

Titolo del progetto

Ricerca HPV nel cavo orale dei pazienti e partner di pazienti affetti da condilomi genitali: valutazione di fattori di rischio, test di screening, correlazione genotipica e con meccanismi di regolazione dell'espressione dei MiRNA.

Stato dell'arte

L'infezione da papillomavirus umano (HPV) è la malattia sessualmente trasmessa (MST) più frequente. A livello genitale è responsabile dell'insorgenza dei condilomi acuminati, lesioni iperproliferative di natura benigna, ma numerosi sierotipi di HPV hanno capacità di provocare lesioni tumorali. Queste classicamente sono neoplasie anogenitali quali tumore della cervice, vaginale, vulvare, del pene e anale.

Il genoma di HPV comprende geni precoci e tardivi (early e late) che codificano per proteine precoci (E1-E7) e tardive (L1-L2). Queste ultime sono proteine che costituiscono il capsido virale, mentre le proteine precoci sono coinvolte nella trascrizione del genoma e nella trasformazione tumorale delle cellule dell'ospite (E6 e E7).

Risulta importante il ruolo che HPV riveste nell'insorgenza di tumori orofaringei in particolare quelli che insorgono a livello tonsillare e nella base della lingua. Studi epidemiologici e molecolari hanno identificato HPV-16, e meno comunemente altri sierotipi quali HPV-18, 31 o 33, quali agenti causali in diversi pazienti affetti da carcinomi squamocellulari oro-faringei. Anche il profilo molecolare dei tumori della testa e collo HPV-positivi risulta differente rispetto a quelli HPV-negativi. In questi ultimi è molto frequente la mutazione di p53, elevati livelli di pRB e ridotti livelli di p16; quelli HPV-positivi sono associati ad una p53 wild-type, downregulation di pRB e sovraespressione di p16.

L'incidenza degli SCC tonsillari HPV-indotti sta aumentando in tutto il mondo, ed essi rappresentano una entità tumorale a se stante con caratteristiche epidemiologiche e fattori di rischio ben identificabili e una migliore prognosi dovuta ad una migliore risposta alla terapia (1).

Da un punto di vista epidemiologico, mentre vi è stato un decremento dell'incidenza dei tumori laringei, ipofaringei e della cavità orale legati ad una riduzione del fumo (principale fattore di

rischio di queste neoplasie), l'incidenza dei tumori orofaringei è rimasta costante con un trend in ascesa. Questo è stato correlato, da diversi studi, al ruolo svolto da HPV, in particolare HPV-16.

Più del 50% dei casi di queste neoplasie è correlata al ruolo oncogeno di HPV, con una maggiore incidenza negli uomini giovani adulti. Infatti questo tipo di tumore mostra una distribuzione bimodale nell'incidenza, con due picchi, uno intorno ai 30 anni e l'altro intorno ai 50 anni. Il tempo tra esposizione ad HPV ed insorgenza del tumore non è noto, ma probabilmente supera i 10 anni. La presenza di HPV-16 nella cavità orale è stata associata al successivo sviluppo di carcinomi orofaringei (2).

I dati pubblicati su studi che valutavano esclusivamente la trasmissione dal cavo orale di un paziente all'altro (3) non hanno evidenziato una maggiore incidenza di HPV nei partner sessuali stabili dei pazienti affetti da carcinoma orofaringeo HPV correlato. Questo suggerisce che i partner eliminano HPV dopo essere stati esposti, ed altri fattori possono giocare un ruolo nell'insorgenza del tumore.

E' stato riscontrato un maggior rischio di contrarre infezioni genitali da HPV in uomini le cui partner avevano infezioni cervicali da HPV, tuttavia la trasmissione di HPV a livello orale in uomini le cui partner erano positive per HPV genitale è risultata bassa e senza concordanza del tipo di HPV. Allo stesso modo la prevalenza di HPV orale in donne con displasia HPV correlata della cervice uterina è basso (4).

Parrebbe esserci dunque una bassa possibilità di trasmissione di HPV con contatti orali-oral e genitale(vulvari)-oral, mentre il rischio risulterebbe aumentato per contatti genitali(vaginali)-genitali.

I Micro (mi)RNAs, piccole molecole di RNA a singola elica non codificante della lunghezza di 21-25 nucleotidi, sono coinvolti nella trasduzione del segnale, apoptosi, progressione del ciclo cellulare etc e sono, inoltre, capaci di interferire con la trascrizione legandosi al mRNA. Il silenziamento può avvenire sia tramite degradazione dell'mRNA sia tramite blocco della traduzione. Queste due modalità dipendono dall'affinità del miRNA verso l'mRNA. È stato dimostrato che se c'è sovrapposizione completa tra il miRNA e il messaggero bersaglio, la proteina Ago2 può tagliare l'mRNA e portare alla sua degradazione. Se invece non c'è una sovrapposizione completa il silenziamento avviene tramite blocco della traduzione. A seconda del tipo di mRNA a cui si legano, i miRNA possono fungere da oncosoppressori o oncogeni (5).

E' noto che tumori correlati ad infezioni virali sono caratterizzati da specifici miRNA pattern, presenti sia nel genoma virale che nell'ospite. In particolare, tumori indotti dal papillomavirus umano (HPV), come ad esempio quello anogenitale e cervicale, così come un sottotipo di carcinomi squamocellulari testa e collo (HNSCC) sono caratterizzati da specifici miRNA-pattern. È interessante notare come i miRNA pattern dei carcinomi squamocellulari della testa e collo HPV-positivi e carcinomi della cervice HPV-positivi mostrino una similarità maggiore rispetto ai miRNA pattern presenti negli spinocellulari testa e collo HPV positivi e negativi (6).

L'isolamento dei miRNA è possibile da prelievo di materiale (condilomi o cito-brush del cavo orale) ma, grazie alla elevata stabilità che essi hanno nei fluidi corporei, anche da campioni sia freschi che archiviati di saliva. È stato rilevato che, determinati subset di miRNA salivari, potevano discriminare gruppi di controllo da gruppi di pazienti affetti da carcinomi squamocellulari testa e collo HPV-positivi, altri subset differenziavano i controlli da SCC testa e collo HPV-negativi e altri ancora differenziavano SCC testa e collo HPV-negativi e HPV-positivi (7).

Descrizione dettagliata del progetto: metodologie, obiettivi e risultati che il progetto si propone di raggiungere e loro interesse per l'avanzamento della conoscenza

Lo scopo dello studio è valutare la potenziale trasmissione di HPV da lesioni genitali mucose sia maschili che femminili verso il cavo orale, sia del paziente affetto da condilomi, dunque per autoinoculazione, sia del partner, dunque per contatto genitale-orale.

Dal materiale prelevato (lesioni genitali e campioni cito-brush sedi orofaringee) sia dei pazienti che dei partner, ci si propone di effettuare la sierotipizzazione di HPV, per valutare la concordanza dei genotipi presenti nelle diverse sedi.

In caso di positività per HPV nel cito-brush del cavo orale, lo screening verrà ampliato con la ricerca di HPV nella saliva dei pazienti, così da valutare un possibile metodo di screening per HPV nel cavo orale veloce e non invasivo.

Ci si propone inoltre la valutazione dei miRNA nelle lesioni genitali, nella saliva e nel brush citologico effettuato, per rilevarne la concordanza.

Il progetto, articolato in 6 fasi, nell'arco di tempo di 36 mesi onnicomprensivi dell'analisi dei dati e stesura del lavoro, vedrà la collaborazione di più figure professionali: dermatologi, otorinolaringoiatri, epidemiologi, patologi e virologi.

Disegno dello studio

Verranno arruolati nello studio tutti i pazienti consecutivi affetti da condilomi che afferiranno all'ambulatorio dedicato alle MST attivo presso la Clinica Dermatologica dell'AOU di Sassari in un periodo di 10 mesi. Stimata l'affluenza di pazienti affetti da condilomi presso l'ambulatorio dedicato alle MST di 2 nuovi casi a settimana, nell'arco di tempo sopra indicato si prevede di arruolare circa 80 pazienti. Verranno successivamente arruolati i partner dei pazienti i cui condilomi genitali siano stati accertati istologicamente.

Criteri di inclusione:

- Uomini e donne con un'età superiore a 16 anni.
- Pazienti con lesioni clinicamente indicative di condilomi genitali.
- Partner dei pazienti con condilomi genitali accertati istologicamente.
- Pazienti in grado di fornire consenso informato alla partecipazione allo studio.
- Per i pazienti minorenni il consenso informato dovrà essere fornito da entrambi i genitori o il tutore legale.

Criteri di esclusione:

- Diniego del consenso al trattamento dati /partecipazione allo studio

Autorizzazione del Comitato Etico

Fase 1 (10 mesi)

Acquisito il consenso alla partecipazione alla ricerca da parte del paziente o del tutore legale in caso di minore, ad ogni paziente arruolato, saranno somministrati due questionari sui dati anagrafici e anamnestici e sulle abitudini di vita ed eventuali fattori di rischio per la trasmissione e persistenza di HPV nel cavo orale. La diagnosi clinica di condiloma genitale sarà confermata istologicamente e sul campione prelevato sarà eseguita la PCR per genotipizzazione HPV.

I dati ricavati dalla compilazione dei questionari, saranno conservati in forma cartacea anonima e identificati attraverso una numerazione in ordine crescente dal Dr. Biondi. La chiave di decrittazione sarà contenuta in una apposita cartella, che sarà custodita in un armadio ignifugo e protetto da chiusura con chiave. Saranno responsabili della custodia la Prof. Montesu e la Prof. Satta e l'accesso ai dati sarà consentito esclusivamente al Dr. Biondi e alle prof. Montesu e Satta.

I campioni biologici verranno raccolti dal Dr. Biondi ed inviati al laboratorio di Igiene e al laboratorio di Anatomia Patologica secondo le consuete procedure aziendali, così da essere analizzati e ottenere la relativa refertazione.

L'analisi genotipica e gli esiti istologici saranno quindi pseudoanonimizzati così da poter essere utilizzati per gli scopi della ricerca.

Fase 2 (6-12 mesi)

Esame clinico della mucosa oro-faringea, allo scopo di evidenziare eventuali lesioni cliniche, cito brush da aree ad alto rischio di insorgenza di carcinoma spinocellulare (tonsille, base della lingua e ugola) e acquisizione di un campione di saliva per la ricerca e genotipizzazione di HPV attraverso PCR.

Fase 3 (12-18 mesi)

Arruolamento dei partner dei pazienti con lesioni genitali positive per HPV.

I partner, che daranno il consenso alla ricerca, saranno sottoposti a somministrazione dei questionari, a visita clinica per la ricerca di lesioni genitali e orofaringee e a prelievo, mediante cito brush orale e raccolta di saliva per l'esecuzione della PCR e genotipizzazione HPV.

Fase 4 (3 mesi)

Nei pazienti positivi per HPV al cavo orale, si predisporrà la ricerca miRNA nei condilomi genitali, nella saliva e nel cito brush, attraverso dei miRNA-arrays per identificare gli eventuali miRNA espressi nei differenti campioni.

Fase 5 (2-4 mesi)

Valutazione e analisi dei risultati.

Per la valutazione e l'analisi dei risultati si utilizzeranno i dati pseudoanonimizzati creati al termine della fase 1. Qualunque dato sensibile sarà custodito così come precedentemente descritto nella fase 1.

Fase 6 (2-3 mesi)

Pubblicazione dei dati rilevati.

Nell'ambito dell'articolazione del progetto, i clinici (dermatologi) avranno il compito di selezionare, arruolare e prelevare il materiale da esaminare, supportati dagli otorinolaringoiatri per la raccolta del materiale orale.

La genotipizzazione virale e l'identificazione dei miRNA sarà di pertinenza dei virologi e dei patologi molecolari e i risultati ottenuti saranno analizzati e valutati dagli epidemiologi.

La stretta collaborazione fra le varie figure professionali, coinvolte nel progetto, con funzioni complementari e integrative, garantisce la corretta gestione delle diverse fasi operative.

Risultati attesi e eventuali potenzialità applicative, impatto scientifico e/o tecnologico e/o sociale e/o economico

La prevalente modalità di trasmissione di HPV genitale è tramite rapporti sessuali non protetti, per cui la presenza di HPV a livello del cavo orale può essere correlata a rapporti orali non protetti. Tuttavia alcuni studi non hanno riscontrato concordanza tra pazienti affetti da carcinomi della cervice uterina, HPV genitale e trasmissione di HPV al cavo orale del partner. Sicuramente vi è la possibilità di una clearance di HPV da parte del partner e invece la presenza di fattori locali che ne favoriscono l'attecchimento e la persistenza. Inoltre, alcuni genotipi che trovano un terreno favorevole nella mucosa genitale, potrebbero non trovarlo nella mucosa orale. Va anche considerato che, sebbene le lesioni condilomatose siano generalmente correlate a sierotipi con bassa potenzialità tumorigenica, i pazienti affetti da condilomi genitali hanno una maggiore probabilità di albergare

nella propria mucosa anche sierotipi di HPV ad alto rischio, con la conseguente potenziale trasmissione al proprio cavo orale o a quello del partner.

Date queste premesse, i risultati attesi da questo progetto di ricerca sono:

- Valutare la frequenza di positività di HPV nel cavo orale dei pazienti e dei partner di pazienti affetti da condilomi genitali, senza necessariamente presenza di concordanza genotipica.
- Attraverso l'analisi dei questionari, completati dai soggetti esaminati, ricercare cofattori di rischio (Es: fumo di sigaretta, bevande alcoliche), implicati nel creare un terreno favorevole alla penetrazione e persistenza di HPV nel cavo orale.
- Valutare la concordanza tra i genotipi isolati dal cito brush oro-faringeo e dalla saliva per utilizzare una metodica di screening veloce, non invasiva, da effettuare nelle popolazioni a rischio individuate, su cui applicare i programmi di sensibilizzazione e prevenzione.
- Studio dei subset di miRNA evidenziati nelle lesioni genitali e nel cito brush del cavo orale, con conseguenti rilevanti implicazioni patogenetiche, cliniche, diagnostiche ed eventualmente terapeutiche.

Bibliografia

1. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, E et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100 (6): 407–420.
2. Agalliu I, Gapstur S, Chen Z et al. Associations of Oral α -, β -, and γ -Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol.* 2016; 2(5):599-606.
3. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners *J Clin Oncol.* 2014;32(23):2408.

4. Uken RB, Brummer O, Schubert-Bayer C et al. Oral HPV prevalence in women positive for cervical HPV infection and their sexual partners: a German screening study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 273(7):1933-42
5. Quabius ES, Merz I, Gorogh T et al. miRNA expression in tonsillar squamous cell carcinomas in relation to HPV infection and expression of the antileukoproteinase SLPI. *Papillomavirus Res.* 2017; 4: 26-34.
6. Lajer CB, Garnæs E, Friis-Hansen L, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer, *Br. J. Cancer* . 2012; 106: 1526–1534.
7. Wan Y, Vagenas D, Salazar C et al. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget.* 2017; 8(59): 99990-100001.