

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Biomediche - Curriculum Sanità Pubblica - dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2018/2019 – XXXII ciclo, con il sostegno di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2014-2020 Asse III - Istruzione e Formazione - Obiettivo Tematico 10 “Investire nell’istruzione, nella formazione e nella formazione professionale per le competenze e l’apprendimento permanente”.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE

Curriculum in Sanità Pubblica

(XXXII ciclo)

Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori
extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna:
aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica

Tutor:

Prof. Andrea Piana

Dottoranda:

Narcisa Muresu

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna:
aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

Indice

1. INTRODUZIONE	Pag. 6
1.1 Human Papillomavirus	Pag. 6
Classificazione e struttura virale	Pag. 7
Ciclo vitale HPV	Pag.10
1.2 Patologie correlate all'infezione da HPV	Pag. 12
Tumore cervicale	Pag. 14
Tumori dell'area ano-genitale	Pag. 14
Tumore del pene	Pag.16
Tumore anale	Pag. 18
Tumori orofaringei	Pag. 21
1.3 Prevenzione primaria e secondaria	Pag. 22
2. SCOPO DEL LAVORO	Pag. 26
3. MATERIALI E METODI	Pag. 28
Analisi isto-patologica	Pag.28
Analisi molecolare	Pag. 30
Analisi statistica	Pag. 34
4. RISULTATI	Pag. 35
5. DISCUSSIONE	Pag. 42
6. CONCLUSIONI	Pag. 43
6. BIBLIOGRAFIA	Pag. 48

Riassunto

Approssimativamente oltre 640.000 casi di tumore ogni anno sono attribuibili all'infezione da Human Papilloma Virus (HPV), equivalenti al 4,5% dei nuovi casi diagnosticati a livello globale.

L'impatto maggiore delle patologie HPV-correlate è certamente più rilevante nelle donne, nelle quali è riconosciuta come causa necessaria per lo sviluppo del carcinoma alla cervice uterina. Tuttavia, sempre più maggiori evidenze suggeriscono un ruolo dell'HPV nell'insorgenza di neoplasie a carico di altri distretti corporei, quali il tratto ano-genitale (ano, pene, vagina, vulva) e orofaringeo.

Nonostante la storia naturale dell'infezione sia ancora poco chiara, il lungo periodo di latenza che decorre dal momento dell'infezione allo sviluppo del carcinoma invasivo consente una diagnosi precoce ed un tempestivo trattamento delle lesioni pre-neoplastiche, con un effetto positivo diretto sull'*outcome* finale. Per tale motivo, negli ultimi anni, si assiste ad una significativa riduzione dell'incidenza del tumore cervicale soprattutto nei Paesi in cui sono attive efficaci misure preventive, attualmente rappresentate dalla vaccinazione anti-HPV nelle adolescenti e l'attuazione di screening per il cervicocarcinoma, nelle donne tra i 25 e i 64 anni. Tale riduzione non appare omogenea a livello globale, infatti, il tumore cervicale rappresenta tutt'oggi la prima causa di morte nelle donne dei Paesi meno sviluppati. Contrariamente da quanto accade per i tumori cervicali, recentemente si assiste ad un trend in aumento per altre patologie HPV-correlate, per le quali, la scarsa conoscenza della storia naturale dell'infezione, non ha permesso di attuare misure preventive e metodologie diagnostiche adeguate.

La presente tesi di dottorato, facente parte di un progetto più ampio ed articolato sull'epidemiologia dell'infezione da HPV, ha come scopo principale quello di ampliare le conoscenze sul ruolo dell'infezione virale nell'eziopatogenesi di neoplasie extra-cervicali.

In particolare, si è focalizzata l'attenzione sui tumori dell'ano e del pene neoplasie che, pur avendo un'incidenza relativamente bassa rispetto ad altre patologie tumorali, sono spesso caratterizzati da una prognosi negativa in quanto diagnosticati tardivamente.

Si è avviato, a tale scopo, una ricerca retrospettiva dei casi diagnosticati presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari nel periodo 2002 – 2018, con la raccolta dei campioni biotipici paraffinati e l'acquisizione delle informazioni demografiche e cliniche relative a ciascun caso osservato.

Tutti i campioni biotici sono stati sottoposti alla ricerca del DNA virale di HPV ed all'identificazione del genotipo responsabile. Inoltre, si è proceduto con la ricerca del trascritto oncogeno E6 e del marcatore immunostochimico p16, marker considerati particolarmente importanti dal punto di vista diagnostico e prognostico nelle lesioni HPV-correlate, in particolare in quelle riguardanti il distretto testa-collo, per le quali una loro positività è associata ad una prognosi positiva.

I risultati ottenuti hanno confermato il ruolo eziologico dell'HPV nello sviluppo di tumori anali e del pene, e sono suggestivi dell'estensione della vaccinazione anti-HPV in entrambi i sessi come strategia preventiva efficace per prevenire l'infezione e conseguentemente l'insorgenza della neoplasia in particolare nelle categorie più a rischio.

1. INTRODUZIONE

1.1 Human Papilloma Virus (HPV)

Si stima che l'infezione da Human Papillomavirus (HPV) sia tra le infezioni sessualmente trasmissibili più diffuse a livello globale e che la maggior parte degli individui sessualmente attivi contragga il virus almeno una volta durante il corso della vita. Più raramente sono riportati altri meccanismi di trasmissione quali l'auto-infezione tramite contatto mano-genitali e casi di trasmissione verticale dalla madre al feto al momento del parto.

Essendo spesso l'infezione asintomatica, diventa difficile conoscere l'esatta incidenza e prevalenza. Tuttavia, meta-analisi condotte negli ultimi decenni su oltre 150.000 donne stimano una prevalenza globale tra il 10-12%, sottolineando rilevanti differenze a seconda delle aree geografiche considerate, con il continente africano che si attesta al primo posto (20-30%), seguita dall'Europa dell'est (21%) e America Latina (16%) [23; 29].

Come accade per tutte le infezioni sessualmente trasmesse, la maggior parte dei fattori di rischio sono relativi alle abitudini sessuali dell'ospite, quali l'età di esordio dell'attività sessuale, numero di partner, rapporti promiscui e pregresse infezioni. Per questo motivo, la storia naturale dell'infezione da HPV segue un andamento caratteristico in base all'età, con un'incidenza maggiore nelle giovani donne tra i 25 e i 30 anni, che tende a diminuire con l'avanzare dell'età e più marcatamente oltre i 45 anni (Fig.1).

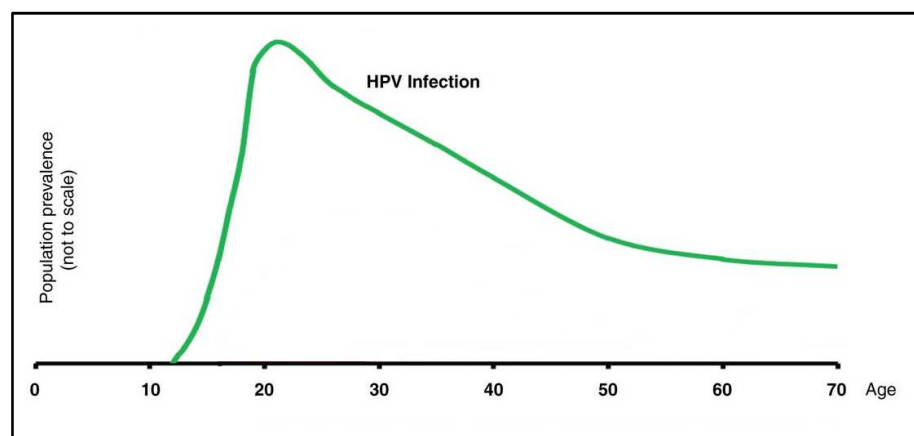


Figura 1: Andamento dell'infezione da HPV in base all'età (Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(4):553–560).

L'evoluzione della patologia dipende da fattori legati alle caratteristiche del virus e dell'ospite: il genotipo di appartenenza, la carica virale infettante e lo stato di immunocompetenza dell'ospite.

L'infezione da HPV risulta essere causa necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo del tumore alla cervice uterina e, per tale motivo, alcuni genotipi sono stati classificati come carcinogeni appartenenti al gruppo 1, secondo l'International Agency for Research on Cancer (IARC) [43]. Il processo carcinogenico dura diversi decenni e prevede diverse fasi, inclusi l'infezione, la persistenza del virus, la progressione della lesione e infine lo sviluppo della neoplasia attraverso l'invasione dei tessuti. I primi stadi sono reversibili, infatti, l'infezione risulta spesso transitoria e si risolve spontaneamente entro i primi 12-18 mesi nel 70% dei casi ed entro due anni per il 90%, contrastata dalla risposta immunitaria dell'ospite [30]. Nel ~10% dei casi l'infezione persiste e per fattori al momento ancora poco chiari, legati presumibilmente a interazioni tra ospite, virus e ambiente, questa può rappresentare il principale fattore di rischio per lo sviluppo del tumore alla cervice uterina.

Classificazione HPV

L'International Committee on the Taxonomy of Virus (ICTV) ha classificato i *Papillomavirus* come appartenenti alla famiglia dei *Papillomaviridae* che rappresentano un gruppo eterogeneo di virus privi di involucro, epitelio trofici, con un diametro tra i 45 e i 55 nm, in grado di infettare la cute e le mucose di un'ampia varietà di animali, incluso l'uomo ed indurre una incontrollata proliferazione cellulare. Differentemente dal passato, dove la classificazione veniva effettuata mediante l'impiego di enzimi di restrizione, attualmente le più moderne metodiche di sequenziamento genico utilizzano un frammento del genoma virale (L1) come riferimento nella classificazione internazionale. Su tali basi sono stati identificati oltre 200 genotipi differenti di HPV, raggruppati in differenti generi (Alpha-, Nu/Mu-, Beta, Gamma) (Fig.2). Ogni genere è suddiviso in diverse specie il cui grado di similarità tra sequenze geniche varia tra il 60 e 70%; ogni singolo genotipo, all'interno di ciascuna specie, ha una corrispondenza genica tra il 71 e l'89%; le singole varianti vengono invece distinte per poche basi (1-2%) all'interno della sequenza L1.

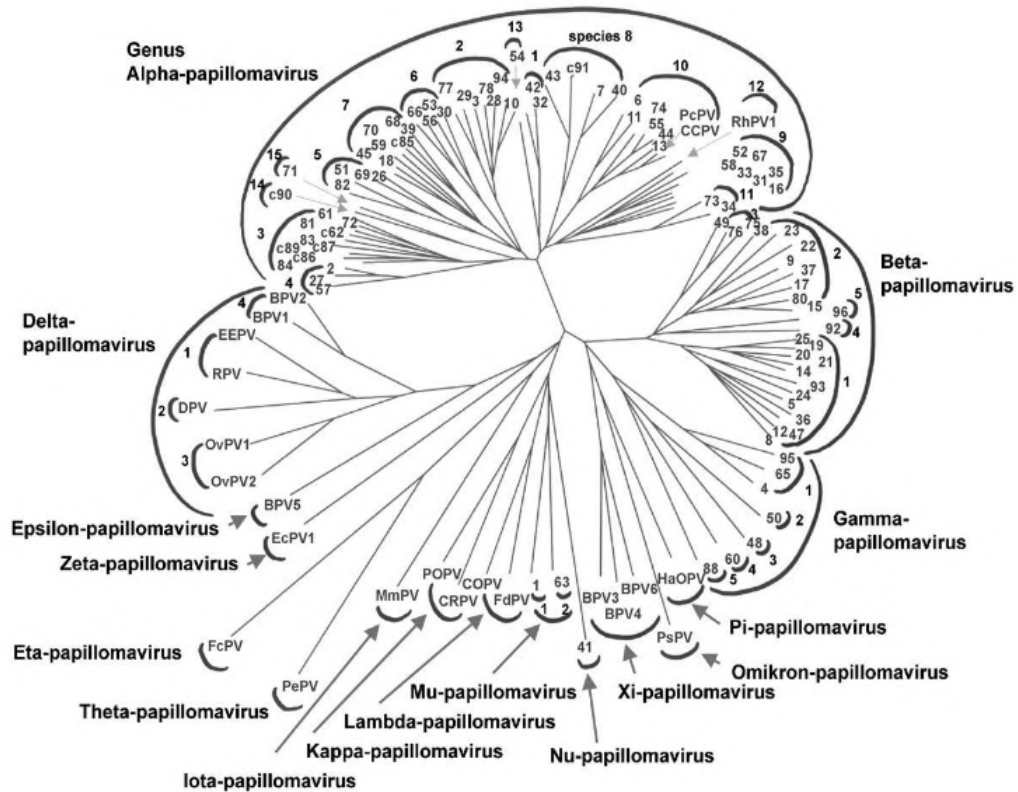


Figura 2: Albero filogenetico dei Papillomavirus

Sono circa 40 i genotipi di interesse clinico per l'uomo, classificati come HPV a basso rischio (HPV-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81, -CP6108) principalmente in grado di infettare la cute delle aree ano genitali provocando lesioni benigne o condilomi e HPV ad alto rischio (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, e -59) associati all'infezione dello strato mucosale del tratto ano-genitale, urinario e dell'orofaringe. L'HPV 16 è responsabile della maggior parte delle lesioni cancerose nei diversi distretti anatomici, seguito dall'HPV-18 come diffusione a livello globale [56].

L'Human Papillomavirus è costituito da una molecola icosaedrica composta da 72 capsomeri ed un genoma a doppio filamento di DNA di circa 8000 bp. Il genoma di HPV (Fig.3) contiene approssimativamente 8 open reading frames (ORFs) divise in 3 regioni principali implicate nella produzione delle diverse proteine virali (Tab.1).

- La prima regione è rappresentata da una regione di controllo di 400-1000 bp, conosciuta come long control region (LCR). Questa regione, caratterizzata da un'elevata variabilità, controlla la trascrizione di tutte le ORFs e la replicazione virale

- La seconda regione, detta Early Region, codifica per le proteine coinvolte durante la replicazione virale. In particolare, regola l'espressione delle proteine oncogene E1-E7, necessarie durante il processo di trasformazione cellulare
- La terza regione è rappresentata dalla Late Region, che codifica per le proteine strutturali necessarie per la replicazione virale (L1 e L2). L1 è la componente principale del capsido ed L2 è deputata all'impacchettamento corretto del DNA virale all'interno del capsido.

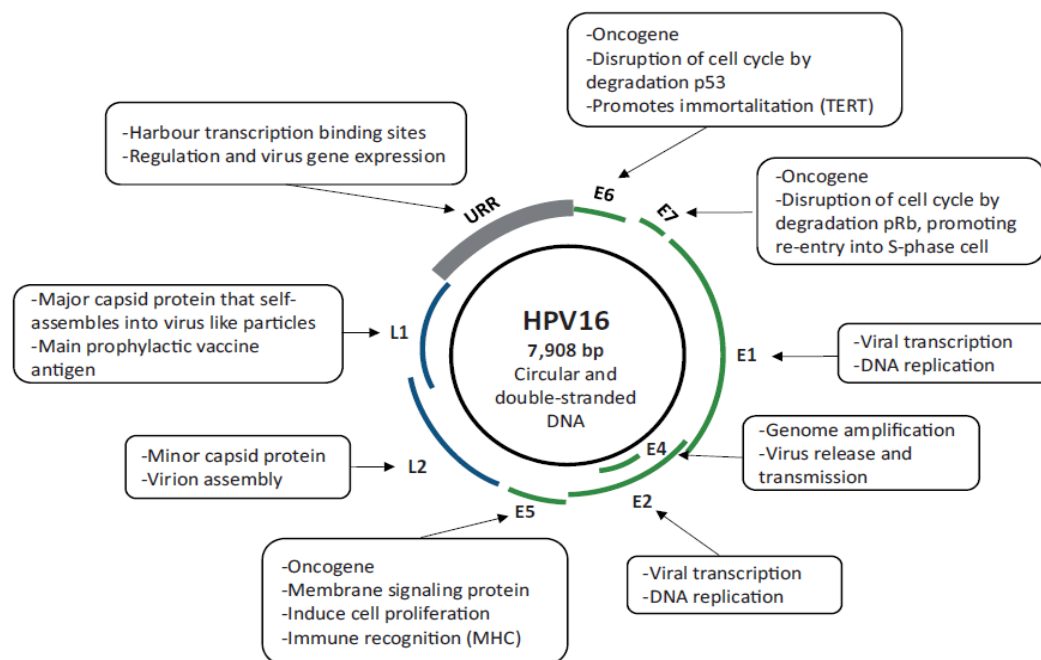


Figura 3: Principali geni di HPV, suddivisi nelle tre regioni principali del genoma: URR (upstream regulatory region), early region (E1-E7) e late region (L1 e L2) [77]

Tabella 1: Proteine virali dell'HPV

Proteine	Funzione
L1	Assemblamento capsomeri e capsido. Interagisce con L2 e recettori della cellula ospite
L2	Facilita l'assemblamento ed interagisce con i recettori cellulari ed il DNA
E1	Necessario per la replicazione virale. Lega il DNA nel punto di origine della replicazione
E2	Principale regolatore della trascrizione virale
E4	Agisce negli stadi tardivi della replicazione facilitando l'assemblamento e il rilascio del virus. Induce l'arresto del ciclo cellulare in G2
E5	Induce la proliferazione cellulare inibendo il processo apoptotico
E6	Induce la sintesi di DNA e previene la differenziazione cellulare
E7	Interagisce con i regolatori negativi del ciclo cellulare e soppressori tumorali. Induce proliferazione cellulare

Ciclo vitale HPV

Diversamente da meccanismi descritti per altri virus, l'HPV infetta esclusivamente le cellule epiteliali in differenziamento della cute o delle mucose, a seconda del genotipo considerato. Dunque, essendo le cellule basali le uniche in grado di dividersi, il virus deve necessariamente infettare queste per iniziare il proprio ciclo vitale.

L'infezione inizia con la penetrazione del virus nello strato basale dell'epidermide attraverso lesioni superficiali o microtraumi che alterano la normale barriera. Inizialmente il genoma di HPV si mantiene in un basso numero di copie nella cellula ospite (50-100 copie) e solo alcuni geni vengono espressi (E1, E2). Quando la cellula ospite va incontro allo stadio di differenziazione cellulare vengono trascritti altri geni precoci, quali E5, E6 ed E7, ed alcuni geni deputati alla produzione delle proteine strutturali (L1 ed L2). Nelle cellule completamente differenziate il numero di copie di DNA virale per cellula aumenta in maniera rilevante e, a seguito della formazione del capside, questi vengono rilasciati nello spazio inter-cellulare dove sono in grado di infettare nuove cellule e riprendere il loro ciclo vitale.

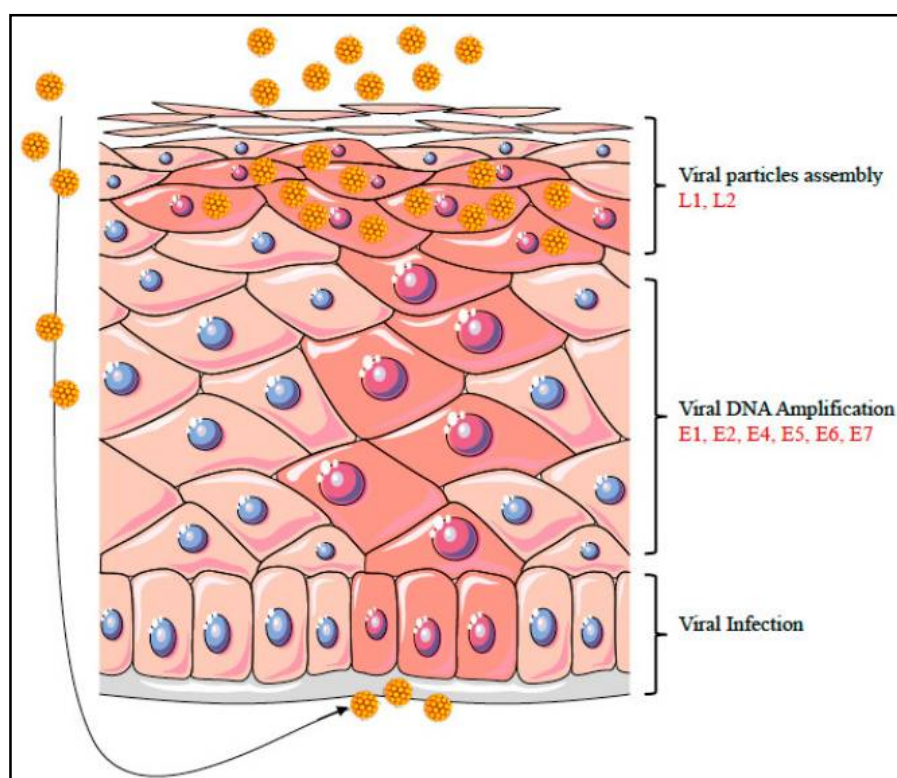


Figura 4: Ciclo vitale dell'HPV nell'epitelio stratificato. Le cellule infettate sono rappresentate in rosa. Il virus penetra fino all'epitelio basale attraverso lesioni cutanee. La differenziazione dell'epitelio attiva il ciclo virale con l'espressione dei geni tardivi (late region) e l'assemblamento del virione. La replicazione virale si accompagna ad un'intensa proliferazione cellulare come mostrato dall'aumento delle cellule infettate [9].

Nel corso delle infezioni sostenute da HPV a basso-rischio il virus rimane in una forma episomale all'interno della cellula ospite, inducendo la sintesi di DNA e proliferazione cellulare. Questi eventi determinano l'insorgenza dei papillomi benigni (verruche e condilomi) [42].

La persistenza dell'infezione, caratteristica dei genotipi ad alto-rischio, avviene mediante l'integrazione del genoma virale nella cellula ospite e risulta essenziale per lo sviluppo del carcinoma. Il sito in cui il virus si integra nel DNA cellulare comporta la distruzione del gene E2 che normalmente agisce come inibitore della sintesi delle proteine E6 ed E7. Tale distruzione determina una trascrizione incontrollata dei geni virali E6 ed E7, il cui coinvolgimento nei processi oncogenici è stato ampiamente dimostrato in studi in vitro e in vivo [46,38].

Il gene E6 codifica per una proteina di 150 amminoacidi la cui attività oncogena è principalmente rappresentata dall'inibizione dell'attività oncosoppressoria della proteina p53. La degradazione della proteina p53 determina la progressione del ciclo cellulare ed impedisce la riparazione del DNA ed il processo apoptotico, contribuendo all'immortalizzazione della cellula. La proteina E7, costituita da circa 100 amminoacidi è importante per l'immortalizzazione delle cellule ma necessita dell'azione combinata con E6 per poter essere efficace. Il suo ruolo oncogeno è determinato dalla capacità di associarsi alle proteine del retino blastoma: pRb, p107 e p130 [54].

Nello stato ipofosforilato pRb regola il ciclo cellulare agendo come un freno per il passaggio dalla fase G1 ad S, legandosi a specifici fattori di trascrizione della famiglia E2F. La rimozione di questi ultimi determina una iper-fosforilazione (ossia attivazione) della pRb e la conseguente attivazione delle altre proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma, p107 e p130 [26]. E7 è inoltre in grado di interagire con chinasi-ciclina dipendenti, in particolare CDK-2, a sua volta regolato dalla proteina p16^{INK4a}. L'inattivazione di pRb mediata da E7 determina una sovraespressione della proteina p16^{INK4a} che non risulta più in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare. Pur non agendo direttamente sul ciclo vitale del virus, p16^{INK4a} è considerato un marcatore dello stato virale attivo e di progressione di una lesione verso lo stadio di carcinoma e a tale scopo utilizzato nella diagnosi di diversi tumori HPV-correlati [45]. Una volta concluso l'amplificazione del genoma, il virus codifica per due proteine strutturali espresse negli strati superiori dell'epitelio, L1 ed L2. L1, una proteina del capsido virale, è espressa successivamente ad L2, il cui compito è quello di regolare l'assemblamento del virione [25].

Un aspetto chiave del meccanismo di tumorigenesi indotto da HPV è rappresentato dall'integrazione del virus nel genoma della cellula ospite. Tale integrazione avvia una cascata di eventi che portano ad una incontrollata espressione dei geni E6 ed E7 che tende ad aumentare nelle lesioni più severe [69].

1.2 Patologie correlate all'infezione da HPV

Nel 1972, il premio Nobel Harald zur Hausen fu il primo a dimostrare la presenza dell'HPV in tumori squamo-cellulari cervicali. Attualmente, l'infezione da HPV è riconosciuta come causa virtuale del 100% dei tumori cervicali e, seppur con ampi margini di prevalenza, dei tumori a carico di vulva, vagina, pene, ano e di alcuni tumori del distretto testa-collo. Rispetto alle conoscenze sulla eziologia del tumore cervicale, il rischio associato all'infezione da HPV in altre neoplasie è difficile da quantificare, sia per il numero ridotto di casi osservati che per la mancanza di gruppi di controllo che garantiscano un confronto. Studi precedenti hanno evidenziato che la percentuale di infezioni genitale negli uomini è più alta rispetto alle donne. Tuttavia, la distribuzione dei genotipi è differente tra i generi con una prevalenza di HPV a basso-rischio negli uomini ed alto-rischio tra le donne. Inoltre, il rischio di contrarre un'infezione da HPV nelle donne diminuisce con l'avanzare dell'età, diversamente dagli uomini dove la prevalenza dell'infezione rimane costante nel corso della vita [34].

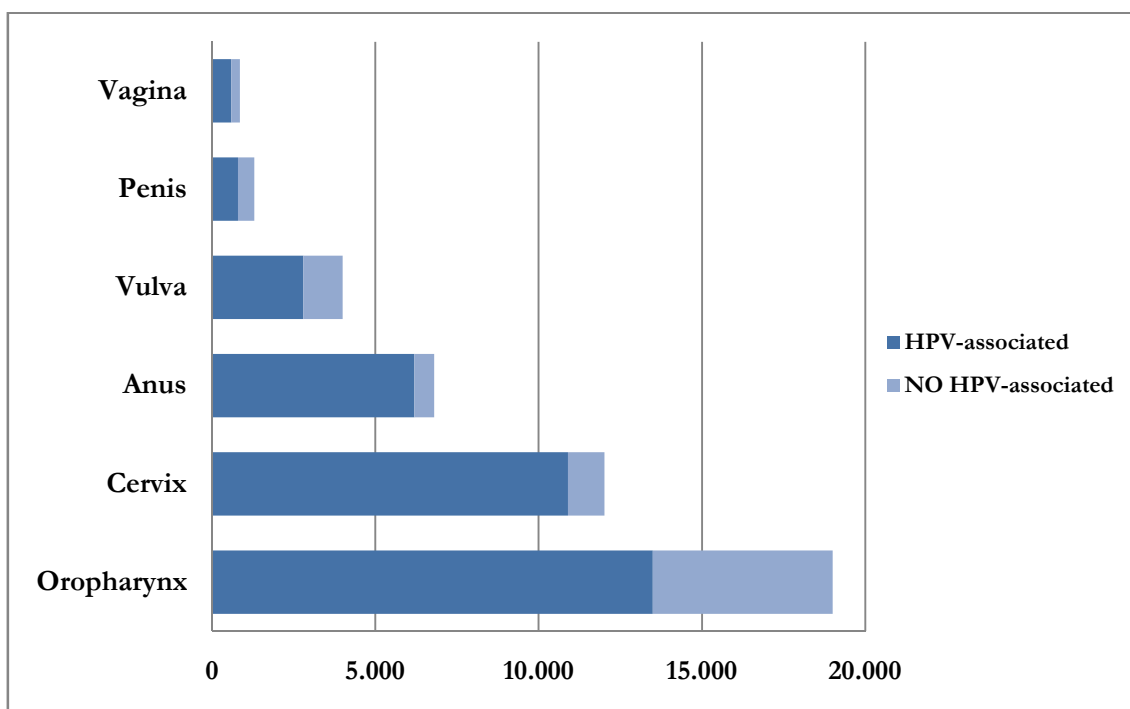


Figura 5: Numero stimato dei tumori HPV-correlati per sito anatomico [67]

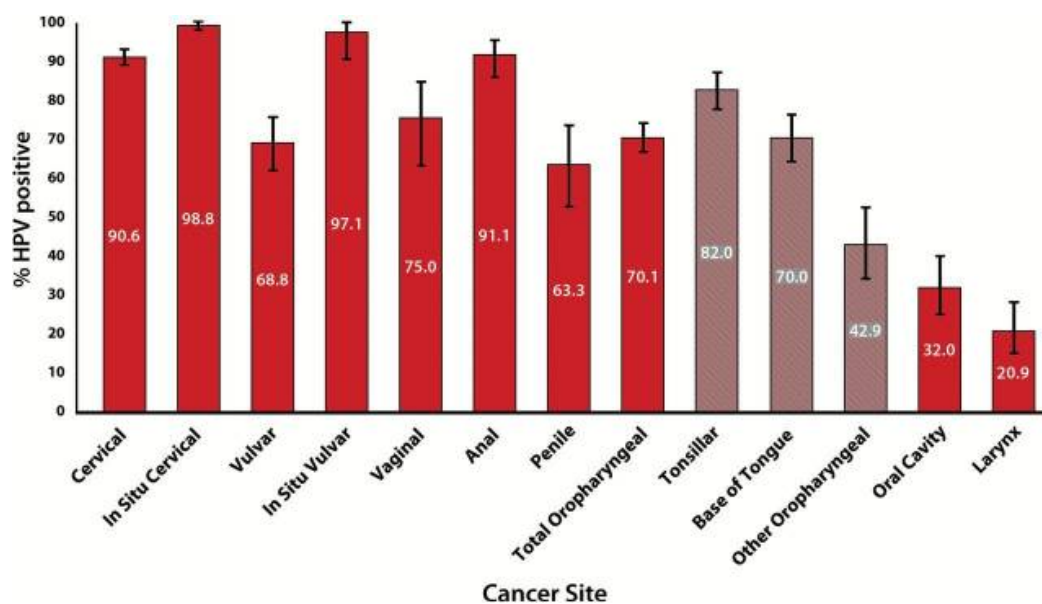


Figura 6: Prevalenza dell'infezione da HPV per sito anatomico [67].

Tumore cervicale

Il cervico-carcinoma è la quarta causa di morte a livello globale con 570.000 nuovi casi e oltre 260.000 decessi nel 2018 [44]. L'infezione da HPV è molto diffusa ed è ritenuta la condizione necessaria, ma non sufficiente per lo sviluppo della neoplasia invasiva. Nella maggior parte dei casi infatti l'organismo umano ha una capacità di clearance naturale del virus che arriva all'80% entro 1-2 anni dal primo contatto. Inoltre, negli ultimi decenni, le strategie preventive messe in atto, quali vaccinazione e screening, hanno ridotto notevolmente l'incidenza dei tumori cervicali, soprattutto nei Paesi più sviluppati [44].

La percentuale di casi associati ad infezione da HPV aumenta in base alla severità dei casi, in un *range* che varia dal 52% nelle donne con citologia ASCUS fino a ~89% delle lesioni di alto grado (HSIL). L'HPV-16 è il genotipo più frequentemente isolato indipendentemente dal grado di lesione osservata [70].

Tumori del tratto ano-genitale

Globalmente, si stima che circa 8500 casi di tumore vulvare, 12.000 tumori vaginali, 35.000 tumori anali e 13.000 tumori del pene, annualmente, siano attribuibili all'infezione da HPV [22]. La proporzione di casi HPV-correlati varia in funzione del sesso (Fig.7,8) e in relazione alle condizioni socio-economiche dell'area geografica considerata.

I tumori vaginali sono tumori abbastanza rari, si stimano 17.600 nuovi casi e oltre 8.000 decessi nel 2018 [44]. Per la maggior parte sono classificati come tumori squamo-cellulare e

spesso preceduti da lesioni intra-epiteliali (VAIN). Una recente meta-analisi ha riportato una prevalenza dell'87% e 67% dell'infezione da HPV rispettivamente nei tumori squamocellulari e nelle lesioni intra-epiteliali a carico della vagina. L'HPV-16 è il genotipo più frequentemente associato in entrambe le tipologie di lesione. L'elevata positività per p16 (~90% dei casi squamocellulari) conferma il ruolo eziologico dell'HPV nell'eziopatogenesi di tale neoplasia [6].

I tumori a carico della vulva rappresentano ~5% dei tumori genitali nelle donne e sono rappresentati per il 90% da tumori squamocellulari [63]. Si stima che tra il 15 e 48% dei tumori alla vulva siano causati da HPV, principalmente HPV-16 [70], mentre i casi HPV-correlati rappresentano il 40% dei tumori squamocellulari e insorgono generalmente nelle donne più giovani. Tuttavia, i dati di prevalenza variano ampiamente tra i vari studi, legati alla metodica utilizzata e al grado di displasia analizzato. Una recente revisione riguardo la sopravvivenza a 5 anni nelle donne con tumore vulvare ha dimostrato una prognosi migliore ed un minore rischio di recidive tra i casi HPV-positivi (con un *range* tra 50-86% e 43-71% per i casi HPV-positivi e negativi, rispettivamente) [63].

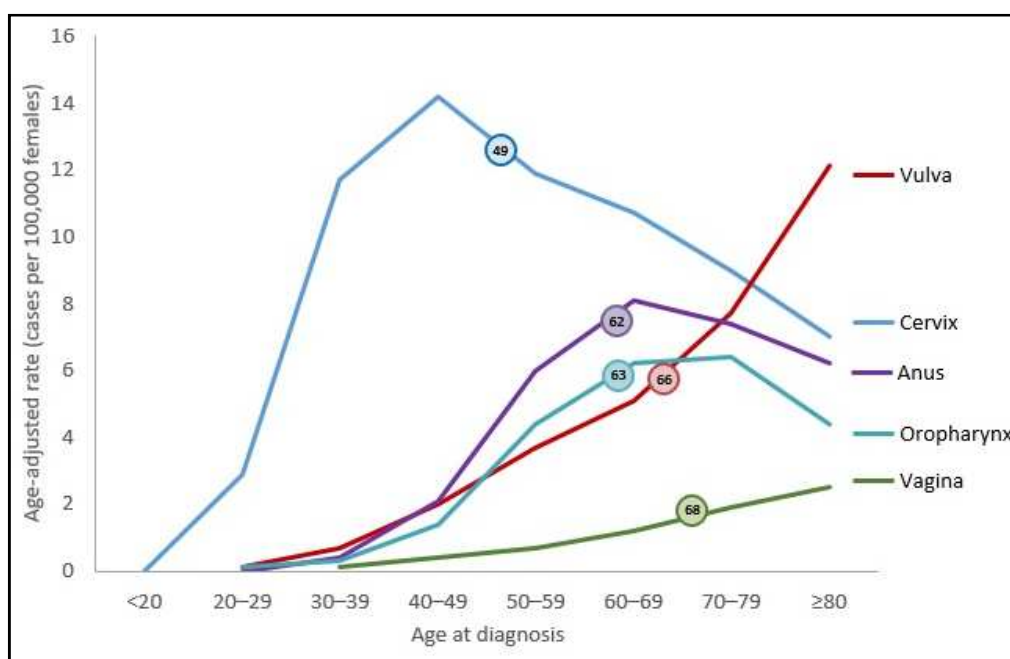


Figura 7: Percentuale di casi attribuibili ad HPV in base all'età nel sesso femminile (USA 2012-2016) [13]

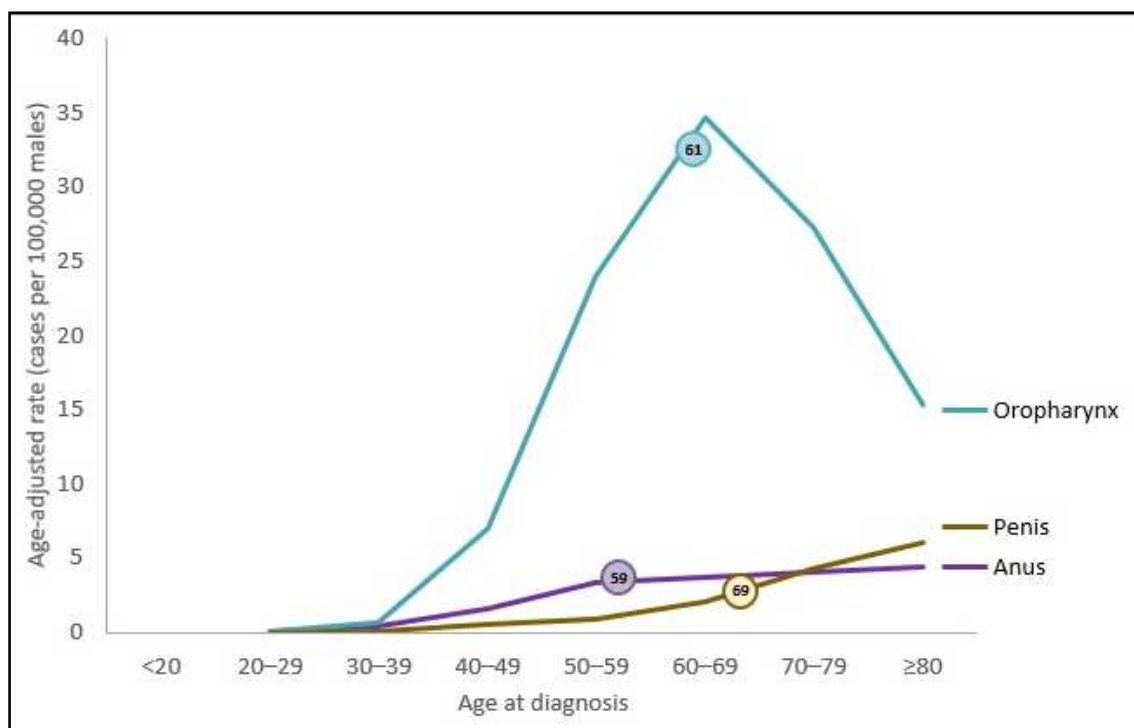


Figura 8: Percentuale di casi attribuibili ad HPV in base all'età nel sesso maschile (USA 2012-2016) [13]

Tumori del pene

Il tumore del pene è una patologia poco comune, rappresenta meno dello 0.5% dei tumori globali con 34.475 nuovi casi e 15.138 morti stimati nel 2018, principalmente nell'età compresa tra i 50 e i 70 anni [11]. Stime recenti mostrano significative differenze a livello geografico con valori nettamente superiori in alcune aree, quali Asia, Africa e sud-America [44]. Una probabile spiegazione può essere collegata alle condizioni socio-economiche nonché alle pratiche religiose e, inoltre, alla maggiore incidenza dei tumori cervicali che determinano, in questo modo, una maggiore circolazione del virus [10]. Christodoulidou et al., attraverso un'indagine dei registri tumori americani ed europei, hanno riportato un incremento della sopravvivenza tra i pazienti con tumore del pene negli ultimi anni, fino al 67% tra il 1990 e il 2007, pur sottolineando che tale incremento non è uniforme a livello globale [16].

L'eziologia del tumore del pene è sicuramente multi-fattoriale, con diversi fattori di rischio conosciuti, inclusi fimosi, scarsa igiene, abitudini al fumo e stati di infiammazione cronica. Altri fattori sono legati alle abitudini sessuali, quali numero di partner sessuali o precedenti infezioni genitali [47]. Tra queste, l'infezione da HPV è riconosciuta come una dei maggiori fattori di rischio nell'eziopatogenesi dei tumori del pene. Si stima che il 36% dei casi siano attribuibili all'infezione da HPV, con un range di prevalenza che va dal 1.3% al 72.9% [27].

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

"Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica"

Tali differenze sono ovviamente legate alla tipologia del tumore e alle metodiche utilizzate per la diagnosi, come accade per tutte le patologie HPV-associate. Una recente revisione ha dimostrato una sostanziale differenza nella positività ad HPV in relazione al grado di differenziamento cellulare e dei sottotipi di tumore squamo-cellulare considerati, con le percentuali più alte nei tumori basali rispetto ad altre tipologie. Maggiore concordanza è riportata riguardo ai genotipi più frequentemente isolati, con l'HPV-16 al primo posto come causa di circa il 75% dei casi [74].

Classificazione istologica tumori del pene

Circa il 95% dei tumori maligni primitivi sono classificati come squamo-cellulari (SCC, Squamous Cell Carcinomas), spesso preceduti da lesioni pre-cancerose. Questa tipologia insorge solitamente sull'estremità prepuziale e se identificata precocemente è associata solitamente ad una prognosi positiva. La rimanente percentuale di casi è rappresentata dal tumore basale, classificati come “non-melanoma skincancer” carico dello strato basale dell'epidermide; dal melanoma che interessa inizialmente i melanociti e si sviluppa sulla superficie del pene; ed infine, il sarcoma che si sviluppa in tessuti più profondi (vasi sanguigni, muscoli e tessuto adiposo) [12]. Da un punto di vista microscopico, prevalgono le forme a bassa malignità, classificate come G1 e G2.

Lo sviluppo di metastasi avviene solitamente per via linfatica ed interessa i linfonodi inguinali, superficiali e profondi. Nella maggior parte dei casi tali linfadenopatie sono di natura infiammatoria, spesso conseguenza di infezioni sovrapposte al tumore. Le metastasi a distanza sono rare (~10% dei casi) e si presentano a distanza di tempo dal momento della diagnosi del tumore primitivo.

L'attuale classificazione approvata dall'OMS nel 2016, diversamente dal passato, si basa non solo sulle caratteristiche morfologiche ma distingue le varie tipologie da un punto di vista clinico-patologico, con particolare riferimento all'HPV status [20]. I tumori non-HPV correlati sono principalmente di tipo squamoso-cellulare e in alcuni casi, come il carcinoma pseudo-glandulare, sono particolarmente aggressivi, mentre altre tipologie (carcinoma verrucoso e *cuniculatum*) non mostrano particolare potenziale metastatico e sono caratterizzate da displasie di basso grado [4]. La terminologia “penile intraepithelial neoplasia” (PeIN) raggruppa tutte le tipologie fino ad ora conosciute e le suddivide in due grandi gruppi: differenziati e non-differenziati, senza tener conto della presenza o meno dell'HPV. Questi sono principalmente rappresentati da carcinomi verrucosi e basaloidi. Le

tipologie HPV-correlate interessano principalmente lo strato basale e indifferenziato, diversamente dalla tipologia non-HPV associata.

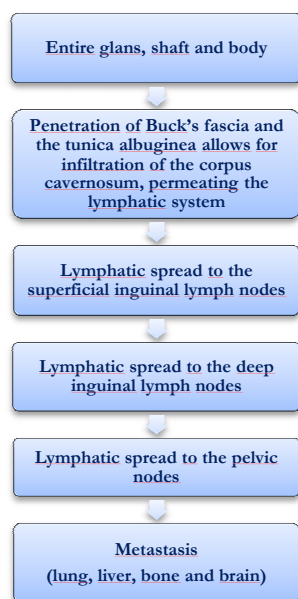


Figura 1: Storia naturale del tumore del pene [62]

Tumore del pene ed infezione da HPV

De Martel e colleghi, sulla base delle stime pubblicate dall'International Agency for Research on Cancer, hanno calcolato che dei 26.000 casi di tumori del pene stimati nel 2012, la metà fossero attribuibili ad un'infezione da HPV, per il 70% dovuta ai genotipi HPV-16 e -18 [22].

Nonostante pochi studi siano stati condotti sull'incidenza e durata delle infezioni da HPV nell'uomo, si stima che la probabilità di contrarre un'infezione da HPV in 12 mesi sia tra il 29 e 39%, inoltre, ~70% dei casi si risolve spontaneamente entro i primi 12 mesi, con una media di 5,9 mesi che tende ad aumentare se l'infezione è sostenuta dal genotipo HPV 16 [28]. Il progetto HIM-study (HPV Infection in Men) ha indagato per la prima volta la progressione delle lesioni HPV-correlate in 3033 uomini. Di questi, 1788 hanno contratto un'infezione sostenuta da almeno un genotipo di HPV nel corso del periodo di follow-up, e nel 5% dei casi queste sono state seguite dallo sviluppo nella maggior parte dei casi di lesioni condilomatoseed, in misura minore, da lesioni intra-epiteliali. Inoltre, gli autori hanno evidenziato come le infezioni sostenute da alcuni genotipi, HPV-6, -11 (LR-HPV) e HPV-16 (HR-HPV), fossero associate ad un maggiore rischio di sviluppare lesioni pre-cancerose [75]. La maggior parte delle manifestazioni cliniche nei casi di infezioni

persistente sono rappresentate da lesioni genitali, benigne ed altamente contagiose. Sono riportati sia casi di auto-infezione che di contagio al partner che nel 64% dei casi sviluppa anch'esso lesioni HPV-correlate [74].

Il meccanismo attraverso cui l'infezione da HPV determina la trasformazione cellulare e la comparsa di lesioni pre-cancerose è mediata dall'espressione delle proteine virali E6 ed E7, a seguito dell'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. La loro espressione, così come già descritto per i tumori HPV-correlati, determina il blocco dalle proteine cellulari p53 e pRb, che normalmente agiscono come onco-soppressori, determinando una incontrollata crescita e proliferazione cellulare [28].

Tumori anali

I tumori anali rappresentano il 4% dei carcinomi del tratto gastro-intestinale, con 48.541 nuovi casi e 19.129 decessi stimati nel 2018 [11]. L'epidemiologia dei tumori anali ha subito un consistente mutamento negli ultimi decenni, con un trend in aumento soprattutto nei Paesi più sviluppati [71]. Dall'analisi del registro americano Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) risulta un aumento dei casi a partire dal 1997, riconducibile a due fattori principali: l'aumento della sopravvivenza nei pazienti HIV-positivi a seguito dell'introduzione della terapia anti-retrovirale, i quali rappresentano uno dei gruppi a maggior rischio e, inoltre, cambiamenti importanti nelle abitudini sessuali nella società attuale. Nel periodo tra il 1997 e il 2009 si assiste inoltre ad un abbassamento dell'età di insorgenza della neoplasia tra gli uomini (35-49 anni) diversamente dalle donne (≥ 65 anni) [57].

L'infezione da HPV è riconosciuta come la causa principale per lo sviluppo del tumore anale. Fattori legati alle abitudini sessuali, quali numero di partner, rapporti anali ed età di esordio dell'attività sessuale, rappresentano fattori di rischio per l'acquisizione dell'infezione. Tali fattori giustificano la più alta incidenza di tumori anali nelle donne con pregressa lesione cervicale, negli omosessuali e nei soggetti HIV positivi, come conseguenza della compromissione del sistema immunitario [17].

Classificazione istologica tumori anali

Secondo l'OMS i tumori anali possono essere classificati in 3 gruppi principali: epiteliali, mesenchimali e tumori secondari. Le forme epiteliali, a loro volta, possono essere suddivise in forme benigne, quali le lesioni intraepiteliali di alto e basso grado, malattia di Bowen e Paget, e maligne tra cui i tumori squamo-cellulari e gli adenocarcinomi [41].

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

Lo stadio della lesione è identificato sulla base della classificazione tumor-node-metastasis (TNM) dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) mediante l'ausilio di immagini ottenute con risonanza magnetica o PET/CT unitamente all'analisi istologica delle biopsie [65].

Le lesioni intraepiteliali seguono la classificazione di Bethesda, già in uso per i tumori cervicali, in cui il grado 2 e 3 corrisponde alle lesioni più severe. Tra il 2 e il 9% dei casi progrediscono in lesioni di alto-grado o forme cancerose. Tuttavia nei soggetti immunodepressi, come pazienti HIV-positivi, tale percentuale aumenta fino al 50% [41].

Il carcinoma squamo-cellulare (SCC) è la forma maggiormente diffusa e rappresenta circa l'80% dei casi [65]. L'adenocarcinoma rappresenta il 3-9% delle neoplasie anali la cui eziologia, probabilmente a causa della scarsa numerosità dei casi osservabili, rimane ancora poco chiara.

La maggior parte dei carcinomi anali rimangono confinati localmente o interessano la regione ano-genitale. Tuttavia, in alcuni casi si assiste ad una diffusione del tumore per via linfatica (10-15% dei casi), interessando i linfonodi perianali o rettali, o attraverso il sangue (<10% dei casi) determinando principalmente metastasi epatiche o polmonari. L'interessamento dei linfonodi inguinali ricorre nel 10-25% dei casi ed è associato ad una peggiore prognosi se trascurati al momento della diagnosi [65].

La sopravvivenza a 5 anni varia sulla base della classificazione della neoplasia: le lesioni T2-T3 mostrano una sopravvivenza del 80-90%, mentre nelle lesioni T4 si riduce fino al 50%. Fattori prognostici positivi sono rappresentati dalla ricorrenza delle lesioni dopo trattamento, assenza di coinvolgimento dei linfonodi e margini negativi dopo ablazione chirurgica [55].

Tumori anali ed HPV

La prima dimostrazione dell'associazione tra HPV e tumori anali risale al 1986 con l'identificazione dell'HPV-16 in un paziente con carcinoma anale. Successivamente, altri studi confermarono la presenza dell'HPV in lesioni pre-cancerose in particolare nei gruppi a maggior rischio [81]. La presenza del virus non è causa sufficiente per lo sviluppo della neoplasia, questo spiega come la maggior parte delle infezioni si risolva autonomamente seppur in tempi differenti, sulla base del genotipo e delle condizioni immunitarie dell'ospite, molto più spesso di quanto accade per le lesioni cervicali [59]. Un recente studio ha confermato il diverso ruolo svolto dai genotipi a basso rischio, responsabili maggiormente di condilomi, rispetto ad HPV ad alto-rischio la cui prevalenza aumenta al

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

crescere della gravità della lesione (67.5% *Vs.* 12.9% in lesioni intra-epiteliali di grado 3 *Vs.* lesioni di grado 1-2, rispettivamente), in particolare per le infezioni sostenute da HPV-16 [40]. Come descritto per altre patologie associate ad HPV, le 3 principali proteine coinvolte nel processo di carcinogenesi sono rappresentate da E6, E7 ed E5, principalmente espresse nei genotipi ad alto-rischio. La proteina E5 ha un ruolo accessorio che contribuisce indirettamente alla trasformazione cellulare, a differenza delle proteine E6 ed E7, aumentando il livello dei recettori per i fattori di crescita sulla superficie della membrana cellulare e riducendo la sensibilità della cellula all'azione del complesso maggiore di istocompatibilità e, di conseguenza, l'efficienza della risposta immunitaria [59].

La prevalenza dell'infezione da HPV riportata in letteratura varia ampiamente, principalmente in relazione alla popolazione osservata e al grado di severità della lesione. Tuttavia, si stima che la percentuale di infezione da HPV vari dal 10%, nella popolazione generale, fino al 90% nei gruppi maggiormente a rischio [57]. A conferma, la recente meta-analisi condotta da Lin e colleghi (2017) ha osservato un *range* di prevalenza dal 42 al 76%, con un aumento della positività in soggetti HIV-positivi, indipendentemente dalla lesione considerata (ossia tra lesioni di alto/basso grado e carcinoma). L'HPV-16 è il genotipo maggiormente responsabile della progressione delle lesioni pre-cancerose, in particolare nei soggetti HIV negativi. Diversamente, tra i pazienti HIV-positivi si osserva una maggiore variabilità nei genotipi isolati [50]. Diversi studi suggeriscono una prognosi migliore nei soggetti con carcinoma anale positivi per HPV, così come riportato per i tumori orofaringei [39,32]. Su tali basi sono stati condotti numerosi studi per la ricerca di bio-marcatori dell'infezione attiva di HPV da impiegare sia nella diagnosi che come fattori prognostici a seguito dei trattamenti convenzionali con chemio-radio terapia. Al momento, le proteine p16 e p53, così come la marcata espressione di E6, hanno dimostrato un significativo valore prognostico con un aumento degli anni liberi da malattia nei pazienti risultati positivi [60].

Tumori orofaringei

L'associazione tra HPV e tumori orofaringei risale al 1985 quando, mediante ibridizzazione southern-blot, è stata identificato il genoma di HPV-16 in un tumore invasivo del distretto testa-collo [51]. Nel 2009, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha dichiarato che “forti evidenze epidemiologiche mostrano un ruolo dell'HPV16 nell'eziologia del cancro orofaringeo e tonsillare” e ha inoltre stimato che il 31% dei casi di OPSCC (Oro-Pharyngeal Squamous Cell Carcinoma) sono attribuibili ad una infezione da

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

HPV [61]. Negli ultimi 20 anni, l'incidenza di OPSCC (Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma) è cresciuta sostanzialmente, soprattutto nei Paesi sviluppati, quali, Europa, Stati Uniti ed Australia [36], al punto da stimare che l'impatto andrà, nei prossimi decenni, a superare quello attribuibile attualmente al cervico-carcinoma [77]. Fumo e alcol restano i principali fattori di rischio per tale neoplasia, unitamente alle abitudini e pratiche sessuali che aumentano il rischio di contrarre un'infezione da HPV, suggerendo una possibile trasmissione sessuale del virus [78]. La prevalenza di HPV in questa tipologia di tumore riflette l'ampia varietà riportata nella classificazione e nei diversi sottogruppi dei tumori testa-collo [78]. Haegglom e colleghi, hanno svolto una meta-analisi differenziando la prevalenza di HPV in base ai distretti considerati. Gli autori hanno riportato una percentuale di positività ad HPV del 56%, 40% e 19% rispettivamente nelle tonsille, nella base linguale e nella parete posteriore [37]. Tuttavia, la presenza del DNA virale non è da considerarsi causa sufficiente per lo sviluppo del carcinoma, così come accade per i tumori cervicali. Molti studi, per questo motivo, hanno indagato il ruolo di possibili marcatori di infezione attiva, quali l'espressione di E6 e p16, osservando una positività tra il 22,4% e il 3,5% [70]. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato un elevato valore prognostico non solo per la positività ad HPV ma anche per p16, osservando una migliore prognosi nei pazienti positivi, indipendentemente dal sito anatomico considerato [73].

1.3 Prevenzione primaria e secondaria delle infezioni da HPV

Allo scopo di ridurre l'impatto delle patologie associate all'infezione da HPV sono state adottate strategie di prevenzione primaria e secondaria, estese ad entrambi i sessi (fig.9).

Pur rimanendo la quarta causa di malattia nelle donne a livello globale, l'incidenza del tumore alla cervice uterina negli ultimi anni si è ridotto notevolmente, in particolare, nei Paesi più sviluppati dove da diversi anni sono attive adeguate strategie preventive. Alla fine del 2016, 82 Paesi avevano introdotto la vaccinazione anti-HPV per le donne all'interno dei loro programmi nazionali di prevenzione e per 13 Paesi, tale invito, era esteso anche al sesso maschile. Tuttavia, numerose aree nei Paesi in via di sviluppo mostrano percentuali di

copertura vaccinale molto basse (<2,5% delle donne tra i 13 e i 20 anni) e, conseguentemente, un'elevata incidenza dei tumori cervicali [70].

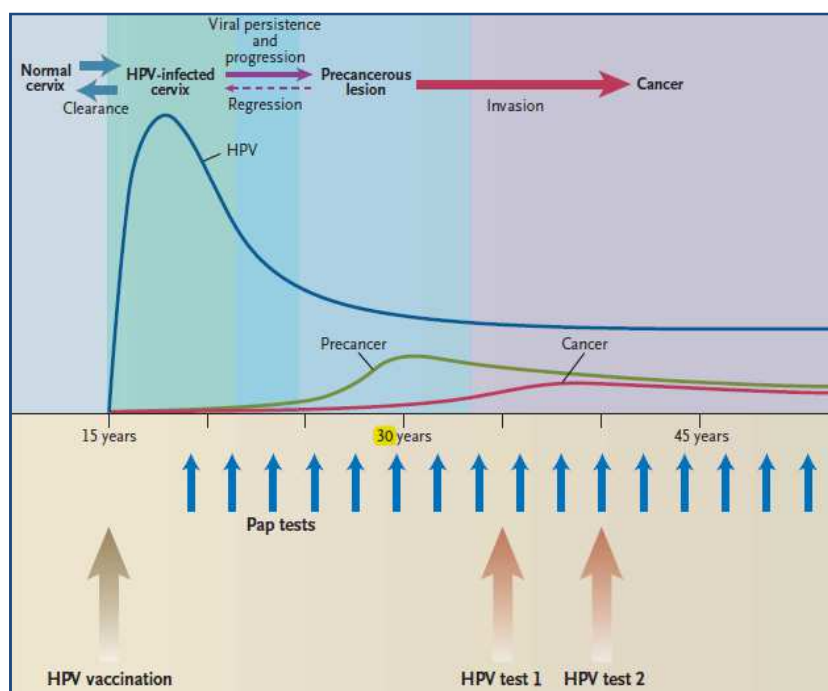


Figura 9: Modello di prevenzione primaria e secondaria adottato per il cervicocarcinoma in relazione alla storia naturale dell'infezione da HPV [68].

Attualmente sono disponibili 3 vaccini anti-HPV (Tab.2), costituiti da virus-like particles (VLPs) prodotte normalmente dalla proteina L1 con un elevato potere immunogeno, alla pari del virione stesso [14]. I tre vaccini svolgono la loro azione preventiva stimolando la produzione di anticorpi che legano le particelle virali impedendone l'ingresso nella cellula.

Vaccino	Genotipi prevenibili
Cervarix [®]	HPV-16, -18
Gardasil [®]	HPV-16, -18, -6, -11
Gardasil [®] 9	HPV-16, -18, -6, -11, -31, -33, -45, -52, -58

Tabella 2: Vaccini anti-HPV attualmente disponibili in commercio

Le attuali raccomandazioni per la somministrazione del vaccino bi/tetra-valente pubblicate dall'Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) del Centres Diseases and Control (CDC) (2006) [5], prevedono:

- Vaccinazione con Cervarix o Gardasil per le adolescenti di 12-13 anni e solo Gardasil per i maschi, in 3 dosi;
- La seconda dose deve essere somministrata 1-2 mesi dopo la prima e l'ultima dose 6 mesi dopo la prima;
- È suggerita la somministrazione anche alle donne tra i 13 e i 26 anni, e negli uomini tra i 12 e i 21;
- La vaccinazione è inoltre consigliata in utenti con precedenti infezioni, in pazienti immunocompromessi e negli omosessuali sopra i 27 anni di età.

Con l'introduzione del vaccino nona-valente, lo stesso ente, raccomanda la somministrazione di sole 2 dosi in adolescenti di entrambi i sessi di 11-12 anni.

In Italia, la vaccinazione anti-HPV è offerta gratuitamente alle donne già dal 2007-2008. Il nuovo Piano di Prevenzione Vaccinale 2017-2019, ha esteso la vaccinazione anche al sesso maschile con chiamata attiva a partire dalla coorte del 2006 [79].

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza dei vaccini attualmente in commercio, stimando che il vaccino bi- e tetra-valente possano prevenire ~460.000 tumori HPV-correlati. Sulla base dei dati epidemiologici, si stima che la vaccinazione anti-HPV con il vaccino nona-valente, garantirebbe la prevenzione dell'89.5% dei tumori cervicali; il 95.4% dei tumori anali; oltre l'80% dei tumori ano-genitali, quali vagina, vulva e pene; ~90% dei tumori testa-collo. Inoltre, i vaccini potrebbero essere efficaci anche contro lesioni genitali benigne, con una riduzione del 90% [70].

Recentemente, diversi studi hanno indagato il potenziale potere terapeutico dei vaccini, anche in soggetti precedentemente venuti a contatto con il virus, con risultati spesso discordanti. Lo studio SPERANZA sostiene l'efficacia della vaccinazione anti-HPV in donne precedentemente conizzate per lesioni pre-cancerose o tumori invasivi, con una riduzione dell'80% nel rischio di recidive [31].

Diversamente, altri report non hanno dimostrato alcuna efficacia della vaccinazione post-trattamento [24].

Lo scopo della prevenzione secondaria è quello di individuare la malattia in uno stadio iniziale in modo da poter intervenire precocemente ed aumentare la possibilità di un *outcome* positivo. Lo screening è un efficace strategia di prevenzione secondaria nel controllo delle patologie tumorali, come accade per il cervico-carcinoma. L'intero processo di carcinogenesi del tumore cervicale dura diversi decenni, dando l'opportunità di riconoscere ed intervenire precocemente sulle lesioni pre-cancerose. L'OMS raccomanda l'inizio dello screening a 30 anni, sulla base dell'incidenza maggiore di lesioni intraepiteliali di medio

grado (CIN2) intorno ai 35 anni [80]. Attualmente i protocolli di screening prevedono la chiamata attiva delle donne tra i 25/30 anni fino ai 65 ogni 3 anni per l'accertamento mediante esame citologico (Pap-test) e ricerca del DNA virale. Il triage di screening è a discrezione delle singole nazioni ed enti di prevenzione locali e, per tale motivo, sono attivi diversi protocolli. Tuttavia, il trend attuale registra uno shift verso l'adozione dell'HPV-DNA test come test primario, per la sua elevata specificità e sensibilità (76% e 86%, rispettivamente), seguito dall'esame citologico, diversamente da quanto accadeva in passato [33,3]. Il test HPV-DNA permette inoltre la possibilità di raccogliere autonomamente un campione mediante prelievo vaginale (self-collection) garantendo un'accuratezza sovrapponibile a quella ottenuta con il classico prelievo effettuato dal clinico [3].

L'efficacia della vaccinazione così come lo screening per il tumore cervicale è stata ampiamente riportata in letteratura. Più recentemente, diversi studi hanno focalizzato la loro ricerca sulla prevenzione di altre patologie HPV-associate, quali i tumori dell'area ano-genitale e testa-collo, mediante lo screening. Tali studi hanno dimostrato che l'attuazione dello screening nelle categorie maggiormente a rischio, quali soggetti omosessuali, HIV-positivi/negativi, trapiantati e donne con precedenti lesioni cervicali potrebbe apportare significativi benefici da un punto di vista prognostico nei pazienti con diagnosi di tumore anale [65].

Con lo scopo di valutare l'efficacia della vaccinazione quadri-valente nel prevenire le infezioni genitali negli uomini, Giuliano e colleghi attraverso uno studio randomizzato, placebo-controlli, hanno osservato una efficacia della vaccinazione del 65.5% contro i genotipi HPV-16, -18, -6 e -11, ricoperti dal vaccino [34].

Ulteriori approfondimenti potrebbero chiarire il beneficio della vaccinazione considerando il rapporto costo-efficacia nelle categorie maggiormente a rischio.

2. SCOPO DEL LAVORO

Diversi fattori possono concorrere nell'eziopatogenesi dei tumori, intrinseci, ossia legati all'ospite (età, sesso, razza, caratteri genetici, struttura fisica, struttura psichica, stato fisiologico) che ambientali (chimici, fisici, biologici, psichici e sociali).

Le importanti scoperte nel campo della microbiologia durante il XX secolo hanno confermato l'ipotesi di una probabile origine infettiva per alcune neoplasie. Nel febbraio del 2009, l'International Agency for Research in Cancer (IARC), ha riconosciuto un gruppo di agenti infettivi legati all'insorgenza dei carcinomi e, su tali basi, classificati come carcinogeni appartenenti al Gruppo 1. I meccanismi possono essere di tipo diretto, come accade per Human Papillomavirus (HPV), Hepatitis B virus (HBV, HCV) e per Epstein-Barr Virus (EBV) che attraverso la produzione di proteine virali sono in grado di immortalizzare la cellula ospite e avviare il processo di carcinogenesi, e in maniera indiretta, come riportato per *Helicobacter pylori*, Human Immunodeficiency Virus (HIV) ed Hepatitis C Virus (HCV), dove l'avvio di un processo infiammatorio cronico, attraverso uno stato di immunosoppressione e l'alterazione della risposta immunitaria, determinano l'insorgenza del tumore [53]. Attualmente, si stima che tra il 15 e il 20% dei tumori globali sia causato da un agente infettivo, pur sottolineando significative differenze tra varie aree geografiche [61]. L'infezione da HPV è classificata al secondo posto come causa di tumori associati ad agenti infettivi con una stima globale di 570.000 e 60.000 casi, rispettivamente nelle donne e negli uomini. Nel decennio successivo alla conferma del ruolo dell'HPV nell'insorgenza del tumore cervicale da parte di zur Hausen, numerosi studi dimostrarono il coinvolgimento del virus in lesioni cancerose e pre-cancerose non solo dell'area ano-genitale ma anche a carico dell'orofaringe [82].

La presente tesi di dottorato si inserisce nell'ambito di un articolato progetto di ricerca avviato, già da diversi anni, presso la Sezione di Igiene del Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Sperimentali dell'Università di Sassari, finalizzato alla definizione delle caratteristiche epidemiologiche, virologiche e di impatto per la Sanità Pubblica delle infezioni sostenute da HPV, utili per la formulazione e valutazione dell'efficacia degli interventi di prevenzione disponibili.

In particolare, obiettivo generale della presente tesi è stato quello di valutare il ruolo dell'infezione da HPV nell'eziopatogenesi dei tumori extra-cervicali con particolare riferimento alle neoplasie a carico dell'ano e del pene, diagnosticati nella popolazione del territorio del Nord Sardegna nel periodo compreso tra il 2002 e il 2018.

A tale scopo, sono stati analizzati campioni biotipici di neoplasie a carico delle suddette sedi anatomiche, inclusi in paraffina e conservati presso l'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica, al fine di:

- Identificare la presenza del genoma virale;
- Identificare lo specifico genotipo;
- Ricercare il trascritto oncogeno E6 e la proteina p16^{INK4a}, considerati marker surrogati di infezione, indicatori dell'integrazione del genoma virale nella cellula ospite;
- Valutare l'accuratezza diagnostica tra i suddetti test;
- Studiare l'associazione tra variabili demografiche (età, sesso, anno di diagnosi, stato civile ed occupazionale) e cliniche (caratteristiche istopatologiche e grading del tumore, positività ad HPV, E6 e p16INK4a, *outcome*) con l'infezione virale, al fine di individuare il gruppo di popolazione esposta ad un maggior rischio di sviluppo del tumore;
- Attraverso il calcolo della sopravvivenza, valutare il ruolo dell'infezione virale nella prognosi delle patologie osservate.

3. MATERIALI E METODI

È stato condotto uno studio osservazionale, retrospettivo mirato a individuare i casi di tumori dell'ano-retto e del pene diagnosticati presso l'U.O.C di Anatomia Patologica dell'A.O.U di Sassari. Tutti i campioni biotici dall'archivio dell'U.O. di Anatomia Patologica dell'A.O.U di Sassari, precedentemente fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina, sono stati sottoposti all'analisi istologica e molecolare per definire la tipologia tumorale e il genoma virale, rispettivamente.

Inoltre, per ciascun paziente arruolato sono state raccolte le caratteristiche socio-demografiche e cliniche mediante le relative schede di accettazione. Le informazioni raccolte riguardavano: sesso, età, anno di diagnosi, stato civile ed occupazionale, sede anatomica del campione e, inoltre, le eventuali patologie associate precedenti o successive all'anno di diagnosi per il tumore anale o peniene di riferimento.

Dai singoli campioni biotici sono state eseguite 10 sezioni microtomiche da 3 μ m ciascuna per le successive analisi.

Analisi istologica

Le sezioni istologiche sono state sottoposte alla colorazione con ematossilina-eosina e valutati da esperti patologi per la classificazione, secondo le linee guida dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC, 8th edition). Ciascun caso è stato classificato come poco-, moderatamente- o ben-differenziato (G3, G2, G1) sulla base del grado di differenziazione cellulare osservato.

Analisi immunoistochimica per p16

Le indagini immunoistochimiche sono state eseguite mediante il kit commerciale CINTec p16 Histology (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ) [64] secondo le linee guida della casa produttrice.

Mediante l'utilizzo del coloratore automatico Ventana Bench Mark Ultra si è proceduti all'analisi in maniera standardizzata ed automatizzata, attraverso i seguenti passaggi:

- Sparaffinatura delle sezioni a 75°C
- Smascheramento dell'antigene (Ag) a 95°C
- Anticorpo primario a 37°C
- Incubazione anticorpo
- Inibizione delle perossidasi endogene
- Colorazione di contrasto nucleare con Ematossilina Harris 20'

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

"Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica"

-Sistema di rilevazione (Kit Ultraview Universal Dab)

-Montaggio e presa in visione dei vetrini

Sono state considerate positive le sezioni che mostravano una forte e diffusa positività citoplasmatica delle cellule neoplastiche sia nella componente in situ che nella componente infiltrante (fig.10); positività debole e focale quando il segnale interessava soloparziali aree neoplastiche (fig.11); esito negativo le sezioni con assenza completa di positività (fig.12)

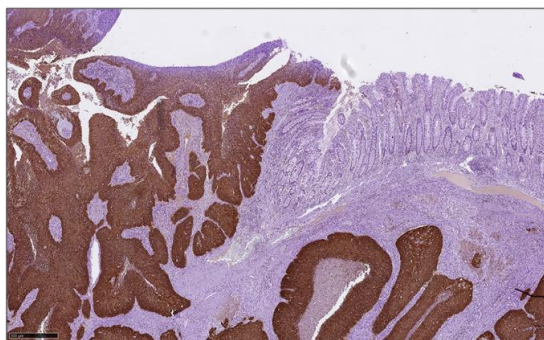


Figura 10: Immunoistochimica per p16 positiva

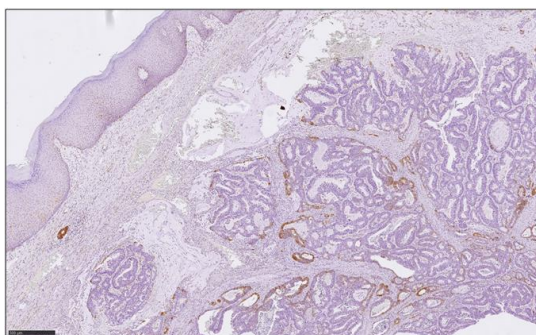


Figura 11: Immunoistochimica per p16 debole e focale

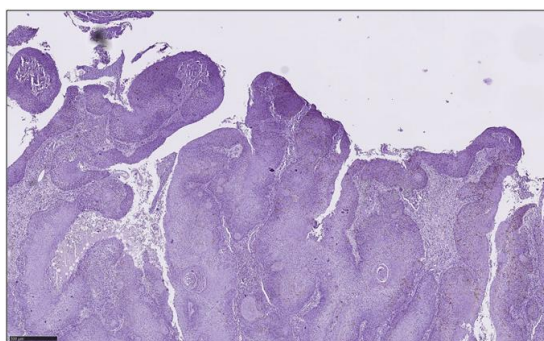


Figura 12: Immunoistochimica per p16 negativa

Analisi molecolare

I campioni sono stati analizzati per la ricerca del DNA virale e la genotipizzazione presso il laboratorio di Epidemiologia Molecolare dell'U.O.C di Igiene e Controllo delle Infezioni Ospedaliere. Inoltre, presso la stessa unità, è stata condotta l'analisi per la ricerca dei trascritti oncogeni E6 di HPV.

Deparaffinization step

Per poter procedere con l'estrazione degli acidi nucleici da campioni conservati in FFPE, la prima fase richiesta è la deparaffinizzazione del campione.

Le metodiche per la deparaffinizzazione del tessuto sono diverse e tra queste è stato adottato l'uso della Deparaffinization Solution come suggerito nella procedura di estrazione degli acidi nucleici mediante il kit AllPrep DNA/RNA da FFPE (QIAGEN).

Sono stati aggiunti 320 µl di soluzione per ciascuna provetta contenente 2 sezioni istologiche da 10 µm e si è proceduti con l'estrazione degli acidi nucleici come indicato dal manuale della ditta fornitrice del kit.

Estrazione del DNA virale

- 1) Vortexare per 10 secondi e incubare a 56 °C per 3 minuti.
- 2) Centrifugare alla massima velocità per 2 minuti.
- 3) Rimuovere il supernatante senza intaccare il pellet.
- 4) Lasciare il tappo delle eppendorf aperto e incubare a 37 °C per 10 minuti
- 5) Risospendere il pellet aggiungendo 150 µl di buffer PKD e 10 µl di Proteinasi K.
Vortexare
- 6) Incubare a 56 °C per 15 minuti
- 7) Porre il campione nel ghiaccio per 3 minuti
- 8) Centrifugare il campione 15 minuti a 20000g
- 9) Trasferire il supernatante, senza toccare il pellet, direttamente in una nuova eppendorf da 1,5 ml.
- 10) Il pellet viene conservato per la successiva estrazione del DNA

Si è proceduti alla purificazione dell'RNA totale secondo il seguente protocollo:

- 11) Incubare il supernatante a 80 °C per 15 minuti
- 12) Centrifugare velocemente per rimuovere le goccioline dal tappo
- 13) Aggiungere 320 µl di buffer RLT, vortexare o pipettare diverse volte per mescolare

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

"Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica"

- 14) Aggiungere 720 μ l di etanolo 100 %, vortexare o pipettare
- 15) Trasferire 700 μ l del campione nelle colonnine apposite per l'estrazione e centrifugare a 8000g per 15 secondi
- 16) Svuotare il contenuto della colonna e ripetere il passaggio precedente se nella eppendorf rimane ancora del materiale. Svuotare la colonna e riutilizzare la stessa
- 17) Aggiungere 350 μ l di buffer FRN nelle colonnina e centrifugare a 8000g per 15 secondi. Svuotare la colonnina e riutilizzare la stessa
- 18) Aggiungere 10 μ l di DNase I a 70 μ l di buffer RDD e agitare gentilmente il tubino per mixare e vortexare per eliminare i residui dal tappo
- 19) Aggiungere la soluzione DNase I e RDD (80 μ l) alla colonnina e lasciare incubare a 20-30 °C per 15 minuti
- 20) Aggiungere 500 μ l buffer FRN nelle colonnina e centrifugare 15 secondi a 8000g
→ Non scartare il materiale della colonnina, in quanto contiene l'RNA.
- 21) Trasferire la colonnina in una nuova colonna, aggiungere lo stesso materiale del passaggio precedente, chiudere la colonnina e centrifugare a 8000g per 15 secondi, come ulteriore lavaggio.
- 22) Scartare il materiale e riutilizzare la stessa colonna
- 23) Aggiungere 500 μ l di buffer RPE nella colonnina. Centrifugare a 8000g per 15 secondi. Scartare il materiale e riutilizzare la stessa colonna
- 24) Trasferire la colonnina in un nuovo collection tube.
- 25) Con il tappo aperto, centrifugare alla massima velocità per 5 minuti. Scartare il materiale e riutilizzare la stessa colonna
- 26) Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml
- 27) Aggiungere 14-30 μ l di RNase-free water direttamente al centro della colonnina e centrifugare alla massima velocità per 1 minuto

Si è proceduti all'estrazione del DNA secondo il seguente protocollo:

- 1) Risospendere il pellet ottenuto nel passaggio precedente (n°10) in 180 μ l di buffer ATL e aggiungere 40 μ l di proteinasi K e vortexare
- 2) Incubare a 56 °C per 1 ora
- 3) Incubare, senza agitare, a 90 °C per 2 ore
- 4) Centrifugare brevemente per rimuovere le goccioline dal tappo
- 5) Aggiungere 200 μ l di buffer AL e vortexare

- 6) Aggiungere 200 µl di etanolo al 100% e vortexare o pipettare per miscelare la soluzione
- 7) Trasferire l'intera soluzione in una colonnina apposita per l'estrazione e centrifugare a 8000g per 1 minuto
- 8) Verificare che tutto il campione abbia attraversato la membrana, diversamente ripetere la centrifugazione
- 9) Trasferire la colonnina in un nuovo collection tube e aggiungere 700 µl di buffer AW1
- 10) Centrifugare a 8000g per 15 secondi. Scartare il contenuto della colonna e riutilizzare la stessa
- 11) Aggiungere 700 µl di buffer AW2 nella colonnina e centrifugare a 8000g per 15 secondi. Scartare il contenuto della colonna e riutilizzare la stessa
- 12) Aggiungere 700 µl di etanolo 100 % e centrifugare a 8000 g per 15 secondi
- 13) Sostituire il collection tube con uno nuovo e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti per asciugare la membrana
- 14) Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1.5 ml
- 15) Aggiungere tra i 30 e i 100 µl di buffer ATE e lasciare incubare per 1 minuto
- 16) Centrifugare a tutta velocità per eluire il DNA

I campioni di DNA ed RNA estratti sono stati conservati a -20°C e sottoposti alle analisi successive entro le 48 ore successive.

Real-Time PCR per la ricerca del DNA virale

La ricerca e genotipizzazione del DNA di HPV è stata condotta mediante una multiplex PCR utilizzando il kit commerciale Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene, Seoul, South Korea) che identifica 19 genotipi ad alto rischio (HPV- 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, and 82) e 9 genotipi a basso rischio (HPV- , 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70).

Ricerca dei trascritti oncogeni E6 di HPV-16

I campioni risultati positivi al genotipo HPV-16 sono stati sottoposti alla ricerca di mRNA del gene E6 mediante una Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), usando copie di primers disegnati da Sotlar e colleghi [72]:

PRIMERS	SEQUENZA
U1-Forward	5'-CAGAGCTGCAAACAACCTATACATGATATA-3'
U1- Reverse	5'-GTTAATACACCTCACGTCGCAGTA-3'
E6-Forward	5'-GAAGATCAAGAAGGATGAGCTAAAAA-3'
E6-Reverse	5'-TGGGAGAAGATGGCGTACAG-3'

L'RNA estratto è stato da prima retro-trascritto per ottenere una copia di DNA (cDNA), attraverso il kit AllPrep DNA/RNA FFPE Kit, (Qiagen, Hilden, Germany Cod. 80234), seguendo le indicazioni della ditta fornitrice, sotto riportate:

- Porre il kit e i reagenti in ghiaccio per tutta la durata della procedura
- Calcolare la quantità iniziale di RNA necessaria per una concentrazione di 250ng.
- Trasferire la quantità necessaria in un tubino per PCR
- Portare a volume con H₂O RNase-free fino a 12 µl
- Aggiungere 2 µl di Wipeout buffer in ciascun tubino

Ad ogni reazione è stato incluso un controllo negativo con solo acqua (no RNA) e come controllo positivo un campione cervicale in liquid-based cytology (LBC) precedentemente analizzato e risultato positivo per HPV-16.

- Porre i tubini e i controlli nel termociclatore e avviare la prima fase che prevede 42 °C per 2 minuti.

Preparare la mix per il numero dei campioni da testare e aggiungere 10% di scarto, come segue:

Reagente	
Reverse Transcription buffer	4 µl
Reverse Transcription Primer Mix	1µl
Reverse transcriptase enzyme	1µl

- Aggiungere 6 µl di mix in ciascun tubino per arrivare a un volume finale di 20 µl
- Avviare la reazione secondo il seguente protocollo:
→ 42 °C per 25 minuti; 95 °C per 3 minuti;

I campioni di cDNA sono stati conservati a -20 °C fino allo svolgimento delle successive analisi.

Durante l'allestimento della mix di amplificazione per la ricerca dei trascritti oncogeni E6 i campioni sono stati tenuti in ghiaccio.

L'analisi è stata condotta attraverso una Real-Time PCR utilizzando la mix SYBR Green JumpStart TaqReadyMix (Cat. Num. S9194. SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO) in un

volume finale di 25 µl contenenti: 5 µl di cDNA, 2,5 µl di primers forward e reverse, 2,5 µl di nuclease-free water e 12,5 µl di SYBR Green JumpStart TaqReadyMix. L'amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 94 °C per 2 minuti, seguito da 40 cicli a 94 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto.

Analisi statistica

Sono state analizzate variabili demografiche, cliniche ed epidemiologiche raccolte ad hoc in database elettronico. I dati qualitativi sono stati riassunti mediante frequenze assolute e relative, mentre quelle quantitative mediante media e deviazione standard sulla base della distribuzione parametrica. Il test del χ^2 o il test esatto di Fisher sono stati utilizzati per il confronto delle variabili qualitative, mentre per il confronto delle variabili quantitative è stato utilizzato il test T di Student. È stata eseguita l'analisi di sopravvivenza mediante la curva Kaplan-Meier. P-value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. Il software statistico utilizzato è stato STATA 15 (StatsCorp, Texas, USA).

4. RISULTATI

Un totale di 33 casi di tumori anali e 32 tumori del pene sono stati diagnosticati tra il 2002 e il 2018 presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica.

Tumori ano-rettali

I casi di tumore ano-rettali hanno interessato 17 (51.5%) maschi e 16 (48.5%) femmine, con un'età media, al momento della diagnosi, rispettivamente di 63,8 (DS 11,9) e 65,4 (DS 12,8) anni ed un'età media complessiva di 64,6 anni (tab.3).

Oltre i 3/4 dei pazienti risultavano coniugati (13/17, 38.9%) ed il 39,1% pensionati (9/23).

Il sito anatomico maggiormente coinvolto era l'ano (30/33; 90.9%) e solo in 3 casi la neoplasia ha interessato il retto (3/33; 9,1%).

L'analisi istologica ha classificato come squamo-cellulari il 66,7% (22/33) dei tumori e solo il 33,3% (11/33) come adenocarcinoma. La maggior parte (14; 42,5%) sono stati classificati come moderatamente differenziati, seguiti da quelli ben differenziati (12; 36,4%) e poco differenziati (7; 21,2%).

Complessivamente, la positività per HPV è stata del 69,7% (23/33), in un solo caso in confezione sostenuta da genotipi ad alto e basso rischio. È stata rilevata una netta prevalenza dei genotipi HPV-16 (20/33; 60,6%), seguita da HPV-35 (2/33; 6,6%); l'HPV-6 (3/33; 9,1%) è risultato l'unico genotipo a basso rischio oncogeno.

Nelle femmine è stata dimostrata una maggiore prevalenza dell'infezione da HPV rispetto al sesso maschile (81,3% vs 58,8%); l'HPV-16 è risultato il genotipo più prevalente nelle donne (75% vs 47,1%).

Il 69,6% (16/23) dei carcinomi squamo-cellulari è risultato positivo al DNA virale, tra gli adenocarcinomi è risultato positivo il 30,4% (7/23) (p-value=0,70).

Tutte le neoplasie classificate come G3 sono risultate positive per HPV; valori inferiori di positività sono stati riscontrati nei tumori bene- (83,3%) e moderatamente- differenziati (42,9%) con p-value= 0.01.

Nessuna delle altre variabili considerate, quali l'età alla diagnosi, l'anno di diagnosi, stato civile ed occupazionale, hanno dimostrato differenze statisticamente significative tra i campioni HPV positivi e negativi.

L'analisi immunoistochimica per la proteina p-16 ha mostrato una positività pari al 39,4% (13/33), con una differenza statisticamente significativa tra i casi HPV-positivi e negativi (56.5% vs 0%; p-value=0,02). Stratificando i casi sulla base del tipo istologico, sono risultati positivi per p16 il 36,4% degli SCC e il 45,5% degli adenocarcinomi.

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

Dal confronto dei risultati ottenuti con l'immunoistochimica e quelli molecolari è stata osservata una moderata concordanza (K di Cohen:0,44; agreement totale del 69,7%).

Sui campioni risultati positivi per HPV-16 è stata valutata la presenza del trascritto oncogeno E6. I risultati hanno evidenziato una positività pari al 30,0% (6/20).

Il 36,4% (12/33) dei pazienti hanno presentato delle comorbidità rappresentate da: adenoma colico (8/12; 66,7%), carcinoma uroteliale della vescica (2/12; 16,7%), metastasi polmonare (2/12; 16,7%) e metastasi epatica (1/12; 8,3%). Tutte le lesioni sopra descritte, sottoposte alla ricerca del DNA virale, sono risultati negative.

Per quanto concerne il parametro sopravvivenza, a luglio 2019, dei 33 pazienti considerati nello studio 17 (51,5%) pazienti risultavano ancora in vita, di cui 9 di sesso maschile (3/17; 17,6%). Tra i 16 soggetti deceduti 11 (11/16; 69%) erano HPV-positivi e per la maggior parte (90%) l'infezione era sostenuta da HPV-16.

L'analisi di regressione logistica (tab.4) ha evidenziato una prognosi peggiore per i pazienti con neoplasia di grado istologico tra 2 e 3 (OR: 4,9; 95% CI: 1.0-23,6; p-value=0,049).

Nessun associazione statisticamente significativa è risultata per le variabili demografiche considerate, mentre, si è osservata una prognosi peggiore nei pazienti HPV-positivi (OS 5 anni: 61% Vs 40% in pazienti HPV-positivi e negativi, rispettivamente) (Fig. 13).

Tumori del pene

Nel periodo considerato sono stati diagnosticati 32 casi di tumore del pene (tab.5). L'età media dei pazienti coinvolti è risultata pari a 68 anni (DS 11,6). La maggior parte dei pazienti erano coniugati (13/17, 76,5%), solo una piccola quota era composta da soggetti divorziati (2/17, 11,8%). La maggior parte dei tumori erano localizzati nel glande (24/32, 75%), tutti classificati come SCC e, di questi, 19 (59,4%) come ben differenziati, 8 (25%) moderatamente differenziati e 5 (15,6%) poco differenziati.

Complessivamente, 9 campioni sono risultati positivi per HPV (9/32; 28,1%).

L'HPV-16 è stato il genotipo più frequentemente isolato (7/9, 77,8%), seguito da HPV-56 (1/32, 3,1%) e HPV-35 (1/32, 3,1%). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nella positività per HPV in riferimento al grado di differenziazione del tumore: rispettivamente il 44,4% (4/9), il 33,3% (3/9) e il 22, 2% (2/9) dei casi risultati positivi alla ricerca del DNA virale erano classificati come G1, G3 e G2.

All'analisi immunoistochimica, 7 campioni sono risultati positivi per la ricerca della proteina p16 (7/32; 21,9%), di questi un campione è risultato HPV-negativo e 6 HPV-positivi (p-value=0,01).

Dal confronto dei risultati ottenuti con l'immunoistochimica e quelli molecolari è stata osservata una buona concordanza (K di Cohen:0,668; agreement totale: 87,5%).

L'analisi dei trascritti oncogeni per E6, condotta sui soli casi risultati positivi per HPV-16, ha dimostrato una positività pari a 71,4% (5/7).

Per il 43,8 (14/32) dei pazienti sono state riportate comorbidità per un totale di 18 patologie, rappresentate per la maggior parte da metastasi linfonodali inguinali (4/18; 22,2%), adenocarcinoma colico (3/18; 16,7%), 2 casi di metastasi polmonari (2/18; 11,1%), 2 tumori spinocellulari della cute (2/18; 11,1%) ed 1 caso rispettivamente di adenocarcinoma alla prostata, tumore renale e carcinoma uroteliale. Tutte le lesioni sono state sottoposte alla ricerca del DNA virale di HPV e per 2 pazienti con metastasi linfonodale e polmonare è stata osservata positività per lo stesso genotipo (HPV-16) identificato nel tumore del pene. Gli stessi due campioni sono risultati positivi anche per la ricerca dei trascritti oncogeni E6 di HPV-16.

Per quanto concerne il parametro sopravvivenza, a luglio 2019, dei 32 pazienti considerati nello studio 14 soggetti (43,8%) erano deceduti, 10 di questi (10/14; 71,4%) entro i primi 5 anni dal momento della diagnosi. Tre pazienti (3/14; 21,4%) erano positivi alla ricerca dell'HPV.

L'analisi di regressione logistica (tab.6) ha messo in evidenza un rischio di mortalità superiore nei casi in cui il grado di differenziazione cellulare è 2 o 3 (G2, G3) (OR=6,3, 95% CI: 1,3-30,0; p-value=0,02). Nessuna delle altre variabili demografiche e cliniche considerate ha mostrato un effetto prognostico negativo. Tuttavia, se si considera la sopravvivenza a 5 anni, si osserva una maggiore mortalità nei soggetti HPV-positivi rispetto ai negativi, 77,8% e 56,5% rispettivamente (p-value=0,56), in assenza di significatività statistica (Fig. 14).

Tabella 3: Variabili demografiche e cliniche dei casi di tumore anale totali e stratificate sulla base dell'esito per la ricerca molecolare del genoma di HPV

Variabile		N (%)	HPV-positività	HPV-negatività	p-value
<i>Sesso</i>	<i>Maschi, n (%)</i>	17 (51,5)	10 (43,5)	7 (70,0)	0,26
	<i>Femmine, n (%)</i>	16 (48,5)	13 (56,5)	3 (30,0)	
<i>Età media (SD), anni</i>		64,6(12,1)	63,7 (12,0)	66,6 (12,9)	0,53
<i>Età ≥55 anni, n (%)</i>		24 (72,7)	16 (69,6)	8 (80,0)	0,69
<i>Statocivile, n (%)</i>	<i>Coniugato</i>	20/26 (76,9)	12 (70,6)	8 (88,9)	0.80
	<i>Single</i>	4/26 (15,4)	3 (17,7)	1 (11,1)	
	<i>Divorziato</i>	2/26 (7,7)	2 (11,8)	-	
<i>Statooccupazionale, n (%)</i>	<i>Disoccupato</i>	8/23 (34,8)	7 (46,7)	1 (12,5)	0.25
	<i>Impiegato</i>	6/23 (26,1)	4 (26,7)	2 (25,0)	
	<i>Pensionato</i>	9/23(39,1)	4 (26,7)	5 (62,5)	
<i>Sospetta diagnosi clinica di carcinoma, n (%)</i>		31/32 (96,9)	22 (95,7)	9 (100,0)	1,0
<i>Sospetta diagnosi clinica di adenoma, n (%)</i>		1/32(3,1)	1 (4,4)	-	1,0
<i>Sospetta diagnosi clinica di condiloma, n (%)</i>		3/32(9,4)	2 (8,7)	1 (11,1)	1,0
<i>Tumore diagnosticato prima del 2010, n (%)</i>		19/33 (57,6)	13 (56,5)	6 (60,0)	1,0
<i>Sitoanatomico, n (%)</i>	<i>Ano</i>	30/33 (90,9)	21 (91,3)	9 (90,0)	1.0
	<i>Retto</i>	3/33(9,1)	2 (8,7)	1 (10,0)	
<i>Esitoistopatologico, n (%)</i>	<i>Adenocarcinoma</i>	11/33 (33.3)	7 (30.4)	4 (40.0)	0.70
	<i>Squamous Cell Carcinoma (SCC)</i>	22/33 (66.7)	16 (69.6)	6 (60.0)	
<i>Gradoistopatologico (AJCC), n (%)</i>	<i>G1</i>	12/33 (36,4)	10 (43,5)	2 (20,0)	0.01
	<i>G2</i>	14/33 (42,4)	6 (26,1)	8 (80,0)	
	<i>G3</i>	7/33 (21,2)	7 (30,4)	-	
<i>Positività all'HPV-DNA, n (%)</i>		23/33 (69,7)	-	-	
<i>Genotipizzazione</i>	<i>HPV-16</i>	20/33 (60,6)	-	-	
	<i>HPV-35</i>	2/33 (6,6)	-	-	
	<i>HPV-6</i>	3/33 (9,1)	-	-	
<i>Positività per p-16, n (%)</i>		13/33 (39,4)	13 (56,5)	0 (0,0)	0,002
<i>Positività E6 gene, n (%)</i>		6/20 (30,0)	-	-	
<i>Patologie secondarie, n (%)</i>	<i>Adenoma colico</i>	7/12 (58,3)	5 (55,6)	2 (66,7)	0.65
	<i>Carcinoma vescicale</i>	2/12 (16,7)	2 (22,2)	-	
	<i>Altro</i>	3/12(25,0)	2 (22,2)	1 (33,3)	

Tabella 4: Analisi di regressione logistica per valutare la relazione tra variabili epidemiologiche dei pazienti con tumore anale e la mortalità

	OR (95 CI)	p-value
<i>Male</i>	1.1 (0.3-4.4)	0.87
<i>Age, years</i>	1.1 (1.0-1.1)	0.10
<i>Age ≥55 years,</i>	2.4 (0.5-11.7)	0.29
<i>Employed</i>	1.4 (0.2-9.3)	0.71
<i>Married</i>	7.0 (0.8-60.0)	0.08
<i>Suspected diagnosis of carcinoma</i>	-	
<i>Suspected diagnosis of adenoma</i>	-	
<i>Suspected diagnosis of condyloma</i>	0.5 (0.0-5.7)	0.55
<i>Anatomic site, Anus Rectal</i>	2.3 (0.2-28.0)	0.52
<i>Squamous Cell Carcinoma</i>	0.7 (0.2-2.8)	0.61
<i>Histopathological grading (AJCC)</i>	2.9 (1.0-8.2)	0.048
<i>Grading 2-3</i>	4.9 (1.0-23.6)	0.049
<i>HPV-DNA positivity</i>	0.9 (0.2-4.1)	0.91
<i>HPV-16</i>	1.2 (0.3-4.7)	0.83
<i>p-16 immunohistochemistry positivity</i>	0.5 (0.1-2.1)	0.36
<i>E6 gene positivity</i>	1.2 (0.2-8.8)	0.86

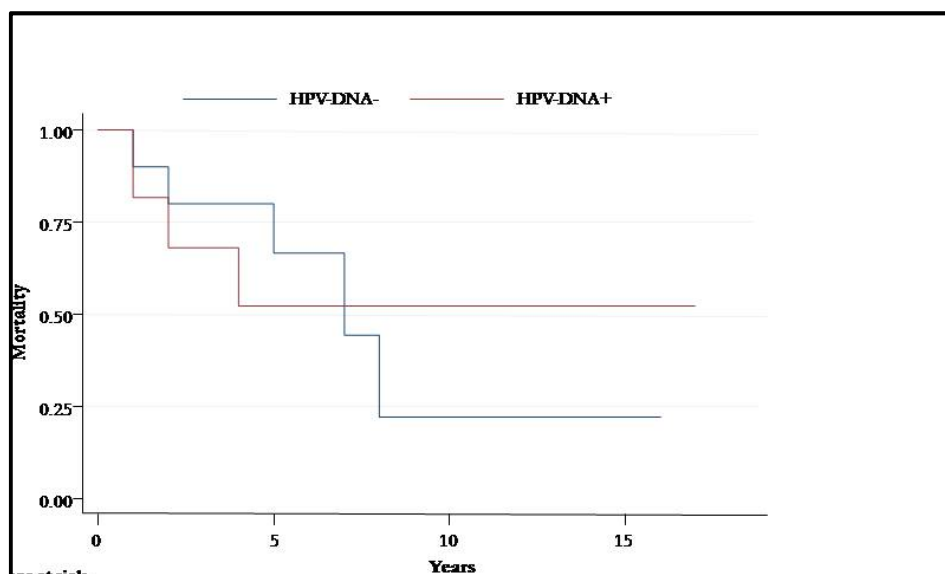


Figura 13: Sopravvivenza generale per pazienti con tumore anale stratificati tra HPV-positivi e negativi

Tabella 5: Variabili demografiche e cliniche dei casi di tumore del pene totali e stratificate sulla dell'esito per la ricerca molecolare del genoma di HPV

Variabile		N (%)	HPV negativity	HPV positivity	p- value	
<i>Età media (SD), anni</i>		68,0 (11,6)	69,6 (10,6)	64,1 (13,7)	0,24	
<i>Età ≥55 anni, n (%)</i>		28/32 (87,51)	21/23 (91,3)	7/9 (77,8)	0,56	
<i>Statocivile, n (%)</i>	<i>Coniugato</i>	13/17 (76,5)	8/12 (66,7)	5/5 (100,0)	0.34	
	<i>Single</i>	2/17 (11,8)	2/12 (16,7)	0/5 (0,0)		
	<i>Vedovo</i>	2/17 (11,8)	2/12 (16,7)	0/5 (0,0)		
<i>Statooccupazionale, n (%)</i>	<i>Occupato</i>	7/26 (38,9)	5/12 (41,7)	2/6 (33,3)	0.73	
	<i>Pensionato</i>	11/26 (61,1)	7/12 (58,3)	4/6 (66,7)		
<i>Sospetta diagnosi di carcinoma, n (%)</i>		23/24 (92,0)	16/17 (94,1)	7/8 (87,5)	1,0	
<i>Tumore diagnosticato prima del 2010, n (%)</i>		10,32 (31,3)	7/23 (30,4)	3/9 (33,3)	1,0	
<i>Sitoanatomico, n (%)</i>	<i>Glande</i>	24/32 (75,0)	18/23 (78,3)	6/9 (66,7)	1.0	
	<i>Pene</i>	8/32 (25,0)	5/23 (21,7)	3/9 (33,3)	1.0	
<i>Esitopatologico</i>	<i>Squamous Cell Carcinoma (SCC)</i>	32/32 (100,0)	23/23 (100,0)	7/9 (77,8)	0.07	
<i>Gradoistopatologico (AJCC), n (%)</i>	<i>G1</i>	19/32 (59,4)	15/23 (65,2)	4/9 (44,4)	0.25	
	<i>G2</i>	8/32 (25,0)	6/23 (26,1)	2/9 (22,2)		
	<i>G3</i>	5/32 (15,6)	2/23 (8,7)	3/9 (33,3)		
<i>Classificazione (AJCC), n (%)</i>	TNM	<i>Tis</i>	3/32 (9,4)	2/23 (8,7)	1/9 (11,1)	0.83
		<i>T1</i>	18/32 (56,3)	13/23 (56,5)	5/9 (55,6)	
		<i>T1a</i>	2/32 (6,3)	2/23 (8,7)	0/9 (0,0)	
		<i>T1b</i>	1/32 (3,1)	1/23 (4,4)	0/9 (0,0)	
		<i>T2</i>	1/32 (3,1)	1/23 (4,4)	0/9 (0,0)	
		<i>T3</i>	4/32 (12,5)	3/23 (13,0)	1/9 (11,1)	
		<i>NC</i>	3/32 (9,4)	1/23 (4,4)	2/9 (22,2)	
<i>Positività all'HPV-DNA, n (%)</i>		9/32 (28,1)				
<i>Genotipizzazione</i>	<i>HPV-16</i>	7/32 (21,9)	0/0 (0,0)	5/7 (71,4)	-	
	<i>HPV-56</i>	2/32 (6,3)	11/23 (47,8)	3/9 (33,3)	0.69	
	<i>HPV-35</i>	1/32 (3,1)				
<i>Positività per p-16, n (%)</i>		7/32 (21,9)				
<i>Positività per E6 gene, n (%)</i>		5/7 (71,4)				
<i>Esito, mortalità n (%)</i>		14/32 (43,8)				

Tabella 6: Analisi di regressione logistica per valutare la relazione tra variabili epidemiologiche dei pazienti con tumore del pene e la mortalità

	OR (95% CI)	p-value
<i>Mean age (SD), years</i>	1.0 (0.9-1.1)	0.99
<i>Age ≥55 years</i>	0.2 (0.0-2.4)	0.21
<i>Married</i>	0.6 (0.1-6.0)	0.68
<i>Employed</i>	1.6 (0.2-10.8)	0.63
<i>Familiarity for carcinoma</i>	-	-
<i>Suspected diagnosis of carcinoma</i>	-	-
<i>Cancer diagnosed before 2010</i>		
<i>Anatomic site, Penis</i>	0.3 (0.1-1-2.0)	0.23
<i>Squamous Cell Carcinoma</i>	0.8 (0.0-13.4)	0.85
<i>Well differentiated, n (%)</i>	0.2 (0.0-0.8)	0.02
<i>Moderately differentiated, n (%)</i>	2.8 (0.5-14.5)	0.23
<i>Poorly differentiated, n (%)</i>	6.8 (0.7-69.6)	0.11
<i>Histopathological grading 2-3</i>	6.3 (1.3-30.0)	0.02
<i>HPV positivity, n (%)</i>	0.6 (0.1-2.7)	0.46
<i>HPV-16</i>	1.0 (0.2-5.2)	0.96
<i>HPV-56</i>	1.3 (0.1-22.9)	0.85
<i>HPV-35</i>	-	-
<i>p-16 immunohistochemistry positivity, n (%)</i>	1.0 (0.2-5.2)	0.96
<i>E6 gene positivity, n (%)</i>	-	-
<i>Outcome, died</i>	-	-

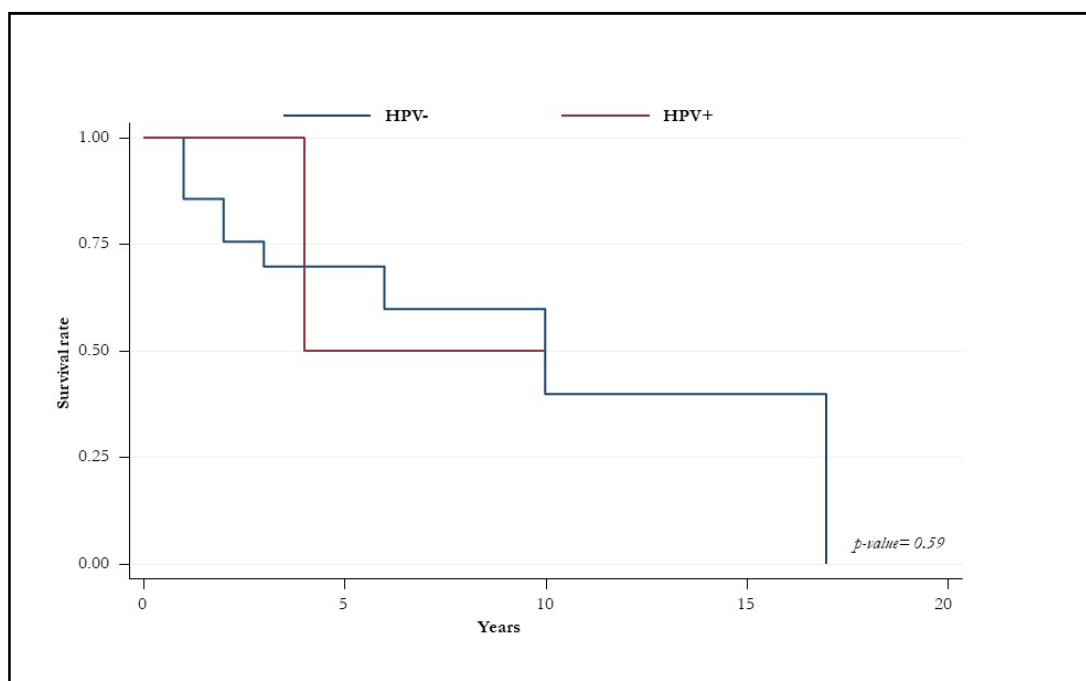


Figura 14: Sopravvivenza generale per pazienti con tumore del pene stratificati tra HPV-positivi e negativi

5. DISCUSSIONE

L'impatto delle malattie HPV correlate è altamente rilevante sia nel sesso maschile che femminile. Globalmente si stima che l'infezione da HPV sia associata al 4,5% delle patologie tumorali diagnosticati ogni anno, pari a oltre 630.000 nuovi casi [22].

Numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo del papillomavirus nell'insorgenza di altre tipologie tumorali differenti dal cervicocarcinoma, rappresentate dai tumori della regione ano-genitale (vulva, vagina, pene, ano) e tumori testa-collo. Tuttavia, i risultati presenti in letteratura mostrano un ampio *range* nella prevalenza osservata, riflettendo l'ampia varietà riscontrabile tra le diverse tipologie di studio e popolazioni target, così come tra le caratteristiche istologiche e le metodiche utilizzate per l'identificazione del virus. Inoltre, se da un lato si assiste ad una riduzione dei casi di cervicocarcinoma a seguito dell'adozione di efficaci protocolli di prevenzione primaria e secondaria, d'altra parte, pur rimanendo patologie relativamente rare nella popolazione generale, si osserva un trend in aumento per altre patologie HPV-correlate, quali i tumori anali e penieni.

La presente tesi di dottorato ha indagato il ruolo dell'infezione da HPV nell'insorgenza di patologie a carico dell'apparato ano-genitale, con particolare riferimento ai tumori dell'ano e del pene nella popolazione del Nord-Sardegna.

Lungo il periodo di osservazione (2002-2018) sono stati diagnosticati presso l'U.O.C di Anatomia Patologica 33 casi di tumori ano-rettali e 32 di tumori del pene.

I risultati ottenuti mediante l'HPV-DNA test hanno mostrato una prevalenza dell'infezione virale del 69,7% e 28,1% rispettivamente nei tumori anali e penieni, con il genotipo HPV-16 responsabile di oltre l'80% dei casi identificati. La netta prevalenza dell'HPV-16 è giustificata dall'ampia diffusione di tale genotipo a livello globale e, conseguentemente, all'identificazione come prima causa nei tumori HPV-correlati, sia nelle neoplasie cervicali che in quelle extra-cervicali.

La prevalenza di infezione osservata nel nostro studio trova riscontro con i dati descritti in letteratura, pur considerando l'ampio *range* di prevalenza legato al disegno dello studio (popolazione target e metodiche utilizzate) e, inoltre, alla differente distribuzione del virus tra le diverse aree geografiche [21].

In una recente meta-analisi, condotta da Lin e colleghi, in soggetti affetti da tumore anale è stata trovata una positività per HPV tra il 42% e il 76%, sottolineando una prevalenza maggiore nei casi più severi e nei soggetti particolarmente a rischio, come i pazienti HIV-positivi [50].

Per quanto riguarda i tumori penieni, stime a livello globale indicano approssimativamente il 50% dei casi HPV-associati. [61]. Una recente revisione sistematica, che ha coinvolto oltre 4000 soggetti affetti da tumore del pene, ha mostrato una positività pari al 50,8% dei casi, con un intervallo di prevalenza compreso tra l'11,6% e il 100% dei casi, diversamente da quanto riportato da de Sanjosè e colleghi i quali, attribuiscono all'infezione da HPV il 27% dei tumori del pene [58]. L'ampia variabilità nella positività per HPV riflette l'eterogeneità nella classificazione istologica dei tumori del pene che parzialmente giustifica le differenze riportate in letteratura.

I tumori squamo-cellulari (SCC) sono quelli maggiormente diagnosticati tra i tumori dell'area ano-genitale [70]. Tuttavia nella nostra analisi tale prevalenza è confermata per quanto riguarda i tumori del pene, con la totalità dei casi classificati come SCC, mentre 1/3 dei tumori anali sono stati identificati come adenocarcinomi. A causa della bassa numerosità con cui gli adenocarcinomi vengono diagnosticati (9-14% dei tumori anali), rimangono ancora poco chiare le cause eziopatologiche di tale neoplasia ed alcuni studi sembrano escludere un legame con l'infezione da HPV [71]. Stratificando i diversi istotipi sulla base della positività per HPV non emerge una differenza significativa tra i due gruppi considerati (72,2% e 63,6% in tumori SCC e adenocarcinoma, rispettivamente), suggerendo una probabile origine infettiva anche per gli adenocarcinomi anali. Tuttavia, tale dato necessiterebbe di una numerosità campionaria maggiore per poter essere confermato.

Tra le diverse variabili epidemiologiche considerate nei pazienti affetti da tumore anale non si evince alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo di HPV-positivi e HPV-negativi. Tuttavia, nonostante tale differenza fosse al di sotto dei limiti della significatività statistica, dall'analisi stratificata per genere si osserva una prevalenza maggiore dell'infezione nel sesso femminile (81,3% vs 58,8%, rispettivamente). Tale dato supporterebbe l'ipotesi, già dimostrata precedentemente, di un maggior rischio di sviluppare tumori ano genitali nelle donne con pregresse lesioni cervicali causate da HPV [48]. Tuttavia, la mancata conoscenza di eventuali esami citologici o molecolari su campioni cervicali delle stesse pazienti affette da tumore anale, non consente una conferma di tale affermazione nella nostra coorte.

Sulla base del grado di differenziazione cellulare emerge una prevalenza dei casi HPV-positivi tra i campioni classificati come poco differenziati, con una positività del 100% e 60% rispettivamente per i tumori anali e penieni. Tale risultato è in accordo con quanto descritto in letteratura per i tumori orofaringei, dove si assiste ad una prevalenza di casi HPV-associati tra i tumori poco o per nulla differenziati [8].

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

La positività per p16, utilizzato come marcatore surrogato di infezione da HPV nelle patologie HPV-correlate, è stata pari al 39% e 22% nei tumori anali e penieni rispettivamente. Inoltre, è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa nella positività per p16 tra il gruppo di casi HPV-positivi e negativi, con una positività del 57% nei tumori anali e del 67% nei tumori del pene nei casi precedentemente risultati positivi all'HPV DNA test. La stessa revisione condotta da Olesen e colleghi, analizzando oltre 2000 casi di tumori del pene, ha mostrato una positività per p16 pari a ~80% e 18% nel gruppo di HPV-positivi e negativi, rispettivamente [58]. Similmente, Alemany e colleghi, attraverso uno studio multicentrico comprendente 1010 casi di tumori del pene ha riportato una percentuale di positività per p16 pari all'80% dei casi HPV positivi [1]. Tuttavia, precedenti studi hanno evidenziato i limiti dell'analisi immunoistochimica dovuti a diversi fattori, alcuni di questi legati alla natura stessa dell'analisi che, in assenza di criteri interpretativi standardizzati, resta una metodica operatore-dipendente e, di conseguenza, soggetta a false interpretazioni. La bassa specificità dell'analisi istologica per la ricerca del p16, messa in risalto dal confronto con i risultati ottenuti mediante la ricerca del DNA di HPV, può inoltre dipendere da una inattivazione del promotore del gene codificante per p16, come dimostrato nei tumori cervicali invasivi nei quali si assiste ad una riduzione nell'espressione della proteina a differenza di quanto accade nei carcinomi in situ, in cui i livelli di espressione per p16 rimangono elevati [66,19]. Nonostante nel nostro studio sia stata osservata una buona concordanza tra i risultati ottenuti mediante l'analisi molecolare e l'immunoistochimica, e considerando che la presenza del DNA virale non è sinonimo di infezione attiva ed integrazione nel genoma della cellule ospite, diversi studi supportano l'adozione di entrambe le metodiche nella diagnosi dei tumori HPV-associati in modo da combinare, da un lato, la sensibilità delle metodiche molecolari e, dall'altro, la conferma della trascrizione dei geni implicati nel processo di trasformazione delle cellule neoplastiche.

Al momento, il ruolo del p16 e l'HPV status come fattori prognostici nei tumori ano-genitali, rimangono ancora poco chiari e controversi. Uno studio comprendente 82 pazienti con tumore del pene, di cui il 30.5% positivi all'HPV-DNA test, non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo di HPV positivi e negativi nella sopravvivenza a 10 anni [7], contrariamente a quanto riportato da Lont e colleghi che hanno evidenziato una prognosi migliore tra i soggetti HPV positivi (93% vs 78%) a 5 anni dalla diagnosi [52].

Nel nostro set di dati, la discordanza tra analisi molecolare e quella immunohistochimica riscontrata in un solo caso di tumore del pene, potrebbe essere dovuta a due fattori: (i) nei casi p16-negativi con positività all'HPV-DNA potrebbe trattarsi di un'infezione transitoria per cui i geni virali non sono espressi o di una inattivazione del gene codificante per p16 a causa di ipermetilazione del gene promotore; (ii) potrebbe essere dovuto ad un fallimento della metodica molecolare a causa della degradazione del DNA virale.

Nella nostra analisi non è stata evidenziata nessuna differenza statisticamente significativa nella sopravvivenza tra il gruppo di soggetti HPV positivi e negativi, probabilmente legata alla ridotta numerosità della coorte considerata.

La caratterizzazione di potenziali fattori prognostici nei casi di tumori anali e penieni in letteratura mostra risultati discordanti. Lo stesso ruolo prognostico dell'infezione da HPV spesso non mostra alcuna differenza significativa tra i due gruppi in relazione all'*outcome*, per fattori legati al disegno dello studio, al numero e all'età dei soggetti arruolati e alle metodiche analitiche utilizzate. Tale aspetto contrasta con quanto accade per i casi di tumori con grado di differenziazione cellulare elevato, i quali sono da sempre associati ad una prognosi negativa in diverse patologie tumorali [15].

L'analisi dei dati clinici, in particolare nei pazienti affetti da tumore del pene, ha mostrato un considerevole rischio di sviluppare patologie secondarie in pazienti con diagnosi primaria di tumore HPV-associato. Precedenti studi hanno evidenziato la particolare tendenza dei tumori penieni di diffondere per via linfatica con una localizzazione iniziale a livello dei linfonodi inguinali e successivamente pelvici. Tali lesioni linfonodali, se non trattate, possono degenerare in ulcere cutanee e causare ulteriori infezioni. Il coinvolgimento di siti anatomici distanti è più raro (1-10% dei casi) e si verifica solitamente in una fase tardiva della malattia [62].

All'interno della nostra coorte, in due pazienti che riportavano nella loro storia clinica lo sviluppo di metastasi inguinali in concomitanza della diagnosi primaria e, per un solo paziente, lo sviluppo a distanza di anni di metastasi polmonari, abbiamo voluto indagare il possibile ruolo dell'HPV nell'insorgenza di tali neoplasie, sia mediante la ricerca del DNA virale che attraverso l'identificazione dei trascritti oncogeni E6 di HPV, marcatori di replicazione virale attiva. I campioni sono risultati positivi ad entrambe le analisi confermando sia il ruolo eziologico dell'HPV nell'insorgenza di tali metastasi, sia il rischio elevato di sviluppare recidive nei pazienti con tumore primario HPV-associato, come già dimostrato in precedenti studi. Nel 1993, Kenberg fu il primo a dimostrare la presenza del DNA di HPV in formazioni metastatiche successive alla diagnosi di un cervicocarcinoma.

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell'associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

Successivamente, numerosi studi confermarono la presenza del genoma virale e, talvolta dei trascritti oncogeni, in linfonodi sentinella attraverso metodiche molecolari [49]. Alcuni di questi studi hanno inoltre dimostrato che l'interessamento linfonodale è associato ad un maggiore rischio di sviluppare recidive [49,76]. Gli autori hanno riportato un rischio elevato in entrambi i sessi di sviluppare patologie secondarie a seguito di tumore primario HPV-associato. Lo stesso studio ha messo in risalto un maggior rischio nel sesso maschile, rispetto alle donne con pregresso cervicocarcinoma; in particolare è stato osservato che pazienti sopravvissuti a neoplasie del pene hanno un rischio maggiore di sviluppare tumori orofaringei.

6. CONCLUSIONI

La presente tesi descrive, per la prima volta, l'impatto dell'infezione da HPV nell'insorgenza dei tumori ano-rettali e penieni nel territorio del Nord Sardegna in associazione con variabili demografiche, istologiche e molecolari.

L'analisi condotta ha confermato un ruolo dell'HPV nell'eziopatogenesi di tali neoplasie, in accordo con i risultati riportati in letteratura. La caratterizzazione dei genotipi ha mostrato una netta prevalenza del genotipo HPV-16, già conosciuto come prima causa dei tumori HPV-correlati sia cervicali che extra-cervicali. L'analisi immunoistochimica per p16, pur mostrando una buona concordanza con l'HPV-DNA test, ha evidenziato alcuni limiti della metodica suggerendo l'adozione di entrambi i test per la diagnosi dei tumori HPV-correlati. Fatta eccezione per il grado di differenziazione istologica, per la quale si osserva una differenza statisticamente significativa nella distribuzione di positività per HPV nel gruppo poco e moderatamente differenziato, nessun'altra delle variabili considerate (demografiche, istologiche e cliniche) ha mostrato significatività. Tuttavia, la bassa numerosità campionaria dello studio ha rappresentato un limite per la significatività dei risultati ottenuti, nonostante siano stati considerati la totalità dei casi diagnosticati tra il 2002 e il 2018 nel nostro contesto territoriale.

Complessivamente, il lavoro condotto supporta l'adozione di strategie preventive primarie, quali la vaccinazione anti-HPV, nel sesso maschile come strumento efficace nella riduzione dei tumori ano-genitali HPV-associati. I risultati ottenuti attraverso l'analisi delle patologie secondarie HPV-correlate hanno sottolineato la necessità di valutare l'efficacia di adeguate misure di prevenzione nelle popolazioni più a rischio e di indagare il potenziale ruolo terapeutico della vaccinazione, in modo da poter ridurre il rischio di recidive o tumori secondari. Inoltre, la ricerca del DNA virale nelle metastasi polmonari sarebbe un ausilio nella differenziazione tra tumori primari e secondari e, di conseguenza, nell'orientamento delle terapie, considerando che la localizzazione polmonare è tra le sedi più frequentemente identificate nelle diagnosi dei tumori secondari (20-54% dei casi totali) [76].

Ulteriori studi osservazionali e sperimentali sarebbero necessari per meglio chiarire il ruolo dell'HPV nei processi di carcinogenesi dei tumori ano-genitali. Infine, se fosse confermato il ruolo dell'infezione nella prognosi dei tumori ano-genitali ed orofaringei, sarebbe particolarmente utile poter disporre di sistemi diagnostici rapidi (*point of care*) in grado di fornire tempestivi risultati analitici, utili per la scelta del percorso terapeutico più idoneo da adottare.

BIBLIOGRAFIA

1. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, et al., Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *European Urology*, 2016;69(5):953-961
2. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017
3. Arbyn M, Verdoodt F, Snijders PJ, Verhoef VM e al., Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol*, 2014; 15(2):172-183
4. Barreto JE, Velazquez EF, Ayala E, Torres J and CubillaAL. Carcinoma cuniculatum: a distinctivevariant of penilesquamouscell carcinoma: report of 7 cases *Am J SurgPathol*. 2007;31: 71-75
5. Berry J, Sean C. Vaccinations for Anal Squamous Cancer: Current and Emerging Therapies Glasgow. *Clin Colon Rectal Surg* 2018;31:321–327
6. Bertoli HK, Rasmussen CL, Sand FL, AlbieriV , Norrild B, Verdoodt F, and Kjaer SK. Human papillomavirus and p16 in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vagina. *Int. J. Cancer*, 2019;145: 78-86
7. Bezerra AL, Lopes A, Landman G, et al. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. *Am J SurgPathol*2001;25:673-8
8. Bishop JA, Westra WH. Ciliated HPV-related Carcinoma: A Well-differentiated Form of Head and Neck Carcinoma That Can Be Mistaken for a Benign Cyst. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(11):1591–1595
9. Bordignon V, Di Domenico E.G, Trento E, D’Agosto G, Cavallo I, Pontone M,Pimpinelli F, Mariani L, Ensoli F. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. *Viruses* 2017, 9, 390
10. Bosch FX. and Cardis E. Cancer incidence correlations: Genital, urinary and some tobacco-related cancers. *Int. J. Cancer*, 1990;46: 178-184
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, and Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.2018;68: 394-424

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell’associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

12. Cancer.net. Disponibile a:<https://www.cancer.net/cancer-types/penile-cancer/introduction> (Ultimo accesso 28 ottobre 2018)
13. Centers for Diseases Control and Prevention. Disponibile a:www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/age.htm(Ultimo accesso 28 ottobre 2019)
14. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res.* 2018;5:46–58
15. Chaux A, Torres J, Pfannl R, Barreto J, Rodriguez I, Velazquez EF, Cubilla AL. Histologic grade in penile squamous cell carcinoma: visual estimation versus digital measurement of proportions of grades, adverse prognosis with any proportion of grade 3 and correlation of a Gleason-like system with nodal metastasis. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(7):1042-8
16. Christodoulidou M, Sahdev V, Houssein S, Muneer A. Epidemiology of penile cancer. *CurrProbl Cancer.* 2015;39(3):126-36
17. Clarke MA, and Wentzensen N. Strategies for Screening and Early Detection of Anal Cancers: A Narrative and Systematic Review and Meta-Analysis of Cytology, HPV Testing, and Other Biomarkers. *CancerCytopathol*, 2018 ; 126: 447-60
18. Coutant C., Barranger E., Cortez A., Dabit D., Uzan S., Bernaudin J.F., Daraï E. Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer. *Ann. Oncol.* 2007;18:1513–1517
19. Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, Kasamatsu E, Monfulleda N, Tous S, Alemany L, Klaustermeier J, Muñoz N, Quint W, de Sanjose S, Bosch FX. Value of p16(INK)⁴(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35(2):253-61
20. Cubilla AL, Velazquez EF, Amin MB, Epstein J, Berney DM, Corbishley CM; Members of the ISUP Penile Tumor Panel. The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. *Histopathology.* 2018;72(6):893-904
21. da Silva Reis A.A and da Cruz A.D. The Impact of Human Papillomavirus on Cancer Risk in Penile Cancer. BOOK: Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - A Clinical Perspective. 2012
22. de Martel C, Plummer M, Vignat J, and Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer*, 2017;141:664-670

Corso di Dottorato in Scienze Biomediche (XXXII Ciclo)

Curriculum Sanità Pubblica

Tesi di Dottorato di Narcisa Muresu

“Studio dell’associazione tra infezione da HPV e tumori extra-cervicali nella popolazione del Nord Sardegna: aspetti epidemiologici, isto-patologici, molecolari e di Sanità Pubblica”

23. de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N and Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007, 7: 453–459
24. Dion G.R, Teng S, Boyd LR, Northam A, et al., Adjuvant Human Papillomavirus Vaccination for Secondary Prevention. A Systematic Review. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;143(6):614-622
25. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15
26. Doorbara J, Quint W, Banks L, Bravo I.G, Stoler M, Broker T.R, Stanley M.A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30S (2012) F55– F70
27. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. *J InfectDis* 2006; 194: 1044–57
28. Flaherty A, Kim T, Giuliano A, Magliocco A, Tariq S. Hakky, Lance C. Pagliaro, Philippe E. Spiess, Implications for human papillomavirus in penile cancer, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2014;32,(1): 53.e1-53.e8
29. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 2012; 20;30Suppl 5:F12-23
30. Franco E.L, Villa LL. and Sobrinho JP. et al. Epidemiology and acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J InfectDis* 1999, 180: 1415–1423
31. Ghelardi A. et al., SPERANZA project: HPV vaccination after treatment for CIN2+. *Gynecologic Oncology* 151 (2018) 229–234
32. Gilbert DC, Williams A, Allan K, Stokoe J, Jackson T, Linsdall S, et al. P16INK4A, p53, EGFR expression and KRAS mutation status in squamous cell cancers of the anus: correlation with *outcomes* following chemo-radiotherapy. *RadiotherOncol* 2013;109(1):146–51
33. GISCI- Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma. Disponibile al sito internet :<https://www.gisci.it/il-nuovo-programma-di-screening-con-il-test-hpv-sostituisce-il-pap-test>. (Ultimo accesso: 25 settembre 2019)
34. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human

- papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer* 2015; 15;136(12):2752e60
35. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med.* 2011;364:401-11
 36. Guerendiain D, Moore C, Wells L, Conn B, Cuschieri K. Scottish Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) material is amenable to HPV detection by the Xpert® HPV assay- *Journal of Clinical Virology.* 2016;77: 55–59
 37. Haeggbloom L, Ramqvist T, Tommasino M, Dalianis T, Näsman A, Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per oropharyngeal sub-site the last 3 years. *Papillomavirus Research.* 2017; 4: 1–11
 38. Hall AH, Alexander KA. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J.Virol.* 2003; 77: 6066-6069
 39. Heath S, Willis V, Allan K, Purdie K, Harwood C, Shields P, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *ClinOncol (R CollRadiol)* 2012;24(1):e18–23
 40. Hildebrand J, Fischbeck A, Hundsdoerfer B, Clanner-Engelshofen B, Marsela E, Wollenberg A, Flaig M, French L. and Reinholz M. Retrospective analysis of alpha-human papillomavirus (HPV) types in tissue samples from anogenital dysplasias – introduction of the RICH (Risk of HPV-related Carcinoma in HIV+/- patients) score. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019
 41. Hoff PM, Coudry R, Motta C, Moniz V. Pathology of Anal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2017;26:57–71
 42. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In *Fields: Knipe BN, Howley DM, Fields PM. Virology, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001; 2197-29*
 43. IARC Monograph-1995. Wood dust and formaldehyde. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, 70:1-492*
 44. International Agency for Research on Cancer (IARC) GLOBOCAN 2018. World Health Organization (WHO) Data source: (<http://gco.iarc.fr/today>)
 45. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, et al. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *International Journal of GynecologicCancer*2006;16:347-353

46. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs. *Methods Mol Biol.* 2005; 292: 401-420
47. Kidd LC, Chaing S, Chipollini J, Giuliano A.R, Spiess P.E, and Sharma P. Relationship between human papillomavirus and penile cancer—implications for prevention and treatment. *TranslAndrol Urol.* 2017; 6(5): 791–802
48. Kost BP, Hofmann J, Stoellnberger S, Bergauer F, Blankenstein T, Alba-Alejandre I, Stein A, Stuckart C, Weizsäcker K, Mylonas I, Mahner S, Gingelmaier A. Prevalence of human papillomavirus infection of the anal canal in women: A prospective analysis of high-risk populations. *Oncology Letters*, 2017 ;13(4): 2495-2501
49. Lee Y.S., Rhim C.C., Lee H.N., Lee K.H., Park J.S., Namkoong S.E. HPV status in sentinel nodes might be a prognostic factor in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2007;105:351–357
50. Lin C, Franceschi S, Clifford GM. Human papillomavirus types from infection to cancer in the anus, according to sex and HIV status: a systematic review and meta-analysis. *Lancet InfectDis*, 2018 ; 18(2): 198–206
51. Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zurHausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J InvestDermatol.* 1985 ;84(5):417-20
52. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*2006;119:1078-81
53. Masrou-Roudsari J, Ebrahimpour S. Causalrole of infectious agents in cancer: An overview. *Caspian J InternMed* 2017; 8(3): 153-15
54. McMurray H.R, Nguyen D., Westbrook T.F. and Mcance D.J. Biology of human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology*,82,15±3
55. Mullen JT, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, Barcenas CH, Crane CH, Skibber JM, FeigBW. Results of surgical salvage after failed chemoradiation therapy for epidermoid carcinoma of the anal canal. *AnnSurgOncol.* 2007; 14(2):478-83
56. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al., Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27
57. Nelson VM, and Benson AB. Epidemiology of Anal Canal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 2017; 26(1):9–15

58. Olesen TB, Sand FL, Rasmussen CL, Albieri V, GrønkærToft B, Norrild B, Munk C, KrügerKjær S. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2019; 20: 145–58
59. Palefsky J. Anal Neoplasia and Cancer: A Growing Problem-Anal Neoplasia and Cancer. *Seminars in Colon and Rectal Surgery Volume*. 2017; 28(2):57-62
60. Parwaiz I, MacCabe T.A, Thomas M.G, Messenger D.E. A Systematic Review and Meta-Analysis of Prognostic Biomarkers in Anal Squamous Cell Carcinoma Treated With Primary Chemoradiotherapy. *Clinical Oncology*, 2019, in press
61. Plummer M, de Martel C, Vignat J et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet GlobHealth* 2016; 4(9): e609–e616.
62. Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and Natural History of Penile Cancer. *Urology*. 2010;76(2 Suppl 1):S2-6
63. Rasmussen C, Sand FL, Hoffmann Frederiksen M, Kaae Andersen K, and Kjær SK. Does HPV status influence survival after vulvar cancer?. *Int. J. Cancer*, 2018;142: 1158-1165
64. Roche tissue diagnostics. CINtec® Histology. Available at: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1875?type=2406>
65. Sajad Ahmad Salati and Azzam Al Kadi. Anal cancer – a review. *International Journal of Health Sciences, Qassim University, Vol. 6, No.2, (June 2012/Rajab 1433H)]*.
66. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998; 153(6):1741-8
67. Saraiya M, Unger E.R, Thompson T.D, et al., HPV Typing of Cancers Workgroup, US Assessment of HPV Types in Cancers: Implications for Current and 9-Valent HPV Vaccines, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107(6)-djv086
68. Schiffman M, and Castle P.E. The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. *N Engl J Med* 2005; 353:2101-2104
69. Schiller JT, Day PM, and Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 2010; 118(1 Suppl): S12–S17
70. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2018; 47:14-26

71. Shiels MS, Kreimer AR, Coghill AE, et al: Anal cancer incidence in the United States, 1977-2011: distinct patterns by histology and behavior. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24:1548–1556, 2015
72. Sotlar K, Selinka HC, Menton M, Kandolf R, Bültmann B. Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and non dysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol*, 1998 ; 69(2): 114-21
73. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. 2013;2(1):51–61
74. Stratton KL, Culkin DJ. A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 30(3):245–249, 252
75. Sudenga SL, Ingles DJ, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp WJ, Messina JL, Stoler MH, Abrahamsen M, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. Genital Human Papillomavirus Infection Progression to External Genital Lesions: The HIM Study. *Eur Urol*. 2016;69(1):166-73
76. Suk R. Trends in Risks for Second Primary Cancers Associated With Index Human Papillomavirus–Associated Cancers., *JAMA Network Open*. 2018;1(5):e181999
77. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R, Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer, *Annals of Oncology*. 2017; 28(10): 2386–2398
78. Tanaka T.I and Alaw F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *Dent Clin North Am*. 2018; 62(1):111-120
79. Vaccino anti-HPV: prove di efficacia, profilo di sicurezza e copertura vaccinale in Italia Fondazione GIMBE. <https://www.evidence.it/articoli/pdf/e1000184.pdf>
80. World Health Organization. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. (2nd ed.) WHO, Geneva (2014)
81. zurHausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009; 384:260–265
82. zurHausen, H, Meinhof W, Scheiber W, and Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*. 1974; 13: 650–656