

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop
**Infezioni da HPV: dalla diagnosi precoce
alla prevenzione primaria**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 9-10 novembre 2005

RIASSUNTI

A cura di
Colomba Giorgi e Sabrina Tocchio
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
05/C9

Istituto Superiore di Sanità

Workshop: Infezioni da HPV: dalla diagnosi precoce alla prevenzione primaria. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 9-10 novembre 2005. Riassunti.

A cura di Colomba Giorgi e Sabrina Tocchio
2005, v, 33 p. ISTISAN Congressi 05/C9

Le infezioni da papillomavirus umani (HPV) sono un'importante causa di tumori a livello dell'epitelio anogenitale, orofaringeo e cutaneo. Tra questi il cancro della cervice è quello con maggiore prevalenza e costituisce la seconda causa di morte per cancro nel mondo. Lo screening per il cancro della cervice effettuato utilizzando il Pap test e l'esame pelvico ha ridotto l'incidenza di questa patologia nei paesi industrializzati ma non nei paesi in via di sviluppo dove l'incidenza e la mortalità per questa patologia rimangono molto alte. L'associazione del cancro della cervice con l'infezione dei cosiddetti HPV "ad alto rischio", fornisce l'opportunità per lo sviluppo sia di nuove tecnologie diagnostiche che di vaccini per la prevenzione e per la cura delle lesioni precancerose. In questo workshop saranno discussi i vantaggi di queste nuove strategie, come correlarle con quelle attualmente in atto ed i riflessi che avrà la loro applicazione sulla sanità pubblica.

Parole chiave: Papillomavirus umano, Tumori, Diagnosi, Vaccini, Sanità Pubblica

Istituto Superiore di Sanità

HPV infections: from early diagnosis to prevention. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 9-10 November 2005. Abstract book.

Edited by Colomba Giorgi and Sabrina Tocchio
2005, v, 33 p. ISTISAN Congressi 05/C9 (in Italian)

Human papillomavirus (HPV) infections are a leading cause of virus-associated cancers of anogenital, oropharyngeal and cutaneous epithelium. The most prevalent of these is cervical cancer, the second most common cause of cancer-related deaths in women worldwide. Screening for cervical cancer is accomplished utilising a Pap smear and pelvic exam. While this technology is widely available and has reduced cervical cancer incidence in industrialized nations, it is not readily available in third world countries where the cervical cancer incidence and mortality remain high. Cervical cancer association with infection with "high risk" HPV types creates a unique opportunity to develop new diagnostic technologies for the detection of the virus and to prevent or treat cervical cancer through anti-viral vaccination strategies. In this workshop the advantages of these new strategies are discussed, as well as how to correlate them to those available and their effects on public health.

Key words: Human Papillomavirus, Tumors, Diagnosis, Vaccines, Public Health

Comitato scientifico: Colomba Giorgi, Giovanna Romeo, Pietro Crovari, Giovanni Renga

Per informazioni su questo documento scrivere a: giorgi@iss.it

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Prima sessione	
HPV: Infezione e Meccanismi patogenetici	1
Seconda sessione	
HPV: Infezione e Meccanismi patogenetici	7
Terza sessione	
Diagnostica delle infezioni da HPV e lesioni associate	15
Quarta sessione	
Strategie per la prevenzione e cura dell'infezione da HPV	21
Bibliografia di riferimento	27
Indice degli autori	33

PROGRAMMA

Mercoledì 9 novembre 2005

- 12.00 Registrazione dei partecipanti
13.00 Indirizzo di benvenuto
Enrico Garaci, *Presidente ISS*
Gian Franco Gensini, *Fondazione Smith kline*

Prima sessione

HPV: INFEZIONI E MECCANISMI PATOGENETICI

Moderatori: Pietro Crovari, Antonio Cassone

- 13.30 *Epidemiologia del cancro cervicale*
Sergio Pecorelli
- 13.50 *Meccanismi molecolari delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV*
Massimo Tommasino
- 14.10 *Papillomavirus: trasformazione cellulare ed evasione della risposta immunitaria*
Maria Saveria Campo
- 14.30 *Meccanismi di trasformazione dei papillomavirus umani mucosali e cutanei*
Santo Landolfo

Seconda sessione

HPV: INFEZIONI E MECCANISMI PATOGENETICI

Moderatori: Pietro Crovari, Antonio Cassone

- 14.50 *HPV e carcinogenesi in infezioni extragenitali*
Aldo Venuti
- 15.10 *Varianti di HPV-16 e rischio di neoplasie genitali nella popolazione italiana*
Franco Maria Buonaguro
- 15.30 *HPV DNA in sede extralesionale: un possibile marcatore di diffusione metastatica nel carcinoma cervicale*
Flavia Lillo

15.50 *Inibizione della proliferazione in cellule HPV16-positive mediante anticorpi intracellulari contro la oncoproteina E7*

Luisa Accardi

16.10 *Attività antiproliferativa dell'Interferon di tipo I in cellule di carcinoma della cervice HPV-positive*

Giovanna Romeo

16.30 Intervallo

Terza sessione DIAGNOSTICA DELLE INFEZIONI DA HPV E LESIONI ASSOCIATE

Moderatori: Pietro Crovari, Giorgio Palù

16.50 *Diagnosi morfologica delle lesioni HPV-associate*

Amina Vocaturo

17.10 *Diagnosi di HPV nel laboratorio di virologia: stato dell'arte e prospettive*

Anna Maria Degener

17.30 *Markers di progressione tumorale in lesioni HPV correlate*

Marco Ciotti

17.50 *Risposta anticorpale nelle infezioni da HPV*

Paola di Bonito

18.10 Discussione

Giovedì 10 Novembre 2005

Quarta sessione STRATEGIE PER LA PREVENZIONE E CURA DELL'INFEZIONE DA HPV

Moderatori: Stefano Vella, Giovanni Renga

9.30 *Vaccinazione preventiva contro HPV*

Luciano Mariani

- 9.50 *HPV Test e Pap Test nello screening del cervico-carcinoma. I risultati dello studio italiano NTCC*
Francesca Carozzi
- 10.10 *Vaccini terapeutici contro le infezioni da HPV*
Colomba Giorgi
- 10.30 Intervallo

Tavola Rotonda
INFEZIONI DA HPV E CARCINOMA DELLA CERVICЕ UTERINA.
NUOVI STRUMENTI DI PREVENZIONE: CRITICITÀ E
OPPORTUNITÀ NEL CONTESTO SANITARIO ITALIANO

Moderatore: **Nicola Falcitelli**

Partecipano: **Donato Greco, Stefano Vella, Marco Rosselli del Turco, Antonio Federici, Francesco Raspagliesi, Antonio Ferro, Nicola Falcitelli, Giovanni Renga, Augusto Battaglia, Sergio Pecorelli**

- 13.00 Conclusioni
Giovanni Renga, Colomba Giorgi

Prima sessione

HPV: infezioni e meccanismi patogenetici

Moderatori

Pietro Crovari, Antonio Cassone

1

MECCANISMI MOLECOLARI DELLE ONCOPROTEINE E6 ED E7 DEI PAPILOMAVIRUS UMANI

Massimo Tommasino e Infections and Cancer Biology Group
International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France

I papillomavirus umani (HPV) costituiscono una grande famiglia. Circa 150 differenti tipi di HPV sono stati isolati fino ad oggi. Questi virus sono divisi in cutanei o mucosali sulla base del loro tropismo tissutale. I mucosali infettano le mucose del tratto genitale delle vie respiratorie alte e sono coinvolti nel cancro del collo dell'utero e nel 25% circa dei tumori testa-collo. Studi funzionali sugli HPV mucosali hanno dimostrato che i prodotti di due geni precoci, E6 and E7, ricoprono un ruolo chiave nella trasformazione maligna indotta dal virus. Queste oncoproteine sono capaci di legare proteine cellulari modificando o alterando la loro normale funzione. I due esempi più studiati sono l'interazione di E6 con la proteina cellulare p53 ed E7 con retinoblastoma (pRb). L'inibizione di p53 e pRb porta alla completa perdita del controllo del ciclo cellulare ed apoptosi, facilitando quindi la trasformazione neoplastica.

In contrasto l'HPV tipo 38 mostra molte attività trasformanti *in vitro* inclusa la immortalizzazione di cheratinociti primari umani. Le attività oncogene delle proteine virali in un sistema *in vivo*, sono state valutate in un modello di topi transgenici esprimenti E6 ed E7 di HPV38 sotto il controllo dell'omologo bovino del promoter umano della cheratina 10 (K10).

Due distinte linee di topi HPV38 transgenici, esprimenti i due geni virali a differenti livelli sono state ottenute. In entrambe le linee E6 ed E7 inducono proliferazione cellulare ed iperplasia. Il verificarsi di entrambi gli eventi nelle due linee transgeniche è proporzionale ai livelli di espressione delle due proteine. L'esposizione dell'epidermide di topi normali e dei topi transgenici per E6 ed E7 di HPV38 a raggi ultravioletti (UV) dà risultati differenti. Nei primi si verifica un accumulo della proteina p21^{WAF1} e l'arresto del ciclo cellulare mentre nei secondi i cheratinociti continuano a proliferare e non c'è espressione della p21^{WAF1}. Questi risultati indicano che in cheratinociti esprimenti le proteine virali si perdono i checkpoint del ciclo cellulare.

Sebbene i topi transgenici per HPV38 non sviluppino tumori spontanei durante tutta la loro vita, trattamenti con carcinogeni inducono un alto tasso di tumori rispetto ai topi normali trattati nello stesso modo.

Questi dati mostrano quindi che E6 ed E7 di HPV 38 hanno proprietà trasformanti anche in un modello animale *in vivo* fornendo ulteriori evidenze che sostengono il ruolo di HPV 38 nella carcinogenesi.

2

PAPILLOMAVIRUS: TRASFORMAZIONE CELLULARE ED EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Maria Saveria Campo

Institute of Comparative Medicine, University of Glasgow, UK

Il genoma del Papillomavirus codifica per tre proteine, E5, E6 e E7, responsabili della patogenesi del virus *in vivo* e della trasformazione cellulare *in vitro*. In questa lezione ci soffermeremo sulle proteine dell'HPV-16, il virus associato più frequentemente con il carcinoma squamoso della cervice uterina, con particolare attenzione alle funzioni responsabili per la trasformazione cellulare e per l'evasione della risposta immunitaria.

HPV-16 E5 è una proteina idrofobica localizzata nelle membrane endoplasmatiche. Tramite interazione con la proteina cellulare 16K, parte della pompa H⁺ V-ATPase, E5 stimola l'attivazione del recettore per EGF e quindi proliferazione cellulare; inibisce la comunicazione intercellulare via le gap junctions; rende le cellule resistenti all'apoptosi e impedisce il trasporto di MHC (HLA) class I e class II. L'assenza di HLA I e/o II dalla superficie cellulare potenzialmente provoca il mancato riconoscimento delle cellule trasformate da parte dei linfociti CD4 e/o CD8 rispettivamente.

HPV-16 E6 interagisce con numerose proteine cellulari e interferisce con la loro funzione. Queste proteine appartengono a quattro gruppi generali: fattori di trascrizione; proteine pro-apoptotiche; proteine coinvolte nella formazione e mantenimento della architettura cellulare, polarità e adesione, e fattori di replicazione e repair del DNA. Dato che parecchie proteine appartengono a più di un gruppo, E6 è capace di sovvertire numerose funzioni cellulari. L'interazione con la p53 è una delle più importanti poiché interferisce sia con i segnali di trascrizione della p53 che con quelli risultanti in apoptosi. L'interazione con IRF-1 (interferon-responsive factor) blocca la trascrizione di geni codificanti per proteine immunitarie indotta da interferone e contribuisce potenzialmente all'evasione immunitaria del virus.

HPV-16 E7 interagisce con numerose proteine cellulari, incluse p105Rb e altri membri della famiglia Rb; fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina; regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata. L'interazione con ISGF-3 and IRF-1 causa la possibile evasione delle cellule trasformate dalla risposta immunitaria innata.

Il quadro emergente da questi studi è che le tre proteine trasformanti di HPV-16 cooperano nel promuovere la proliferazione cellulare, nell'inibire l'apoptosi e nell'evadere la risposta immunitaria dell'ospite sia innata che acquisita.

3

MECCANISMI DI TRASFORMAZIONE DEI PAPILLOMAVIRUS UMANI MUCOSALI E CUTANEI

Santo Landolfo

*Laboratorio di Virologia Molecolare, Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia,
Università degli Studi di Torino*

I papillomavirus umani (HPV) sono dei piccoli virus a DNA a doppia elica che infettano i tessuti epiteliali di cute e mucose. Numerosi studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato che gli HPV genotipo α (precedentemente definiti mucosali) sono agenti causali del cancro della cervice uterina. I meccanismi molecolari coinvolti sono ben definiti e sono principalmente associati alla capacità delle proteine E6 ed E7 dei genotipi definiti “ad alto rischio di trasformazione” (HPV-16,18,31,33,45) di legare e neutralizzare l’attività di p53 e pRb rispettivamente. L’associazione tra HPV (genotipo β) e tumori cutanei (NMSC, nonmelanoma skin cancer) è invece meno chiara, anche se esistono diversi lavori che dimostrano la presenza del genoma di HPV nei carcinomi squamosi cutanei, soprattutto negli individui immunodepressi. La presenza di questi virus come commensali complica ovviamente l’interpretazione dei dati sulla presenza del DNA di HPV, soprattutto in considerazione del fatto che tecniche come la PCR sono in grado di visualizzare anche poche copie di genoma virale. I virus presenti nella cute di ogni individuo verrebbero quindi attivati dall’esposizione ai raggi ultravioletti, dall’immunodepressione, dall’iperproliferazione dell’epitelio come la psoriasi, o da background genetici particolari dell’ospite come l’epidermodisplasia verruciforme (EV). Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che le proteine E6 ed E7 di genotipi cutanei presentano una bassa affinità di legame per le proteine p53 e pRb e non attivano la loro degradazione. Nei soggetti immunodepressi e nei pazienti EV inoltre i tumori si sviluppano prevalentemente nelle zone fotoesposte e sono soprattutto associati a HPV-5 e HPV-8. Più recentemente è stato dimostrato che la proteina E6 di HPV cutanei associati a tumori come HPV-5 e HPV-8 è in grado di legare sia la proteina XRCC1 coinvolta nel processo di riparo del DNA, sia la proteina pro-apoptotica bak, riducendo l’attività biologica di entrambe. Anche se i dati accumulati sui meccanismi di base della patogenesi degli HPV cutanei sono molto inferiori a quelli su HPV mucosali, è sempre più evidente che il comportamento biologico dei mucosali rispetto ai cutanei è molto diverso, e gli HPV cutanei devono quindi essere considerati dei cofattori di carcinogenesi cutanea.

Seconda sessione

HPV: infezioni e meccanismi patogenetici

Moderatori

Pietro Crovari, Antonio Cassone

4

HPV E CANCEROGENESI IN INFEZIONI EXTRAGENITALI

Aldo Venuti

Laboratorio di Virologia, Istituto per la Ricerca sul Cancro "Regina Elena", Roma

L'applicazione dei postulati di Koch risulta essere praticamente impossibile per i virus oncogeni ed i maggiori problemi insorgono per le due tipologie, diretta e indiretta, di interazioni nel processo di trasformazione cellulare. È bene quindi differenziare fra le due alternative adottando diversi criteri. Per la diretta si potrebbero adottare i seguenti criteri:

- la presenza costante e la persistenza del DNA virale;
- l'attività proliferativa di geni virali e/o cellulari virus-modificati;
- il fenotipo trasformato legato alla continua espressione virale;
- evidenza epidemiologica del virus come un fattore di rischio elevato per il cancro.

Per i virus che agiscono con meccanismi indiretti una loro valutazione può essere effettuata sui dati epidemiologici, sui possibili modi di azione (i.e. prevenire l'apoptosi) e sui dati clinici.

Con questi criteri è stata stabilita l'associazione fra HPV mucosali ed il carcinoma della cervice e, quindi, per estrapolazione anche altri tumori HPV-associati potrebbero avere le stesse caratteristiche.

Sequenze genomiche di HPV sono state riscontrate in un'ampia varietà di tumori umani; il significato della loro presenza sarà discusso alla luce dei dati a favore e contrari ad un'associazione degli HPV con tumori extragenitali. Attualmente dati convincenti esistono per i tumori anali e quelli dell'orofaringe.

Al contrario, l'attività cancerogena degli HPV cutanei sembra essere legata a meccanismi indiretti che consentirebbero la sopravvivenza di cellule che, danneggiate ad esempio dagli UV, andrebbero invece incontro ad apoptosi. Il coinvolgimento degli HPV nei tumori cutanei è stato dimostrato per la prima volta in pazienti affetti da una rara malattia ereditaria: l'epidermodisplasia verruciforme (EV). I tipi di HPV riscontrati in questa patologia sono chiamati EV-HPV. Gli stessi tipi sono stati anche ritrovati nel 30-50% dei tumori cutanei (non-melanomi) della popolazione immuno-competente ed in oltre il 90% dei tumori cutanei di pazienti immuno-depressi. Non vi è una predominanza di un tipo di HPV né si può parlare di tipi ad alto rischio analogamente a quanto riferito per la EV ed il carcinoma della cervice. I dati circa il contributo degli HPV cutanei alla cancerogenesi saranno discussi in relazione alla possibilità di un meccanismo tipo "hit and run" oppure ausiliario alle radiazioni solari. In conclusione gli HPV giocano un ruolo nella patogenesi dei tumori extragenitali, ma il meccanismo attraverso il quale esercitano questa azione sembra essere differente a seconda del tipo virale (mucosale o cutaneo) e della localizzazione anatomica.

5

VARIANTI DI HPV16 E RISCHIO DI NEOPLASIE GENITALI NELLA POPOLAZIONE ITALIANA

Franco Maria Buonaguro

Laboratorio di Oncologia Virale e Centro di Riferimento per l'AIDS, Istituto Nazionale Tumori "Fondazione Pascale", Napoli

Il Papillomavirus tipo 16 (HPV16) presenta diverse varianti (E, AA, As, Af1, Af2), ciascuna con una specifica distribuzione geografica, proprietà biologiche e biochimiche, e rischio di progressione neoplastica. Recentemente l'identificazione delle varianti di HPV16 nella popolazione femminile generale, e nelle pazienti affette da lesioni invasive (ICC) o da neoplasie intraepiteliali (CIN1-3), afferenti a Centri di screening ginecologico in Lombardia e Campania, ha permesso la caratterizzazione della distribuzione di varianti e la valutazione del rischio di progressione neoplastica presente nella popolazione italiana.

Campioni biologici da cervice uterina sono stati collezionati da 197 pazienti e da 257 soggetti clinicamente sani (controlli) nello stesso range di età. Le sequenze di HPV16 sono state identificate mediante una reazione di PCR specifica per i geni E6/E7. Inoltre è stato messo a punto ed utilizzato un sistema di PCR per l'identificazione delle classi e sottoclassi di HPV16 basato sull'utilizzo di *oligoprimers* specifici per la presenza di nucleotidi *signature* delle rispettive LCR ed E6.

Sequenze di HPV16 sono state identificate nel 62,8% degli ICC, nel 43,9% del CIN2-3, nel 43,4% del CIN1 e nell'8,6% dei controlli. Nelle 123 lesioni positive per l'HPV16 sono state identificate le quattro varianti virali: Ep-T350, E-G350, AA ed Af1. Le pazienti infettate da varianti non Europee (AA ed Af1) presentavano un rischio di sviluppare lesioni ICC (OR = 68,9) più alto di quelle infettate da varianti Europee (Ep-T350 ed E-G350) (OR = 13.0) rispetto a soggetti negativi per l'HPV16. Inoltre i soggetti positivi per varianti non Europee presentavano un rischio relativo (RR) di sviluppare ICC 15.3 superiore a quei soggetti positivi per l'HPV16 Europeo prototipo (Ep-T350).

La presenza di varianti non Europee dell'HPV16 nel 21,7% dell'ICC, rare nelle lesioni preinvasive (<9%) e nei tessuti normali di controllo (>0,5%), e la loro associazione ad un maggiore rischio relativo di progressione ad ICC suggerisce che esse sono più oncogeniche delle varianti Europee, con la rilevante implicazione della necessità di identificare le varianti di HPV16 ed ottimizzare i protocolli diagnostico/terapeutici, incluso lo sviluppo di vaccini terapeutici specifici.

6

HPV DNA IN SEDE EXTRALESIONALE: UN POSSIBILE MARCATORE DI DIFFUSIONE METASTATICA NEL CARCINOMA CERVICALE

Flavia Lillo, Massimo Origoni, Davide Farci Santarcangeli, Laura Galli, Sara Lodini, Gianluca Taccagni
Laboratorio di Virologia e Centro AIDS “S. Luigi”, IRCCS – Ospedale San Raffaele, Milano

La presenza di metastasi linfonodali rappresenta un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza delle pazienti affette da carcinoma della cervice uterina, essendo questa ridotta (a tre anni 74 verso 86%) nei soggetti con un linfonodo positivo e nulla a 5 anni nei soggetti con più di 5 linfonodi positivi. Nei soggetti con linfonodi negativi la percentuale di ricorrenza di malattia è di circa il 15%, indicando la necessità di un sistema più efficace di riconoscimento di micrometastasi che può presentare maggiori difficoltà di identificazione utilizzando sistemi convenzionali. I metodi molecolari, in questo contesto, possono rappresentare un valido supporto, offrendo la possibilità di analizzare, con elevata sensibilità una maggior quantità di materiale. Numerosi parametri tumore-specifici sono stati proposti a questo scopo, inclusa la determinazione di messaggeri cellulari (es. citocheratina-19) volti a distinguere la presenza di cellule metastatiche in attiva replicazione da frammenti di materiale necrotico rilasciato dalla neoplasia. La determinazione del DNA di HPV, agente causale riconosciuto del carcinoma della cervice e presente in tutte le cellule tumorali, può rappresentare un utile marcatore di disseminazione. La presenza di sequenze HPV specifiche nei linfonodi e nel plasma di pazienti affette da carcinoma della cervice è stata valutata da numerosi autori, con risultati variabili dal riscontro di una associazione positiva con la disseminazione del tumore a nessuna associazione significativa. Nel presente studio sono stati valutati il tipo e la quantità di HPV-DNA in una serie di 13 casi di carcinoma ed i relativi linfonodi. L'età media delle pazienti era di 48,6 anni (range 34-67). La classificazione FIGO ha identificato 10 casi in stadio Ib, un caso IIA, un caso IIB ed un caso IIIB. Istologicamente, 8 casi erano carcinomi squamosi, 2 casi adenocarcinomi e 3 casi adeno-squamosi. In 5 pazienti è stata rilevata invasione linfonodale (da 1 a 10 linfonodi positivi per pz). Nel 61% dei tumori primitivi il tipo virale identificato era HPV-16, nel 30,7% HPV-18, nel 23% HPV-33 ed in un singolo caso HPV-31. Nel 30% dei casi sono state identificate infezioni miste. In tutti i linfonodi è stato possibile identificare sequenze di HPV con una totale concordanza di tipo rispetto al tumore primitivo nei linfonodi positivi ed una concordanza del 52% nei negativi. La valutazione quantitativa della presenza di HPV-DNA ha dimostrato che, nei linfonodi positivi, è presente una quantità significativamente superiore ($p=0,0049$) rispetto ai negativi. Questi risultati preliminari suggeriscono che la tipizzazione e la quantificazione di HPV nei linfonodi possono rappresentare un utile marcatore di disseminazione, offrendo evidenti ricadute nel monitoraggio e trattamento delle pazienti. Saranno comunque necessari studi controllati per confermare questa ipotesi ed eventualmente stabilire un adeguato *cut-off* clinico.

7

INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DI CELLULE HPV16-POSITIVE MEDIANTE ANTICORPI INTRACELLULARI CONTRO LA ONCOPROTEINA VIRALE E7

Luisa Accardi

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Alcuni papillomavirus umani, i cosiddetti tipi “ad alto rischio” sono notoriamente associati all’insorgenza di tumori ed in particolare al cancro della cervice uterina, che per incidenza e causa di morte nelle donne è secondo solo al cancro della mammella. Gli interventi contro questa patologia sono attualmente la prevenzione tramite indagini di tipo citologico (Pap test) e la terapia chirurgia in sede. Gli effetti di un vaccino preventivo attualmente in fase di sperimentazione non saranno verificabili che nel prossimo ventennio. Per questi motivi ha grande importanza la ricerca di metodi alternativi alla chirurgia che siano efficaci nel trattamento delle lesioni già in atto. In questo ambito, gli anticorpi ricombinanti hanno già dimostrato elevate potenzialità di applicazione per il trattamento di alcuni tumori. In particolare, gli anticorpi ricombinanti in formato a singola catena (scFv) possono rappresentare strumenti efficaci nell’immunizzazione intracellulare per contrastare specificamente l’azione di proteine oncogene. Nel nostro laboratorio, mediante la tecnologia phage display, sono stati selezionati da una library di anticorpi umani in fago tre anticorpi scFv contro la proteina oncogena E7 del papillomavirus umano di tipo 16, ad alto rischio. Il più reattivo di questi, scFv43, è stato espresso intracellularmente in linee di carcinoma della cervice uterina, mediante appositi vettori di espressione in eucarioti, al fine di poter contrastare l’azione favorente la proliferazione della proteina E7. La sua espressione nei compartimenti nucleare e secretorio è risultata in una efficace azione antiproliferativa, al contrario di quella nel citoplasma. L’ambiente citoplasmatico notoriamente non permette la formazione dei legami disolfuro necessari per il corretto ripiegamento delle molecole proteiche e quindi gli anticorpi che funzionano nel citoplasma sono in genere quelli intrinsecamente stabili a causa della loro specifica sequenza aminoacidica. Abbiamo perciò confrontato i tre scFv selezionati inizialmente allineandone la sequenza aminoacidica dedotta da quella nucleotidica con quelle delle immunoglobuline presenti in banca dati ed abbiamo individuato alcuni residui mutati potenzialmente “destabilizzanti” nella regione variabile della catena pesante (VH) e nella regione ipervariabile della catena leggera (VL CDR3). Il passo successivo è stato di stabilire una strategia di mutagenesi che riportasse almeno parzialmente gli anticorpi alla sequenza di una immunoglobulina originale. Gli anticorpi ottenuti per mutagenesi sono stati poi saggiati in vitro per analizzarne la effettiva stabilità. Tale proprietà ha, infatti, particolare rilevanza qualora si vogliano utilizzare gli anticorpi in vivo nella terapia contro il tumore associato a HPV16.

ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA DELL'INTERFERON DI TIPO I IN CELLULE DI CARCINOMA DELLA CERVICE HPV-POSITIVE

Maria Vincenza Chiantore (a), Serena Vannucchi (a), Elisabetta Affabris (b), Gianna Fiorucci (a,c), Giovanna Romeo (a,d)

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*

(b) *Dipartimento di Biologia, Università di Roma 3;*

(c) *Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR;*

(d) *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi "La Sapienza", Roma*

Differenti sottotipi di Interferone (IFN) hanno dimostrato efficacia clinica nel trattamento di vari tipi di cancro. Inoltre, come risultato dell'attività antivirale, gli IFN sono efficaci nel controllo delle epatiti croniche e dei papillomi ricorrenti e riducono lo sviluppo dei tumori causati da infezioni virali. Gli effetti antitumorali dell'IFN di tipo I sono dovuti sia all'azione antivirale che alla capacità di modulare l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e/o con funzione di soppressori tumorali. Queste citochine che hanno rappresentato la prima terapia biologica efficace nel trattamento dei tumori, svolgono un'azione sinergica con la chirurgia e la chemioterapia nella regressione tumorale e potenziano l'azione di altre citochine o di anticorpi monoclonali con risultati dipendenti dal contesto cellulare. Abbiamo dimostrato che gli IFN di tipo I inibiscono la proliferazione in cellule di carcinoma squamoso della cervice (SCC) HPV-positivo inducendo un rallentamento della fase S del ciclo cellulare. La deregolazione della fase S attiva la morte per apoptosi in cellule SCC che esprimono ORF di E6 ed E7 di HPV-16 e -68. L'apoptosi da IFN- è mediata dal Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). L'IFN- attiva il pathway di morte sia inducendo l'espressione di TRAIL sia incrementando la sensibilità delle cellule di carcinoma a questo fattore proapoptotico. Entrambi i fenomeni sono legati alla deregolazione da IFN della fase S che rappresenta la base molecolare per la correlazione tra l'alterazione del ciclo cellulare e l'apoptosi. TRAIL è un potenziale agente antitumorale poiché risulta efficace sulle cellule tumorali senza danneggiare i tessuti sani circostanti. L'apoptosi indotta da TRAIL è indipendente da p53 e perciò potenzialmente efficace contro tumori resistenti alla chemioterapia. L'uso combinato di IFN e TRAIL, incrementando la morte cellulare per apoptosi, riveste un potenziale interesse terapeutico nel trattamento del cancro della cervice. Inoltre, la caratterizzazione del ruolo delle proteine della famiglia p53 e pRb e di altri target di E6 ed E7 in un contesto di crescita cellulare deregolata da HPV e la conoscenza dei meccanismi attraverso cui l'IFN influenza la replicazione del DNA risultano fondamentali per disegnare una strategia terapeutica e modelli preclinici efficaci basati sull'uso di IFN al fine di contrastare la progressione tumorale nel carcinoma della cervice uterina. Il ruolo del contesto cellulare nell'efficacia antiproliferativa dell'IFN è attualmente studiato mediante il silenziamento specifico dell'espressione delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV o l'inibizione delle loro attività attraverso la sovraespressione dei soppressori tumorali target, in cellule trattate con l'IFN.

Terza sessione

**Diagnostica delle infezioni da HPV
e lesioni associate**

Moderatori

Pietro Crovari, Giorgio Palù

DIAGNOSI MORFOLOGICA DELLE LESIONI HPV-ASSOCIATE

Amina Vocaturo

Dipartimento di Patologia, Istituto per la Ricerca sul Cancro “Regina Elena”, Roma

Gli effetti citopatici del virus del papilloma, visibili al microscopio ottico, consistono in aloni perinucleari di citoplasma rarefatto con condensazione del citoplasma periferico e queste alterazioni vanno sotto il nome di “coilocitosi”. Tali modificazioni furono inizialmente considerate un processo separato dalla “vera” displasia. Tuttavia, le evidenze emerse negli ultimi 30 hanno riconosciuto nell’HPV il principale agente causale nella patogenesi di tutti i precursori del carcinoma cervicale e del carcinoma invasivo: infatti con le tecniche biomolecolari la presenza dell’HPV è diagnosticata nella maggior parte delle lesioni intraepiteliali e nei carcinomi cervicali invasivi (in questi ultimi in più del 99% dei casi). Le alterazioni citopatiche vere e proprie non possono essere quindi concettualmente diversificate dalle alterazioni di tipo “displastico”. Infatti numerosi studi hanno dimostrato che i parametri morfologici per differenziare la coilocitosi dalla displasia lieve variano tra gli osservatori e soprattutto sono privi di significato clinico: infatti entrambe le lesioni condividono gli stessi tipi di HPV e sono simili il comportamento biologico e il trattamento. È per questo che il workshop di Bethesda 1988 ha cambiato il sistema di refertazione della citologia cervico-vaginale, introducendo il concetto di “Lesione Squamosa Intraepiteliale” (SIL) e graduandola in 2 classi diagnostiche:

- SIL di basso grado (che comprende le alterazioni citopatiche vere e proprie, la displasia di grado lieve e CIN1);
- SIL di alto grado (che comprende la displasia di grado moderato e grave, la CIN 2/3 e il carcinoma *in situ*).

DIAGNOSI DI HPV NEL LABORATORIO DI VIROLOGIA: STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE

Anna Maria Degener

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Virologia, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

La famiglia *Papillomaviridae* comprende più di 100 genotipi virali, capaci di causare negli epitelii lesioni che vanno dalla displasia ai tumori benigni fino al cancro della cute e delle mucose. Studi longitudinali hanno permesso di stabilire che il DNA di HPV si ritrova in più del 90% dei carcinomi, che la sua persistenza è necessaria per lo sviluppo del cancro della cervice uterina e che il test per rivelare la presenza di DNA di HPV (in associazione con la citologia) possiede un elevato valore predittivo negativo. Differenti tecniche molecolari per la diagnosi accurata di infezione da HPV sono state messe a punto, ma fino ad oggi solo il test basato sulla cattura dell'ibrido è approvato dalla Food and Drug Administration (FDA).

Altri test diagnostici commerciali o sperimentali vengono utilizzati in programmi di screening su vasta scala per la diagnosi precoce di infezione da HPV, ma il loro utilizzo nei laboratori clinici non è ancora standardizzato a livello mondiale, perciò i dati risultanti non sono facilmente confrontabili. Occorre inoltre distinguere tra metodiche a basso costo e di facile utilizzo nella pratica clinica e quelle più complesse che consentono di acquisire anche dati precisi sulla prevalenza dei differenti genotipi di HPV, in relazione alla patologia, nelle popolazioni di diverse località geografiche e dati sulla storia naturale dell'infezione.

Verranno perciò passati in rassegna i sistemi basati sulla ricerca degli acidi nucleici in cellule esfoliative o biopsie partendo dalla ibridazione *in situ* fino alle tecniche di amplificazione genica, sia specifiche per un singolo genotipo che ad ampio spettro. Inoltre verranno analizzati i vari metodi di conferma della presenza di HPV DNA e di tipizzazione che possono prevedere la distinzione soltanto in tipi ad alto o basso rischio oncogeno fino alla determinazione della sequenza nucleotidica, sottolineando che la scelta della loro applicazione viene stabilita in base alle finalità della ricerca.

È comunque evidente che solo una precisa tipizzazione permette di ottenere, oltre ad una diagnosi clinica più accurata, anche la possibilità di valutare la persistenza del virus e la prevalenza della circolazione dei diversi genotipi nelle popolazioni di differenti aree geografiche, dati che rivestono particolare importanza in previsione dell'allestimento di vaccini efficaci.

11

MARKERS DI PROGRESSIONE TUMORALE IN LESIONI HPV CORRELATE

Marco Ciotti

*Dipartimento di Microbiologia Clinica, Azienda Policlinico Universitario "Tor Vergata",
Roma*

Il ruolo del papillomavirus umano (HPV) nell'eziologia del cancro della cervice uterina è ormai accertato. Essi vengono classificati in due gruppi: HPV ad alto rischio e HPV a basso rischio. I tipi ad alto rischio si riscontrano in quasi il 100% dei carcinomi cervicali, mentre i tipi a basso rischio si riscontrano solo occasionalmente in questo tipo di lesioni.

L'individuazione di markers precoci di trasformazione neoplastica sarebbe di grande aiuto nel management di queste pazienti. A tal fine, abbiamo condotto uno studio di immunoistochimica e PCR-HPV su 302 campioni d'archivio in paraffina (150 carcinomi squamosi e 152 lesioni CIN). I markers selezionati sono stati: p16^{INK4a}, survivina e ERK1. Si è anche visto se questi markers possano avere un ruolo nel predire la clearance del virus dopo trattamento del CIN e l'esito della malattia.

L'indagine molecolare ha confermato che i papillomavirus ad alto rischio sono strettamente associati alle lesioni CIN e al carcinoma squamocellulare. L'immunoistochimica ha evidenziato una significativa relazione lineare tra l'intensità di colorazione per i markers suddetti e il grado della lesione. La colorazione per p16^{INK4a}, survivina e ERK1 non era invece predittiva di eliminazione o persistenza del papillomavirus ad alto rischio dopo trattamento del CIN.

Complessivamente, questi dati indicano che p16^{INK4a}, survivina e ERK1 sembrano essere dei markers precoci di cancerogenesi cervicale. La loro aumentata espressione è strettamente correlata alla presenza di HPV ad alto rischio nelle lesioni CIN e cancro cervicale nel caso di p16^{INK4a} e survivina, ma non nel caso di ERK1.

RISPOSTA ANTICORPALE NELLE INFEZIONI DA HPV

Paola Di Bonito

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I papillomavirus infettano gli epiteli della cute, dei genitali e dell'apparato respiratorio in modo specifico. Tra gli oltre 100 genotipi virali riconosciuti la maggior parte causa lesioni benigne, mentre alcuni genotipi sono associati allo sviluppo di lesioni che degenerano in cancro. Studi epidemiologici hanno dimostrato che HPV16 e pochi altri genotipi virali sono fattore di rischio per lo sviluppo del cancro. I papillomavirus sono diagnosticati mediante saggi di PCR su DNA estratto dalle cellule delle lesioni epiteliali. A causa dell'impossibilità di coltivare *in vitro* i papillomavirus, le tecniche sierologiche si sono sviluppate lentamente. Durante gli ultimi 15 anni diversi metodi sono stati preparati e utilizzati per studiare la presenza di anticorpi specifici nei sieri umani. Essi utilizzano antigeni virali espressi in sistemi eucariotici e procariotici con i metodi del DNA ricombinante. Molti laboratori hanno armonizzato i loro metodi utilizzando un'ELISA che impiega le *virus-like particles* (VLPs) generate per auto-assemblaggio della proteina L1. Tutti i metodi hanno concorso a delucidare molti e importanti aspetti dell'infezione da papillomavirus come l'assenza di correlazione tra guarigione della lesione e presenza nel siero di anticorpi specifici, l'assenza di anticorpi in alcuni pazienti che guariscono oppure la presenza di anticorpi nella maggior parte dei pazienti le cui lesioni hanno subito una trasformazione neoplastica. Attualmente i saggi sierologici vengono usati a scopi epidemiologici e per monitorare l'induzione di anticorpi specifici nello studio e il disegno di vaccini. Nel nostro laboratorio per studi di seroprevalenza è stato messo a punto un ELISA basato sull'impiego di 5 antigeni denaturati di HPV16 espressi in *Escherichia coli* e purificati. Il saggio impiega le proteine del capsido L1 e L2, gli oncogeni E6 ed E7 e la proteina E4. Tale ELISA è stato usato per monitorare la presenza di anticorpi specifici in sieri di donne infettate da HPV di diverso genotipo. I risultati mostrano che il 72,7% dei sieri da pazienti infettati con HPV16 reagiscono almeno con un antigene virale. In modo sorprendente, una più alta percentuale di pazienti infettati con HPV diverso dal 16 reagiscono con un antigene del nostro test (90%). I dati dimostrano che proteine virali ricombinanti di HPV16 possono essere impiegate anche per monitorare anticorpi in pazienti infettati da HPV di genotipo diverso. Inoltre l'impiego simultaneo di più proteine virali, migliora la sensibilità del saggio sierologico e apre all'interessante prospettiva dell'uso dell'intero proteoma virale nella sierologia di HPV.

Quarta sessione

**STRATEGIE PER LA PREVENZIONE E CURA
DELL'INFEZIONE DA HPV**

Moderatori

Stefano Vella, Giovanni Renga

VACCINAZIONE PREVENTIVA ANTI-HPV

Luciano Mariani

Dipartimento di Ginecologia Oncologica, Istituto Regina Elena (IRCCS), Roma

La pratica vaccinale in tema di Human Papillomavirus (HPV) rappresenta uno degli esempi più significativi ed ambiziosi di come le acquisizioni scientifiche e la ricerca biotecnologica possano produrre risultati di altissimo valore socio-sanitario. La possibilità di disegnare progetti vaccinali anti-HPV rende concreta l'idea di una prevenzione primaria del cervicocarcinoma, ponendo le basi per una vera rivoluzione nell'approccio a questa patologia oncologica.

L'ampio bagaglio culturale (virologico, immunologico, epidemiologico e ginecologico) sull'interazione dell'infezione virale con l'ospite ha consentito (mediante la tecnica dei *virus-like particles*) di allestire preparati altamente immunogenici e non pericolosi: cioè non infettanti, né potenzialmente oncogenici. Le sperimentazioni sul modello animale, benché con tutti i limiti applicativi del caso (l'HPV non è infettante nell'animale di laboratorio e pertanto si è dovuto ricorrere alle forme equivalenti), hanno verificato l'efficacia e l'innocuità del vaccino.

Gli studi di Fase III, di cui si attendono a brevissimo i risultati definitivi, indicano con giustificata soddisfazione l'ottenimento di una larghissima copertura protettiva (tra il 90 ed il 100%) a fronte di nessun effetto collaterale degno di nota.

Se l'efficacia della vaccinazione preventiva sembrerebbe, quindi, essere totalmente confermata, rimangono tuttavia aperti molti problemi clinici e metodologici. La scelta dell'area geografica ove pianificare trials post-marketing (Paesi industrializzati vs Paesi in via di sviluppo), la modalità di vaccinazione, l'identificazione del target ideale (limiti d'età, popolazione femminile e maschile), i tempi di somministrazione e di eventuali boost successivi, l'integrazione con i programmi di screening sul territorio, sono solo alcuni delle tematiche cruciali che attendono una risposta.

HPV TEST E PAP TEST NELLO SCREENING DEL CERVICO-CARCINOMA. L'ESPERIENZA ITALIANA: RISULTATI DELLO STUDIO NTCC

Francesca Carozzi (a), Anna R. Del Mistro (b), Carlo Naldoni (c), Marcello Vettorazzi (d), Anna Gillio-Tosi (e), Paola Pienotti (f), Cristina Sani (a), Alberta Vignato (g), Paolo Dalla Palma (h), Salvatore Girlando (h), Paolo Giorgi-Rossi (i), Massimo Confortini (a), Marco Zappa (a), Guglielmo Ronco (l).

(a) *Istituto Toscano Tumori, CSPO, Firenze;*

(b) *Servizio di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica, Azienda Ospedaliera, Padova;*

(c) *Centro di riferimento screening, Assessorato alla Sanità, Regione Emilia Romagna, Ravenna;*

(d) *Registro Tumori Veneto, Università di Padova;*

(e) *Unità di Epidemiologia dei Tumori, CPO, CERMS, Università di Torino;*

(f) *Ospedale "Maggiore", Bologna;*

(g) *Ospedale "San Bonifacio", Soave, Verona;*

(h) *Ospedale "S. Chiara", Trento;*

(i) *Agenzia per la Salute Pubblica, Regione Lazio, Roma;*

(j) *Unità di Epidemiologia dei Tumori, CPO, Torino.*

Nella primavera del 2002 è stato avviato uno studio multicentrico italiano (NTCC: Nuove Tecnologie nello screening del carcinoma cervicale), controllato e randomizzato, sull'utilizzo della ricerca molecolare del papillomavirus umano (HPV) come test primario per lo screening del cancro della cervicale uterina. L'obiettivo finale dello studio è valutare, in confronto allo screening convenzionale basato sul test citologico triennale, la protezione fornita da uno screening basato sulla ricerca molecolare dell'HPV come unico test primario, effettuato ad intervalli prolungati (ogni 5-6 anni) sulle donne negative, i costi (in termini di numero e tipo di test necessari) e gli effetti indesiderati di tale strategia, nonché definire per il test HPV l'età d'inizio e termine migliori e le politiche di gestione delle donne positive. Nella prima fase di reclutamento, le donne eleggibili, che hanno accettato di partecipare allo studio, sono state assegnate casualmente ai due bracci previsti dallo studio: convenzionale o sperimentale. Le donne assegnate al primo braccio hanno eseguito un esame citologico convenzionale. Il prelievo effettuato sulle donne assegnate al braccio sperimentale è stato esaminato sia per la presenza di HPV-HR e sia mediante citologia su strato sottile. Nella prima fase sono state reclutate complessivamente circa 46.000 donne. Meno del 10% delle donne del braccio sperimentale sono risultate positive al test HPV-HR. Nella seconda fase del reclutamento, lo screening delle donne assegnate al braccio sperimentale è stato effettuato solo con il test HPV. Il reclutamento si è concluso alla fine del 2004; il numero di donne arruolate è di circa 50.000 unità. L'8% delle donne assegnate al braccio sperimentale contro il 2,8% del braccio convenzionale è stato inviato all'esame colposcopico. I dati dello studio sono ancora incompleti; i risultati preliminari sembrano indicare che il test HPV aumenta fortemente la sensibilità ma con una riduzione del valore predittivo positivo (PPV). Sulla base di questi dati sono allo studio strategie per la gestione delle donne HPV positive. Il disegno dello studio prevede di risottoporre le donne di entrambi i bracci a screening dopo tre anni. Il risultato principale sarà il tasso di identificazione di lesioni di alto grado al reclutamento e soprattutto al successivo round di screening. I dati ottenuti permetteranno di trarre conclusioni sulla sicurezza di intervalli di 5-6 anni tra i test HPV.

VACCINO TERAPEUTICO CONTRO LE INFEZIONI DA HPV

Colomba Giorgi

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'identificazione del papillomavirus umano (HPV) come agente causale del cancro della cervice e delle lesioni precancerose ha fatto pensare alla possibilità di aggredire questa patologia mediante vaccini contro HPV sia profilattici che terapeutici. Vaccini profilattici in grado di sviluppare anticorpi neutralizzanti contro il capsido virale sono in fase avanzata di sperimentazione clinica e saranno presto disponibili. Per i vaccini terapeutici significativi sviluppi si sono avuti negli ultimi anni, indicando come possibile una opzione non chirurgica del trattamento dei pazienti con displasie associate ad HPV.

Il potenziale oncogeno dei cosiddetti HPV ad alto rischio è attribuito ai prodotti dei due geni precoci E6 ed E7, la cui espressione è rilevata durante tutto il ciclo virale ed è necessaria per l'insorgere ed il mantenimento della trasformazione maligna della cellula. Entrambi questi antigeni tumore-specifici sono considerati quali bersagli per una specifica immunoterapia contro il cancro della cervice. Molti sono gli approcci che si stanno seguendo per sviluppare un vaccino che sia in grado di attivare nell'organismo una risposta immunitaria citotossica che sia in grado di distruggere le cellule del tumore. Tali strategie sono basate sulla espressione di E6 ed E7 mediante vettori sia batterici che virali, plasmidi, *virus-like particles* chimeriche, peptici sintetici e proteine ricombinanti purificate espresse in batteri e piante.

Recenti studi hanno inoltre mostrato il possibile uso di cellule dendritiche caricate con HPV E7 come "vaccino" in grado di stimolare una risposta immunitaria citotossica contro le cellule del cancro della cervice.

Solo pochi trials clinici sono stati autorizzati dalle Commissioni Etiche per la sperimentazione di questi vaccini sull'uomo e solo su casi cosiddetti compassionevoli, quei casi cioè in cui sono state tentate tutte le terapie finora accettate con esito negativo.

La via quindi per la realizzazione di un vaccino terapeutico è ancora lunga e ci vorranno ancora molti anni di ricerca prima che possa essere realizzato.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

La bibliografia di seguito riportata si riferisce ai contributi che nel volume sono presentati secondo la stessa sequenza numerica

1

Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001,20(54):7874-7887.

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004,78(21):11451-11460.

Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001,20(54):7888-7898.

2

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005,113:276-283.

McCance D.J. The Biology of E7. In: McCance D.J. (Ed.). *Perspectives in Medical Virology: Human Papilloma Viruses*. London: Elsevier; 2002. pp. 101-118.

Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001,20(54):7888-7898.

O'Brien PM, Campo MS. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 2002,88:103-117.

Thomas M., Pim D., Banks L. Papillomavirus E6 Protein Interactions. In: McCance D.J. (Ed.). *Perspectives in Medical Virology: Human Papilloma Viruses*. London: Elsevier; 2002. pp. 71-99.

Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 2003,148:1445-1453.

Venuti A., Campo M.S. The E5 Protein of Papillomaviruses. In: McCance D.J. (Ed.). *Perspectives in Medical Virology: Human Papilloma Viruses*. London: Elsevier; 2002. pp. 141-162.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmī Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 2003,310:100-108.

Zwerschke W, Jansen-Durr P. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res* 2000,78:1-29.

4

Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992,21:95-100.

Future Directions in Epidemiologic and Preventive Research on Human Papillomaviruses and Cancer. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2003, No. 31.

Harald zur Hausen. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 2001,20:7820-7823.

Hennig EM, Nesland JM, Di Lonardo A, Venuti A. Multiple primary cancers and HPV infection: are they related? *J Exp Clin Cancer Res* 1999,18:53-54.

Muscardin LM, Poggiali F, Balus L, Venuti A. HPV5b variant in neoplastic lesion of an Italian patient affected by epidermodysplasia verruciformis. *Eur J Dermatol* 2001,6:572-575.

Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. Review. *J Clin Virol* 2005,32:S59-66.

Venuti A, Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Rahimi S, Vigili M. Presence of HPV in head and neck tumours: high prevalence in tonsillar localization. *J Exp Clin Cancer Res* 2004,23:561-566.

Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol* 2000,60:396-402.

5

Buonaguro FM, Human Papillomaviruses and Cervical Lesions in the Italian Population. *The Women's Oncology Review* 2004,4(2):79-84.

Buonaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, Biryahwaho B, Sempala SD, Giraldo G. The Uganda study on HPV variants and genital cancers. *J Clin Virol* 2000,19(1-2):31-41.

Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Virol* 2000,81(12):2969-2982.

Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol* 2004,74(1):117-126.

6

Delgado G, Bundy B, Zaino R, Sevin BU, Creasman WT, Major F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990, 38(3):352-357.

Fuller AF Jr, Elliott N, Kosloff C, Hoskins WJ, Lewis JL Jr. Determinants of increased risk for recurrence in patients undergoing radical hysterectomy for stage IB and IIA carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1989,33(1):34-39.

Lentz SE, Muderspach LI, Felix JC, Ye W, Groshen S, Amezcua CA. Identification of micrometastases in histologically negative lymph nodes of early-stage cervical cancer patients. *Obstet Gynecol* 2004,103(6):1204-1210.

Lillo FB, Lodini S, Ferrari D, Stayton C, Taccagni G, Galli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clin Infect Dis* 2005,40(3):451-457.

Van Trappen PO, Gyselman VG, Lowe DG, Ryan A, Oram DH, Bosze P, Weekes AR, Shepherd JH, Dorudi S, Bustin SA, Jacobs IJ. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* 2001,357:15-20.

Yuan C, Wang P, Lai C, Tsu E, Yen M, Ng H. Recurrence and survival analyses of 1,115 cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Obstet Invest* 1999, 47(2):127-132.

8

Borden EC, Lindner D, Dreicer R, Hussein M, Peereboom D. Second-generation interferons for cancer: clinical targets. *Semin Cancer Biol* 2000,10:125-144.

Chadha KC, Ambrus JL Jr, Dembinski W, Ambrus JL Sr. Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. *Exp Biol Med* 2004,229:285-290.

Vannucchi S, Chiantore MV, Fiorucci G, Percario ZA, Leone S, Affabris E, Romeo G. Trail is a key target in s-phase slowing-dependent apoptosis induced by interferon- in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2005,24:2536-2546.

Vannucchi S, Percario ZA, Chiantore MV, Matarrese P, Chelbi-Alix MK, Fagioli M, Pelicci PG, Malorni W, Fiorucci G, Romeo G, Affabris E. Interferon- induces S phase slowing via up-regulated expression of PML in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2000,19:5041-5053.

Yazigi R, Aliste G, Torres R, Ciudad AM, Cuevas M, Garrido J, Prado S, Sola A, Castillo R, Cerda B, Cumsille MA, Gonzalez M, Navarro C, Reyes JM. Phase III randomized pilot study comparing interferon α -2b in combination with radiation therapy versus radiation therapy alone in patients with stage III-B carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2003,13:164-169.

9

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Human Papillomaviruses*. Lyon: IARC; 1995 (Vol.64).

Solomon D, Nayar R. (Ed.). *The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria and explanatory notes*. Second Edition. New York: Springer-Verlag; 2005. 191 p.

The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. NCI workshop. *JAMA* 1989,262:931-934.

11

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997,3:917-921.

Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003,31:3-13.

Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 1997,15:1437-1444.

Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 2001,75:4705-4712.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003,348:518-527.

zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer: *J Natl Cancer Inst* 2001,93:252-253.

zur Hausen H. Papillomaviruses as carcinomaviruses. In: Klein G (Ed.). *Advances in Viral Oncology*. New York: Raven Press; 1989,8:1-26.

13

Stern PL, Brown M, Stacey SN, Kitchener HC, Hampson I, Abdel-Hady El-S, Moore JV. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 2000,19:57-66.

Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002,89:249-261.

Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001,93:284-292.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU, Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002,347(21):1645-1651.

Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G, GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004,364:1757-1765.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE, Olsson SE, Steinwall M, Brown DR, Kurman RJ, Ronnett BM, Stoler MH, Ferenczy A, Harper DM, Tamm GM, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Jansen KU, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005,6(5):271-278.

15

Brinkman JA, Caffrey AS, Muderspach LI, Roman LD, Kast WM. The impact of ant HPV vaccination on cervical cancer incidence and HPV induced cervical lesions: consequences for clinical management. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005,26:129-142.

Franconi R, Di Bonito P, Dibello F, Accardi L, Muller A, Birilli A, Simeone P, Venuti A, Giorgi C. Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Res* 2002,62(13): 3654-3658.

Frazer IH, Quinn M, Nicklin JL, Tan J, Perrin LC, Ng P, O'Connor VM, White O, Wendt N, Martin J, Crowley JM, Edwards SJ, McKenzie AW, Mitchell SV, Maher DW, Pearse MJ, Bassler RL. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 2004,23:172-181.

Monsonego J, Bosch X, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, Sankaranarayanan R, Schiller J, Singer A, Wright T, Kinney W, Meijer C, Linder J. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004,108:329-333.

Preville X, Ladant D, Timmerman B, Leclerc C. Eradication of established tumors by vaccination with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res* 2005,66:641-648.

Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Bossini B, Roman JJ, Cannon MJ, Bignetti E, Cane S, Pecorelli S. Induction of tumor-specific cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes by HPV16 and HPV18 E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with cancer of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003,89:271-280.

Stanley M. The end for genital human papillomavirus infections? *Lancet Oncol* 2005,6: 256-257.

Tomson TT, Roden RB, Wu TC. Human papillomavirus vaccines for the prevention and treatment of cervical cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2004,5:1247-1261.

INDICE DEGLI AUTORI

Accardi, L.; 12
Affabris, E.; 13
Buonaguro, F.M.; 10
Campo, M.S.; 4
Carozzi, F.; 24
Chiantore, M.V.; 13
Ciotti, M.; 19
Confortini, M.; 24
Dalla Palma, P.; 24
Degener, A.M.; 18
Del Mistro, A.R.; 24
Di Bonito, P.; 20
Farci Santarcangeli, D.; 11
Fiorucci, G.; 13
Galli, L.; 11
Gillio-Tosi, A.; 24
Giorgi, C.; 25
Giorgi-Rossi, P.; 24
Girlando, S.; 24
Infections and Cancer Biology Group; 3
Landolfo, S.; 5
Lillo, F.; 11
Lodini, S.; 11
Mariani, L.; 23
Naldoni, C.; 24
Origoni, M.; 11
Pienotti, P.; 24
Romeo, G.; 13
Ronco, G.; 24
Sani, C.; 24
Taccagni, G.; 11
Tommasino, M.; 3
Vannucchi, S.; 13
Venuti, A.; 9
Vettorazzi, M.; 24
Vignato, A.; 24
Vocaturo, A.; 17
Zappa, M.; 24

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2005 (n. 3) 13° Suppl.