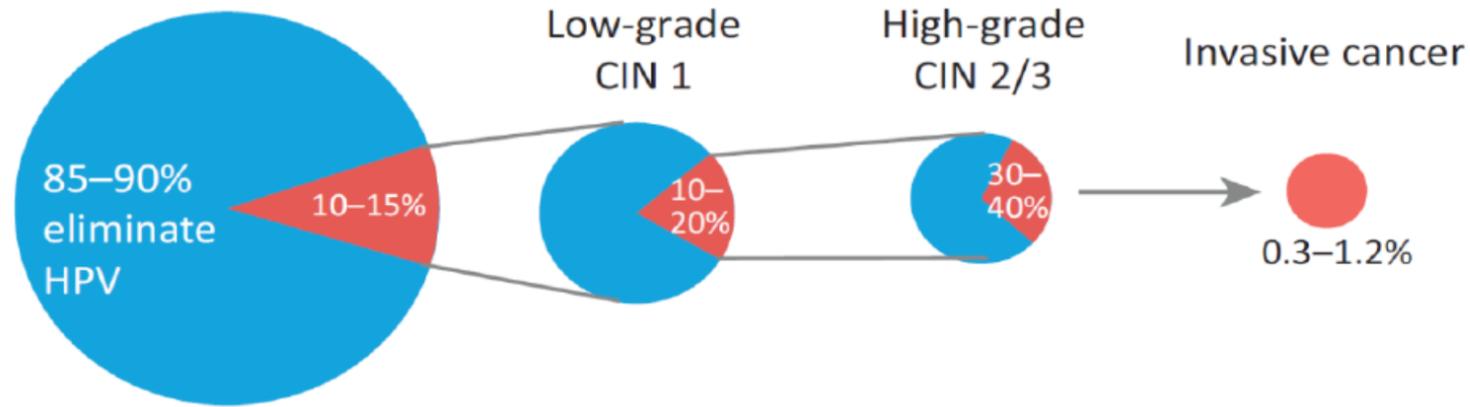
PENILE CANCER: Most penile cancers (63%) is caused by HPV. Penile cancer is a rare form of cancer that usually forms on or under the foreskin.

VAGINAL CANCER: Most vaginal cancer (75%) is caused by HPV.

VULVAR CANCER: Most vulvar cancer (69%) is caused by HPV.



PROGRESSIONE DI UN'INFEZIONE CERVICALE VERSO IL CANCRO



CITOLOGIA

Un **CIN1 (cervical intraepithelial neoplasia)**, frequentemente diagnosticato, indica una lesione intraepiteliale benigna (basso grado) vuol dire che c'è persistenza virale e la lesione va eliminata (**VENGONO PRODOTTI I VIRIONI**)

Un **CIN2** indica una displasia moderata (**MANCATA PRODUZIONE DI VIRIONI**)

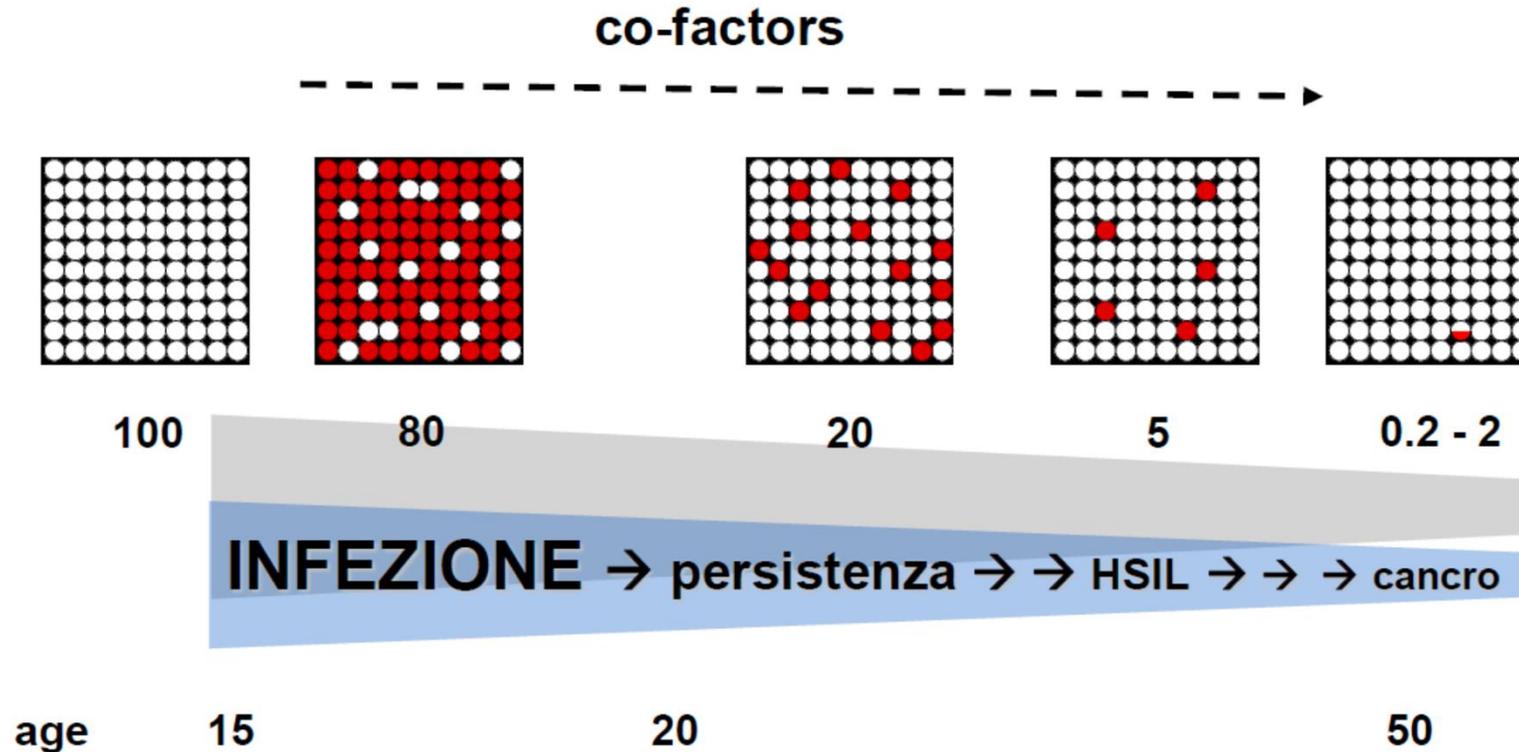
Un **CIN3** indica modificazioni cellulari gravi, compresi carcinomi in situ e carcinomi invasivi (**INTEGRAZIONE DEL GENOMA VIRALE**)

ISTOLOGIA

LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS
LSIL

HIGH-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS
HSIL

Man mano che si va avanti, la possibilità di eliminare spontaneamente l'infezione diminuisce, e aumenta quella di transitare verso un cancro invasivo (la carcinogenesi richiede anni)



- Il cancro cervicale è la II causa di morte per tumore nella donna
- Nel mondo circa 500.000 nuovi casi annui di neoplasia cervicale e 333.000 morti
- In Italia l'incidenza è di circa 4.000 nuovi casi annui con 1.500 morti
- Il 90.7-96.6% delle **neoplasie cervicali a cellule squamose** è positivo per HPV

MODALITA' DI TRASSMISSIONE E FATTORI DI RISCHIO

Le infezioni da HPV vengono trasmesse:

- per contatto diretto
- tramite piccole lacerazioni cutanee o delle mucose
- per contatto sessuale
- durante il passaggio di un neonato attraverso il canale del parto infetto

Fattori di rischio

Virali

- HPV alto rischio, HPV16 e...
- Varianti
- Carica virale (per HPV16)
- Infezioni multiple
- Co-infezione con HSV-2
- Co-infezione con HIV

Altri

- Elevato numero di partner
- Presenza di altre infezioni sessualmente trasmesse
- Fumo
- Dieta
- Fattori genetici
- Fattori ambientali
- Uso prolungato di contraccettivi per via orale
- Numerose gravidanze

DIAGNOSI DI LABORATORIO

- I papillomavirus non possono essere coltivati in vitro con i metodi tradizionali, ma richiedono l'impiego delle colture organotipiche, di difficile manipolazione, per cui a differenza di altri virus non è previsto l'isolamento culturale come metodo diagnostico.
- Anche dal punto di vista sierologico i titoli anticorpali contro gli antigeni di HPV non si sono dimostrati finora dei marcatori affidabili per la diagnosi di infezione da HPV; solo una bassa percentuale di pazienti sviluppa anticorpi anti-HPV durante l'infezione e comunque la loro presenza non può essere utilizzata a scopo diagnostico.



**LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV È, IN PRIMO
LUOGO, BASATA SU **METODI MOLECOLARI**
(RICERCA DI HPV DNA E SUCCESSIVA TIPIZZAZIONE).**

DIAGNOSI DI LABORATORIO

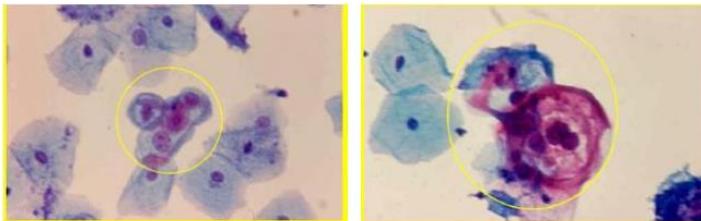
Test	Elementi evidenziati
Citologia	Cellule coilocitiche
Analisi in situ con sonde di DNA (tecniche di ibridazione)*	Acidi nucleici virali
Reazione di polimerizzazione a catena*	Acidi nucleici virali
Immunofluorescenza	Antigeni virali strutturali
Microscopia elettronica	Virus
Coltura virale°	Non utile
*Metodo di elezione	

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE INFEZIONI DA PAPILLOMAVIRUS

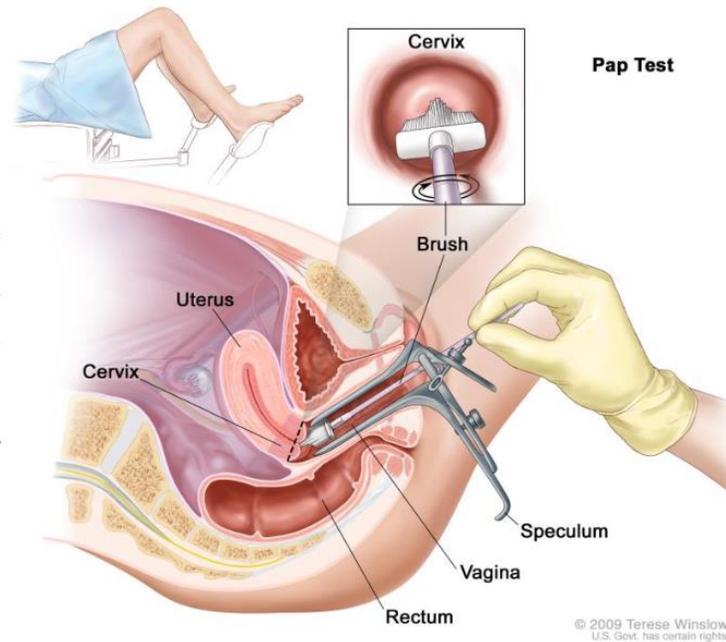
Tramite un tampone cervicale e una spatola vengono prelevate cellule del collo e della cervice dell'utero

Pap test (TEST DI PAPANICOLAU)

Il **Pap Test** è un esame citologico che analizza le cellule su un vetrino dopo colorazione con **eosina/ematossina**. L'analisi al microscopio del campione permette di individuare eventuali cellule con caratteristiche pre-tumorali o tumorali e, sulla base del loro grado di atipicità, di stimare il livello di danno tissutale.

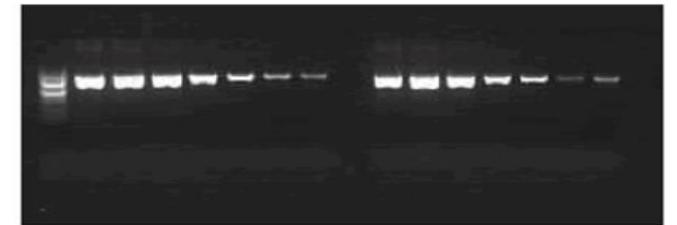


COILOCITI



DNA test

Il **test per HPV** è un saggio della reazione a catena della polimerasi (PCR) per il rilevamento qualitativo che utilizza un'amplificazione target omogenea e una tecnologia di rilevamento per individuare il DNA del papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio in cellule cervicali raccolte in un terreno liquido



VACCINI anti-HPV

I vaccini contro HPV sono composti da proteine purificate da HPV (**PROTEINA L1**), che formano particelle simil-virali (**VLP, VIRUS-LIKE PARTICLES**) associate a sostanze adiuvanti. Le VLP mimano il capsid virale, ma non contengono materiale genetico dei virus; pertanto sono in grado di indurre una risposta anticorpale specifica per tipo di HPV, a seconda delle proteine utilizzate, ma non sono in grado di provocare infezioni!!

Vaccini	
Tecnologia del DNA ricombinante	
Prevenzione HPV	
Cervarix bivalente	16 / 18
Gardasil quadrivalente	6/11/16/18
Gardasil-9 9-valente	6/11/16/18 31/33/45/52/58

