

Impiego di campioni paraffinati di lesioni cancerose della cervice uterina nella genotipizzazione di HPV

C.M. COSTANZO^{1,3}, V. RAPISARDA², G. ZARBO², R. RUSSO^{1,3}, D. ZAPPALÀ^{1,3},
C.I. PALERMO^{1,3}, C. FRANCHINA^{1,3}, G. SCALIA^{1,3}

RIASSUNTO: Impiego di campioni paraffinati di lesioni cancerose della cervice uterina nella genotipizzazione di HPV.

C.M. COSTANZO, V. RAPISARDA, G. ZARBO, R. RUSSO, D. ZAPPALÀ,
C.I. PALERMO, C. FRANCHINA, G. SCALIA

Nello studio del carcinoma della cervice uterina molta rilevanza assumono i papillomavirus umani quali agenti eziologici. Programmi di screening mediante citologia cervicale (Pap test o test di Papanicolau) hanno consentito una drastica riduzione dell'incidenza del cancro alla cervice, grazie soprattutto alla semplicità di prelievo ed al basso costo dell'indagine che consente di lavorare su grandi numeri ed in tempi brevi; tuttavia questo test ha una sensibilità e una specificità limitata, specialmente in casi di basso grado di lesione (low grade). L'uso della biologia molecolare nello studio delle lesioni neoplastiche di vario grado fornisce l'opportunità per una più accurata diagnosi di infezione da HPV. In questo studio sono stati eseguiti test di genotipizzazione in campioni biotipici ottenuti da pazienti affette da carcinoma in situ o carcinoma invasivo. I risultati confermano il ruolo predominante di HPV 16 così come descritto in letteratura internazionale ma appare evidente che il genotipo 18 nella nostra area geografica non ha la rilevanza che viene descritta in altre nazioni. L'impiego di campioni di tessuto fissati e paraffinati, inoltre, offre l'opportunità di compiere indagini retrospettive che possono consentire una più approfondita conoscenza dell'andamento epidemiologico di HPV e del suo effettivo ruolo nella genesi del carcinoma della cervice uterina.

SUMMARY: Use of paraffin wax embedded biopsies from cervix carcinoma for HPV genotyping.

C.M. COSTANZO, V. RAPISARDA, G. ZARBO, R. RUSSO, D. ZAPPALÀ,
C.I. PALERMO, C. FRANCHINA, G. SCALIA

In the study of the uterine cervix carcinoma the virus HPV, considered as etiological agents, have a real importance. Screening programs by cervical cytology (Pap test or Papanicolau test) have caused a drastic reduction in the incidence of cervix carcinoma. This was particularly due to the simplicity of the sampling and the low cost of the method, thus making it possible to work on large number of specimens in a short period of time. Nevertheless, this test has both a limited sensibility and peculiarity, especially when there is a low grade injury. The use of molecular biology in the study of both pre-cancerous injuries and cancerous ones gives the opportunity for a more careful diagnosis of HPV infection. In this study, genotyping for HPV was carried out in biopsies taken from patients affected with carcinoma in situ or invasive carcinoma. The results obtained confirm the predominant role of HPV 16 as described in literature; but in our geographic area, the genotype 18 does not have as much relevance as in other nations. Moreover, the use of samples of paraffin wax embedded tissues offers the opportunity of doing retrospective researches that can give the opportunity for a deeper knowledge of the epidemiological course of the HPV and its role in cervix carcinoma.

KEY WORDS: Genotipizzazione di HPV - Biopsia - DNA - Carcinoma - Cervice.
HPV genotyping - Biopsy - DNA - Carcinoma - Cervix.

Introduzione

I Papillomavirus umani (HPV) sono virus a DNA dei quali, a tutt'oggi, sono stati identificati più di 100 ge-

notipi, distinti in alto rischio (HR-HPV) e basso rischio (LR-HPV) di trasformazione neoplastica. Circa un terzo degli HPV è associato a patologie benigne o maligne del tratto anogenitale. L'infezione da HPV è estremamente diffusa nella popolazione, si stima infatti che oltre il 75% delle donne sessualmente attive si infetti nel corso della vita con almeno un HPV (11). Molteplici possono essere i fattori di rischio di contrarre l'infezione da HPV ed i più rilevanti appaiono essere i rapporti sessuali in giovane età, l'elevato numero di partner sessuali, o i rapporti con soggetti che abbiano avuto precedentemente numerosi partner (9). Tuttavia, è necessario tenere pre-

¹ Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche
Università degli Studi di Catania
² U.O. Ginecologia ed Ostetricia
³ U.O. Virologia Clinica
Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele
P.O. "G. Rodolico", Catania

sente che non tutte le donne con infezione da HPV svilupperanno neoplasia; infatti, è alto il numero di donne positive al virus, durante la propria vita riproduttiva, ma solo in alcune di esse si avrà una evoluzione patologica. Per lo sviluppo della patologia, inoltre, devono entrare in gioco elementi noti come “co-carcinogeni” (5) che possano favorire la progressione dell’infezione in senso maligno; tra questi sono frequentemente riportati il fumo (5) di sigaretta, l’uso a lungo termine di contraccettivi orali, la co-infezione con altri germi (2). È ben noto il coinvolgimento dell’HPV nella genesi del carcinoma della vagina, della vulva, dell’ano, del pene, dello scroto e dell’uretra. Tra questi il cancro della cervice è quello con maggiore prevalenza e costituisce la seconda causa di morte per cancro nel mondo dopo il carcinoma della mammella (8). In Italia, i dati dei registri nazionali tumori mostrano che ogni anno vengono diagnosticati circa 3.500 nuovi casi di carcinoma della cervice (pari a una stima di incidenza annuale di 10 casi ogni 100.000 donne). La stessa fonte indica in circa 1000 il numero di donne morte per questa causa nel quinquennio 1998-2002 (1). Nel corso della vita, il rischio di una diagnosi di tumore della cervice è del 6,2 per mille (1 caso ogni 163 donne), mentre la letalità è del 0,8 per mille. Inoltre, sia l’incidenza sia la mortalità mostrano una tendenza alla riduzione nel corso degli ultimi anni (6). Per quanto riguarda la prevalenza dell’infezione da HPV in Italia, i dati disponibili su donne di età compresa tra 17 e 70 anni, che afferiscono a controlli ginecologici di routine o a programmi di screening (pap-test), mostrano una prevalenza del 7-16% (4, 10, 12). Nelle donne con diagnosi di citologia anormale la prevalenza sale invece al 35% per arrivare al 96% in caso di diagnosi di displasia severa o oltre (Cin2+) (4). In questo studio è stata svolta un’indagine retrospettiva per valutare l’incidenza dei vari genotipi di HPV in biopsie della cervice in casi di carcinoma *in situ* o di carcinoma invasivo.

Materiali e metodi

Sono state analizzate 66 biopsie della cervice uterina provenienti da donne di età compresa tra i 26 ed i 59 anni (media 39,9, mediana 38). Venivano utilizzate sezioni di 10 mm di tessuto incluso in paraffina provenienti da conizzazione o da pezzi operatori di casi di carcinoma della cervice uterina. Dei 66 campioni, 48 derivavano da conizzazioni a seguito di una diagnosi di CIN 3, mentre i restanti 18 erano ottenuti da pezzi operatori dopo diagnosi di Ca invasivo. L’estrazione del DNA, preceduta dalla “deparaffinazione” del campione, e la successiva amplificazione dell’acido nucleico per HPV venivano eseguite mediante l’impiego di kit AlphaStrip II HPV (Alphagenics – Diaco Biotechnologies S.r.l., Trieste, Italia). Il kit è in grado di tipizzare i genotipi ad alto rischio 16,

TABELLA 1 - DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI DI HPV IN CARCINOMA DELLA CERVICE.

Patologia	n.	HPV +	%
Ca in situ	48	39	81,2
Ca invasivo	18	15	83,3
Totale	66	54	81,8

18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. Il bersaglio di amplificazione si trova sulla regione L1. I prodotti di amplificazione venivano valutati a seguito di corsa elettroforetica ed i campioni positivi venivano sottoposti ad ibridazione inversa per la tipizzazione genica.

Risultati

Nella Tabella 1 sono esposti i risultati ottenuti. In particolare, 39 (81,2%) delle 48 conizzazioni risultavano positive ad un genotipo HR e di queste una presentava un’infezione multipla in cui erano presenti i genotipi 16 e 58. Le altre 38 evidenziavano la sporadica presenza dei genotipi 6, 31, 33, 73 ed 82, mentre i genotipi più rappresentati erano il 16 (53,8% di tutti i genotipi) ed il 18 (7,7% dei positivi). Le restanti 9 erano negative al DNA di HPV. Quindici (83,3%) dei 18 casi di carcinoma invasivo erano positivi solo ai due genotipi più comunemente riscontrati in questi casi: 16 (80,0% dei positivi) e 18 (20,0%). I casi in cui non si rilevava la presenza di DNA di HPV erano solo 3 (16,7%).

Discussione

Le lesioni da HPV possono presentarsi a qualsiasi età a partire dal secondo decennio di vita, fino alla tarda età, con un picco di incidenza che si sposta sempre più verso l’età giovanile: dai 40-45 anni nei casi di carcinoma, ai circa 30 anni per le lesioni precancerose di alto grado (CIN 3). Questo spostamento del picco verso un’età di insorgenza sempre minore, può essere spiegato combinando due dati di fatto: in primo luogo il sempre più precoce inizio dell’attività sessuale e quindi la maggiore probabilità di infezione precoce con HPV; in secondo luogo, la maggiore consapevolezza della donna e la capillare proposta dei programmi di prevenzione, che hanno condotto ad un più frequente uso dello screening citologico riducendo la frequenza di neoplasie di grado elevato, ed evidenziando precocemente le lesioni precancerose. Tuttavia la maggior parte (70-90%) delle infezioni da papillomavirus è transitoria, in quanto il virus viene eliminato dal sistema immunitario prima che possa sviluppare un effetto patogeno (12); di fatto la storia naturale dell’infezione è fortemente condizionata dall’equilibrio che si instaura fra ospite ed agen-

te infettante e, da qui, scaturiscono tre possibilità di evoluzione dell'infezione da HPV: regressione, persistenza e progressione. Studi longitudinali hanno permesso di stabilire che il DNA di HPV si ritrova in più del 90% dei carcinomi e che la sua persistenza è necessaria per lo sviluppo del cancro della cervice uterina (13). La recente diffusione di tecniche biomolecolari volte alla rilevazione di acido nucleico di HPV nei casi di alterazione citologica, ha evidenziato una rilevante incidenza di HPV in tamponi eso-endocervicali. La mera rilevazione di acido nucleico di HPV in assenza di una tipizzazione genica, però, non fornisce un adeguato avanzamento diagnostico che permetta l'applicazione di un corretto ed oculato follow-up della paziente. In ogni caso, come detto, la presenza di HPV sia pure HR, non comporta necessariamente l'evoluzione in carcinoma. Certamente, però, deve essere tenuta in considerazione la potenzialità oncogena di HPV. Quindi il reperimento del DNA di HR-HPV deve indurre un controllo ginecologico più serrato anche nei casi di displasia di basso grado. Questo studio è stato intrapreso per valutare le potenzialità delle tecniche dei test di biologia molecolare volti alla genotipizzazione di HPV nello studio retrospettivo di casi di carcinoma in situ o di carcinomi invasivi. I risultati ottenuti hanno dimostrato una percentuale di positività del 81,8%, comparabile alla prevalenza descritta dalla letteratura internazionale (14). In

questo studio il genotipo 16 è il più comune sia nei casi di carcinoma *in situ* (53,8%) sia in quelli di carcinoma invasivo (80,0%). Per ciò che attiene al genotipo 18, per quanto sia più frequente rispetto agli altri genotipi, non raggiunge i livelli descritti in altri Paesi: ciò appare in linea con quanto riportato dai dati epidemiologici italiani (3, 7). Appare di rilievo, inoltre, l'osservazione che, mentre nei casi di carcinoma invasivo gli unici genotipi evidenziabili erano il 16 ed il 18, nei casi di carcinoma in situ si reperiscono numerosi genotipi diversi, tutti definiti ad alto rischio.

Conclusioni

Pur non essendo da considerarsi routinario l'impiego di tecniche di genotipizzazione in campioni di tessuto inclusi in paraffina dopo conizzazione o biopsia da pezzo operatorio, l'utilizzo di tali metodiche può consentire un più approfondito studio del ruolo dei vari genotipi nell'insorgenza di patologie neoplastiche di alto grado. Ciò potrebbe avere un importante significato dal punto di vista epidemiologico e diagnostico-terapeutico. Potrebbe essere possibile, infatti, valutare eventuali variazioni della prevalenza dei genotipi nella popolazione anche in rapporto ai vari stadi evolutivi della patologia.

Bibliografia

1. AIRT Working Group. *I tumori in Italia-Rapporto 2006. Incidenza, mortalità e stime*. Epidemiologia e prevenzione 2006; (1) S: 64-65.
2. Ault KA. *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract*. Infect Dis Obstet Gynecol 2006; 2006 suppl 40470. 1-5.
3. Capra G, Giovannelli L, Bellavia C, Migliore MC, Caleca MP, Perino A, Ammatuna P. *HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy*. Virus Res. 2008; 133: 195-200.
4. Carozzi EM, Confortini M, Cecchini S et al. *Triage with Human Papillomavirus testing of women with cytologic abnormalities prompting referral for colposcopy assessment*. Cancer 2005; 105:2-7.
5. Feldman JG, Chirgwin K, Dehovitz JA, Minkoff H. *The association of smoking and risk of condyloma acuminatum in women*. Obstet Gynecol 1997;89:346-50.
6. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globcan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC CancerBase No 5, version 2.0*. Lyon: IARC Press; 2004.
7. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. *Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0*. IARC CancerBase, vol. 5. Lyon: IARC Press 2001.
8. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ, Franco EL, et al. *Advances in prevention of cervical cancer and other Human Papillomavirus-related diseases*. Ped Infect Dis J 2006; 25:S65-81.
9. Kataja V, Syrjanen S, Yliskoski M et al. *Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study*. Am J Epidemiol 1993;138:735-45
10. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Bezamer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. *Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear*. Lancet 2001;358, 1782-1783 Woodman CB, Collins S, Winter H et al. *Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study*. Lancet 2001;357:1831-613.
11. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.
12. Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, Snijders JFP, Gillio-Tos A, Meijer CJLM, Merletti F, Franceschi S. *Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy*. European Journal of Cancer 41, 297-305.
13. Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E et al. *Direct Sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy*. Microbes and Infection 2006 (in corso di stampa).
14. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol 1999; 189:112-119.