

Papillomavirus umani: biologia e patogenesi

Luisa Barzon

I papillomavirus sono piccoli virus epiteliotropici privi di *envelope*, con genoma a DNA circolare a doppio filamento. Appartengono alla famiglia dei *Papillomaviridae*, che include diverse centinaia di tipi virali raggruppati filogeneticamente in 12 generi (designati con una lettera dell'alfabeto greco, ad esempio Alpha e Beta), i quali a loro volta includono le specie virali contrassegnate da numeri (ad esempio, Alpha 1).

I papillomavirus sono virus molto antichi e strettamente specie-specifici, che nel corso di milioni di anni sono evoluti insieme alle loro specie ospiti, tra cui uccelli, rettili e mammiferi, compresi gli esseri umani. I papillomavirus umani (HPV) comprendono più di 450 genotipi ("tipi"), organizzati in cinque generi, Alpha, Beta, Gamma, Mu e Nu, tutti in grado di infettare l'epitelio della cute. Il genere Alpha comprende tipi di HPV in grado di infettare anche l'epitelio delle mucose orali e genitali. La maggior parte delle infezioni da HPV sono asintomatiche; alcuni tipi di HPV, come HPV1 e HPV6, possono provocare lesioni benigne della cute (verruche) e delle mucose (condilomi), rispettivamente. Un gruppo di HPV definiti oncogeni, come HPV16 e HPV18, può causare infezioni persistenti e tumori maligni.

CLASSIFICAZIONE DEGLI HPV

La maggior parte dei tipi di HPV appartenente ai generi Beta e Gamma sono associati a infezioni cutanee asintomatiche in individui immunocompetenti. Queste infezioni sono acquisite in età pediatrica e possono persistere per anni o decenni. Gli HPV del genere Mu causano verruche cutanee nel palmo delle mani e nella pianta dei piedi, che vengono eliminate dopo mesi o anni da una risposta immunitaria cellulo-mediata. Nei pazienti immunosoppressi, le lesioni cutanee da HPV sono refrattarie al trattamento e recidivano frequentemente.

Il genere Alpha include circa 40 tipi di HPV trasmessi sessualmente che infettano principalmente gli epiteli muco-cutanei anogenitali e le mucose orofaringee. Questi virus sono generalmente eliminati dall'immunità cellulo-mediata entro 1-2 anni dall'infezione, ma talora possono persistere, soprattutto nel caso degli HPV oncogeni, come conseguenza dell'integrazione del genoma virale nei cromosomi della cellula ospite. I membri del genere Alpha possono causare infezioni clinicamente non apparenti oppure, come nel caso di HPV6 e HPV11, verruche genitali. Un gruppo di 12 tipi di HPV del genere Alpha, filogeneticamente correlati, ha potenziale cancerogeno, come dimostrato da studi meccanicistici ed epidemiologici di un nesso causale con il cancro del collo dell'utero e altri carcinomi anogenitali e dell'orofaringe. Questi tipi di HPV oncogeni o "ad alto rischio" includono HPV16 (specie Alpha 9), che rappresenta il tipo di HPV più frequentemente rilevato a livello di popolazione e associato a circa il 60% del carcinomi invasivi del collo dell'utero a livello globale e a una quota rilevante di altri tumori correlati all'infezione da HPV, ovvero carcinomi squamosi della vagina, della vulva, del pene e dell'orofaringe. La specie

Alpha 9 include anche i tipi ad alto rischio HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 e HPV58. HPV18, che è il secondo tipo di HPV ad alto rischio in ordine di rilevanza e associato a circa il 15% dei casi di carcinoma cervicale, appartiene alla specie Alpha 7, insieme ai tipi ad alto rischio HPV39, HPV45 e HPV59. Gli altri tipi di HPV ad alto rischio sono HPV51 (specie Alpha 5) e HPV56 (specie Alpha 6). HPV68 (specie Alpha 7) è stato classificato come un probabile cancerogeno dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), e altri tipi di HPV (cioè HPV26, HPV30, HPV34, HPV53, HPV66, HPV67, HPV69, HPV70, HPV73, HPV82 e HPV85) come possibili cancerogeni, ma raramente associati a cancro.¹

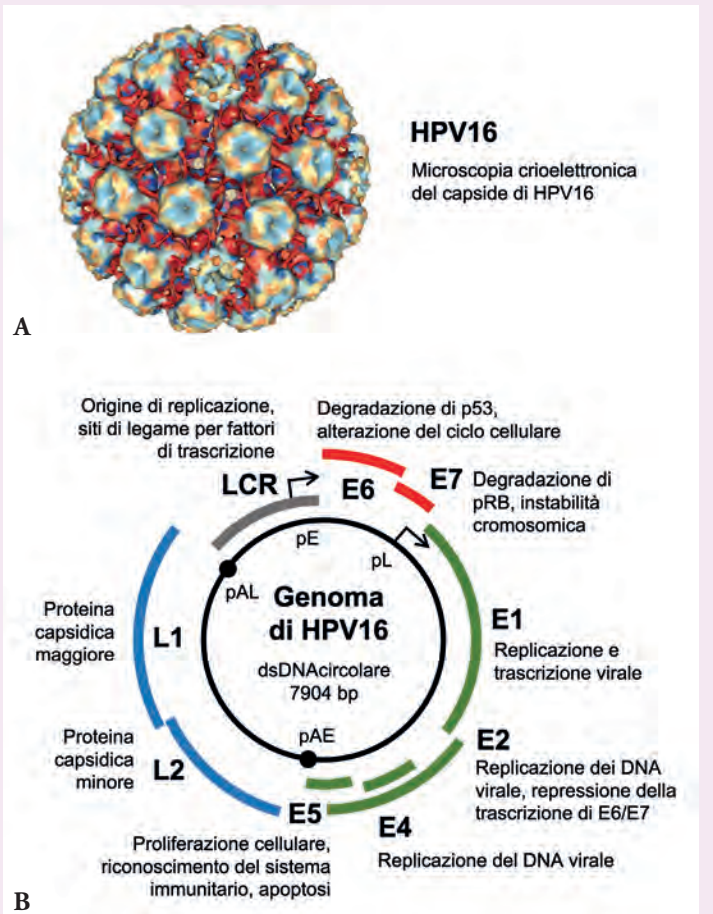
I genotipi ("tipi") di HPV differiscono uno dall'altro per più del 10% della sequenza nucleotidica del gene molto conservato L1, che codifica la proteina capsidica maggiore. Virus che differiscono per meno del 10% della sequenza del gene L1 sono definiti varianti; alcune varianti dei tipi di HPV ad alto rischio sono state associate a un aumento del rischio di sviluppare cancro.^{2,3}

STRUTTURA E ORGANIZZAZIONE DEL VIRIONE E DEL GENOMA HPV

I virioni dei papillomavirus hanno piccole dimensioni, sono privi di *envelope*, e hanno simmetria icosaedrica (Fig. 1.1A). Sono costruiti da 72 capsomeri, ciascuno contenente 5 unità della proteina capsidica maggiore L1 e un numero minore di unità della proteina capsidica minore L2, la quale collega il capside al genoma virale.⁴

Il genoma dell'HPV è una molecola circolare a doppio filamento di DNA di circa 8000 paia di basi ed è associato ai nucleosomi di istoni cellulari. Contiene sei geni precoci (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), che codificano proteine coinvolte nella replica-

FIG. 1.1. A) Struttura del virione del papillomavirus umano di tipo 16 (HPV16) ottenuta mediante microscopia elettronica a criomicroscopia del capside di HPV16; B) organizzazione del genoma di HPV16, open reading frame e funzione delle proteine codificate.



LCR: *long control region*; pE: promotore precoce; pL: promotore tardivo; pAE: sito di poliadenilazione precoce; pAL: sito di poliadenilazione tardiva.

zione del genoma virale e nell'induzione della proliferazione delle cellule ospiti, due geni tardivi (L1 e L2), che codificano proteine del capsido virale, e una regione di controllo trascrizionale (*long control region*, LCR), che contiene l'origine di replicazione del DNA virale e siti di legame per fattori di trascrizione virali e della cellula ospite che controllano l'espressione genica virale. Le proteine E1 ed E2 sono direttamente coinvolte nella replicazione del genoma virale; L1 e L2 sono coinvolte nell'assemblaggio del virus e sono altamente conservate tra i papillomavirus; E4, E5, E6 ed E7 hanno funzioni accessorie e sono in grado di modificare la cellula infetta per facilitare la replicazione del virus (Fig. 1.1B).⁵

Dopo l'infezione, l'espressione dei geni virali è controllata da più promotori e da un complesso schema di splicing alternativo del mRNA, che è associato al programma di differenziazione degli epiteliali. HPV16 utilizza due principali promotori e due siti di poliadenilazione per generare mRNA precoci e tardivi: un promotore precoce situato a monte del gene E6, un promotore tardivo situato a monte del gene E1 e due siti di poliadenilazione situati a valle dei geni precoci e tardivi, rispettivamente.

REPLICAZIONE DEL VIRUS

I papillomavirus sono strettamente specie-specifici e hanno un tropismo selettivo per le cellule epiteliali squamose. L'infezione produttiva da HPV richiede che il virus acceda allo strato basale degli epitelii. Le cellule basali sono le uniche cellule nello strato epiteliale squamoso con caratteristiche simili a cellule staminali e in grado di dividersi, consentendo la replicazione del genoma virale e la sua persistenza come episoma nucleare.⁶ Di conseguenza, è necessario che la barriera epiteliale sia danneggiata da ferite ed abrasioni affinché il virus possa accedere alle cellule basali ed iniziare il processo infettivo.

Per garantire che l'infezione iniziale avvenga solo nelle cellule epiteliali basali, il virus maschera il dominio di legame al recettore presente sulla superficie del virione finché non viene modificato da una serie di cambiamenti conformazionali innescati dal legame con proteoglicani di eparan solfato presenti nella membrana basale dell'epitelio. Questi cambiamenti conformazionali includono l'esposizione del dominio N-terminale della proteina capsidica minore L2 in seguito alla scissione da parte di proteasi cellulari. La scissione è necessaria per l'esposizione di un putativo dominio di legame al recettore (non ancora identificato con certezza) presente sulla superficie dei cheratinociti, probabilmente situato su L1. Il legame al recettore porta all'internalizzazione del virus e all'inizio del processo infettivo. Ogni passaggio in questo processo è straordinariamente lento e l'intervallo tra il legame del virus alla membrana basale e l'internalizzazione nel cheratinocita richiede circa 24 ore. Questo lungo intervallo consente la neutralizzazione dell'infezione mediante anticorpi indotti da vaccini VLP.⁷

Dopo l'infezione, il genoma di HPV subisce diversi cicli di replicazione e quindi viene mantenuto a basso numero di copie nelle cellule basali dell'epitelio. La produzione di virioni avviene solo nello strato differenziato terminalmente dell'epitelio squamoso stratificato. Nel corso del differenziamento delle cellule epiteliali, il genoma virale si replica ad un alto numero di copie ed esprime i geni del capsido L1 e L2, con conseguente produzione della progenie virale, che viene rilasciata dalla superficie epiteliale all'interno delle cellule esfoliate. Mentre la replicazione di mantenimento nello strato basale epiteliale dipende dai fattori di replicazione delle cellule ospiti, l'amplificazione del genoma ad alto numero di copie nei livelli cellulari epiteliali sovrabasali

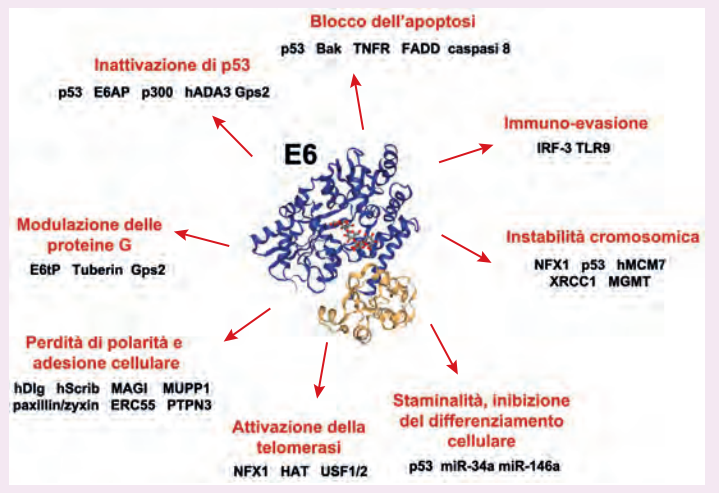
richiede l'attività di diversi prodotti genici virali, inclusi E6, E7, E2 ed E1. Il programma dell'espressione genica virale dipende dallo stadio del differenziamento cellulare presente negli strati cellulari epiteliali sovrabasali, caratterizzato da cambiamenti temporali nell'attività dei promotori e nello splicing dell'mRNA.⁸

CANCEROGENESI MEDIATA DA HPV

L'infezione persistente da HPV ad alto rischio è condizione necessaria, anche se non sufficiente, per causare cancro. Per persistere, HPV deve infettare le cellule dell'epitelio basale, che sono ancora in grado di proliferare. La persistenza avviene tipicamente con tipi di HPV ad alto rischio, caratterizzati da una maggiore capacità di attivare la proliferazione cellulare rispetto agli HPV a basso rischio. Nelle cellule infette, la proliferazione è disaccoppiata dal differenziamento attraverso l'inattivazione dei regolatori chiave del ciclo cellulare, inclusi membri dei geni oncosoppressori pRB e p53. La maggiore capacità oncogena dei tipi di HPV ad alto rischio, e in particolare di HPV16, risiede nell'attività delle oncoproteine E6 ed E7, le cui principali funzioni sono l'inibizione di p53 e pRB, rispettivamente.⁹ La proteina E6 degli HPV ad alto rischio induce la degradazione di p53 mediante ubiquitinazione. E6 si associa dapprima alla ubiquitin ligasi cellulare E6-associated protein (E6AP); quindi il complesso E6/E6AP si lega a p53, inducendo ubiquitinazione e successiva degradazione proteosomica di p53. Al contrario, la proteina E6 degli HPV a basso rischio non è in grado di mediare la degradazione di p53. Altre funzioni di E6 degli HPV ad alto rischio sono l'attivazione della telomerasi, l'alterazione delle vie coinvolte nella risposta del sistema immunitario, nel differenziamento epiteliale, nella proliferazione cellulare e nella segnalazione di morte cellulare (Fig. 1.2). Una classe di bersagli cellulari che sono legati solo da E6 ad alto rischio sono le proteine con domini PDZ, che interagiscono con il dominio C-terminale di E6. Queste proteine cellulari con domini PDZ (ad es., i soppressori tumorali Discs large, Scribble e MAGI-1) sono coinvolte nella regolazione dell'adesione cellulare, del contatto inter-cellulare e della polarità cellulare.¹⁰

La proteina E7 degli HPV ad alto rischio interagisce con le proteine della famiglia pRB, portando al rilascio e all'attivazione dei fattori di trascrizione E2F che regolano i geni della fase S.⁹ Una conseguenza di questa attività di E7 è infatti l'attivazione dell'oncosoppressore p53, con conseguente arresto del ciclo cellulare o induzione di apoptosi. Per evitare questa inibizione, le proteine E6 ad alto

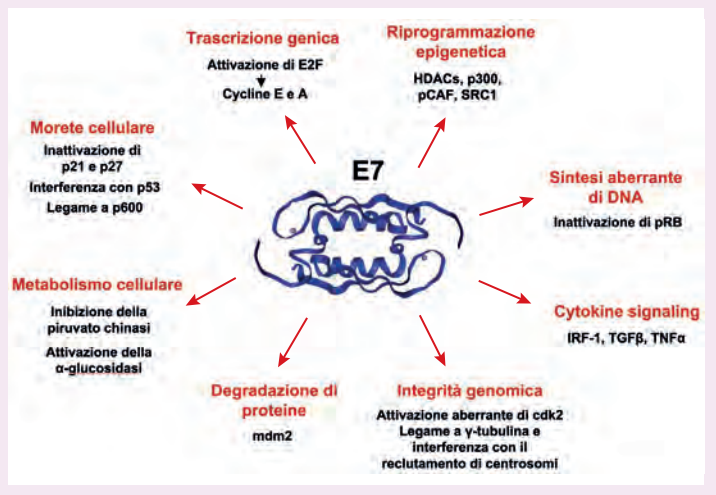
FIG. 1.2. Struttura della proteina E6 di HPV16 in complesso con l'enzima ubiquitina ligasi E6AP (PDB: 4GIZ). Sono indicati i bersagli molecolari e le funzioni di HPV16 E6.



rischio si sono evolute per inibire p53. Questa azione cooperativa di E6 ed E7 abroga più checkpoint del ciclo cellulare, garantendo così sia l'amplificazione del genoma virale sia la sopravvivenza della cellula infetta. Altre attività di E7 ad alto rischio sono l'induzione di instabilità genomica e l'accumulo di anomalie cromosomiche, che favoriscono la trasformazione delle cellule epiteliali (Fig. 1.3).

Sia E6 che E7 possono influenzare l'espressione genica cellulare e virale modulando la metilazione del DNA e inducendo modificazioni istoniche. Ad esempio, E6 ed E7 di HPV16 upregolano la demetilasi dell'istone KDM2B tramite soppressione dell'espressione di miR-146a-5p.¹¹ Infine, un evento importante nella cancerogenesi mediata da HPV è l'integrazione del genoma di HPV nei cromosomi della cellula ospite. Questo in genere porta all'inattivazione di E2, che è il principale inibitore dell'espressione di E6 ed E7, e alla inattivazione o alterazione dei geni dell'ospite a causa della mutagenesi inserzionale.¹²

FIG. 1.3. Struttura del dimero della proteina E7 di HPV16 (PDB: 2B9D). Sono indicati i bersagli molecolari e le funzioni di HPV16 E7.



EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DELL'OSPITE DA PARTE DEGLI HPV AD ALTO RISCHIO

Sebbene l'infezione da HPV ad alto rischio sia piuttosto comune e circa l'80% delle donne venga infettato in qualche momento della loro vita, l'insorgenza del cancro cervicale è un evento raro. Infatti, la maggior parte delle infezioni viene eliminata dalla risposta immunitaria cellulo-mediata, per cui il virus non persiste abbastanza a lungo da consentire la trasformazione cellulare. A questo proposito, è stato dimostrato che l'infezione da HPV16 persiste più a lungo rispetto alla maggior parte degli altri tipi di HPV ad alto rischio, e questa caratteristica potrebbe contribuire alla maggiore attività cancerogena di questo ceppo virale.¹³

L'evasione della risposta immunitaria dell'ospite da parte dei tipi di HPV ad alto rischio è un meccanismo chiave che promuove la persistenza virale e la progressione tumorale. Una strategia sviluppata dagli HPV per evitare il rilevamento da parte della risposta immunitaria innata e adattativa è il ciclo di replicazione virale esclusivamente intraepiteliale e non litico, senza viremia né infiammazione, che impedisce l'attivazione e il reclutamento delle cellule presentanti l'antigene nel sito di infezione. Altri meccanismi di evasione immunitaria dell'HPV dall'attività di E6 ed E7 includono la regolazione negativa della risposta interferonica, l'inibizione delle cellule di Langerhans, l'inibizione delle molecole di adesione come il CDH1 e la modulazione delle vie di segnalazione intracellulari.

Bibliografia

1. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens — part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321–2.
2. Mirabello L, Yeager M, Cullen M, *et al.* HPV16 sublineage associations with histology-specific cancer risk using HPV whole-genome sequences in 3200 women. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djw100.
3. Lavezzo E, Masi G, Toppo S, *et al.* Characterization of intra-type variants of oncogenic human papillomaviruses by next-generation deep sequencing of the E6/E7 region. *Viruses* 2016;8:79.
4. Doorbar J, Quint W, Banks L, *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30(Suppl. 5):F55–F70.
5. Schwartz S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology* 2013;445:187–96.
6. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, *et al.* Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000318.
7. Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:681–92.
8. Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:239–51.
9. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2017;772:23–35.
10. Banks L, Pim D, Thomas M. Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:877–86.
11. Peta E, Sinigaglia A, Masi G, *et al.* HPV16 E6 and E7 upregulate the histone lysine demethylase KDM2B through the c-MYC/miR-146a-5p axis. *Oncogene* 2018;37:1654–68.
12. Groves IJ, Coleman N. Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us? *J Pathol* 2018;245:9–18.
13. Koshiol JE, Schroeder JC, Jamieson DJ, *et al.* Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Cancer* 2006;119:1623–9.

Epidemiologia dell'infezione da HPV

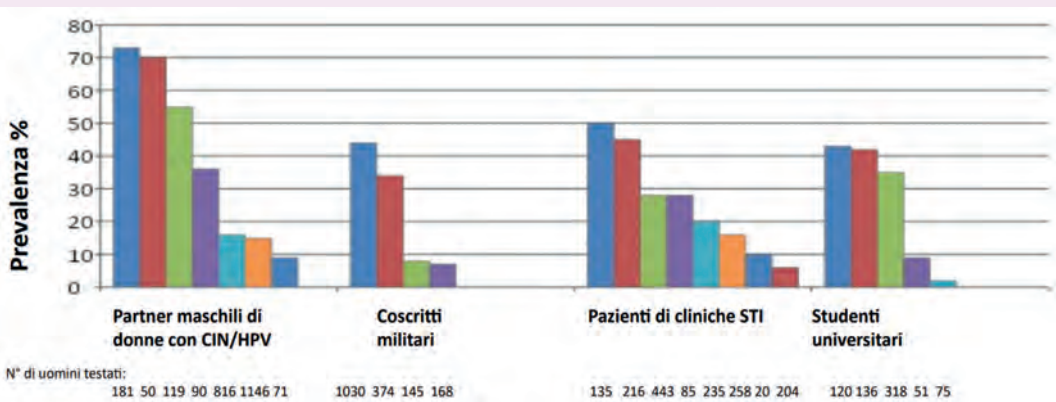
Anna Maria Cattelan, Eleonora Vania

Il Papillomavirus umano (*Human Papillomavirus*, HPV) è un'infezione sessualmente trasmessa con alta prevalenza, ed è diventata una importante causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo, con un'incidenza stimata di 6,2 milioni di nuovi casi all'anno.¹ A livello globale, si stima che ogni anno 625.600 donne e 69.400 uomini contraggano un cancro correlato all'HPV.² L'HPV infetta sia gli uomini che le donne e, come tutte le infezioni sessualmente trasmesse, è principalmente acquisito nei primi dieci anni di attività sessuale, tipicamente tra i 15 e i 25 anni di età nella maggior parte dei paesi occidentali; si stima un'incidenza di HPV del 40-60% entro i primi due anni dall'inizio dei rapporti sessuali. In ogni caso, l'infezione da HPV può avvenire in ogni momento della vita e, virtualmente, tutti gli adulti sessualmente attivi potrebbero esserne a rischio. L'infezione può rimanere latente e riapparire in alcune circostanze come la tarda età o l'immunosoppressione.³

Ad oggi sono stati identificati più di 200 genotipi di HPV, e circa 40 di essi mostrano un tropismo specifico per la regione anogenitale.⁴ Più specificamente, 12 genotipi (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), conosciuti anche come genotipi ad alto rischio (*High-risk*, HR), sono stati classificati come oncogeni per il genere umano in accordo con l'Agenzia per la Ricerca sul Cancro; i genotipi definiti invece a basso rischio (*Low-Risk*, LR), includono HPV6 e HPV11, che generalmente causano malattie benigne come i condilomi genitali⁵ (Fig. 2.1).

Le infezioni da HPV sono primariamente contratte attraverso il contatto diretto della pelle o delle mucose con una lesione infetta. L'HPV genitale è in gran parte trasmesso attraverso i rap-

FIG. 2.1. Prevalenza dell'HPV in uomini di diverse popolazioni.



Ogni barra rappresenta uno studio.

CIN: neoplasia intraepiteliale; STI: Infezioni Trasmesse Sessualmente.

Fonte dei dati: adattato da Dunne EF, *et al.*⁷

TAB. 2.I. Classificazione dei genotipi di HPV, delle modalità di trasmissione, e delle principali condizioni cliniche associate secondo l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC).

Human Papillomavirus (HPV)	Trasmissione	Condizioni cliniche associate
HPV ad alto rischio HPV 16, 18, 45, 31	Sessuale	Cancro cervicale, anale, penieno, vulvare, orofaringeo e lesioni precursori associate
Probabili carcinogeni HPV 68	Sessuale	Cancro cervicale
Possibili carcinogeni HPV 5, 8	Contatto non sessuale	Epidermodisplasia verruciforme
Possibili carcinogeni HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97	Non chiara	Incerte
Gruppo a basso rischio HPV 6, 11	Sessuale/mamma-bambino (alla nascita)	Condilomi anogenitali, PPR ad esordio giovanile*, PPR a esordio nell'adulto*

*PPR: papillomatosi respiratoria ricorrente.

porti sessuali, prevalentemente rapporti anali insertivi tra uomini, anche se ulteriori possibili vie di trasmissione sono i rapporti non penetrativi genitali, oro-genitali, e manuali-genitali. Come altre infezioni batteriche e virali sessualmente trasmesse (ad es: *HIV*, *epatite B*, *HSV-2*, *Chlamydia tracomatis*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae*), l'HPV può anche essere trasmesso al feto durante la gravidanza o al momento del parto. Un'altra possibile fonte di infezione è la trasmissione indiretta tramite i fomite contaminati da HPV (ad es: vestiti, lenzuola, asciugamani, oggetti); in ogni caso, questo ruolo nell'indurre infezioni attive non è ancora chiaro.³

Anche se la ricerca sull'HPV si è storicamente focalizzata sulle donne, negli ultimi due decenni si è sviluppato un interesse crescente per il ruolo dell'HPV negli uomini. Quasi un uomo su tre nel mondo è infetto da almeno un tipo di HPV genitale e circa un uomo su cinque è infetto da uno o più tipi di HR-HPV.⁶ Nel sesso maschile, l'HPV è responsabile di diverse condizioni, inclusi i condilomi acuminati (chiamati anche condilomi genitali) e, nel caso di infezione persistente con genotipi ad alto rischio, questa è associata con il carcinoma anale, orale (lingua e tonsille) e del pene.^{4,7} Tuttavia, nel 90% dei casi l'organismo controlla da solo l'infezione da HPV, che decorre spesso asintomatica e scompare senza interventi, ostacolando una corretta stima della prevalenza.

Sono stati condotti diversi studi in tutto il mondo sull'epidemiologia dell'HPV e sulle sue proprietà oncogene correlate ai vari genotipi (Tab. 2.I). In una delle prime revisioni sistematiche di 40 studi pubblicati tra il 1990 e il 2006, la prevalenza delle infezioni sintomatiche in vari gruppi di uomini era del 1,3-72,9% con una prevalenza complessiva di HPV >20% in 15 studi.⁸ La Figura 2.1 mostra la prevalenza dei diversi HPV all'interno e tra le diverse popolazioni. Questo ampio intervallo di prevalenza variava in base ai tipi di campionamento e metodi di elaborazione, ai siti anatomici, ai campioni raccolti e alla popolazione studiata.

La maggior parte degli studi inclusi in tali revisioni valutavano campioni raccolti dal glande, dalla corona, dal prepuzio, dallo scroto e dall'asta del pene; solo pochi studi avevano valutato l'area perianale, anale o rettale, dove è stata riscontrata una prevalenza dello 0-32,8%. In aggiunta, il campionamento da glande, corona, prepuzio ed asta del pene sembra avere diversi vantaggi in termini di rilevamento di un adeguato DNA di HPV, di semplicità e di praticità di raccolta; gli autori suggeriscono che il prepuzio, quando presente, è probabilmente il miglior sito singolo per il rilevamento del DNA di HPV.⁸