



## **Il ruolo del Papillomavirus (HPV) nella patologia neoplastica della laringe**

Matteo Garotta<sup>1</sup>, Antonio Occhini<sup>1</sup>, Giulia Bertino<sup>1</sup>, Patrizia Morbini<sup>2</sup>, Marco Benazzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica Otorinolaringoiatrica e <sup>2</sup>S.C. Anatomia Patologica, Università degli Studi di Pavia,  
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### ***Il ruolo del Papillomavirus (HPV) nella patologia neoplastica della laringe***

I carcinomi a cellule squamose rappresentano la neoplasia più frequente nella regione testa e collo (HNSCC) e la laringe è uno dei siti più frequentemente colpiti. In questo lavoro verranno presentati lo stato dell'arte relativo agli studi sul ruolo dell'infezione da HPV nella genesi del carcinoma laringeo ed i risultati in merito alla prevalenza di tale virus in una serie di campioni di lesioni preneoplastiche e neoplastiche della laringe, raccolti presso l'Unità Operativa Complessa di Otorinolaringoiatria della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia negli ultimi 10 anni.

L'ibridazione inversa, metodica utilizzata per la genotipizzazione dei campioni, con il kit Inno-Lipa per la rilevazione di HPV si è rivelata una metodica molto sensibile, tuttavia di per sé non è in grado di dimostrare il ruolo oncogenetico del virus. Il *gold-standard* per la dimostrazione dell'integrazione virale è rappresentato dalla ricerca dell'mRNA di E6/7, ma non è disponibile in tutte le strutture. La responsabilità di HPV nella genesi delle neoplasie della laringe, ed in generale di tutta la regione testa-collo, non deve comunque essere esclusa in quanto sembrano esistere prove indirette di un suo ruolo nella trasformazione neoplastica.

### ***The role of papillomavirus (HPV) in larynx cancer***

The squamous cell carcinomas are the most frequent cancer in the head and neck region (HNSCC) and the larynx is one of the sites most frequently affected. This work will be presented the state of studies about the role of HPV in the genesis of laryngeal cancer and results on the prevalence of this virus in a series of samples of pre-neoplastic and neoplastic lesions of the larynx, collected from Complex Operative Unit of Otorhinolaryngology at the Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo of Pavia in the last 10 years. The reverse hybridization, a method used for samples genotyping with the Inno-Lipa kits for the detection of HPV has been a very sensitive method, but in itself is not able to demonstrate Oncogenetics role of the virus. The gold standard for demonstrating viral integration is the determination of mRNA of E6/7, but is not available in all laboratories. The responsibility of HPV in the genesis of cancer of the larynx, and in general of all head and neck should not be excluded because there is indirect evidence of a role in neoplastic transformation.

---

## Introduzione

I carcinomi a cellule squamose rappresentano la neoplasia più frequente nella regione testa e collo (HNSCC). La laringe è uno dei siti più frequentemente colpiti, tanto che solo negli Stati Uniti, nel 2008, si stimavano approssimativamente 12000 nuovi casi all'anno e 3670 morti all'anno a causa di tale neoplasia [1].

È noto che il fumo di sigaretta e il consumo di alcool sono i due maggiori fattori di rischio coinvolti nell'eziopatogenesi della patologia neoplastica della laringe, e specialmente quando presenti in combinazione hanno un effetto sinergico [2].

Tuttavia approssimativamente il 5% di tutti i carcinomi laringei si presentano in soggetti non fumatori o bevitori; ciò suggerisce che altri fattori di rischio possano essere responsabili della trasformazione neoplastica delle cellule della mucosa laringea. Uno dei potenziali fattori di rischio è il papillomavirus (HPV), che è stato correlato per la prima volta al carcinoma laringeo 30 anni fa [3]. Fino ad oggi sono stati segnalati più di 100 tipi di HPV, e alcuni di essi sono già stati ampiamente riconosciuti essere in grado di sostenere la trasformazione neoplastica dell'epitelio squamocellulare della regione anogenitale, della cervice uterina, e dell'orofaringe [4].

In questo lavoro verranno presentati lo stato dell'arte relativo agli studi sul ruolo dell'infezione da HPV nella genesi del carcinoma laringeo ed i risultati in merito alla prevalenza di tale virus in una serie di campioni di lesioni preneoplastiche e neoplastiche della laringe, raccolta presso l'Unità Operativa Complessa di Otorinolaringoiatria della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia negli ultimi 10 anni.

### *Stato dell'arte sul ruolo dell'infezione da HPV nelle neoplasie del distretto cervico-cefalico*

La ricerca sul Papillomavirus ha avuto inizio alla fine nel diciannovesimo secolo. I primi studi dimostrarono come fosse possibile la trasmissione intraspecie della verruca canina, bovina e umana tramite l'inoculo di "estratti di verruca" [5]. L'eziologia virale della papillomatosi laringea fu descritta per la prima volta da Ullman, nel 1923: egli inoculò del tessuto proveniente da una neoformazione papillomatosa di un bambino di 6 anni a livello del suo braccio. Dopo tre mesi e mezzo rilevò la comparsa di numerose piccole verruche piane a livello dei siti di inoculazione [6].

La struttura di HPV fu visualizzata tramite microscopia elettronica in verruche umane ed il DNA eliocidale fu identificato nelle preparazioni umane di papillomavirus (HPV) da Crawford LV e Crawford EM nel 1963 [7]. L'esistenza dei tipi differenti di HPV fu stata dimostrata tramite la scoperta che l'RNA complementare del virus della verruca plantare non dava ibridazioni *in situ* positive con tutte le verruche virali o con il DNA del condiloma [8]. Negli anni settanta questa scoperta fu seguita dall'identificazione di molti sottotipi di HPV [9] e dall'isolamento di molti nuovi tipi di HPV [10-11].

Nel 1980 Lack EE dimostrò la presenza di antigeni gene-specifici a livello delle neoformazioni laringee utilizzando la tecnica perossidasi-antiperossidasi (PAP test) [12].

Nel 1983 K. Syrjanen fu il primo a descrivere l'associazione tra HPV e lesioni squamose di vari distretti corporei, inclusa la cavità orale e ad ipotizzare che HPV avrebbe potuto essere responsabile dello sviluppo almeno di alcuni determinati tipi di carcinoma a cellule squamose orali (OSCC) [13].

Durante gli anni seguenti, in letteratura furono pubblicati diversi studi che fornirono un'ulteriore prova quantitativa che l'infezione orale da HPV, in particolare con i genotipi ad alto rischio, potesse costituire un significativo fattore di rischio per lo sviluppo di un OSCC [14-15].

Scheurlen W nel 1986 isolò genotipi ad alto rischio di HPV in carcinomi della laringe [16], Kashima H discusse invece il ruolo di HPV nel carcinoma ex-papilloma concludendo che lo sviluppo del carcinoma da un papilloma preesistente, partiva da una papillomatosi laringea giovanile [17].

Oggi è chiaro che la continua espressione dell'oncogenesi virale da HPV è necessaria per la progressione istopatologica e per lo sviluppo del fenotipo maligno di un tumore del tratto cervico faciale HPV-associato, ma la reale prevalenza globale ed il tipo di distribuzione dell'infezione da HPV sono spesso poco conosciute.

In letteratura esiste infatti un'alta variabilità per quanto riguarda lo studio del rapporto tra l'infezione da HPV e lo sviluppo di tumori squamo cellulari del distretto testa e collo. Questo è dovuto al fatto che le metodiche di campionamento utilizzate nei vari studi (biopsia o *scraping*, fissazione in formalina ed inclusione in paraffina o congelamento del pezzo), così come le tecniche d'analisi del DNA (*Southern blot*, PCR / RT-PCR, ibridazione *in situ*), i *primer* utilizzati (MY9/MY11, GP5/GP6, *primer* genotipo specifici) e il tipo di test per l'identificazione del sierotipo (saggio lineare, sequenziamento diretto, *reverse dot blot*, ecc.), possono influenzare notevolmente i dati ottenuti. I dati della letteratura sono pertanto spesso difficilmente confrontabili perché non esiste attualmente una metodica di analisi ed identificazione di HPV approvata ed adottata universalmente.

Bisogna inoltre ricordare che mentre fino agli anni '90 era possibile identificare solo alcuni sierotipi virali (HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33), dopo gli anni '90 lo sviluppo di nuovi kit ha permesso l'identificazione di altri sierotipi di HPV ad alto e a basso rischio ontogenetico [18-19].

Il lavoro più significativo in merito allo studio sulla prevalenza dell'infezione da HPV nelle neoplasie del distretto cervico-cafalico è senza dubbio la metanalisi di Kreimer e Collaboratori [20]. Gli autori hanno analizzato in maniera sistematica studi pubblicati in letteratura su biopsie di HNSCC che hanno impiegato la metodica PCR per la rilevazione del genotipo HPV per descrivere la prevalenza e la distribuzione dell'HPV nei diversi siti anatomici. Sono stati identificati 60 studi idonei, per un totale di 5.046 campioni tumorali di HNSCC. I risultati hanno mostrato una prevalenza globale di HPV pari al 25.9% con delle variazioni a seconda delle sedi: significativamente più elevata nel SCC orofaringeo (35.6%), rispetto al SCC orale (23.5%) o al SCC laringeo (24.0%). Il sierotipo HPV-16 era presente nella maggior parte dei SCC orofaringei HPV-positivi (86.7%) rispetto a quelli orali (68.2%) e laringei (69.2%). Al contrario, il sierotipo HPV-18 era raro nei SCC orofaringei HPV-positivi (2.8%) rispetto alle altre sedi (34.1% per i SCC orali e 17.0% per i SCC laringei). La prevalenza di HPV nei HNSCC era più elevata negli studi eseguiti nel Nord America rispetto a quelli eseguiti in Europa ed in Asia. Oltre ai sierotipi HPV-16 e HPV-18, gli altri HPV oncogenici sono stati identificati raramente nel HNSCC. L'alta prevalenza di HPV-16 e la mancanza di HPV-18 nei carcinomi orofaringei rispetto agli altri HNSCC può quindi assumere, secondo gli Autori, il significato di un'interazione specifica tra virus e tessuto [20].

Anche la metanalisi di Hobbs e Collaboratori ha ottenuto risultati sovrapponibili: il genoma di HPV è stato osservato in circa il 26% degli HNSCC, soprattutto nei tumori orofaringei (oltre il 50% di positività). Inoltre l'associazione tra sierotipo HPV-16 e tumore era massima per la tonsilla palatina (OR: 15.1), intermedia per l'orofaringe (OR: 4.3) e minore per la cavità orale (OR: 2.0) e la laringe (OR: 2.0) [21].

Infine, una metanalisi pubblicata nel 2008 da Termine N. e Collaboratori ha valutato la prevalenza dell'infezione da HPV nelle biopsie del OSCC *versus* biopsie del NHSCC in studi eseguiti tra il 1988 ed il 2007 in relazione alla metodica di identificazione del DNA virale (PCR e *in situ hybridization* (ISH)), allo scopo di verificare l'influenza di questa variabile [22]. Sono stati identificati ed analizzati 62 studi idonei. La prevalenza globale di HPV DNA nei campioni totali (n = 4852) era del 34.5%, superiore nel OSCC (38.1%) rispetto ai HNSCC non sito-specifici (24.1%). In relazione alla metodica utilizzata, gli studi che hanno impiegato la PCR hanno riferito una prevalenza più alta di quelli che hanno usato la ISH (34.8 *versus* 32.9%) soprattutto nel sottogruppo OSCC (OSCC con PCR: 39.9%) [22].

La presenza di HPV è stata documentata anche nella mucosa normale e nelle lesioni preneoplastiche: sembra infatti esserci una stretta correlazione tra grado di displasia e presenza di HPV, e la probabilità di identificazione dell'HPV nella mucosa orale cresce parallelamente al grado di displasia delle lesioni considerate [23]. Nonostante la difficile confrontabilità dei risultati dei diversi studi, a causa dei problemi metodologici, le meta-analisi hanno permesso di definire alcuni punti fondamentali sulla correlazione tra l'infezione da HPV ed il tumore della testa e del collo, che riguardano soprattutto il carcinoma dell'orofaringe [24-28]:

- L'infezione da HPV è strettamente e significativamente correlata al carcinoma dell'orofaringe, soprattutto della zona tonsillare, con una prevalenza compresa tra il 40 ed il 70% [29].
- I tumori dell'orofaringe HPV-positivi sono clinicamente e molecolarmente distinti da quelli HPV-negativi. Tendono infatti a comparire in soggetti di età più giovane, di solito non fumatori o bevitori e sono caratterizzati da una morfologia di tipo basaloide.

I tumori dell'orofaringe HPV positivi hanno una prognosi più favorevole rispetto a quelli HPV negativi nella maggior parte degli studi. La riduzione del rischio di morte negli OSCC HPV positivi è infatti segnalata tra il 60 e l'80% rispetto agli HPV negativi [30-32]. La causa di questa migliore sopravvivenza non è stata totalmente chiarita tuttavia la migliore risposta alle terapie radianti, la presenza di una maggiore capacità di risposta immune agli agenti virali e l'assenza di "field cancerization" (caratteristica dei tumori in fumatori e bevitori) vengono suggerite come cause principali. [33-35]. Inoltre la capacità di risposta apoptotica è intatta negli OSCC HPV positivi, per preservazione della via apoptotica di p53 dovuta alla presenza di geni p53 *wild type*, che consente una migliore risposta alle radio e chemioterapie [36]. Nei tumori orofaringei HPV associati inoltre è ricorrente la sovraespressione della proteina p16, il livello di proteina p16 in soggetti HPV negativi ma tabagisti e alcolisti risulta al contrario basso [37]. Ne consegue che i tumori orofaringei tabacco alcol associati presentano una ipoespressione p16 e mutazione p53, mentre quelli HPV positivi sono strettamente correlati ai genotipi *wild type* di p53 e Rb1 e a una iperespressione di p16. Tale risultato non tiene tuttavia conto dei casi in cui entrambi i fattori di rischio coesistono.

Altri studi [Fischer e Collaboratori e Lewis e coll.] hanno confermato tali dati e sostengono quindi che p16 possa essere considerato il più forte indicatore prognostico indipendente in OSCC.

Diversa è la situazione per quel che riguarda il carcinoma laringeo. Anche se le *review* suggeriscono un ruolo dei sierotipi ad alto rischio (soprattutto HPV-16 e -18) nella trasformazione maligna delle lesioni laringee, la frequenza di identificazione dell'infezione da HPV in queste forme è estremamente variabile da studio a studio (da 0% a 85%) [38-40].

Kasperbauer e Collaboratori hanno determinato l'incidenza di HPV su un archivio di campioni provenienti da carcinomi verrucosi fissati in formalina ed inclusi in paraffina utilizzando rispettivamente la metodica PCR con HPV *consensus primers* e ibridazione *in situ* per testare la presenza di HPV 6/11, 16/18, 31/33/35. Il DNA di HPV è stato rilevato in 17 campioni dei 20 testati con la PCR (85%); tramite l'ibridazione *in situ* nessun dei 20 campioni era positivo per i sette tipi di HPV testati [35].

Gallo e Collaboratori nel 2009 hanno pubblicato uno studio trasversale con l'obiettivo di verificare il ruolo dell'infezione da HPV e da adenovirus (AdV) nella patogenesi dei carcinomi squamocellulari della laringe e delle lesioni displastiche della laringe. I campioni bioptici sono stati prelevati da 68 pazienti con lesioni benigne e maligne della laringe. Tutti i campioni di tessuto sono stati analizzati per mezzo di PCR con due gruppi di *primer* per HPV e con un paio di *primer* per gli AdV. Tutti i casi di carcinoma e di displasia come pure tutti i casi controllo erano negativi per entrambi i virus. Quattro dei cinque casi di papilloma laringeo erano positivi soltanto per HPV, confermando il ruolo di questi virus nella patogenesi della papillomatosi. L'assenza di genoma virale nei carcinomi laringei così co-

me negli altri casi studiati suggeriva l'esistenza di altri fattori che svolgono un ruolo più importante che l'infezione virale nella carcinogenesi di queste lesioni [36].

Alla luce del fatto che vi sono in letteratura lavori che mostrano risultati del rapporto tra infezione da HPV e SCC laringei, si ritiene comunque che la stima più aderente alla realtà sulla prevalenza dell'infezione da HPV nelle neoplasie della laringe sia quella emersa dalla metanalisi di Kreimer e Collaboratori. In questo studio gli Autori hanno preso in esame i risultati di 35 studi sul carcinoma laringeo che hanno coinvolto 1435 pazienti. Gli Autori riferiscono una frequenza media di infezione da HPV del 24%, causata nel 70% dei casi da HPV-16 [20]. Tuttavia un *bias* di questo lavoro è rappresentato dal fatto che nel gruppo dei carcinomi laringei sono stati inclusi anche quelli ipofaringei e questo potrebbe aver influito in senso positivo o negativo il calcolo della reale frequenza d'infezione. Dal momento che la presenza del virus non comporta necessariamente la sua responsabilità nella genesi del carcinoma laringeo, in letteratura sono stati pubblicati diversi studi che hanno cercato di dimostrare l'integrazione del HPV DNA nel DNA della cellula ospite, che ad oggi è l'unica prova certa del ruolo oncogenico del virus.

Uno studio del gruppo romano di Cattani e Collaboratori ha studiato la correlazione tra l'amplificazione del gene della ciclina 1 (CCND1) e la prevalenza di infezione da HPV in una serie di 75 SCC laringei utilizzando rispettivamente la metodica PCR con HPV *consensus primers* e l'analisi *Southern blot* con una sonda CCND1-specifica. La prevalenza di infezione da HPV era del 29.3%, quasi esclusivamente dovuta ai ceppi virali altamente oncogenici HPV-16, HPV-18 e HPV-33. L'amplificazione del gene CCND1 è stata osservata in 15 dei 75 tumori (20%) ed era significativamente associata all'infezione da HPV ( $P < 0.001$ ). Secondo gli Autori, l'amplificazione del gene CCND1 nei SCC laringei può essere considerato conseguenza dell'instabilità genomica e all'accumulo di mutazioni determinate dai geni oncogeni E6 e E7 del HPV. Queste alterazioni provocherebbero una perturbazione del ciclo cellulare e sarebbero quindi evidenza indiretta dell'integrazione virale [41].

Altri studi hanno focalizzato l'attenzione sulla possibile correlazione tra l'iperespressione della proteina p53 e l'infezione da HPV, ottenendo risultati contrastanti. Da un lato, Ma e Collaboratori hanno mostrato che sebbene la sovra espressione della proteina p53 fosse stata identificata in 35 (58.3%) dei 60 pazienti con carcinoma laringeo e cellule squamose HPV-positivo (prevalenza: 58.8%), non esisteva alcuna correlazione significativa tra infezione da HPV ed iperespressione di p53 in questi soggetti [42]. Al contrario, uno studio pubblicato nel 2002 da Jacob e Collaboratori ha osservato una correlazione staticamente significativa tra tipo di neoplasia laringea e accumulo di p53 ( $P = 0.00000$ ), tra presenza di HPV e accumulo di p53 ( $P = 0.00424$ ) e di espressione di PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*,  $P = 0.00266$ ), evidenziando il fatto che i tumori HPV-positivi mostrano un accumulo significativo di p53 ed un conseguente aumento della proliferazione [43].

Altri lavori hanno valutato la correlazione tra l'infezione da HPV e l'iperespressione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) nel carcinoma laringeo.

Almadori ha dimostrato che, a fronte di una prevalenza di infezione del 35.7% (anche in questo caso quasi esclusiva dei ceppi virali altamente oncogenici HPV-16, HPV-18 e HPV-33), il livello di EGFR era significativamente più elevato nei casi HPV-positivi rispetto a quelli HPV-negativi ( $P = 0.002$ ). Inoltre, l'iperespressione di EGFR è stata osservata in 20 neoplasie laringee su 42 (47.6%) ed era significativamente superiore nei casi con infezione da HPV ( $P = 0.03$ ). Un aumento di espressione e di attivazione di EGFR nei carcinomi a cellule squamose laringei si può verificare anche come conseguenza dell'azione degli oncogeni E6 e E7 del HPV e supporta l'ipotesi del coinvolgimento dell'infezione da HPV nella carcinogenesi laringea [44].

Un altro fattore che potrebbe essere considerato segno indiretto della responsabilità di HPV nella genesi del carcinoma laringeo è l'iperespressione di p16, ma in letteratura i dati disponibili sono discordanti.

Laco e Collaboratori hanno valutato un archivio di 88 campioni provenienti da lesioni laringee maligne e benigne, testando l'espressione di p16 con immunistoichimica e l'incidenza di HPV utilizzando la metodica PCR e l'ibridazione *in situ* cromogenica (CISH). L'espressione di p16 era aumentata in ugual modo nei papillomi, nelle displasie e nei carcinomi. L'indice di correlazione di p16 e l'infezione da HR-HPV analizzato con CISH era 0.676, quindi molto più bassa rispetto agli studi eseguiti su lesioni displastiche della cervice, ciò suggerisce che non solo le oncoproteine ma anche altri fattori probabilmente sono correlati con l'espressione del p16.

L'evidenza che p16 non sia un adeguato *marker* di positività per infezione da HPV è stata confermata anche da altri studi. Weinberger e Collaboratori [45] hanno infatti dimostrato che nel distretto cervico-cefalico il fumo e l'alcool possono inibire la sovraespressione della proteina p16 [46]; mentre Begum e Collaboratori [47] hanno rilevato come p16 risulti essere sovraespresso non solo in tutto l'epitelio neoplastico dei pazienti con neoplasia tonsillare ma anche nell'epitelio non neoplastico e nel tessuto tonsillare dei pazienti non affetti da cancro [48-49].

Altri studi hanno tentato di identificare il DNA integrato del HPV-16 amplificando i geni E2/E6 mediante PCR o RT-PCR, ma i risultati hanno mostrato percentuali molto basse di casi positivi [40, 50-51].

Infine, i SCC laringei HPV positivi non presentano le caratteristiche cliniche o molecolari osservate nei carcinomi orofaringei HPV positivi. Infatti, i diversi studi pubblicati in materia non hanno evidenziato alcuna correlazione statisticamente significativa tra infezione da HPV e giovane età, abitudine al fumo, stadio clinico, morfologia basaloide e prognosi [19, 44, 52].

## **Obiettivo della ricerca**

È stata condotta un'analisi retrospettiva su una serie di campioni di lesioni preneoplastiche e neoplastiche del distretto cervico-cefalico raccolte negli ultimi 10 anni dall'U.O.C. di Otorinolaringoiatria della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia al fine di valutare la prevalenza dell'infezione da HPV, utilizzando la medesima metodica di genotipizzazione impiegata per la diagnosi e la caratterizzazione delle infezioni cervico vaginali nel nostro ospedale. Nei pazienti sottoposti a biopsie multiple per la presenza di lesioni evolutive e recidivanti nel tempo, la progressione della malattia neoplastica e l'infezione da HPV sono state valutate nel tempo.

## **Materiali e metodi**

### ***Analisi e tipologia del campione***

La ricerca di HPV è stata condotta su una serie di campioni istologici di lesioni benigne, preneoplastiche e neoplastiche del distretto cervico-cefalico prelevati da pazienti afferiti all'U.O.C. di Otorinolaringoiatria della Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia negli ultimi 10 anni. Inoltre, dalle cartelle cliniche relative ai pazienti oggetto dello studio sono state raccolte informazioni riguardo l'età anagrafica, il sesso, le abitudini voluttuarie (fumo ed alcool) e l'andamento della patologia nel tempo inteso come comparsa di lesioni recidivanti.

### ***Ricerca e caratterizzazione dell'infezione da HPV***

L'HPV DNA è stato estratto dai campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) mediante incubazione per 24 ore a 58°C in 100-200 microlitri di tampone di estrazione (contenente KCl, TRIS-

HCl, MgCl<sub>2</sub>, TWEEN, NP40) in cui erano diluiti 0.5 mg/ml di proteinasi K. La soluzione è stata quindi ulteriormente incubata a 95°C per 20 min per inattivare la proteinasi K e successivamente centrifugata per 10 min. a 10.000 rpm. Il DNA recuperato dalla provetta è stato amplificato mediante PCR usando una coppia di primer SPF10 (4 forward e 6 reverse) ad ampio spettro per il rilevamento della regione L1 del genoma virale. Questo breve segmento di 65 bp è comune a tutti i tipi virali e rappresenta il 40% del genoma virale.

Il sequenziamento e la genotipizzazione del HPV DNA sono stati eseguiti tramite la metodica della ibridazione inversa del DNA, metodica estremamente specifica (100%) e sensibile (97%) e con elevata accuratezza di genotipizzazione (96.5%) che utilizza il kit diagnostico Inno-Lipa HPV Genotyping V2 Ampl. (Innogenetics, Gent, BE). In questo caso è stato utilizzato un kit in grado di identificare i 10 sierotipi HPV a basso rischio (LR HPV) e 15 sierotipi HPV ad alto rischio (HR HPV). La validità del test è stata dimostrata da numerosi studi; il test viene utilizzato in numerosi centri per la diagnosi e la tipizzazione dell'infezione da HPV in ambito ginecologico; Inno-Lipa è stata approvata dalla Comunità Europea per l'esecuzione del test dell'HPV nei campioni cervico-vaginali.

Nella ibridazione inversa, il prodotto di PCR viene denaturato in ambiente alcalino (400 mmol/L NaOH, 10 mmol/L EDTA) e successivamente ibridato con oligonucleotidi (specifici per diversi tipi virali) immobilizzati su membrana (LIPA, *line probe assay*). L'HPV DNA amplificato è stato valutato tramite specifiche stringhe di nitrocellulosa che contengono le sonde di diversi sierotipi. L'accoppiamento esatto tra il DNA virale e la sonda viene identificato mediante una reazione cromogena.

La metodica della ibridazione inversa ha i seguenti vantaggi:

- È altamente specifica, permette la rilevazione di un singolo *mismatch* nucleotidico.
- La rilevazione è molto sensibile, soprattutto per identificare specie secondarie come nel caso di infezioni miste.
- La lettura dei risultati può essere eseguita manualmente o in maniera automatica.
- Il test è rapido (circa 8 ore, compresa l'amplificazione).

### **Valutazione dell'integrazione del DNA virale**

La valutazione dell'eventuale integrazione di HPV è stata condotta sia in maniera indiretta analizzando l'espressione di p53 e di p16 con metodiche immunoistochimiche, sia in maniera diretta mediante la tecnica di ibridazione di *situ*.

### **Analisi immunoistochimica**

Le reazioni immunoistochimiche dei campioni in esame sono state eseguite su sezioni non colorate ottenute dalle inclusioni in paraffina, dello spessore di quattro *micron*. I vetrini sono stati sparaffinati mediante passaggi di 10 minuti ciascuno in una scala discendente degli alcoli (xilolo, alcol assoluto, alcol 95°). Per l'inibizione delle perossidasi endogene (emazie, fagosomi dei macrofagi), i vetrini sono stati immersi per 8 minuti in una soluzione al 3% di perossido di idrogeno in alcol etilico al 95%.

Per la determinazione di p53 i vetrini sono stati sciacquati in acqua corrente, e sottoposti ad un pretrattamento per lo smascheramento di epitopi antigenici costituito da tre cicli di 5' in forno a microonde, potenza 650W, in tampone citrato pH6. Le sezioni sono quindi state ricoperte con anticorpo primario monoclonale (DO7, DakoCytomation, Carpinteria, Ca) diluito 1:5000 in tampone *Antibody diluent* (Dako) ed incubate a 4 gradi per 12 ore. La reazione immunoistochimica è stata rivelata mediante sistema *Envision* (Dako) utilizzando come substrato cromogeno diaminobenzidina tetraidrocloruro (Dako *liquid DAB substrate-chromogen system*). Dopo lo sviluppo i vetrini sono stati contrastati in ematossilina, risciacquati, disidratati in una scala ascendente degli alcoli e montati con montante permanente. In ogni serie di reazioni, sono stati allestiti vetrini di controllo contenenti sezioni di tumore sede di mutazioni documentate per p53; controlli negativi sono stati ottenuti mediante la sostituzione dell'anticorpo primario con siero non immune. L'immunoreattività per p53 è stata valutata median-

te un microscopio a luce normale ad ingrandimento 40x. La presenza di immunoreattività nucleare per p53 in almeno il 10% delle cellule epiteliali displastiche o neoplastiche è stata considerata positiva per sovraespressione della proteina.

Per la determinazione di p16, i vetrini sono stati sciacquati in acqua corrente, e sottoposti ad un pretrattamento per lo smascheramento di epitopi antigenici costituito da tre cicli di 5' in forno a microonde, potenza 650W, in soluzione di smascheramento fornita nel *kit* di determinazione (CINtec *Histology*, mtm laboratories AG, Heidelberg DE). Le sezioni sono quindi state ricoperte con anticorpo primario monoclonale (p16<sup>INK4a</sup>) ed incubate a temperatura ambiente per 30 minuti. La reazione immunostochimica è stata rivelata mediante l'agente di visualizzazione fornito nel *kit* CINtec *Histology* utilizzando come substrato cromogeno diaminobenzidina tetraidrocloruro. Dopo lo sviluppo i vetrini sono stati contrastati in ematossilina, risciacquati, disidratati in una scala ascendente degli alcoli e montati con montante permanente. In ogni serie di reazioni, sono stati allestiti vetrini di controllo contenenti sezioni di cervice uterina sede di espressione nota di p16; controlli negativi sono stati ottenuti mediante la sostituzione dell'anticorpo primario con siero non immune. L'immunoreattività per p16 è stata valutata in maniera semiquantitativa, distinguendo l'assenza di espressione (0), l'espressione sporadica in meno del 30% delle cellule (1), l'espressione nel 30-60% delle cellule (2), e l'espressione nella maggioranza delle cellule (3).

Le reazioni sono state analizzate senza che fossero note le caratteristiche cliniche e molecolari del paziente.

#### ***Ibridazione in situ con amplificazione catalizzata del segnale [CASH]***

Le reazioni di ibridazione *in situ* sono state eseguite su sezioni dello spessore di 4 micron, sparaffinate in una scala discendente degli alcoli, risciacquate in acqua distillata ed incubate in tampone citrato pH6 a 95°C per 40 minuti. Successivamente le sezioni sono state sottoposte a digestione proteica con proteinasi k a temperatura ambiente per 10 minuti, risciacquate in acqua distillata ed incubate in metanolo contenente perossido di idrogeno all'1% per 20 minuti al fine di inibire le perossidasi endogene. Dopo un nuovo risciacquo in acqua distillata, le sezioni sono state asciugate all'aria a temperatura ambiente per alcuni minuti. Per l'ibridazione sono state utilizzate una sonda a DNA ad ampio spettro, marcata con biotina, in grado di riconoscere i sierotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58e 59 di HPV (Dako GenPont HPV, Dako Cytomation, Carpinteria, CA) e quattro sonde sierotipo-specifiche per HPV 16, 18, 31 e 33, coniugate con biotina (DISH Rembrandt Biotin labelled DNA probes, PanPath, Budel, NL). I casi positivi alla biologia molecolare per uno o più dei sierotipi riconosciuti dalle sonde sono stati ibridizzati con tutte le sonde corrispondenti ai sierotipi presenti. Come controllo positivo sono state utilizzate sezioni di biopsie endocervicali con quadri di displasia severa che risultavano positive alla biologia molecolare per i sierotipi riconosciuti dalle sonde. Come controlli negativi sono stati utilizzati campioni di neoplasia del distretto cervicocefalico che erano risultate negative per HPV alle indagini molecolari.

Su ciascuna sezione è stata depositata una goccia della soluzione contenente le sonde, e i preparati sono stati sigillati con un vetrino coprioggetto. I vetrini così preparati sono stati sottoposti a denaturazione per 5 minuti a 95°C e successivamente incubati a 37°C per 16 ore in un incubatore per ISH. Alla fine della incubazione, i vetrini coprioggetto sono stati rimossi mediante lavaggio in tampone Tris contenente Tween 20 (TBST, DakoCytomation). Le sezioni incubate con sonda GenPoint Dako sono quindi state sottoposte a lavaggio stringente nell'apposita soluzione (DakoCytomation) per 30 minuti a 48°C, con agitazione meccanica. Le sezioni incubate con sonde Rembrandt sono state invece incubate con soluzione di lavaggio stringente PanWash, PanPath, per 15 minuti a 37°C. A questo passaggio hanno fatto seguito per tutti i vetrini 3 risciacqui da 5 minuti in tampone TBST, l'incubazione in *primary streptavidin* (DakoCytomation) per 15 minuti a temperatura ambiente, tre ulteriori risciacqui in tampone, l'incubazione in tiramide (DakoCytomation) per 15 minuti a temperatura ambiente, tre risciacqui in tampone, l'incubazione in *secondary streptavidin* (DakoCytomation) per 15 minuti a tem-

peratura ambiente, il risciacquo in acqua distillata e lo sviluppo della reazione con la soluzione cromogena di aminoetilcarbazo (DakoCytomation) per alcuni secondi, sotto controllo microscopico. Infine le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Harris e montate con montante acquoso M.

### ***Scraping della mucosa orale***

In un campione di 27 pazienti affetti da neoplasie laringee è stata eseguita la ricerca e la tipizzazione di HPV anche sul materiale di raschiamento (*scraping*) della mucosa orale per verificare la concordanza dei risultati in termini di prevalenza e genotipizzazione (ibridazione inversa su PCR). Il raschiamento è stato eseguito con una spatola sterile di legno, che permette una scelta più precisa del sito di prelievo. Ciascun sito è stato raschiato 5 volte, e la punta della spatola è stata immersa in un contenitore riempito con metanolo (ThinPrepPreservCyt solution). Il materiale del raschiamento è stato incubato per 24 h a 58°C in buffer sterile da 100-200 microlitri (contenente 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% Tween 20, 0.45% NP40) e successivamente dissolto in 0.5 mg/dl di proteinasi K. La soluzione è stata poi incubata a 95°C per 20 minuti per disattivare la proteinasi K e centrifugata a 10000 giri/min per 10 min. Il DNA estratto ha poi subito l'identificazione e la genotipizzazione tramite la metodica dell'ibridazione inversa del DNA.

### ***Analisi statistica***

La presenza di infezione da HPV è stata calcolata in termini di percentuale assoluta, di percentuale in base ai diversi sierotipi (LG-HPV vs HG-HPV; HPV-16,18 vs HPV non16-18), di percentuale in base al diverso tipo istologico delle lesioni ed alle diverse sedi per valutare eventuali differenze di prevalenza tra i campioni laringei e quelli delle altre sedi.

Sono state quindi eseguite le analisi di correlazione mediante  $\chi^2$  tra la positività/negatività per HPV e l'espressione di p16 e p53, il sesso, l'età, le abitudini voluttuarie e la comparsa di recidive.

## **Risultati**

### ***Caratterizzazione del campione***

Centodieci campioni provenienti da 94 pazienti (21 di sesso femminile, 73 di sesso maschile, età mediana 61 anni, range 24-88 anni) sono stati inseriti nello studio. La maggior parte dei campioni è stata prelevata dalla laringe (61 campioni da (17 campioni da 17 pazienti, 15%) e dall'ipofaringe (4 campioni da 4 pazienti, 4%) (Figura 1).

Sessantuno (55%) dei 110 campioni oggetto dello studio sono risultati positivi per HPV.

La tabella 1 mostra la distribuzione della prevalenza dell'infezione da HPV in base al sito di prelievo del campione tumorale. La prevalenza di infezione è risultata leggermente superiore nelle lesioni della cavità orale (68%) e dell'orofaringe (65%) rispetto a quella osservata a livello laringeo (44%).

La completa positività (100%) dei campioni prelevati nell'ipofaringe non è statisticamente significativa poiché si riferisce a soli 4 casi, per questo motivo non verrà presa in considerazione nelle valutazioni successive.

### ***Distribuzione della prevalenza di HPV per sede e tipo istologico delle lesioni***

Le tabelle 2, 3 e 4 presentano la distribuzione della positività per HPV in base al tipo istologico per le diverse sedi anatomiche:

- a livello del cavo orale, sono stati analizzati 1 caso di cheratosi, 13 casi di lesioni displastiche di basso grado, 3 casi di lesioni displastiche di alto grado e 11 lesioni neoplastiche. La prevalenza di infezione da HPV, assente nel caso di cheratosi, è risultata progressivamente più ele-

vata al peggioramento del tipo istologico della lesione, fino ad essere quasi assoluta nelle lesioni più gravi (100% nelle displasie di alto grado e 91% nelle neoplasie).

- A livello dell'orofaringe sono state analizzate 16 lesioni neoplastiche ed un caso di cheratosi. È emersa una prevalenza di infezione da HPV del 62% nelle lesioni neoplastiche e del 100% nella cheratosi.
- A livello della laringe sono stati analizzati 24 casi di noduli, 14 casi di lesioni displastiche di basso grado, 9 casi di lesioni displastiche di alto grado e 14 lesioni francamente neoplastiche. Anche per questa sede la prevalenza di infezione da HPV, assente nel caso di noduli, è risultata progressivamente maggiore con il peggioramento del tipo istologico della lesione, fino a raggiungere l'86% nei casi di carcinoma.

### ***Sierotipi***

A livello del cavo orale sono stati osservati 6 sierotipi a basso rischio dei quali HPV-6 è risultato il più frequente, (31%), seguito da HPV-4, HPV-11, HPV-40 e HPV-42, e 5 sierotipi ad alto rischio. HPV-18 è risultato positivo nel 31% dei casi, HPV-31 nel 21%, HPV-16 nel 16%, HPV-52 nel 10% e HPV-51 nel 5% dei casi. Da notare inoltre che nel 68% dei campioni HPV-positivi è emersa la presenza di una co-infezione, che coinvolgeva da 2 a 4 virus diversi.

A livello dell'orofaringe sono stati riscontrati 4 sierotipi a basso rischio, dei quali HPV-6 è risultato il più frequente (18%) seguito da HPV-40, HPV-42 e HPV-44, ed 8 sierotipi ad alto rischio. HPV-16, HPV-45, HPV-51 sono risultati presenti nel 18% dei casi, HPV-35, HPV-39, HPV-52 e HPV-56 nel 9% dei casi. La presenza di co-infezione, che coinvolgeva da 2 a 3 virus diversi, è risultata presente nel 33% dei campioni HPV-positivi.

A livello della laringe sono stati isolati 4 sierotipi a basso rischio, con HPV-6 presente nel 52% dei casi, seguito da HPV-11, HPV-40 e HPV-42, e 12 sierotipi ad alto rischio. HPV-16 e HPV-31 sono risultati presenti nel 41% dei casi, HPV-51 nel 18%, HPV-18 ed HPV-45 nel 15%, HPV-52 e HPV-66 nel 7%, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-56 e HPV-68 nel 4% dei casi. La presenza di co-infezione, che coinvolgeva da 2 a 5 virus diversi, è risultata presente nell'88% dei campioni HPV-positivi.

### ***Distribuzione della prevalenza dei sierotipi di HPV per sede e tipo istologico delle lesioni***

Le tabelle 5, 6 e 7 presentano la distribuzione dei diversi sierotipi in base alla sede ed alle caratteristiche istologiche delle lesioni. Osservando la distribuzione a livello della cavità orale, è possibile notare che il numero di casi di HPV ad alto rischio (HR HPV) aumenta con il peggiorare del tipo istologico della lesione (dal 33% nelle lesioni displastiche di basso grado al 64-67% delle lesioni displastiche di alto grado o francamente neoplastiche), mentre l'incidenza di ceppi virali a basso rischio (LR HPV) si mantiene relativamente costante (23-33%). È inoltre emerso che i ceppi HR HPV non sono rappresentati solamente dai sierotipi HPV 16 e 18, ma anche con altri genotipi ad alto rischio (23% nelle lesioni displastiche di basso grado e 18% nel caso del carcinoma) (Tabella 5).

Una situazione analoga è stata osservata anche nel caso dell'orofaringe: la maggior parte dei ceppi virali HPV ad alto rischio (6 ceppi su 8) era di tipo non HPV-16 o -18; mentre solo 2 (12%) degli 8 casi di infezione da HR HPV erano di tipo 16/18.

In soli 2 casi (12%) è stata osservata la presenza di infezione da HPV a basso grado di malignità (Tabella 6).

Anche nella laringe è stato osservato un aumento della prevalenza d'infezione da HR HPV al peggioramento delle caratteristiche istologiche delle lesioni (43-79%), con una distribuzione simile tra ceppi HPV-16/18 (28-36%) e ceppi HR HPV non 16/18 (14-43%). I LR HPV sono risultati invece scarsamente rappresentati in tutte le diverse lesioni istologiche (7-22%) (Tabella 7).

### ***Lesioni recidivanti***

In 12 pazienti (3 per il cavo orale e 9 per la laringe) è stato possibile analizzare lesioni recidivanti in tempi successivi. In 2 dei 3 pazienti con lesioni del cavo orale la prima biopsia è risultata positiva per displasia di basso grado e negativa per HPV; mentre nel terzo caso, positivo per displasia di alto grado, è stata riscontrata la presenza di un ceppo virale a basso rischio (LR HPV). In tutti e tre i casi le biopsie delle lesioni recidivanti sono risultate positive per carcinoma [SCC]; nei due pazienti inizialmente negativi per HPV si è riscontrata non solo la presenza di HPV, ma anche di co-infezione da parte di diversi sierotipi. Nel terzo caso si è osservata la presenza dello stesso sierotipo virale a basso rischio (Tabella 8).

Lo stesso comportamento è stato osservato nei 9 pazienti con lesioni laringee recidivanti. In particolare la prima biopsia mostrava 6 lesioni displastiche di basso grado tutte negative per HPV, 2 lesioni displastiche di alto grado una delle quali positiva per i ceppi virali 16 e 18, ed 1 lesione cancerosa positiva per il ceppo virale 16. Tutte le lesioni recidivanti sono evolute verso forme di displasia grave o SCC e sono risultate positive per sierotipi multipli di HR HPV (Tabella 9).

### ***Scraping della mucosa orale***

In 27 pazienti affetti da SCC della laringe (22 casi HPV positivi e 5 casi HPV negativi) è stato eseguito anche il raschiamento della mucosa orale per la ricerca di HPV. Tutti i 22 casi di SCC positivi per HPV sulla laringe sono risultati positivi per HPV anche sulla mucosa orale. Un solo caso dei 5 SCC negativi per HPV sulla laringe è invece risultato positivo per HPV sulla mucosa orale.

### ***Ibridazione in situ***

La ricerca mediante ibridazione *in situ* del DNA virale integrato è risultata negativa in tutti i campioni di lesioni laringee e del cavo orale; mentre è risultata positiva in 3 dei 17 campioni (17%) di lesioni dell'orofaringe. L'analisi immunostochimica per l'antigene capsidico dei più comuni HR HPV ha confermato l'assenza d'infezioni produttive in tutti i campioni esaminati.

### ***Analisi di correlazione***

Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i casi HPV positivi ed HPV negativi in termini di sesso, età, abitudini voluttuarie e comparsa di recidive per tutte le sedi anatomiche considerate. Allo stesso modo non è stata osservata alcuna correlazione statisticamente significativa tra presenza/assenza di infezione da HPV ed espressione di p16 o p53.

## **Discussione**

Il potere oncogenico di HPV è ormai riconosciuto universalmente a livello del tratto genitale femminile, ove più del 90% delle neoplasie della cervice uterina, ed una percentuale lievemente inferiore delle neoplasie vulvari, risulta associato all'infezione. In questo distretto, è stato dimostrato chiaramente il meccanismo mediante il quale il virus induce la trasformazione neoplastica nelle cellule ospiti [53-55]. Nel distretto cervico-cefalico, una correlazione diretta con l'infezione da HPV è stata documentata per i papillomi squamosi laringei, in particolare per quanto riguarda i genotipi a basso rischio [56].

Da diversi anni ormai esistono evidenze scientifiche sul possibile ruolo oncogenetico di HPV anche per alcune neoplasie squamocellulari del tratto cervico-cefalico, anche se i dati disponibili sono difficilmente confrontabili per la grande variabilità di tecniche utilizzate per la determinazione e la tipizzazione del virus, e per la diversa sede anatomica delle lesioni. [38-40]

La metodica di ibridazione inversa da noi utilizzata per la documentazione della presenza di HPV nei campioni della regione testa-collo ha dimostrato la stessa elevata sensibilità che è già stata ampiamente dimostrata per le lesioni della regione genitale femminile [57], tanto che la percentuale complessiva di neoplasie HPV positive nella nostra serie di campioni è risultata dell'85%, valori per sede rispettivamente del 91% per il cavo orale, dell'86% per la laringe e del 62% per il cavo orale. Queste percentuali sono nettamente superiori alle metanalisi di Kreimer [20], che riportano i dati più rappresentativi in letteratura in quanto eseguiti su casistiche molto numerose, e per le quali la prevalenza complessiva dell'infezione da HPV è del 26%.

Se si considerano poi i diversi sierotipi virali, un dato interessante emerso dal nostro studio è che, a differenza da quanto riportato in letteratura [20], HPV-16 ed HPV-31 sono risultati i virus maggiormente prevalenti, mentre HPV 18 è stato isolato meno frequentemente. Queste differenze dipendono dal fatto che la nostra metodica è in grado di identificare fino a 10 diversi sierotipi a basso grado di malignità e 15 diversi sierotipi ad alto grado di malignità ed ha consentito di dimostrare che la presenza di HR HPV non 16-18 presenta nel distretto cervico-cefalico percentuali di prevalenza uguali, se non addirittura superiori a quelle di HPV 16-18.

Le percentuali di prevalenza d'infezione da HPV pubblicate in letteratura e valutate con metodiche che si basano solo sull'identificazione di HPV 16 e 18 potrebbero quindi essere tutte sottostimate.

Inoltre, abbiamo riscontrato un elevato tasso di co-infezione da parte di diversi sierotipi, che ha raggiunto il valore dell'88% per la laringe. La presenza di co-infezione non va trascurata perché in letteratura è stato dimostrato, almeno per quel che riguarda la cervice uterina, che questa costituisce un fattore prognostico sfavorevole [58].

In letteratura numerosi lavori sono poi concordi nell'affermare che per le neoplasie dell'orofaringe esiste una sottopopolazione di circa il 40% dei casi (per lo più neoplasie tonsillari) HPV positive in cui il ruolo oncogenetico del virus ed il suo valore prognostico favorevole sono certi [59]; mentre il ruolo di HPV nella cancerogenesi della laringe è ancora incerto [35-36].

Dai dati emersi dal nostro studio non è stato possibile confermare tali evidenze; anzi è stata rilevata l'assenza di differenze statisticamente significative in termini di età, abitudini voluttuarie, caratteristiche istologiche e comparsa di recidive tra le neoplasie HPV+ ed HPV-, sia per quel che riguarda l'orofaringe che per la laringe. Per verificare quindi se alla positività per HPV corrispondesse la presenza di DNA virale integrato, che rappresenta l'evento fondamentale per l'effetto oncogenetico del virus [60-61], abbiamo condotto dei test di rilevazione diretta (ibridazione *in situ* ed immunistochemica per l'antigene capsidico) ed indiretta (immunistochemica per p16, p53). L'ibridazione *in situ* è risultata positiva solo nel 2.7% del campione complessivo, l'immunistochemica per l'antigene capsidico è risultata negativa in tutti i casi e non è stata osservata alcuna differenza di espressione di p16 o p53 tra i casi HPV positivi e negativi.

Ad oggi non sembra esistere quindi una metodica di scelta per la determinazione dell'integrazione virale. L'ibridazione *in situ* è indubbiamente una metodica molto sensibile, è in grado di distinguere tra il virus presente in stato epitomale e quello integrato, ma è tecnicamente complessa; mentre l'analisi immunistochemica per p16 nelle neoplasie del distretto cervico-cefalico non sembra essere specifica dell'iperespressione HPV-mediata. È stato infatti dimostrato non solo che il fumo e l'alcool possono inibire tale iperespressione [45], ma anche che il tessuto tonsillare normale può esprimere p16 sia nei pazienti sani che nei pazienti affetti da neoplasia tonsillare [47].

La metodica ideale potrebbe essere la ricerca dell'RNA di E6/E7 in quanto tali oncogeni vengono espressi solo dopo che è avvenuta l'integrazione virale, ma questo esame deve essere condotto su tessuto congelato e non può essere eseguito su materiale d'archivio o su piccoli campioni. Esiste anche la possibilità di estrarre l'RNA da campioni fissati in paraffina, ma questa metodica d'analisi richiede laboratori dedicati, è costosa e non è disponibile quindi in tutti i laboratori [62-63].

Da quanto affermato fino ad ora si potrebbe quindi dedurre che la presenza di HPV da noi rilevata costituisca un fattore casuale, che nulla ha che vedere con la trasformazione neoplastica dei campioni esaminati; tuttavia altre evidenze da noi osservate sembrano invece dimostrare il contrario.

Abbiamo infatti rilevato che la positività per HPV aumenta all'aumentare del grado di severità dell'istologia della lesione, tanto che nella laringe tutte le lesioni benigne (noduli) sono risultate HPV negative, mentre sono state osservate percentuali progressivamente maggiori per le lesioni displastiche (57% basso grado, 78% alto grado e neoplastiche 86%).

Lo stesso andamento è stato osservato per il cavo orale; mentre nell'orofaringe non è stato possibile confermare la correlazione tra gravità della lesione e prevalenza di infezione da HPV poiché non sono state identificate lesioni displastiche di basso o di alto grado. Questo è dovuto al fatto che i campioni tumorali sono stati prelevati a livello della fossa tonsillare o della base della lingua, siti in cui, al momento della valutazione, le lesioni sono quasi sempre di tipo maligno, mentre il solo campione che ha dato un esito benigno (cheratosi) è stato prelevato dal pilastro palatino anteriore. Nonostante ciò, in circa due terzi delle lesioni francamente neoplastiche dell'orofaringe sono risultate HPV positive.

Un'altra prova del possibile ruolo oncogenetico del virus nei campioni da noi esaminati è la dimostrazione che in tutte le lesioni recidivanti non solo si è osservato un aumento della severità dell'esito istologico, ma questo è risultato associato alla comparsa di positività per HPV. Inoltre, in un ristretto numero di pazienti con neoplasie della laringe abbiamo potuto dimostrare che tutti coloro che erano HPV positivi sulla laringe, lo erano anche a livello della mucosa orale, mentre uno solo dei pazienti HPV negativi sulla laringe è risultato positivo nel cavo orale.

Almeno nella patologia neoplastica della laringe HPV potrebbe quindi non essere un semplice ospite occasionale delle vie aerodigestive superiori, ma l'agente responsabile delle fasi più avanzate della trasformazione maligna di una mucosa già danneggiata da altri fattori oncogenetici.

## Conclusioni

L'ibridazione inversa con il kit Inno-Lipa per la rilevazione di HPV si è rivelata una metodica molto sensibile non solo in ambito ginecologico, ma anche in ambito otorinolaringoiatrico, tuttavia di per sé non è in grado di dimostrare il ruolo oncogenetico del virus. Il *gold-standard* per la dimostrazione dell'integrazione virale è rappresentato dalla ricerca dell'mRNA di E6/7, ma richiede laboratori dedicati e non è disponibile in tutte le strutture. La responsabilità di HPV nella genesi delle neoplasie della laringe, ed in generale di tutta la regione testa-collo, non deve comunque essere esclusa in quanto sembrano esistere prove indirette di un suo ruolo nella trasformazione neoplastica.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Prevalenza dell'infezione da HPV in base al sito anatomico.**

| Sito                | N. di campioni | HPV positivi | HPV negativi |
|---------------------|----------------|--------------|--------------|
| <i>Cavità orale</i> | 28             | 68%          | 32%          |
| <i>Orofaringe</i>   | 17             | 65%          | 35%          |
| <i>Ipopofaringe</i> | 4              | 100%         | 0            |
| <i>Laringe</i>      | 61             | 44%          | 56%          |

**Tabella 2. Prevalenza dell'infezione da HPV in base al tipo istologico: cavità orale.**

| Tipo istologico                 | N. di campioni | HPV positivi | HPV negativi |
|---------------------------------|----------------|--------------|--------------|
| <i>Cheratosi</i>                | 1              | 0            | 100%         |
| <i>Displasia di basso grado</i> | 13             | 46%          | 54%          |
| <i>Displasia di alto grado</i>  | 3              | 100%         | 0            |
| <i>Carcinoma</i>                | 11             | 91%          | 9%           |

**Tabella 3. Prevalenza dell'infezione da HPV in base al tipo istologico: orofaringe.**

| Tipo istologico  | N. di campioni | HPV positivi | HPV negativi |
|------------------|----------------|--------------|--------------|
| <i>Cheratosi</i> | 1              | 100%         | 0            |
| <i>Carcinoma</i> | 16             | 62%          | 38%          |

**Tabella 4. Prevalenza dell'infezione da HPV in base al tipo istologico: laringe.**

| Tipo istologico                 | N. di campioni | HPV positivi | HPV negativi |
|---------------------------------|----------------|--------------|--------------|
| <i>Noduli</i>                   | 24             | 0            | 100%         |
| <i>Displasia di basso grado</i> | 14             | 57%          | 43%          |
| <i>Displasia di alto grado</i>  | 9              | 78%          | 22%          |
| <i>Carcinoma</i>                | 14             | 86%          | 14%          |

**Tabella 5. Distribuzione dei sierotipi HPV in base al tipo istologico: cavo orale (Abbreviazioni: HR HPV = HPV ad alto rischio; LR HPV = HPV a basso rischio).**

| Tipo istologico                 | HPV DNA     | HR HPV     | HPV 16/18  | Altri HR HPV | LR HPV     |
|---------------------------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|
| <i>Displasia di basso grado</i> | 6/13 (46%)  | 3/13 (23%) | 0/13 (0)   | 3/13 (23%)   | 3/13 (23%) |
| <i>Displasia di alto grado</i>  | 3/3 (100%)  | 2/3 (67%)  | 2/3 (67%)  | 0/3 (0)      | 1/3 (33%)  |
| <i>Carcinoma</i>                | 10/11 (91%) | 7/11 (64%) | 5/11 (45%) | 2/11 (18%)   | 3/11 (27%) |

**Tabella 6. Distribuzione dei sierotipi HPV in base al tipo istologico: orofaringe (Abbreviazioni: HR HPV = HPV ad alto rischio; LR HPV = HPV a basso rischio).**

| Tipo istologico                 | HPV DNA     | HR HPV     | HPV 16/18  | Altri HR HPV | LR HPV     |
|---------------------------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|
| <i>Displasia di basso grado</i> | 1/1 (100%)  | 1/1 (100%) | 0/1 (0)    | 1/1 (100%)   | 0/1 (0)    |
| <i>Carcinoma</i>                | 10/16 (62%) | 8/16 (50%) | 2/16 (12%) | 6/16 (37%)   | 2/16 (12%) |

**Tabella 7. Distribuzione dei sierotipi HPV in base al tipo istologico: laringe (Abbreviazioni: HR HPV = HPV ad alto rischio; LR HPV = HPV a basso rischio).**

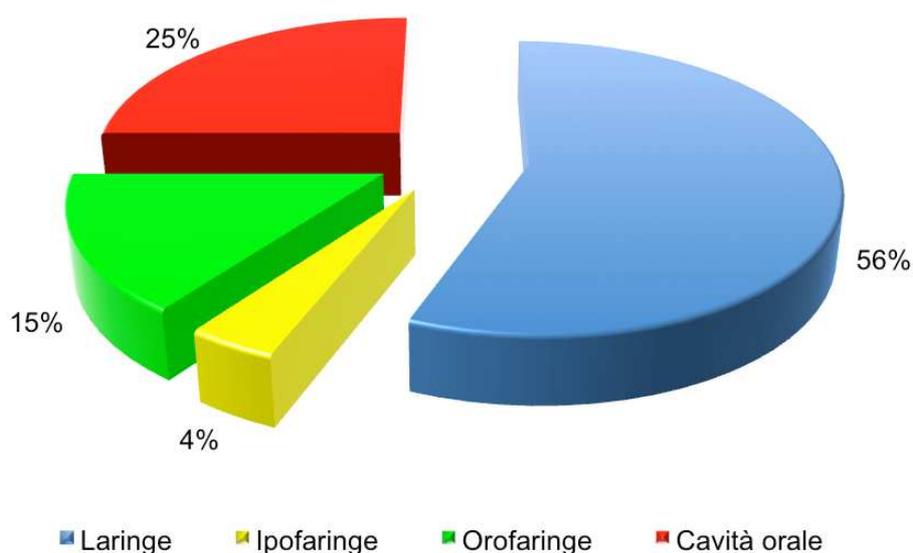
| Tipo istologico          | HPV DNA     | HR HPV      | HPV 16/18  | Altri HR HPV | LR HPV     |
|--------------------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| Displasia di basso grado | 8/14 (57%)  | 6/14 (43%)  | 4/14 (28%) | 2/14 (14%)   | 2/14 (14%) |
| Displasia di alto grado  | 7/9 (78%)   | 5/9 (55%)   | 3/9 (33%)  | 2/9 (22%)    | 2/9 (22%)  |
| Carcinoma                | 12/14 (86%) | 11/14 (79%) | 5/14 (36%) | 6/14 (43%)   | 1/14 (7%)  |

**Tabella 8. Esiti delle biopsie delle lesioni primitive e recidivanti situate nel cavo orale (Abbreviazioni: SCC = carcinoma a cellule squamose; LR HPV = HPV a basso rischio).**

| Paziente | Prima biopsia (sierotipo HPV)       | Biopsie successive (sierotipo HPV) |
|----------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1        | Displasia di basso grado (negativa) | SCC (HPV-6, -40, -16, -18)         |
| 2        | Displasia di basso grado (negativa) | SCC (HPV-40, -16, -18)             |
| 3        | Displasia di alto grado (LR HPV)    | SCC (LR HPV)                       |

**Tabella 9. Esiti delle biopsie delle lesioni primitive e recidivanti situate nella laringe (Abbreviazioni: SCC = carcinoma a cellule squamose; LR HPV = HPV a basso rischio).**

| Paziente | Prima biopsia (sierotipo HPV)         | Biopsie successive (sierotipo HPV)   |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1        | Displasia di alto grado (HPV-16, -18) | SCC (HPV-42, -16, -18, -31, -39)     |
| 2        | Displasia di alto grado (negativa)    | SCC (HPV-6, -45)                     |
| 3        | Displasia di basso grado (negativa)   | Displasia di alto grado (HPV-6, -31) |
| 4        | Displasia di basso grado (negativa)   | SCC (HPV-6, -40, -31, -33)           |
| 5        | Cheratosi (negativa)                  | SCC (HPV-16, -18)                    |
| 6        | Displasia di basso grado (negativa)   | SCC (HPV-6, -52, -56)                |
| 7        | Cheratosi (negativa)                  | SCC (LR HPV)                         |
| 8        | Displasia di basso grado (negativa)   | SCC (HPV-6, -16, -31)                |
| 9        | SCC (HPV-16)                          | Displasia di basso grado (LR HPV)    |



**Figura 1. Distribuzione dei campioni per sito anatomico.**

## Bibliografia

1. Ries L, Melbert D, Krapcho M et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda, *National Cancer Institute*, 2008.
2. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B:9-15.
3. Syrjänen KJ, Surjanen SM. Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1981;43:181-194.
4. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006;118:1071-1076.
5. Leena-Maija Aaltonen; Heikki Rihkanen, Antti Vaeheri et al. Human Papillomavirus in Larynx. *Laryngoscope* 2002;112:4.
6. Ullman UV. On the aetiology of the laryngeal papillomata. *Acta Otolaryngol* 1923;5:317-334.
7. Crawford LV, Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology* 1963;21:258-263.
8. zur Hausen H. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13:650-656.
9. Gissmann L, zur Hausen H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1976;73:1310-1313.
10. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses [HPV]: characterization of four different isolates. *Virology* 1977;76:569-580.
11. Orth G, Jablonska S, Favre M et al. G. Characterization of two new types of HPV from lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:1537-1541.
12. Lack EE, Jenson AB, Smith HG et al. Immunoperoxidase localization of human papillomavirus in laryngeal papillomas. *Intervirology* 1980;14[3-4]:148-154.
13. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus [HPV] involvement in oral squamous cell carcinome. *Int J Oral Surg*. 1983;12[6]:418-424.
14. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91[6]:622-635.
15. Psyri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5[1]:24-31.
16. Scheurlen W, Stremlau A, Gissmann L, et al. Rearranged HPV 16 molecules in an anal and in a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1986;38[5]:671-676.
17. Kashima H, Wu TC, Mounts P et al. Carcinoma ex-papilloma: histologic and virologic studies in whole-organ sections of the larynx. *Laryngoscope* 1988;98[6]:619-624.
18. Kahn M, Hammes S, Botka C et al. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem* 1998;273:23290-23296.
19. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M et al. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265(Suppl. 1):S89-96.
20. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-475.
21. Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey M et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31:259-266.
22. Termine N, Panzarella V, Falaschini S et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis [1988-2007]. *Ann Oncol* 2008;19[10]:1681-1690.
23. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2001;91:622-635.
24. Gillison ML, Koch WM, Capone RB et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92[9]:709-720.
25. Licitra L, Perrone F, Bossi P et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:5630-5636.
26. Fakhry C, Westra WH, Li S et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100[4]:261-269.
27. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S et al. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27[12]:1992-1928.
28. Ang KK, Harris J, Wheeler R et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363[1]:24-35.
29. D'Souza G. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-1956.
30. Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:88-92.

31. Torrente MC, Ampuero S, Abud M et al. Molecular detection and typing of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol* 2005;125:888–893.
32. Syrjanen S. Human papillomavirus [HPV] in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32(suppl 1):S59-66.
33. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004;363:1488-1489.
34. Baumann JL, Cohen S. Human Papillomavirus in Early Laryngeal Carcinoma. *Laryngoscope* 2009;1:1.
35. Kasperbauer JL, O'Halloran GL, Espy MJ et al. Polymerase chain reaction [PCR] identification of human papillomavirus [HPV] DNA in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 1993;103(4):416-420.
36. Gallo A, Degener AM, Pagliuca G et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;8:23.
37. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106:553-558.
38. Kasperbauer JL, O'Halloran GL, Espy MJ et al. Polymerase chain reaction [PCR] identification of human papillomavirus [HPV] DNA in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 1993;103(4):416-420.
39. Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC et al. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg* 1998;176(5):428-429.
40. Gallo A, Degener AM, Pagliuca G et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(2):276-281.
41. Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A et al. Association between cyclin D1 [CCND1] gene amplification and human papillomavirus infection in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(11):2585-2589.
42. Ma XL, Ueno K, Pan ZM et al. Human papillomavirus DNA sequences and p53 over-expression in laryngeal squamous cell carcinomas in Northeast China. *J Med Virol* 1998;54(3):186-191.
43. Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E et al. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol* 2002;79(3):142-150.
44. Almadori G, Cadoni G, Cattani P et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):3988-3993.
45. Paul M, Weinberger, Ziwei Yu, Panteleimon Kountourakis et al. Defining molecular phenotypes of human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: Validation of three-class hypothesis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2009;141:382-389.
46. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D et al. Molecular classification in oropharyngeal cancers with favourable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-747.
47. Shahnaz Begum, Dengfeng Cao, Maura Gillison et al. Tissue Distribution of Human Papillomavirus 16 DNA Integration in Patients with Tonsillar Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):15.
48. Begum S, Cao D, Gillison M et al. Tissue Distribution of Human Papillomavirus 16 DNA Integration in Patients with Tonsillar Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):1.
49. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG et al. Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancers With Favorable Prognosis. *Journal of clinical oncology original report* 2006;2:1.
50. Venuti A, Manni V, Morello R et al. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol.* 2000;60(4):396-402.
51. Torrente MC, Ampuero S, Abud M et al. Molecular detection and typing of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol* 2005;125(89):888-893.
52. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009;119(8):1531-1537.
53. Torres Lobatón A, Rojo Herrera G, Torres Rojo A et al. Cervical cancer. Current view of its epidemiology and risk factors. *Ginecol Obstet Mex* 2004;72:466-474.
54. Kedzia W, Goździcka-Józefiak A. Mechanism of the cancerogenesis in cervix paraepidermal epithelium cells with chronic infection of oncogenic types of human papilloma virus. *Ginekol Pol* 2007;78(9):701-708.
55. Howell-Jones R, Bailey A, Beddows S et al. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. *Br J Cancer* 2010;103(2):209-216.
56. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope* 2002;112:700-707.
57. Dal Bello B, Spinillo A, Alberizzi P et al. Cervical Infections by Multiple Human Papillomavirus [HPV] Genotypes: Prevalence and Impact on the Risk of Precancerous Epithelial Lesions. *Journal of Medical Virology* 2009;81:703-712.
58. Gillison ML, Koch WM, Capone RB et al. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(9):3.
59. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004;50:9-19.
60. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006;110:525-541.
61. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A et al. Human papilloma virus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol. Diagn* 2004;8(1):57-64.

62. Kösel S, Burggraf S, Engelhardt W et al. Increased levels of HPV16 E6\*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology [CIN II+] detected by rapid real time RT-PCR amplification. *Cytopathology* 2007;18(5):290-299.