

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche

Dottorato di Ricerca in Scienze Odontostomatologiche

XXIX Ciclo



**VALUTAZIONE DELLA COMPRESENZA DEL
PAPILLOMAVIRUS (HPV) IN SEDE ORALE E GENITALE IN
DONNE CON CITOLOGIA CERVICALE POSITIVA E NEI
RISPETTIVI PARTNER**

TUTOR: Chiar.mo Prof. Giampietro Farronato

COORDINATORE: Chiar.mo Prof. Massimo Del Fabbro

Tesi di Dottorato del:
Dott. Gianguido COSSELLU
Matricola: R10614 - R33

Anno Accademico 2015 – 2016

INDICE

1.	INTRODUZIONE	1
2.	IL PAPILOMA VIRUS	5
2.1	STRUTTURA	6
2.2	CICLO VITALE E ESPRESSIONE GENICA	7
2.3	PATOGENESI	12
3.	LESIONI EXTRA ORALI CAUSATE DA HPV	16
4.	LESIONI DEL CAVO ORALE CAUSATE DA HPV	17
4.1	CONDILOMI ACUMINATI	18
4.2	PAPILLOMA SQUAMOSO	20
4.3	VERRUCA VOLGARE	21
4.4	IPERPLASIA EPITELIALE FOCALE MALATTIA DI HECK	22
4.5	CARCINOMA SQUAMOCELLULARE	23
4.5.1	Incidenza e mortalità a livello mondiale	25
4.5.2	Incidenza, mortalità e sopravvivenza a livello europeo e italiano	29
5.	CONSIDERAZIONI IN TEMA DI PREVENZIONE E TERAPIA: ESTENDERE LA VACCINAZIONE ANCHE AGLI UOMINI?	37
6.	SCOPO	43
7.	MATERIALI E METODI	44
7.1	RACCOLTA DEI CAMPIONI	46
7.2	ESTRAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA	47
7.3	GENOTIPIZZAZIONE HPV	51
7.4	CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI DI HPV MEDIANTE INNOLIPA	54

7.5 ANALISI STATISTICA DEI DATI	54
8. RISULTATI	55
9. DISCUSSIONE	67
10. CONCLUSIONI	77
11. BIBLIOGRAFIA	78
APPENDICE CON LE PUBBLICAZIONI EFFETTUATE NEL CORSO DEL DOTTORATO	85

1. INTRODUZIONE

L'infezione da Human Papilloma Virus (HPV) è una delle più diffuse infezioni sessualmente trasmesse nella popolazione mondiale.

Alla luce dei cambiamenti delle abitudini sessuali avvenuti negli ultimi decenni (per esempio l'evoluzione dell'età di esordio dell'attività sessuale, l'incremento nel numero dei partner, le diverse abitudini sessuali), sono aumentate di riflesso le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione sia nel distretto genitale sia in quello orofaringeo con la sempre maggiore esposizione all'infezione di pazienti in età precoce. Tale evoluzione del quadro infettivo del papilloma virus ha portato gli epidemiologi a definire endemica l'infezione da HPV.

Il motivo per cui si è deciso di realizzare questo progetto è da ricercarsi nel fatto che il papilloma virus è ormai appurato essere significativamente associato al carcinoma squamocellulare, il principale tumore del distretto orofaringeo.

Nel corso degli ultimi trent'anni, in gran parte delle principali nazioni industrializzate in tutto il mondo, l'incidenza dei tumori dell'orofaringe è rapidamente incrementata ¹⁻⁵.

Uno degli aspetti più importanti dei tumori della regione testa-collo relativo a questi ultimi decenni è dato dal fatto che in precedenza il carcinoma squamocellulare è sempre stato principalmente diagnosticato in soggetti adulti con una storia positiva in relazione all'utilizzo di tabacco ed alcool. Attualmente però, sebbene l'uso di tabacco si sia ridotto, l'incidenza di questo tumore è aumentata significativamente. Ad oggi i pazienti affetti da tumore orofaringeo tendono ad essere soggetti giovani adulti di età compresa tra i 40 e i 50 anni, che non hanno mai fumato o fatto utilizzo di tabacco. La ragione di questo cambiamento è da ricercarsi in primis nel fatto che questi tumori risultano essere sempre più dipendenti dall'HPV.^{6,7}

	HPV NEGATIVO	HPV POSITIVO
INCIDENZA	Riduzione	Aumento
FATTORI DI RISCHIO COMUNI	Tabacco, Alcohol	HPV
LOCALIZZIONE PREFERITA	Tonsille, palato molle	Base della lingua, tonsille
ETA'	Più anziani	Più giovani
LIVELLO DI ISTRUZIONE	Basso	Alto
USO DI TABACCO	Alto	Basso
SOPRAVVIVENZA	Scarsa	Buona

Tabella 1

Comparazione delle principali caratteristiche dei tumori del distretto testa-collo in base alla loro associazione con HPV ⁸

Sia in Europa che in America, l' infezioni da HPV è la maggior infezione sessualmente trasmessa con una stima di oltre la metà di tutte le nuove infezioni sessualmente trasmissibili.⁹

Si stima che la maggior parte degli adulti, ad un certo punto nel corso della loro vita, si infetterà in qualche modo con il virus dell'HPV. Per fortuna, la maggior parte delle volte il sistema immunitario sarà in grado di eliminare il virus prima che questo causi delle lesioni.

Le infezioni da HPV possono essere quindi nella maggior parte dei casi totalmente asintomatiche o causare comunque delle lesioni benigne, come ad esempio le verruche volgari, i condilomi a livello genitale o a livello delle corde vocali dei bambini nati da madri infette.

Altro aspetto importante che abbiamo tenuto in considerazione per la realizzazione del disegno dello studio è dato dal fatto che i tumori orofaringei causati da HPV sono dalle 3 alle 5 volte più frequenti tra gli uomini piuttosto che tra le donne.^{6,10}

Questi dati sono confermati da diverse report relativi a numerose nazioni altamente industrializzate e sviluppate come Australia, Canada, Giappone, Danimarca, Norvegia, Svezia, Olanda, Gran Bretagna, Stati Uniti: l'incidenza dei tumori orali HPV correlati è drasticamente incrementata negli uomini mentre è solo parzialmente aumentata nelle donne.¹¹⁻

Ad oggi, dunque, i tumori orofaringei sono causati principalmente proprio dal virus HPV.

La tabella seguente riporta quelli che sono i principali sintomi causati da queste lesioni.

SINTOMI	% DI PAZIENTI
Massa a livello del COLLO	51%
Infiammazione alla GOLA	28%
LESIONE ORALE visibile	14%
Difficoltà a DEGLUTIRE	10%
Nodo in GOLA	9%

Tabella 2

Principali sintomi evidenziati dai pazienti affetti da tumore orofaringeo HPV+ ¹⁵

La caratteristica sicuramente considerabile come positiva in merito alle lesioni da HPV è data da un prognosi nettamente più favorevole per i tumori HPV correlati rispetto agli altri.

Basti ricordare come a distanza di due anni i soggetti con tumori HPV correlati presentano una percentuale di sopravvivenza prossima al 95% rispetto ad un 60% circa dei tumori HPV-negativi. La differenza si mantiene anche considerando a 5 anni con una differenza di 79% rispetto ad un nettamente inferiore 46%. ¹⁶⁻¹⁸

Tale differenza è spiegabile principalmente dal fatto che questi tumori rispondono in modo migliore ai trattamenti.

In generale si deve sempre ricordare e sottolineare come, in primis, la possibilità di sopravvivenza dipenda da quando si fa diagnosi e quindi dal grado di estensione del tumore stesso.

ANNI	HPV POSITIVI	HPV NEGATIVI
1	97%	90%
2	95%	62%
3	86-93%	58%
4	84%	50%
5	79-82%	46%

Tabella 3

Percentuale di sopravvivenza a distanza di 1-5 anni dalla diagnosi di tumore orofaringeo HPV correlato ¹⁹

Considerato quanto detto, si deduce come la conoscenza della storia naturale dell'infezione da HPV costituisca un presupposto indispensabile nella formazione dell'odontoiatra, del chirurgo maxillo-facciale, dell'otorino e di tutte quelle figure che si interessano della salute del cavo orale, essendo sempre più spesso coinvolti nella gestione del paziente a rischio di infezione e/o già con la presenza di lesione franche causate dal virus stesso.

Il progetto di questa tesi di Dottorato parte dunque da un'attenta analisi della letteratura scientifica avente come oggetto di studio l'eventuale compresenza dell' *Human papillomavirus* (HPV) a livello del cavo orale di donne con citologia cervicale positiva e nei rispettivi partner maschili sani.

Da questa è scaturito un protocollo clinico di ricerca basato sulla selezione di donne con una lesione cervicale comprovata da un PAP test positivo, dalla successiva ricerca del virus HPV sia all'interno delle mucose genitali sia del cavo orale dei soggetti reclutati. Inoltre, considerato ancora una volta la notevole aumentata incidenza di tumore orofaringeo nei soggetti maschili, si è deciso di andare ad esaminare anche il rispettivo partner maschile sia a livello genitale sia a livello del cavo orale per poter evidenziare possibili correlazioni all'interno della coppia stessa.

Siamo andati a valutare anche da un punto di vista clinico la presenza di eventuali lesioni a livello delle mucose orali dei soggetti analizzati e l'associazione con eventuali fattori di rischio specifici.

2. IL PAPILOMA VIRUS

Il papilloma virus umano o HPV (Human Papilloma Virus) è un virus appartenente alla famiglia papillomaviridae. Le infezioni da HPV sono estremamente diffuse e si accompagnano costantemente a comparsa di lesioni proliferative circoscritte, in genere esofitiche, con diversi aspetti clinici e istopatologici secondo il tipo di epitelio interessato.

Sulla base del sequenziamento del DNA sono stati finora identificati oltre 130 tipi di HPV, mentre sono in attesa di tipizzazione circa 300 nuovi genotipi candidati. Gli HPV sono distinti in tipi cutanei, che infettano principalmente mani e piedi, e tipi mucosali, che hanno come target la mucosa del cavo orale, delle alte vie aeree e digerenti, del distretto ano-genitale, dell'uretra e della congiuntiva.

Sulla base del comportamento biologico delle lesioni indotte dal virus, essi sono stati inoltre suddivisi in tre gruppi:

- HPV ad alto rischio oncologico come i genotipi 16, 18, 45, 56, 59, 66, 67, 68, 70, 73, 82, associati a lesioni potenzialmente maligne (per esempio CSC ano-genitale e del distretto testa/collo).
- HPV a rischio oncologico intermedio come i genotipi 31, 33, 35, 39, 51, 52, 53, 58.
- HPV a basso rischio oncologico come i genotipi cutanei 2, 4, 27, e i genotipi mucosi 6, 11, 13, 32, 42 più comunemente associati a malattie benigne (per esempio verruche volgari, condilomi e papillomi).

L'HPV ha la capacità di integrare il proprio DNA in quello della cellula neoplastica, mentre nelle cellule normali o precancerose rimane in forma episomica. Nelle cellule maligne l'HPV sintetizza le proteine E6 ed E7 le cui capacità trasformanti si esercitano inibendo o attivando vari oncogeni o proteine che regolano la proliferazione cellulare (pRb e p53).

La mucosa orale è suscettibile all'infezione da parte di vari tipi di HPV (tra i più comuni i genotipi 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 32 e 57). Questi virus sono stati isolati da lesioni sia benigne sia maligne.

Recentemente i carcinomi orali localizzati a livello orofaringeo e tonsillare sono stati associati in gran parte all'HPV 16.

2.1 Struttura

Il virione di HPV è privo di involucro pericapsidico ed ha simmetria icosaedrica. Il capside è costituito da 72 capsomeri (12 pentameri e 60 esameri) organizzate simmetricamente in 20 facce tali da conferire al virione, al microscopio elettronico, l'aspetto caratteristico di una pallina da golf con un diametro di circa 55 nm.

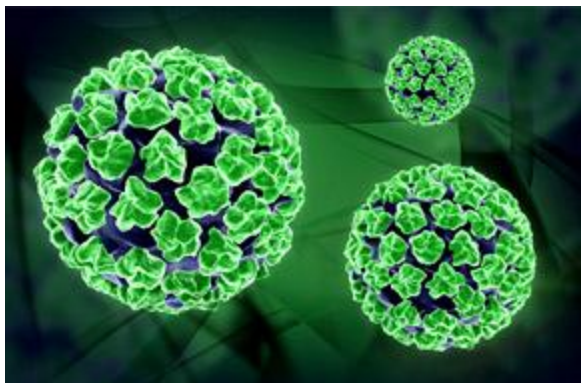


Figura 1,2

Ricostruzione tridimensionale della struttura dell' HPV

Il capside è costituito da due proteine che sono codificate nella regione tardiva del genoma:

- Proteina L1, o proteina maggiore, comune a tutte le varianti di Papilloma virus Umano: costituisce l'80% delle proteine del virus. Si ritiene possibile che la maggior parte degli anticorpi sia prodotta proprio contro questa proteina.
- Proteina minore o L2: completa il restante 20%. Non è costante nelle varie forme di Papilloma Virus Umano.

Il capside racchiude il genoma virale, una singola molecola di DNA circolare covalentemente chiusa, di circa 7900 paia di basi. Questo DNA virale è associato a proteine istoniche (di origine cellulare) a formare un complesso simile alla cromatina. Nel genoma di alcuni HPV genitali sono state identificate delle regioni di attacco alle proteine istoniche, le cossi dette scaffold attachment regions (SARs) o matrix attachment regions (MARs), molto simili a quelle presenti nel DNA eucariotico.

Tutti gli HPV hanno una simile organizzazione genetica. I 9 o 10 geni sono suddivisi in precoci (E –early) o tardivi (L – late). Quelli precoci vengono trascritti efficientemente nelle fasi non produttive delle infezioni e codificano proteine funzionali, necessarie alla replicazione del DNA e, in alcuni casi, importanti nella trasformazione cellulare. I geni tardivi (L1-L2) sono espressi soprattutto nelle fasi produttive delle infezioni. Nel genoma è inoltre presente una regione non codificante di circa 1kb denominata long control region (LCR) o upstream regulatory region (URR) che contiene l'origine di replicazione e molti elementi di controllo della trascrizione e della replicazione.

I promotori sono per la maggior parte localizzati nella regione precoce e in quella non codificante e sono responsabili dell'espressione dei geni che codificano per i fattori coinvolti nella replicazione, nel controllo della trascrizione e nella trasformazione cellulare. Inoltre, è presente un major late promoter, localizzato nella LCR, che controlla l'espressione dei geni tardivi e del gene E4. Infine nella regione LCR è presente una regione enhancer che interagisce sia con prodotti genici virali, che con fattori cellulari.

I diversi tipi di HPV vengono definiti in base all'analisi della sequenza nucleotidica. Un nuovo tipo di papilloma virus deve presentare una divergenza maggiore del 10% rispetto alle sequenze delle regioni E6, E7 e L1 di tutti i tipi già noti. Differenze minori definiscono i sottotipi. Si tratta, in questo caso, di una tipizzazione genetica, certamente molto più accurata sia della tipizzazione antigenica sia delle diverse tipizzazioni biologiche che vengono ancora utilizzate per altri agenti infettanti. È auspicabile che tutti i microrganismi vengano tipizzati in base ai dati di sequenza in modo tale da poter fornire così una maggiore oggettività alle nostre classificazioni e conoscenze.

2.2 Ciclo vitale ed espressione genica:

I papilloma virus sono in grado di infettare principalmente le cellule epiteliali. HPV può trascrivere solo nelle cellule in replicazione, in quanto non codifica per una sua DNA polimerasi ed utilizza quella dell'ospite, che viene sintetizzata nelle cellule in attiva divisione; infatti le cellule bersaglio del virus sono la cute e le mucose, due tessuti che si rigenerano in continuazione. Quindi il ciclo vitale produttivo dei Papilloma virus è strettamente connesso al

programma di differenziamento della cellula epiteliale ospite infettata. Ogni strato dell'epidermide rappresenta una fase differente del programma di differenziamento terminale del cheratinocita, e ad ogni stadio di questo programma troviamo una precisa fase del ciclo vitale del virus. La progressione dell'infezione virale è quindi, funzione del programma di differenziamento delle cellule epiteliali squamose. La cute è formata da vari strati.

Lo strato più esterno, chiamato epitelio stratificato squamoso (o epidermide), è composto da 4 strati morfologicamente distinti: germinativo, spinoso, granulare e corneo.

Per stabilire con successo un'infezione persistente, il virus deve raggiungere, attraverso piccole ferite o abrasioni superficiali della mucosa dell'ospite, le cellule dello strato epiteliale basale. Questo tipo di cellule sono caratterizzate da una spiccata attività proliferativa e sono quindi, in grado di permettere la persistenza del virus.

L'HPV penetra all'interno della cellula ospite dove permane in fase latente, oppure può andare incontro a replicazione attiva portando alla sintesi di virus infettivi. Il periodo di incubazione varia da pochi mesi ad oltre 2 anni. Comunque, molti individui possono rimanere per tutta la vita portatori sani del virus senza produrre mai lesioni cliniche apparenti. L'infezione viene identificata quando si riscontra il DNA del virus nello strato basale dell'epidermide, anche se, in tale stadio, non è patologicamente manifesta.

L'infezione produttiva si manifesta attraverso due stadi: precoce e tardivo. Lo stadio precoce segue l'internalizzazione del virus e la produzione dei fattori che sono indispensabili per la replicazione del genoma. Durante questo stadio, che avviene a livello basale dell'epitelio, si realizza la replicazione plasmidica del genoma virale con l'espressione di solo alcuni geni precoci. Durante lo stadio tardivo continua la replicazione del genoma, avviene l'espressione dei geni strutturali e l'assemblaggio delle particelle virali; tale stadio tardivo si verifica soltanto negli strati granuloso (soprattutto) e corneo dell'epitelio. Il fatto che il virione maturo sia prodotto soltanto negli strati superficiali dell'epitelio sembra dipendere dalla presenza di fattori trascrizionali cellulari che agiscono unitamente alla proteina E2 sui promotori della regione tardiva.

L'internalizzazione della particella virale avviene tramite un meccanismo di endocitosi. Il capsid virale viene disassemblato a livello del citoplasma e il genoma virale è indirizzato al nucleo cellulare. In questa sede, fattori trascrizionali di origine cellulare attivano una prima fase di trascrizione. Le proteine sintetizzate ritornano al nucleo (con la sola eccezione di E5

che resta a livello citoplasmatico); tra queste proteine, E1 e E2 svolgono un ruolo molto importante nella replicazione del genoma virale.

La transizione dall'infezione virale latente alla fase vegetativa è correlata al processo di differenziamento che le cellule epiteliali subiscono durante la migrazione verso gli strati cellulari più superficiali. Dopo l'iniziale fase proliferativa, i cheratinociti basali entrano nella fase post-mitotica del loro ciclo, iniziano a differenziare e migrare verso lo strato spinoso e granulare e assumono una forma non vitale nello strato corneo. La differenziazione squamosa è un processo che porta ad un cambiamento, finemente regolato e coordinato, dell'espressione genica che include l'induzione di alcuni geni, quali quelli delle cheratine, e la repressione di altri, ad esempio i geni legati alla progressione del ciclo cellulare.

Per assicurare la replicazione e il completamento del ciclo virale anche in queste cellule, gli HPV hanno elaborato un sistema per disaccoppiare la proliferazione dal differenziamento cellulare. La replicazione del DNA degli HPV avviene attraverso due diversi meccanismi che dipendono dallo stato di differenziamento della cellula ospite:

- 1) Replicazione plasmidica;
- 2) Replicazione vegetativa;

Il primo si verifica nelle cellule proliferanti dello strato basale dell'epitelio, in queste cellule il DNA virale viene mantenuto stabilmente in forma episomale a copie multiple e si replica contemporaneamente al DNA cellulare (una volta per ciclo cellulare), venendo così trasmesso alle cellule figlie ad ogni divisione cellulare. In questa fase vengono espressi solamente i geni precoci del virus (E1- E2 - E3 - E4 - E5 - E6 - E7).

A causa delle dimensioni ridotte del loro genoma, questi virus non possono codificare la maggior parte degli enzimi necessari per la replicazione del loro DNA e di conseguenza utilizzano strutture e componenti cellulari dell'ospite. Questo tipo di replicazione assicura l'instaurarsi di un'infezione del virus persistente nelle cellule basali dell'epidermide.

La replicazione vegetativa del virus, invece, avviene nelle cellule degli strati superiori dell'epitelio (strato granuloso). Queste cellule si trovano ad uno stadio di differenziamento avanzato e non si ha più la sintesi del DNA cellulare. Paradossalmente, si osserva ugualmente un'intensa replicazione del DNA virale, cioè si formano i DNA che verranno poi racchiusi nei capsidi della progenie virale, l'attivazione dell'espressione dei geni virali tardivi, la sintesi di proteine capsidiche e l'assemblaggio dei virioni.

La formazione della progenie virale completa è presente solo nello strato più esterno dell'epitelio (strato corneo) e i virus assemblati sono espulsi nell'ambiente esterno quando le cellule epiteliali si desquamano.

Di conseguenza il virus è trasmesso principalmente attraverso contatto diretto. Il ciclo biologico degli HPV ad alto e basso rischio differisce in modo significativo. L'infezione e la conseguente lesione provocata da parte di questi due tipi di HPV dipende dal comportamento del genoma virale all'interno della cellula infettata. Il genoma di HPV può esistere in due stati differenti: come episoma o integrato nel genoma dell'ospite. La forma episomiale del virus, che è associata con la fase di latenza, caratterizzata da 1-2 copie del genoma virale per cellula o con la fase vegetativa caratterizzata invece da 100-300 copie, è stata osservata nelle lesioni a basso grado o nelle lesioni della neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN).

Il mantenimento del genoma in forma episomiale è una fase critica del ciclo vitale di HPV e dell'infezione persistente. Al contrario, la forma integrata nel genoma ospite, in singola copia o in strutture multicopie ripetute in tandem, è osservata nelle lesioni ad alto grado e nel carcinoma cervicale invasivo. Tale integrazione, riscontrabile solo nel caso di HPV ad alto rischio, determina un'interruzione del ciclo di crescita del virus e implica la distruzione di una parte del genoma virale e alterazioni geniche cellulari.

In particolare, nel genoma virale si ha la perdita della regione genica compresa tra i geni E1 ed E2 con conseguente mancata trascrizione dei geni tardivi codificanti per le proteine strutturali e trascrizione incontrollata dei geni precoci E6 ed E7 che codificano per oncoproteine importanti nella replicazione virale e soprattutto nella capacità di bloccare i processi di apoptosi e trasformazione delle cellule.

Negli HPV ad alto rischio la trascrizione inizia a partire da due promotori virali, uno precoce e uno tardivo. Il promotore precoce si trova a monte dell'ORF per la proteina E6, codifica per le proteine virali precoci ed è espresso prima della replicazione produttiva. In concomitanza con l'induzione della replicazione e della sintesi di nuovi virioni, viene attivato un promotore tardivo che consente l'espressione delle proteine tardive da una serie di siti eterogenei.

Le proteine precoci servono a modificare il metabolismo della cellula infettata e quindi sono quasi tutte espresse nella fase iniziale del ciclo replicativo e sono le uniche espresse nelle cellule basali degli epitelii pluristratificati, mentre le tardive sono le proteine strutturali, che associandosi tra loro formano la struttura icosaedrica del capsido virale. Le proteine E sono essenziali per il mantenimento di elevati livelli di trascrizione del genoma virale e per la

sintesi del suo DNA. La proteina E1 svolge funzione regolatoria, importante nella fase iniziale della replicazione del genoma virale, in collaborazione con E2. Presenta un'attività elicastica ATP dipendente necessaria per il riconoscimento e l'inizio della sintesi del DNA. La proteina E2 è attiva sotto forma di dimeri. Presenta diversi domini di legame al DNA; è inoltre presente una sequenza di legame per l'attivazione di E1. Regola la trascrizione virale a livello di promotori precoci; a bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre a concentrazioni elevate reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, le due principali oncoproteine virali e la sua perdita rappresenta il primo stadio di trasformazione neoplastica: quando il DNA di HPV si integra con il genoma umano si ha la rottura delle sequenze geniche di E2, con soppressione dell'inibizione nei confronti di E6 ed E7.

La funzione degli eventuali prodotti degli ORF E3 ed E8 non è ben nota, comunque, essi sono scarsamente conservati e possono non essere presenti nel genoma di alcuni genotipi di HPV; La proteina E4 nonostante la sua inclusione tra le proteine early è espressa nelle fasi tardive dell'infezione e riveste un ruolo nel processo di maturazione e proliferazione virale. Si ritrova nelle cellule infette solo quando il processo di differenziazione è già avanzato ed in coincidenza con gli eventi tardivi del ciclo di replicazione virale. Essa è generalmente associata allo scheletro di cheratina delle cellule epiteliali e nelle cellule infette provoca un collasso del network dei filamenti di cheratina provocando la deformazione delle cellule infettate (coilocitosi).

E' stato ipotizzato che la sua funzione sia anche quella di cooperare alla fuoriuscita dei virioni neoformati dalla cellula infetta. La proteina E5 possiede una porzione N- terminale altamente idrofobica con la quale si inserisce nella membrana della cellula infetta e blocca l'esposizione dei complessi di istocompatibilità di tipo I e II, evitando la risposta cellulare T mediata.

La proteina E5 inibisce inoltre l'apoptosi e altera i segnali promossi dal legame di EGF e di PDGF con i rispettivi recettori; in particolare dimeri di E5, inserendosi nella membrana cellulare in prossimità dei recettori per il PDGF ne provoca l'attivazione, indipendentemente dalla presenza del ligando specifico, provocando così l'innescamento di segnali di moltiplicazione cellulare.^[2] La proteina E6 ha un'azione simile a quella di altre oncoproteine prodotte da deossiribovirus oncogeni. Si lega a p53 formando un complesso inattivo e rimuovendo il blocco G1 del ciclo cellulare, interferendo con la riparazione del DNA e con l'innescamento dell'apoptosi. La proteina E7 si lega alla proteina del gene oncosoppressore RB

(retinoblastoma), inattivandolo ed impedendone la funzione fisiologica di regolatore negativo della trascrizione e di blocco del ciclo cellulare. L'ORF L1 codifica per la proteina capsidica virale maggiore che è altamente conservata nei diversi HPV. È responsabile dell'attacco del virus alle cellule suscettibili ed inoltre media la risposta umorale e cellulo-mediata all'infezione. L'ORF L2 codifica per la proteina capsidica minore che è meno conservata nei diversi HPV. La sua funzione non è chiara ma sembra che l'espressione della L2 insieme all'L1 aumenti l'efficienza di assemblaggio del capsido. La trascrizione delle ORF L1 ed L2 avviene nel momento dell'assemblaggio dei virioni completi.

2.3 Patogenesi

L'infezione richiede cellule epiteliali proliferanti, situate nello strato basale dell'epidermide e delle mucose. Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di una progenie virale matura è tipica delle infezioni da HPV a basso o medio rischio, in cui il genoma virale permane in forma episomale. Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte da HPV ad alto rischio, quali HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare, con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa.

Tale integrazione è determinante nei meccanismi di trasformazione ed apoptosi cellulare, poiché si verifica a livello della ORF E2, con conseguente perdita dell'azione repressiva di E2 sulle oncoproteine virali E6 e E7, che svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di cancerogenesi. Pertanto nelle cellule dei tumori indotti da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 e E7 sono integrati e funzionali, con conseguente stimolo alla proliferazione cellulare, mentre i geni E2, E4 e E5 vengono persi o non trascritti.²⁰

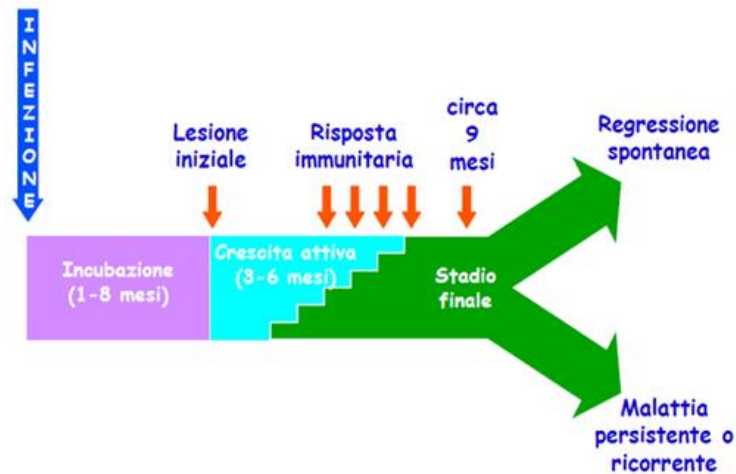


Figura 3

Infezione da HPV: dalla diagnosi precoce alla prevenzione primaria” Istituto Superiore di Sanità,
Roma 27 giugno 2012

Vie di trasmissione:

1) Orizzontale:

a. Sessuale: si verifica a livello cervicale, vulvare, vaginale, perianale. Occasionalmente, le infezioni ano-genitali sono trasmesse digitalmente da un sito dell’epitelio all’altro. Il rischio di contrarre una infezione da HPV aumenta con il numero dei partner sessuali, ed è massimo tra i giovani adulti (20-35 anni). Il virus è più frequentemente trovato tra le popolazione promiscue e in condizioni precarie di igiene. L'uso del profilattico non pare avere azione protettiva completa.

b. Non Sessuale: indumenti contaminati, strumentario medico.

2) Verticale: durante il passaggio nel canale del parto.

La storia naturale dell’infezione genitale da HPV è fortemente condizionata dall’equilibrio che si instaura fra ospite ed agente infettante. Nella maggior parte dei casi, infatti, il virus viene eliminato dalla risposta immunitaria dell’ospite prima di sviluppare un effetto patogeno; in altri casi può restare latente o andare incontro a replicazione provocando una lesione a livello

genitale che, se non regredisce spontaneamente, può manifestarsi attraverso diverse forme cliniche.

Circa l'80% delle infezioni sono transitorie asintomatiche e guariscono spontaneamente grazie alla risposta immunitaria cellulo - mediata; il periodo medio di regressione di un'infezione da HPV è tra i 6 e i 18 mesi.

La persistenza dell'infezione è invece la condizione necessaria per l'evoluzione verso il carcinoma; i genotipi di HPV ad alto rischio hanno una maggiore probabilità di infezione persistente.

L'età è un altro fattore importante: la probabilità di infezione persistente aumenta dopo i 35 anni. Il periodo che intercorre fra l'infezione e l'apparizione dei primi segni clinici varia da 1-10 anni.

L'infezione genitale da HPV è quindi una delle più diffuse infezioni sessualmente trasmesse nella popolazione mondiale: negli Stati Uniti è stato stimato che la prevalenza dell'infezione nelle donne di età compresa nel range 19-54 anni sia pari al 40% circa e risulta fortemente associata ai fattori di rischio legati al comportamento sessuale; in Europa la prevalenza dell'infezione cervicale da HPV ad alto rischio oncogeno è del 3-15% nelle donne di età compresa tra 20 e 60 anni, ma significativamente più elevata (29-45%) nelle giovani donne, al punto che ormai gli epidemiologi hanno ormai definito endemica l'infezione da HPV.

L'aspetto più importante, come già anticipato, è dato dal fatto che sempre più si riscontri la presenza del virus HPV 16 nelle cellule epiteliali delle cripte tonsillari e della base linguale associato alla presenza di un carcinoma squamo cellulare. Nella cavità orale propriamente detta (per esempio sedi anatomiche poste al davanti dei pilastri palatini anteriori) il rischio di infezione da HPV nei ca orali sarebbe invece inferiore, pur essendo quasi quadruplicato rispetto ai pazienti con mucosa sana. Si deduce pertanto come la conoscenza della storia naturale dell'infezione da HPV, oltre a rappresentare un'enorme sfida per i responsabili della salute pubblica, costituisce un presupposto indispensabile nella formazione del medico e dell'odontoiatra.

La storia naturale da infezione da HPV nella cavità orale e nell'orofaringe non è del tutto chiarita, sebbene vi siano alcune caratteristiche simili rispetto a quella delle cervice uterina.

Le osservazioni riguardanti le similitudini istologiche tra distretto cervico/vaginale e orofaringeo, entrambi rivestiti da epitelio squamoso non o lievemente cheratinizzato e con un processo di maturazione sovrapponibile, e alla capacità del virus di bloccare i processi di

apoptosi i cheratinociti orali umani in vitro hanno permesso di mutuare al distretto orale il concetto di oncogenicità HPV- indotta accertato in ambito ginecologico.

Anche a livello delle mucose orali il virus è stato riscontrato sia in condizioni di tessuti completamente sani sia in presenza di lesioni di vario grado.

I tumori della testa e del collo HPV positivi si presentano in giovane età e sono spesso correlati alle abitudini sessuali (numero di partner e sesso orale). Tra gli organi del distretto cervico-facciale, l'orofaringe è la parte del corpo maggiormente colpita da tumori HPV positivi.

Diversi studi hanno dimostrato che questi tumori HPV correlati sono più curabili rispetto alle forme causate dall'elevato consumo di alcool e fumo. Per questo motivo il test di valutazione dell'HPV sta entrando nella routine diagnostica con sempre maggior frequenza come valido strumento prognostico.

3. LESIONI EXTRA ORALI CAUSATE DA HPV

Si stima che fino al 70-80% dei soggetti sessualmente attivi si infetti nel corso della vita con un virus HPV e tra questi fino al 50% si infetti con un tipo oncogeno. La stragrande maggioranza di questi soggetti riesce a debellare il processo infettivo in tempi brevi, senza subire alcun danno; si stima, in particolare, che nell'80-90% dei casi il sistema immunitario umano sconfigga naturalmente l'infezione entro 2-3 anni: l'infezione è quindi transitoria, asintomatica e guarisce spontaneamente (più facilmente nelle infezioni a basso rischio oncogeno, 90% c.a. dei casi, rispetto a quelle ad alto rischio oncogeno, 70% c.a. dei casi).^[7]

Come detto in precedenza il Papilloma Virus può causare lesioni di diverso tipo, più o meno gravi.

Dal punto di vista cutaneo e delle mucose; le lesioni principali che possono interessare altri distretti oltre a quello testa-collo vi sono:

verruche comuni, verruche plantari, carcinomi cutanei, condilomi piani, papulosi bowenoide, carcinoma della cervice uterina, cancro vulvare, carcinoma anale, papillomatosi respiratoria ricorrente (rrp), cancro laringeo, papilloma congiuntivale, tumore del pene

4.LESIONI DEL CAVO ORALE CAUSATE DA HPV

Le mucose del cavo orale sono anch'esse un luogo altamente esposto all'infezione da HPV ove possono causare lesioni benigne quali ad esempio i condilomi, o lesioni maligne quale il carcinoma squamo cellulare. Importante ricordare che non basta la sola presenza del virus affinché si generi una qualsivoglia lesione: il virus è un fattore predisponente necessario ma non sufficiente per la patogenesi della patologia stessa.

Le lesioni del cavo orali generate da HPV sono: i condilomi acuminati, papilloma squamoso, la verruca volgare, l'iperplasia epitelio focale (malattia di Heck) e il carcinoma squamocellulare.

4.1 Condilomi Acuminati



Figura 4

condilomi acuminati a livello della mucosa orale

I condilomi acuminati del cavo orale sono le lesioni a trasmissione sessuale più frequenti. Il tempo d'incubazione dopo un rapporto sessuale è di circa 3-4 mesi; possono essere ritrovate su tutte le mucose della bocca, in forme singole o multiple con un aspetto di piccole escrescenze sessili con superficie liscia e appuntita.

Gli HPV di tipo 2, 6, 11, 16, 18 e 32 sono la causa principale di queste lesioni.

I condilomi rappresentano circa il 20% di tutte le malattie trasmesse sessualmente e si osservano in regione ano-genitale e perianale o solo sui genitali, sia nella popolazione omosessuale che eterosessuale, specie se vi sono delle condizioni di promiscuità.

Forme disseminate di condilomatosi, sia della mucosa ano genitale che orale, si osservano specie nei pazienti HIV +. La condilomatosi della regione ano genitale in bambini piccoli può essere indice di abuso sessuale.

I condilomi hanno una spiccata tendenza all'auto disseminazione.

Il Papilloma virus che provoca i condilomi, però, è benigno, così come benigne sono queste lesioni.

Si presentano come delle escrescenze di color rosato o brunoastro, irregolari e frastagliate, che possono essere poche o numerose e provocare prurito (anche se questo sintomo non è sempre

presente). Più raramente queste lesioni appaiono piatte (condilomi piani) piuttosto che rilevate. Se il contagio avviene in gravidanza i condilomi tendono a moltiplicarsi, e dal momento che durante il parto la madre potrebbe trasmetterli al bambino, sarebbe meglio curarli prima.

A complicare ulteriormente il problema dei condilomi acuminati contribuiscono le difficoltà terapeutiche, spesso inefficaci nell'impedire la comparsa di recidive.

Dal momento che la malattia è particolarmente contagiosa, è essenziale la prevenzione igienica; trattandosi di una malattia a trasmissione sessuale, esiste una correlazione diretta tra il numero di partner sessuali e la frequenza di condilomi genitali.

La diagnosi presunta è formulata in base alla morfologia clinica e l'anamnesi.

Al microscopio ottico i papillomi presentano creste epiteliali ricoperte da epitelio squamoso stratificato con presenza di acantosi, iperpara/ortocheratosi, cellule balloniformi con nucleo picnotico e citoplasma chiaro (coilociti) e cellule infiammatorie nello stroma della tonaca sottomucosa.

In genere, alla terapia farmacologica (basata sulla somministrazione di interferone, podofillina, acido tricloroacetico o 5-fluoro-uracile), si preferisce quella chirurgica. La laserterapia, da eseguirsi in anestesia locale o generale nei casi più gravi, determina lisi cellulare e morte dei virus ivi contenuti. Il fascio laser può essere indirizzato con estrema precisione sui condilomi, minimizzando l'estensione delle cicatrici post-trattamento. Lo stesso risultato può essere raggiunto attraverso l'elettrocoagulazione, mentre in altri casi si preferisce l'escissione chirurgica. Per quanto riguarda il trattamento farmacologico, l'applicazione locale di preparati a base di podofillina determina lo sbiancamento della lesione e la seguente caduta nel giro di pochi giorni; si tratta comunque di un'operazione di competenza medica (importante è il lavaggio qualche ora dopo della sede di applicazione), assolutamente da evitarsi in gravidanza, così come su lesioni sanguinanti o superiori ai due cm; l'acido tricloroacetico garantisce lo stesso risultato con minori controindicazioni e tossicità.

Considerato l'importante rischio di recidive, il paziente viene seguito anche dopo l'asportazione dei condilomi, mediante un'adeguata sorveglianza delle sue condizioni nei mesi a venire. Il tutto deve essere integrato con l'utilizzo rigoroso del preservativo durante tutta la durata della terapia e con il controllo e l'eventuale trattamento del o dei partner sessuali (anche se non presentano condilomi visibili ad occhio nudo).

4.2 Papilloma Squamoso



Figura 5

Papilloma squamoso del cavo orale causato da HPV

È la lesione più frequente e si presenta come una papula esofitica pedunculata, isolata, di colorito bianco o roseo e con piccole proiezioni digitiformi sulla superficie (aspetto a cavolfiore); le dimensioni possono variare da alcuni millimetri a 1-2 centimetri.

L'esame microscopico mostra propaggini multiple con uno stroma fibrovascolare rivestito da un epitelio squamoso cheratinizzato.

Si riscontra con più frequenza dalla terza alla sesta decade di vita in entrambi i sessi. Nei papillomi squamosi si rintraccia più frequentemente i tipi HPV 6 e 11 ma è possibile ritrovare anche il 13, 16 e 32, solitamente predilige la lingua, il palato, i tuberi e i trigoni retro-molari.

La diagnosi differenziale con altre lesioni simili è difficile, per cui è sempre consigliata l'escissione chirurgica con cauterizzazione elettrica o laser.

4.3 Verruca Volgare



Figura 6

verruca volgare a livello del labbro

La verruca volgare non è molto frequente nel cavo orale, la ritroviamo principalmente nei bambini sul vermiglio delle labbra o sulla lingua. Spesso è data da un autoinoculazione del virus proveniente da lesioni alla cute delle mani. Queste lesioni sono attribuite ai tipi 2,4 e 40. Il contagio può avvenire per contatto diretto e indiretto ma generalmente si verifica per autoinoculazione del virus proveniente da lesioni alla cute delle mani (spesso mordendo le lesioni localizzate sulle mani).

La verruca volgare si manifesta come papule rosee - biancastre delle dimensioni di 1-10 mm, di consistenza dura, isolate o in numero limitato tendenti a formare placche.

In ambito orale la ritroviamo principalmente nei bambini localizzata sul vermiglio delle labbra e sulla lingua.

L'aspetto istologico delle verruche è comune e presenta ipercheratosi, acantosi, cheratinociti vacuolizzati (coilociti) nello strato granuloso e spinoso, iperplasia delle papille dermiche.

L'obiettivo del trattamento mira alla cauterizzazione o la rimozione della cute infettata dal virus. Pertanto, teoricamente, l'asportazione chirurgica, il laser o l'intervento con azoto liquido sono ugualmente efficaci.

4.4 Iperplasia Epiteliale Focale – Malattia Di HECK

Malattia infettiva della mucosa orale, benigna, multifocale, sostenuta da infezione da Papilloma virus (HPV 13 e 32). Si caratterizza per la presenza di lesioni nodulari rilevate o di placche multiple piane o rilevate, di colorito roseo- biancastro, indolenti, soffici e di dimensioni variabili (1-10 mm) sulla mucosa, sulla lingua, sulle gengive e soprattutto sul versante mucoso del labbro inferiore.



Figura 7

Lesione nodulare da HPV

Si riscontra maggiormente nei bambini, è stata osservata in diversi Paesi del mondo, Italia compresa, ma è più comune nelle popolazioni indigene del Sud America, Alaska e Groenlandia con una prevalenza di 7-36%.

Clinicamente è caratterizzata da lesioni nodulari rilevate o da placche multiple piane o rilevate, di colorito roseo- biancastro, indolenti, soffici e di dimensioni variabili (1 a 10 mm).

La sede è la mucosa orale: le guance, la lingua, le gengive, ma, soprattutto, il versante mucoso del labbro inferiore. La condizione tende a essere asintomatica, con un alto tasso di remissione spontanea.

La diagnosi è istologica con tipiche cellule chiare coilocitiche supportata dalla ibridazione in-situ e dalla PCR (Polymerase Chain Reaction). Diagnosi differenziale con le altre virosi iperplastiche, i fibromi e la malattia di Cowden.

Il trattamento prevede escissione chirurgica essenzialmente per motivi estetici e/o funzionali. Terapie sistemiche con interferone α e β in caso di lesioni multifocali o estese.

4.5 Carcinoma Squamocellulare

Negli ultimi 30 anni, l'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) in collaborazione con la World Health Organization (WHO) ha raccolto e pubblicato le stime inerenti i principali tumori diagnosticati a livello mondiale. I primi dati risalgono al 1975 in cui si riportavano i dati relative ai 12 più comuni tumori fino ad arrivare ad oggi con la valutazione dei dati di almeno 26 tumori diversi e con stime specifiche relative alle diverse aree geografiche per quanto concerne incidenza, mortalità e prevalenza divise per sesso ed età.

I dati ad oggi disponibili risalgono al 2008 e restano ancora un valido riferimento per capire al meglio il quadro a livello mondiale ma anche italiano della situazione inerente in particolare i tumori del distretto testa-collo con particolare riferimento a quelli relativi al cavo orale.^{21,22}

I dati che riportiamo fanno riferimento a:

Incidence data derive from population-based cancer registries: it is the number of new cases occurring, expressed as an absolute number of cases per year or as a rate per 100,000 persons per year.

Mortality statistics are collected and made available by the World Health Organization (WHO) published in World Health Statistics 2010. It is the number of deaths occurring, and the mortality rate is the number of deaths per 100,000 persons per year. Mortality is the product of the incidence and the fatality for a given cancer.

Prevalence describes the number of persons alive at a particular point in time with the disease of interest. it is generally presented as the number of persons still alive after a given number of years following diagnosis.

Age-standardized rates (ASRs) were also calculated; these take into account differences in the age structure of the populations being compared. This is necessary because the incidence and mortality rates for most cancers increase rapidly with age, so that populations containing a high proportion of old people will tend to have a higher overall (crude) rate than one with mainly young people. Because we wish to know the risk irrespective of this incidental (confounding) effect, we compare populations as if they had exactly the same age structure—that of the so called world standard population.

Si è stimato che oltre 12.7 milioni di nuovi casi di tumore sono stati diagnosticati nel 2008 a oltre 7 milioni e mezzo di morti sono da attribuirsi a tale patologia per il medesimo anno. Se il tumore del polmone risulta essere ancora quello che registra il maggior numero di nuovi casi e morti, anche i tumori del distretto testa-collo (labbra, cavo orale, nasofaringe, faringe, esofago, laringe) considerati tutti insieme contano per quasi il 10% dei nuovi casi di tumore e di morti causati da questa patologia!

4.5.1 Incidenza e mortalità a livello mondiale

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	263020	2.1	3.8	127654	1.7	1.9	610656	2.1	12.4
Nasopharynx	84441	0.7	1.2	51609	0.7	0.8	222711	0.8	4.5
Other pharynx	136622	1.1	2.0	95550	1.3	1.4	288038	1.0	5.9
Oesophagus	481645	3.8	7.0	406533	5.4	5.8	482145	1.7	9.8
Larynx	150677	1.2	2.2	81892	1.1	1.2	425697	1.5	8.7
Stomach	988602	7.8	14.0	737419	9.7	10.3	1598440	5.5	32.5
Colorectum	1235108	9.8	17.2	609051	8.1	8.2	3260890	11.3	66.3
Liver	749744	5.9	10.8	695726	9.2	9.9	613213	2.1	12.5
Gallbladder	145203	1.1	2.0	109587	1.4	1.5	168458	0.6	3.4
Pancreas	278684	2.2	3.9	266669	3.5	3.7	172492	0.6	3.5
Lung	1608055	12.7	22.9	1376579	18.2	19.3	1677416	5.8	34.1
Melanoma of skin	199627	1.6	2.8	46372	0.6	0.6	755878	2.6	15.4
Breast	1384155	10.9	38.9	458503	6.1	12.4	5189028	18.0	210.7
Cervix uteri	530232	4.2	15.2	275008	3.6	7.8	1555341	5.4	63.2
Corpus uteri	288387	2.3	8.2	73854	1.0	1.9	1097620	3.8	44.6
Ovary	224747	1.8	6.3	140163	1.9	3.8	549850	1.9	22.3
Prostate	899102	7.1	27.9	258133	3.4	7.4	3200372	11.1	130.4
Testis	52322	0.4	1.5	9874	0.1	0.3	201562	0.7	8.2
Kidney	273518	2.2	4.0	116368	1.5	1.6	744190	2.6	15.1
Bladder	382660	3.0	5.3	150282	2.0	2.0	1172461	4.1	23.9
Brain, nervous system	237913	1.9	3.5	174880	2.3	2.5	317039	1.1	6.4
Thyroid	213179	1.7	3.1	35383	0.5	0.5	862474	3.0	17.5
Hodgkin lymphoma	67919	0.5	1.0	29902	0.4	0.4	196345	0.7	4.0
Non-Hodgkin lymphoma	356431	2.8	5.1	191599	2.5	2.7	772021	2.7	15.7
Multiple myeloma	102826	0.8	1.4	72453	1.0	1.0	210697	0.7	4.3
Leukaemia	350434	2.8	5.0	257161	3.4	3.6	499874	1.7	10.2
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	12662554	100.0	180.8	7564802	100.0	105.6	28803166	100.0	585.8

Tabella 4

Estimated new cancer cases (thousands), ASRs (per 100,000), incidence, mortality and prevalence (5-year) worldwide

World: Both sexes, all ages

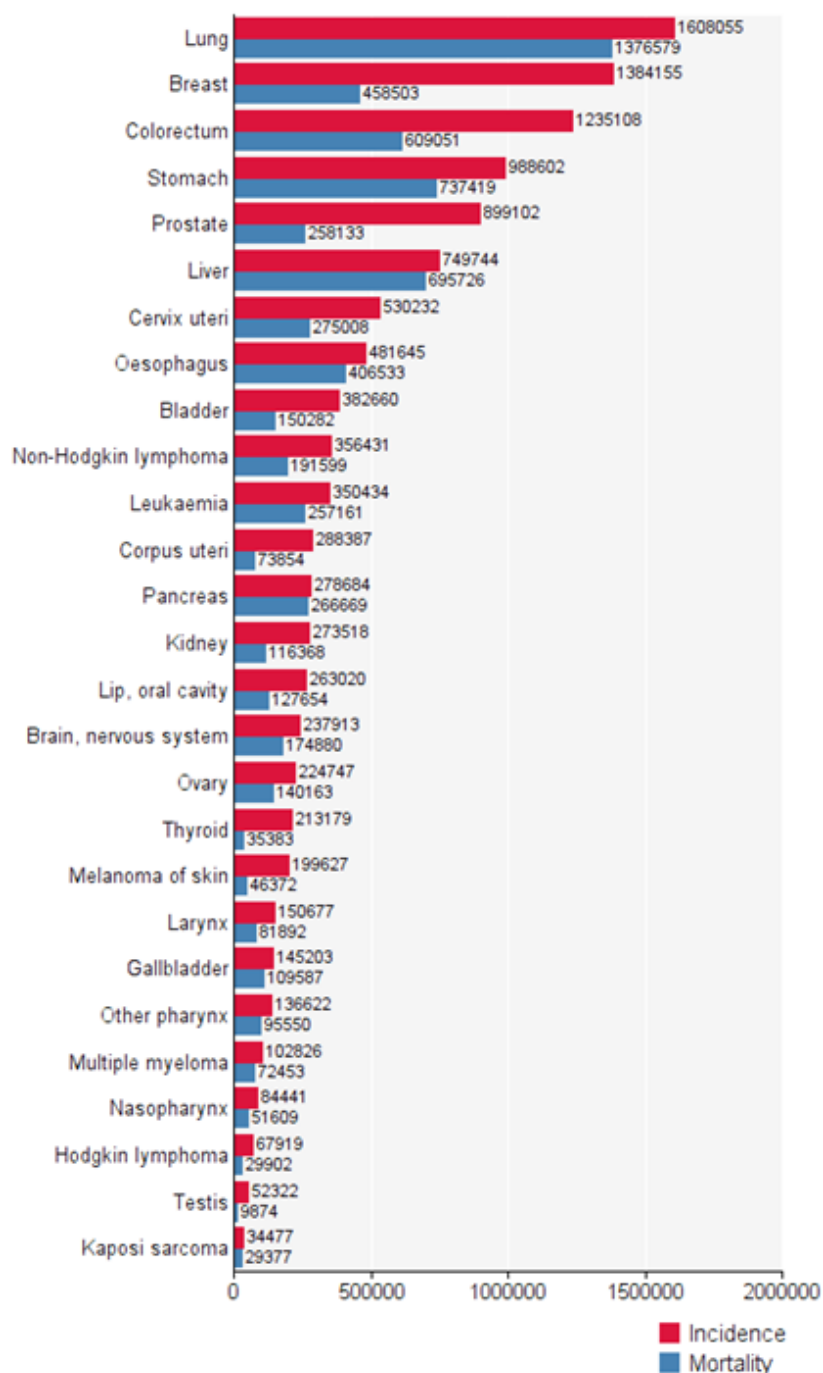


Figura 8
Incidenza e mortalità dei principali tumori nella popolazione mondiale

I dati epidemiologici riportati dalla IARC indicano e sottolineano come anche solo il carcinoma orale sia una patologia tutt'altro che rara. Infatti è, per incidenza, tra tutti i tumori maligni, tra i primi 15 tumori con il più alto numero di nuovi casi per anno a livello mondiale.

Per avere un'idea della gravità della patologia basti pensare che nel mondo ne muoiono 350 persone al giorno,14 ogni ora. Anche solo livello nazionale italiano si stima una media superiore ai 4 decessi al giorno.

Un aspetto particolarmente rilevante è dato dal fatto che negli ultimi anni è stato registrato un trend in continuo aumento nella sua incidenza, un abbassamento della età media di insorgenza ed un maggior interessamento della popolazione femminile.^{23,24}

A livello mondiale i dati riportano importanti differenze considerando le nazioni in base al loro stato di industrializzazione. In tal senso da notare come il tumore della cervice (causato da HPV) si trovi al secondo posto tra i più diffusi nei paesi in via di sviluppo(453000 casi) ma, per fortuna, sia solo al decimo posto nei paesi industrializzati (76000 casi). Questo a dimostrazione di come siano fondamentali i programmi di prevenzione attuati dalle nazioni più sviluppate.

Le stesse considerazioni possono essere fatte anche per quanto riguarda il ca orale. Infatti, è importante sottolineare come nelle nazioni meno sviluppate vi sia un numero estremamente superiore sia per numero di nuovi casi sia per numero di morti in entrambi i sessi. In particolare se per gli uomini si ha un'incidenza di circa 63.000 nuovi casi nei paesi più sviluppati a fronte di circa 110.000 in quelli meno sviluppati. Il dato è ancor più importante considerando i soggetti di sesso femminile: da quasi 28.500 nuovi casi a oltre 64.000.

Anche il numero di morti dovute a ca orale è più che raddoppiato. Da un totale di 30.689 casi nelle regioni più sviluppate fino ad oltre il triplo (96.965) in quelli meno sviluppati.

Anche in questo caso un'attenzione maggiore e la possibilità di accedere più facilmente ai servizi sanitari pubblici e privati fa diminuire notevolmente il rischio di diagnosi tardive e trattamenti inappropriati.

More developed regions

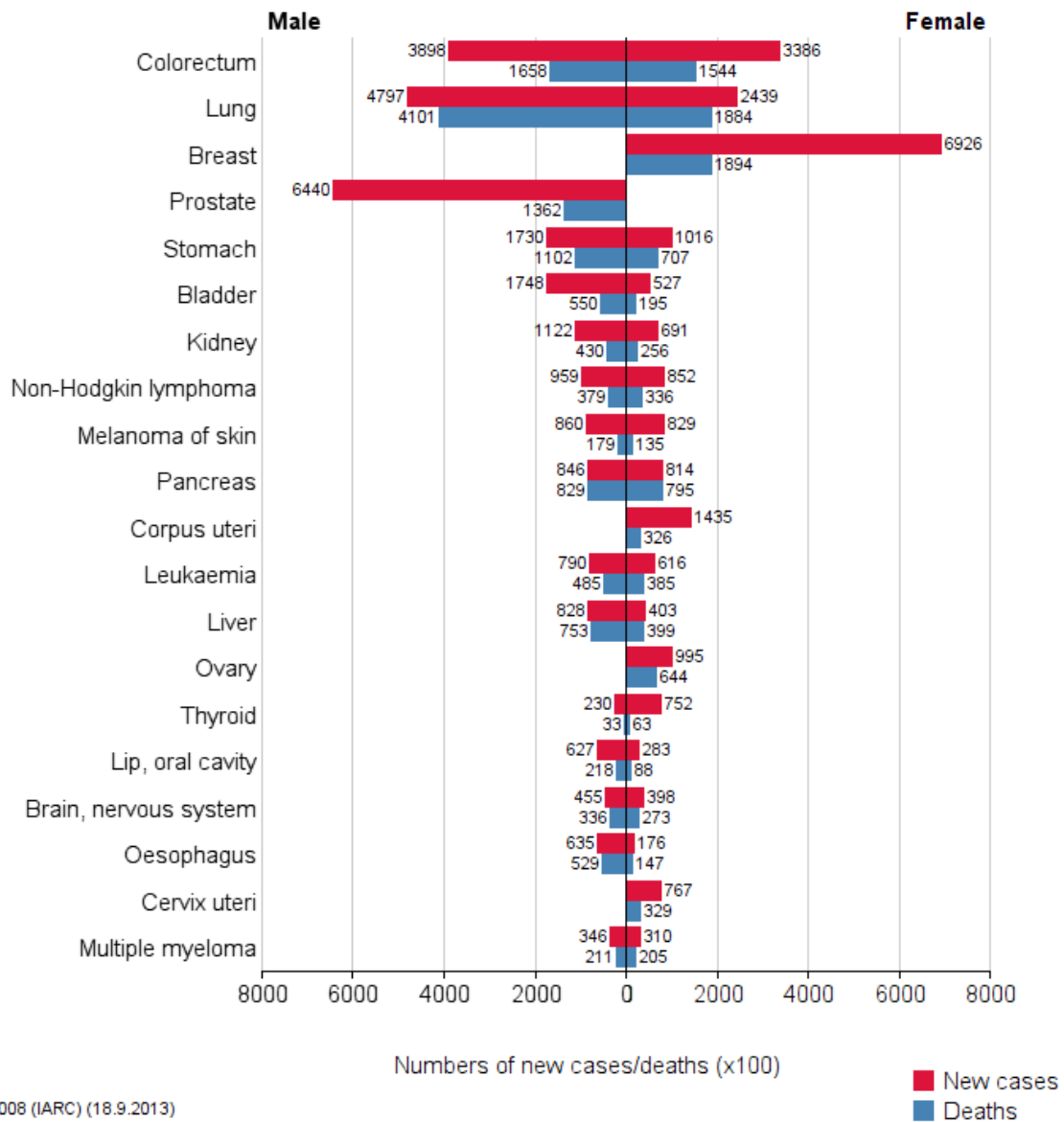


Figura 9

Nuovi casi e morti causate dai principali tumori a livello della popolazione mondiale nelle regioni più sviluppate

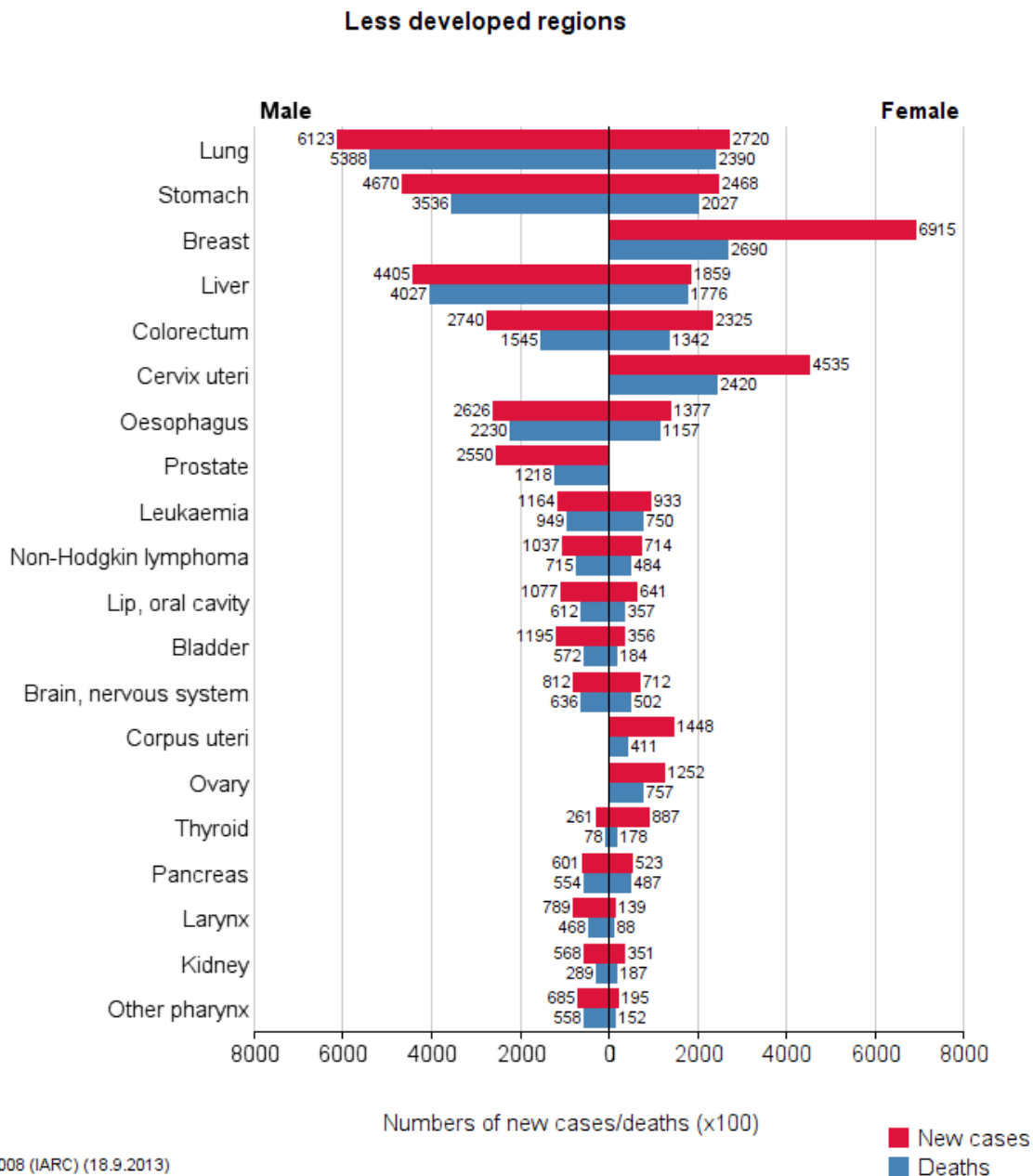


Figura 10

Nuovi casi e morti causate dai principali tumori a livello della popolazione mondiale nelle regioni meno sviluppate

4.5.2 Incidenza, mortalità e sopravvivenza a livello europeo e italiano

A livello europeo sono stati registrati 56934 nuovi casi nel corso dell'anno censito con una diffusione principale a livello delle nazioni centro-orientali. Questa differente distribuzione è da spiegarsi con la probabile associazione a specifici fattori di rischio quali l'uso di tabacco ed alcol che sono maggiormente consumati in quelle regione dell'Europa rispetto alla zona sud-occidentale.

L'incidenza del carcinoma orale presenta cospicue oscillazioni ne vari paesi:1-6% in occidente (crude rate media di 6,4-8,5).

L'Italia si pone in media con il resto dei paesi europei con una crude rate di 7,5 a fronte di 4450 nuovi casi annui. In particolare il numero di nuovi soggetti con ca orale mostra una forte prevalenza negli uomini con numero di nuovi casi che supera il doppio rispetto a quelli diagnosticati nelle donne: 1494 women and 2956 negli uomini. Confermato anche il dato relativo all'incidenza con valori doppi negli uomini (10,2) rispetto alle donne (4,9).

Lip, oral cavity - Estimated incidence, all ages: both sexes			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Europe	56934	7.8	4.6
Southern Europe	13014	8.5	4.8
Western Europe	15272	8.1	4.6
Central and Eastern Europe	22359	7.6	4.8
Northern Europe	6289	6.4	3.8
Russian Federation	10480	7.4	4.8
Germany	6168	7.5	4.0
France (metropolitan)	5841	9.4	5.7
Spain	5167	11.6	6.7
Italy	4450	7.5	4.0
United Kingdom	3708	6.1	3.6
Ukraine	3578	7.8	4.7

Lip, oral cavity - Estimated incidence, all ages: female			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Russian Federation	2764	3.6	2.0
France (metropolitan)	2026	6.4	3.4
Germany	2023	4.8	2.2
Italy	1494	4.9	2.3
United Kingdom	1415	4.5	2.4

Lip, oral cavity - Estimated incidence, all ages: male			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Russian Federation	7716	11.8	9.1
Germany	4145	10.3	5.8
Spain	3825	17.4	11.0
France (metropolitan)	3815	12.7	8.2
Italy	2956	10.2	6.0

Tabella 5

Incidenza del tumore del cavo orale diviso per sesso a livello degli stati europeo

Nella maggioranza dei paesi europei, la mortalità per tumore del cavo orale negli uomini ha avuto un sensibile aumento fra gli anni '50 e la fine degli anni '80. L'aumento del tasso di mortalità è stato di 4 volte in Germania ed in Ungheria e più di due volte in Polonia, Romania e Spagna.

A livello Europeo il maggior numero di decessi dovuti a ca orale si registra in Russia (5170) e Germania (2109).

Considerando però la crude rate e il rapporto con il numero di abitanti, è in Ungheria dove ad oggi si registra il valore più elevato di decessi (772, crude rate 7,7) e la Slovakia (275, crude rate 5,1).

Il numero di decessi in Italia è pari a 1692 casi nel solo 2008 e si attesta come il quarto paese nell'area europea per quantità di morti all'anno a fronte di una crude rate però piuttosto bassa stimata in 2,8.

Si conferma anche a livello italiano un notevole sbilanciamento a favore dei soggetti maschili sia per l'incidenza relativa ai nuovi casi sia per la mortalità.

Da sottolineare comunque come tali distanze si stiano riducendo in Europa e principalmente nell'Europa Centrale ed Orientale.

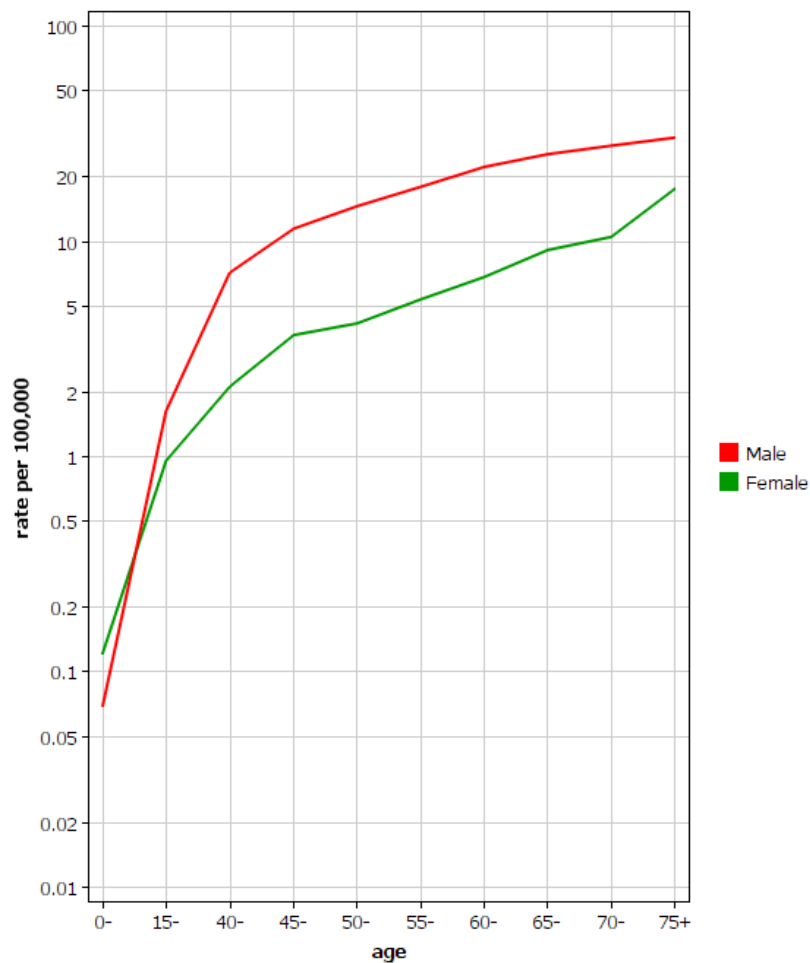


Figura 11

Valutazione dell'incidenza del tumore del cavo orale diviso per sesso e per fasce di età a livello della popolazione italiana

Anche in Italia si conferma un interessamento di soggetti adulti: il tumore si presenta prevalentemente nella quinta, sesta e settima decade di vita, ma la proporzione dei pazienti al di sotto dei 45 anni è in netto aumento.

Lip, oral cavity - Estimated mortality, all ages: both sexes			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Russian Federation	5170	3.7	2.4
Germany	2109	2.6	1.3
Ukraine	2069	4.5	2.8
Italy	1692	2.8	1.3
France (metropolitan)	1500	2.4	1.3
Spain	1234	2.8	1.5
United Kingdom	1227	2.0	1.0
Poland	1150	3.0	1.8
Romania	841	3.9	2.6
Hungary	772	7.7	4.7
Lip, oral cavity - Estimated mortality, all ages: male			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Russian Federation	4080	6.2	4.8
Ukraine	1772	8.4	5.9
Germany	1488	3.7	2.0
Italy	1092	3.8	2.0
France (metropolitan)	1088	3.6	2.2
Spain	904	4.1	2.5
Poland	853	4.6	3.2
United Kingdom	775	2.6	1.5
Romania	753	7.2	5.2
Hungary	621	13.1	8.6
Lip, oral cavity - Estimated mortality, all ages: female			
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)
Russian Federation	1090	1.4	0.7
Germany	621	1.5	0.6
Italy	600	2.0	0.7
United Kingdom	452	1.4	0.6
France (metropolitan)	412	1.3	0.6
Spain	330	1.5	0.6
Poland	297	1.5	0.7
Ukraine	297	1.2	0.6
Hungary	151	2.9	1.5
The Netherlands	110	1.3	0.6

Tabella 6
Stime di mortalità per tumore del cavo orale diviso per sesso a livello europeo

Altro aspetto importante è la valutazione del numero di persone vive dopo che si è evidenziata una diagnosi di ca orale. I dati relativi a questa valutazione sono riportati nella seguente tabella. Si noti come a distanza di 5 anni dalla prima diagnosi la metà circa dei soggetti non sopravvive.

Cancer	Incidence	Prevalence		
		1-year (prop.)	3-year (prop.)	5-year (prop.)
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	338875	247393 (483.6)	637265 (1245.8)	951498 (1860.1)
Bladder	15814	13710 (26.8)	36996 (72.3)	56363 (110.2)
Brain, nervous system	4287	1806 (3.5)	3648 (7.1)	4648 (9.1)
Breast	47514	42733 (161.2)	122978 (463.8)	196070 (739.5)
Cervix uteri	2878	2487 (9.4)	6794 (25.6)	10421 (39.3)
Colorectum	51765	39513 (77.2)	101442 (198.3)	150411 (294.0)
Corpus uteri	6955	6218 (23.5)	17175 (64.8)	26640 (100.5)
Gallbladder	4883	1865 (3.6)	3709 (7.3)	4732 (9.3)
Hodgkin lymphoma	1656	1322 (2.6)	3772 (7.4)	6053 (11.8)
Kidney	8786	6809 (13.3)	18187 (35.6)	27866 (54.5)
Larynx	4334	3801 (7.4)	10348 (20.2)	15815 (30.9)
Leukaemia	8631	5470 (10.7)	13556 (26.5)	19765 (38.6)
Lip, oral cavity	4442	3431 (6.7)	8694 (17.0)	12632 (24.7)
Liver	12171	5750 (11.2)	10984 (21.5)	13457 (26.3)
Lung	36637	17589 (34.4)	34597 (67.6)	43243 (84.5)
Melanoma of skin	8008	6980 (13.6)	20135 (39.4)	32215 (63.0)
Multiple myeloma	5531	4281 (8.4)	10326 (20.2)	14339 (28.0)
Nasopharynx	451	370 (0.7)	946 (1.8)	1369 (2.7)
Non-Hodgkin lymphoma	11873	8479 (16.6)	22225 (43.4)	33635 (65.8)
Oesophagus	2407	1113 (2.2)	2188 (4.3)	2728 (5.3)
Other pharynx	1773	1347 (2.6)	3255 (6.4)	4587 (9.0)
Ovary	5110	3669 (13.8)	8905 (33.6)	12541 (47.3)
Pancreas	10442	2970 (5.8)	5258 (10.3)	6272 (12.3)
Prostate	40050	37793 (153.4)	100725 (408.8)	151024 (613.0)
Stomach	15503	8555 (16.7)	19766 (38.6)	27604 (54.0)
Testis	1819	1466 (6.0)	4386 (17.8)	7320 (29.7)
Thyroid	7420	6489 (12.7)	18875 (36.9)	30809 (60.2)

Tabella 7

Valutazione della prevalenza del tumore del cavo orale a livello italiano con una stima da 1 a 5 anni

Un'ultima importante osservazione è data dalla stima proposta dalla IARC-WHO su quello che si presume essere l'andamento dell'incidenza di ca orale in proiezione nel 2025. Si evidenzia dallo schema seguente come tali valori risultano in costante aumento in entrambi i sessi e in entrambe le fasce di età. Anzi, si conferma una sempre maggior tendenza all'interessamento di soggetti più giovani.

A maggior ragione risulta ancora oggi importante poter andare a capire al meglio il ruolo che hanno i diversi fattori di rischio, HPV compreso, nell'eziopatogenesi del ca orale e nella sua progressione.

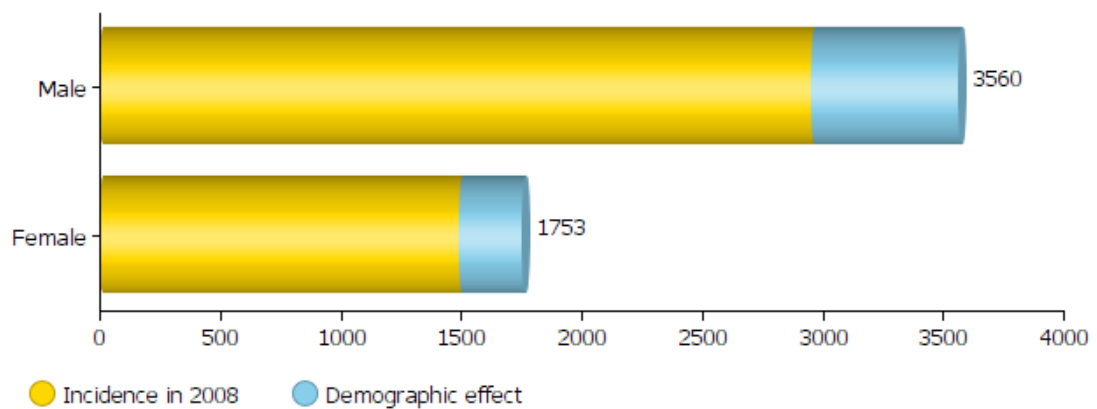
È proprio in questo contesto che si pone il nostro studio: con l'intento di evidenziare e comprendere quelle che possono essere le diverse vie di trasmissione del virus, capire quali

possono essere considerati dei soggetti eventualmente a rischio e comprendere le possibili associazioni tra altri fattori e la presenza del virus stesso.

Year	Estimated number of new cancers (all ages)	Male	Female	Both sexes
2008		2956	1494	4450
	ages < 65	1561	532	2093
	ages >= 65	1395	962	2357
2025		3560	1753	5313
	ages < 65	1794	578	2372
	ages >= 65	1766	1175	2941
	Demographic change	604	259	863
	ages < 65	233	46	279
	ages >= 65	371	213	584

Tabella 8
Stima per il 2025 di persone con ca orale in Italia suddivise per fasce di età

Italy
Lip, oral cavity
Number of new cancers in 2025 (all ages)



GLOBOCAN 2008 (IARC) (19.9.2013)

Figura 12
Stima complessiva dell'aumento dei casi di tumore di ca orale in Italia

Il carcinoma orale si presenta con aspetti clinici che variano da una lesione bianca o rossa ad un'area ulcerativa o ad una tumefazione.

La morfologia clinica è in funzione delle modalità di crescita della neoplasia per cui si possono osservare lesioni esofitiche di aspetto papillare o verrucoso o lesioni a crescita endofitica che assumono l'aspetto di ulcere penetranti.

Le sedi più frequenti del carcinoma orale sono: labbro inferiore (30-40% dei casi), bordi laterali della lingua (25%), pavimento orale (20%), palato molle e trigono retromolare (15%), gengiva e cresta alveolare (4%) e mucosa vestibolare (1%). Nella maggioranza dei casi i carcinomi orali sono asintomatici; il dolore accompagnato da ulcerazione si riscontra talvolta nei tumori linguali.

Nei casi più avanzati si possono riscontrare alitosi, sanguinamento, fistolizzazioni cutanee, tumefazioni dei mascellari, difficoltà della fonazione e dell'apertura della mandibola. Occasionalmente si osservano pazienti in cui il primo segno clinico è una tumefazione linfonodale a livello laterocervicale o sottomandibolare.²⁵

Le lesioni possono infiltrarsi anche nei piani profondi e nell'osso mandibolare/mascellare causando mobilità dentale o, quando viene a essere coinvolto il nervo mandibolare, parestesie.

Sulla base della microscopia il carcinoma squamocellulare si divide in tre tipi principali a seconda del grado di differenziazione delle cellule neoplastiche. Nel tipo ben differenziato (grado 1) le cellule neoplastiche tendono a cheratinizzare e viene mantenuto un certo grado di organizzazione architetturale della lamina epiteliale. Nei tumori moderatamente differenziati (grado 2) si nota una scarsa produzione di cheratina e una parziale conservazione dell'architettura epiteliale. Nei tumori poco differenziati (grado 3) l'architettura epiteliale è completamente scompaginata e le cellule neoplastiche mostrano un intenso pleomorfismo che rende difficoltoso il riconoscimento della loro origine epiteliale. Il grado di differenziazione del tumore comunque non ha un valore predittivo sulla prognosi; mentre risultano più importanti l'accertamento dello spessore del tumore e dei margini di resezione chirurgica della neoplasia che devono risultare liberi. Ovviamente riveste una grande importanza ai fini prognostici la valutazione delle metastasi linfonodali.

Il trattamento del carcinoma orale si basa sulle dimensioni del tumore primario, la sede anatomica, l'estensione ai linfonodi e le eventuali metastasi a distanza. Attualmente il sistema più usato è la classificazione TNM in cui ogni singolo tumore viene stadiato in base alle dimensioni (T), l'interessamento linfonodale (N) e le eventuali metastasi a distanza (M).

Uno dei vantaggi del carcinoma della zona testa/collo provocato dal papilloma, è che è un tipo di carcinoma sensibile alla chemioterapia. Oltre alla chirurgia dunque questi carcinomi hanno una risposta molto buona alla terapia coadiuvante data appunto dalla chemioterapia.²⁶

5. CONSIDERAZIONI IN TEMA DI PREVENZIONE E TERAPIA: ESTENDERE LA VACCINAZIONE ANCHE AGLI UOMINI?

Come detto nel capitolo precedente il virus dell'HPV nell'uomo si manifesta principalmente sotto forma di condilomi genitali chiamati anche verruche genitali o creste di gallo per via della loro morbida e rosata consistenza.

Esse compaiono sul pene o nell'area anale e perineale entro 6 mesi dall'avvenuto contagio, e si manifestano come piccole lesioni ruvide che possono essere isolate o formare dei raggruppamenti assai fastidiosi perché accompagnati da bruciore e prurito.

Il contagio potrebbe far sì che queste lesioni vadano a formarsi anche nell'area della bocca e della gola; manifestandosi (in queste sedi) in forme più gravi.

Negli ultimi anni si è manifestato nei giovani un aumento dell'incidenza di tumori orofaringei.

Nell'ultimo decennio il cancro dell'orofaringe causato da infezione da HPV ha avuto un incremento di circa 4 – 5 volte rispetto alle precedenti stime. Nella maggior parte dei casi il tipo virale responsabile è il 16, il più aggressivo.²⁷

Dare una stima precisa e puntuale dell'incidenza e della prevalenza dell'infezione da HPV negli uomini è tutt'ora abbastanza difficile. Alla base di questa affermazione ci sono due principali motivazioni:

1. Relativa scarsità di studi epidemiologici condotti sugli uomini se comparati alla numerosità di quelli condotti nel sesso femminile;

2. Ampio range di variabilità della prevalenza riportata (1,3%-72,9%, media superiore al 20%) in relazione a:

- differenti modalità di prelievo utilizzate e tecniche di analisi dei campioni
- area geografica in cui viene eseguito lo studio (in Europa ed Asia Orientale sono state osservate prevalenze più basse rispetto ai paesi del continente americano)
- sito anatomico in cui viene ricercato il virus e numero di siti considerati nello studio;

- difficoltà a disporre di una popolazione rappresentativa della popolazione generale (maggior quantità di dati sulle popolazioni a rischio);

- gruppo di rischio considerato (basso rischio 1-83%, alto rischio 2-93%) dove per gruppi ad alto rischio vengono considerati gli omosessuali (MSM), coloro che presentano una condizione di immunosoppressione e coloro che sono affetti dall'infezione da HIV.

Attualmente si stima che fino al 65-70% dei soggetti di sesso maschile contrae un'infezione da uno o più ceppi di HPV (oncogeni e non) durante l'arco della vita con un andamento particolare e non sovrapponibile a quello riportato per il sesso femminile.^{28,29}

Nella Tabella seguente vengono sottolineate le differenze tra i due sessi riguardo al "comportamento" dell'infezione da HPV.

	Donne	Uomini
Prevalenza globale	Percentualmente più bassa (↓)	Percentualmente più elevata (↑)
Influenza dell'età	Andamento bimodale. ³ <ul style="list-style-type: none"> • Picco sino ai 25-30 anni • Declino sino all'epoca perimenopausale in cui si osserva un secondo picco 	<ul style="list-style-type: none"> • Manca una sostanziale tendenza al declino con l'età • Manca un picco nelle età più giovani
Acquisizione ceppi oncogeni	Maggiore probabilità per i ceppi oncogeni	Analoga probabilità di contrarre un ceppo oncogeno o non oncogeno
Durata dell'infezione ceppi oncogeni vs. non oncogeni	Maggior durata per i ceppi oncogeni	Analoga durata
Clearance dell'infezione	Più lenta	Rapida

Tabella 8

Differenze dell'infezione tra HPV divise per sesso

Le motivazioni alla base di tali differenze non sono completamente note, tra le ipotesi più accreditate troviamo:

- la possibile diversa interazione tra virus e ospite nei due sessi;
- una maggior induzione della risposta immune nei confronti di HPV nella donna rispetto all'uomo;
- le diversità anatomo-funzionale tra i due sessi.

Per quanto riguarda il maschio, i fattori di rischio dell'infezione da HPV sono rappresentati da un precoce inizio dell'attività sessuale (e di conseguenza da una sua lunga durata), da abitudini sessuali caratterizzate da elevato numero di partners di sesso femminile ma anche di

semplice maschile (MSM) e dalla presenza di una condizione di immunodepressione congenita o acquisita.

È importante sottolineare che, mentre per la donna esiste una metodica di screening ben validata quale il Pap-test per la prevenzione delle neoplasie della cervice uterina, per il maschio non esiste alcun test di screening standardizzato per l'infezione da HPV.

Il peso delle malattie HPV-correlate nell'uomo è elevato, anche se i tumori correlati all'HPV diagnosticati ogni anno negli uomini sono la metà del numero di casi rispetto a quelli diagnosticati nelle donne ad eccezione proprio del tumore del distretto testa-collo.

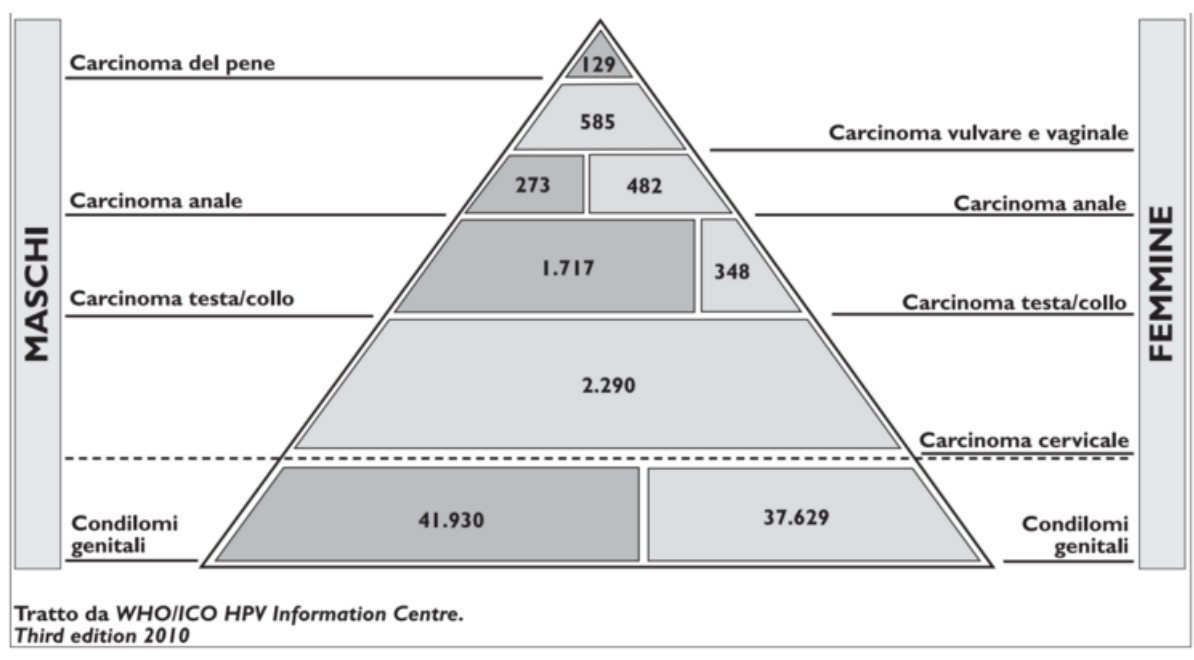


Figura 12

Dati di incidenza dell'HPV in Italia a confronto in base al sesso

È quindi fondamentale capire quanto siano influenti questi dati e di conseguenza cercare di essere più consapevoli di dover ridurre la trasmissione dell'infezione HPV tra partner sessuali e aumentare così l'efficienza dei programmi di prevenzione quali ad esempio l'utilizzo del vaccino.

Al momento attuale non esistono, oltre alla vaccinazione, strumenti preventivi nei confronti delle infezioni da HPV nella popolazione sessualmente attiva. L'utilizzo del preservativo, seppur associato ad un minor rischio di contrarre l'infezione non elimina totalmente il rischio

di acquisizione/trasmissione dell'infezione a differenza di quanto avviene per le altre malattie a trasmissione sessuale.

L'unico vaccino attualmente approvato per l'utilizzo nel sesso maschile è il vaccino quadrivalente contenente i sierotipi 6,11,16,18. Tale vaccino ha mostrato nel sesso maschile una buona immunogenicità, simile e non inferiore a quella riportata nel sesso femminile, ed un buon profilo di sicurezza.

Il vaccino quadrivalente ha mostrato un'efficacia profilattica nei confronti delle lesioni genitali esterne (definite come condilomi genitali, neoplasie intraepiteliali e cancro perianale, perineale e del pene) da HPV 6, 11, 16, 18 pari al 90,4%.

Analogamente a quanto riportato nelle donne, anche per l'uomo non è noto quale sia il correlato di protezione.

Per quanto riguarda la durata della protezione conferita, considerando che le medie geometriche dei titoli anticorpali sono simili tra uomo e donna, è ragionevole pensare che anche la durata della protezione possa essere simile in entrambi i sessi. L'accettabilità e l'uptake della vaccinazione nel maschio sono però risultati essere più bassi rispetto al sesso femminile.

Alla base di tale evidenza sono state proposte alcune spiegazioni: una minor "forza" della raccomandazione nel maschio rispetto a quella della femmina (a testimonianza di come le attitudini del personale sanitario nei confronti della vaccinazione abbiano una grande influenza nella scelta vaccinale), una minore tendenza ad occuparsi della propria salute tipica del sesso maschile, una scarsa conoscenza delle manifestazioni dell'infezione nel maschio e di conseguenza una minor consapevolezza di malattia, sembrano essere i principali determinanti.

Da non trascurare inoltre è il costo del vaccino che ne limita l'utilizzo soprattutto nei paesi a medio/basso reddito e nelle minoranze etniche presenti in alcuni paesi industrializzati.

Nel mondo le raccomandazioni per la vaccinazione contro HPV nel maschio differiscono in maniera significativa. Al momento attuale sono solo 3 gli stati extraeuropei in cui è raccomandata la vaccinazione di routine nel sesso maschile




		
US_Advisory Committee in Immunization Practices (ACIP, MMWR 23/12/2011) Vaccinazione universale	Australia_Pharmaceuticals Benefits Advisory Committee (PBAC) (19/12/2011) Raccomandazione positiva	Canada_National Advisory Committee on Immunization (NACI, CCDR - Gennaio 2012) Raccomandazione Grado A
Vaccinazione di routine per i bambini di 11 o 12 anni + catch-up dai 13 ai 21 anni	Vaccinazione nelle scuole per i ragazzi di 12-13 anni + 2 anni di catch-up per i ragazzi di 14-15 anni	Vaccinazione per i maschi dai 9 ai 26 anni (vaccinazione di routine tra i 9 e i 13 anni)

Figura 13

Raccomandazioni in merito alla vaccinazione di routine del maschio

In Europa, ad agosto 2011, l'EMA ha approvato il vaccino quadrivalente per l'uso nel maschio dai 9 ai 26 anni per la prevenzione delle lesioni condilomatose, mentre negli Stati Uniti il vaccino è indicato anche per la prevenzione delle lesioni precancerose di pene ed ano . Attualmente in Austria e in Sassonia le Autorità Sanitarie hanno approvato l'estensione della raccomandazione anche al sesso maschile.

In Italia, seppur un grosso passo in avanti in termini di prevenzione delle patologie HPV-correlate è stato fatto con il nuovo Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale 2012-2014 che prevede la somministrazione gratuita in tutto il Paese del vaccino anti-HPV alle dodicenni, la vaccinazioni nel sesso maschile non rientra negli obiettivi del piano .

Nel 2012 la Consensus Conference sulle Patologie da HPV nel maschio, costituita dai maggiori esperti clinici e di sanità pubblica, oltre a raccomandare la vaccinazione del maschio 12enne, suggeriva di attivare un programma di vaccinazione HPV in regime di co-payment, come già avviene per il sesso femminile.

Sebbene da parte delle società scientifiche emergano segnali positivi, le raccomandazioni per la vaccinazione contro l'HPV nel maschio nei programmi di immunizzazione nazionali sono ancora scarse.

Mentre è già stato ben documentato come nelle donne la vaccinazione contro HPV sia costo-efficace, le dinamiche alla base di una politica vaccinale che includa anche i maschi sono state più volte messe in discussione.

Questo deriva probabilmente dal fatto che rispetto al sesso femminile si ha una minor conoscenza della storia naturale dell'infezione, dalla conflittualità dei dati epidemiologici e di concordanza di coppia (a loro volta modulata dai differenti comportamenti sessuali e dalla metodologia di diagnosi adottata) e dalla mancanza di un sistema di monitoraggio attendibile e validato sia a breve che a lungo termine.

Nell'analisi di costo-beneficio è tuttavia necessario considerare una serie di fattori :

in primis vanno considerati i possibili benefici diretti (riduzione della patologia HPV-correlata) ed indiretti (riduzione della circolazione del virus e riduzione pertanto della trasmissione alla donna).

In conclusione si ritiene che, trattandosi di una malattia a trasmissione sessuale, intervenire in termini di prevenzione primaria su uno dei soggetti della coppia avrà, evidentemente, un impatto positivo nella riduzione di patologia nel partner.

Tra le motivazioni alla base del supporto della vaccinazione del sesso maschile vi è il fornire uguali possibilità preventive in relazione all'equità tra i sessi di fronte a una patologia di coppia.

La strategia di includere il maschio nelle campagne vaccinali si pone come obiettivo di minimizzare la capacità di trasmissione dell'infezione tra i due sessi, ma soprattutto di contrastare il manifestarsi di numerose e spesso gravi patologie correlate all'HPV che colpiscono anche gli uomini.

Alla luce delle sempre maggiori evidenze scientifiche non dovrebbe essere più corretto parlare di un vaccino contro la prevenzione delle neoplasie dell'apparato genitale ma di un vaccino per la prevenzione delle infezioni da HPV.

6. SCOPO

Il nostro studio ha come obiettivo principale quello di valutare la compresenza del papilloma virus, caratterizzandone anche i diversi genotipi, a livello delle mucose orali e genitali in donne italiane con una lesione da HPV a livello genitale (PAP test positivo) e nei rispettivi partner stabili maschili.

Abbiamo inoltre valutato quanto alcuni fattori di rischio, quali fumo, alcol, numero di partner, età, uso di diversi metodi contraccettivi, abitudini sessuali possano influenzare sulla gravità e sulla eventuale presenza del virus stesso a livello del cavo orale degli stessi soggetti.

7. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell' Ospedale Maggiore Policlinico, Fondazione IRCCS Ca' Granda di Milano nella seduta del 9 Dicembre 2014, delibera del 30 Dicembre 2014 n° 2765.

Sono stati arruolati complessivamente 135 soggetti.

Criteri di inclusione:

Pap – test positivo effettuato massimo sei mesi prima dalla visita

Soggetti maggiorenni

Accettazione e firma del consenso

Relazione stabile con il partner da almeno 1 anno

Criteri di esclusione:

soggetti immunocompromessi

soggetti affetti da altre malattie infettive (HCV, HIV, ecc.)

utilizzo di antibiotici nel mese precedente la visita

utilizzo di specifici presidi orali e genitali ad azione antibatterica (colluttori, creme, ovuli vaginali, ecc)

40 soggetti, al momento in cui è stato spiegato come si sarebbe svolta la ricerca, hanno rifiutato di partecipare allo studio; 7 sono stati esclusi al momento della visita del cavo orale

in quanto avevano utilizzato dei colluttori con clorexidina nei giorni precedenti la visita; 15 sono stati esclusi per incompletezza/inadeguatezza dei campioni raccolti.

I soggetti analizzati sono stati in totale 73: 44 femmine e 28 maschi.

Di questi 26 erano coppie eterosessuali con partner stabile da almeno un anno dalla data del prelievo e una coppia omosessuale di uomini.

Tutti i soggetti femminili presentavano una lesione cervicale diagnostica con un PAP - Test positivo effettuato non oltre i 6 mesi precedenti alla data di reclutamento.

Tutti i soggetti sono stati reclutati presso la Clinica Ostetrica Ginecologica Mangiagalli, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano ove le donne si recavano per i trattamenti specifici in base alle lesioni genitali diagnosticate precedentemente.

Nel contesto della visita ginecologica, sono state invitate insieme ai loro partner a partecipare allo studio e successivamente visitati presso la UOC di Chirurgia Maxillo Facciale e di Odontoiatria dello stesso Ospedale per la valutazione del cavo orale.

In questa occasione si è proceduto alla visita del cavo orale anche del partner maschile e al raccoglimento del campione di urine.

I pazienti, laddove fossero state riscontrate patologie legate ad una possibile infezione da HPV e/o eventuali altre lesioni, venivano informati contestualmente alla visita e indirizzati presso lo studio dentistico privato di fiducia o presso l'ambulatorio di riferimento presso la medesima UOC.

7.1 Raccolta Dei Campioni

La visita è stata divisa in più fasi:

- Spiegazione del protocollo e firma del consenso informato
- Compilazione di un questionario anonimo inerente: l'assunzione di alcolici, il numero di sigarette consumate quotidianamente, il numero di partner negli ultimi 12 mesi, il numero di rapporti sessuali indicativi in un mese, l'eventuale utilizzo di anticoncezionali, pregresse infezioni a livello genitale
- Brush vaginale (effettuato contestualmente alla visita ginecologica)
- Raccolta del campione di urine (solo per i soggetti maschili)
- Brush orale.
- Sciacquo oro-faringeo con soluzione fisiologica

Ad ogni paziente è stato chiesto di non lavare i denti e astenersi dall'assunzione di alimenti almeno 2 ore prima della visita per non alterare i prelievi.

Il tampone orale è stato effettuato tramite il device ORAcollect•DNA comprensivo di un contenitore caratterizzato dalla presenza al suo interno di un liquido batteriostatico che consente quindi di ottimizzare la conservazione dei campioni stessi. Il device è stato passato su tutte le mucose del cavo orale comprensivo di vestibolo superiore e inferiore, superficie dorsale e laterale della lingua, mucosa del pavimento, mucosa gengivale e palatale.

Per lo sciacquo oro-faringeo, ai pazienti è stata dato un bicchierino sterile con all'interno un quantitativo fisso di soluzione fisiologica. I soggetti dovevano fare dei gargarismi e tenere in bocca la soluzione fisiologica per circa 20 secondi e poi risputarla nel contenitore stesso.

Tutti i campioni sono stati collocati immediatamente dopo la loro raccolta in freezer a -80°C per mantenere i microrganismi inalterati fino al momento dell'analisi in laboratorio.

Ai soggetti di sesso maschile non è stata effettuata una peniscopia ma è stato spiegato quali possono essere le manifestazioni a livello genitale causate da HPV ed è stata consigliato un auto-controllo e, in caso di sospette lesioni o per un eventuale consulto preventivo specifico, è stato loro consigliato di rivolgersi al dermatologo e/o all'andrologo.

7.2 Estrazione e amplificazione del DNA

I campioni dei brush cervicali, dei tamponi orali, degli sciacqui oro-faringei e delle urine sono stati congelati subito dopo le visite e conservati ad una temperatura di (-80°C) fino alla loro consegna presso il laboratorio dove sono state effettuate le analisi.

Una parte dei campioni è stata utilizzata per l'estrazione del DNA virale; una parte è stata invece conservata nel freezer per successive analisi di caratterizzazione del microbioma.

Al fine di estrarre DNA di buona qualità, che consenta allo stesso tempo un rapido ottenimento del materiale genetico su cui sviluppare le successive analisi di DNA-HPV test e genotipizzazione, è stato utilizzato un kit commerciale di estrazione a colonnina specifico per estrazione di RNA/DNA da virus secondo il metodo in uso presso la Piattaforma Genomica.

Il DNA è stato estratto dalle quattro matrici analizzate: brush cervicali, urine, brush orali e sciacqui oro-faringei.

Estrazione di DNA dai campioni cervicali, di urine e sciacqui oro-faringei

I campioni cervicali, di urine e gli sciacqui oro-faringei sono stati processati seguendo il protocollo incluso nel kit commerciale “NucleoSpin® Virus, Viral RNA and DNA isolation” (Macherey-Nagel) e applicando le modifiche suggerite dal “Nucleospin 8 Virus” protocol (Macherey-Nagel).

In sintesi, prima della lisi dei campioni, i campioni cervicali sono stati incubati in 500ul di PBS sterile a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo l'incubazione, 200 ul di PBS sono stati usati per l'estrazione del DNA. I campioni di urine e gli sciacqui sono stati scongelati durante la notte alla temperatura di 4°, successivamente 3 ml del campione sono stati centrifugati a 13,000 xg per 10 min. Il pellet è stato risospeso in 200ul di PBS sterile e quindi è stato applicato il protocollo di estrazione del DNA. Il DNA ottenuto è stato conservato a -20°C fino alla sua analisi.

Il kit si basa sulla “Nucleo Spin Silica Membrane ”: una membrana di silice ottimizzata sia per il recupero ottimizzato di DNA sia per la bassa efficienza di legame alle impurità. Il

protocollo di estrazione prevede la lisi del campione con un buffer di lisi contenente sali caotropici, agenti denaturanti e detergenti. Il lisato viene poi mescolato con un binding-buffer per creare le condizioni ottimali per il legame del DNA alla membrana di silice presente all'interno della colonnina. Dopo il caricamento nella colonnina, i contaminanti vengono eliminati tramite lavaggi successivi con buffers differenti. Il DNA virale viene eluito dalla membrana di silice utilizzando acqua RNase free contenuta nel kit di estrazione.

Estrazione di DNA dai brush orali

Per estrarre DNA di buona qualità da campioni orali raccolti con il sistema Oragene si è utilizzato uno specifico kit commerciale. (<http://www.dnagenotek.com/ROW/products/prepITL2P.html>, PD-PR-006: Laboratory protocol for manual purification of DNA from 0.5 mL of sample).

Il protocollo prevede una prima fase di incubazione del campione a 50°C per assicurare che il DNA sia adeguatamente rilasciato e le nucleasi inattivate. In seguito si procede con una un passaggio di purificazione in fase liquida per eliminare le impurità e gli inibitori. Dopo centrifugazione il DNA presente nel supernatante viene precipitato con etanolo e risospeso in acqua RNase free contenuta nel kit di estrazione.

Verifica della qualità del DNA estratto

Si è proceduto alla verifica della qualità del DNA estratto, per escludere la presenza di eventuali inibitori nelle successive reazioni di amplificazione del DNA che creerebbero falsi negativi nelle analisi DNA-HPV.

Il kit utilizzato per l'estrazione del DNA arricchisce per la frazione virale ma estrae anche il DNA genomico presente nel campione. Se si ottiene un amplificato, mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), di un gene presente nel genoma umano, si può escludere con certezza la presenza di inibitori di PCR.

Il gene utilizzato come controllo è ALAS1 (5'-Aminolevulinate Synthase 1) che si è amplificato in tutti i campioni.

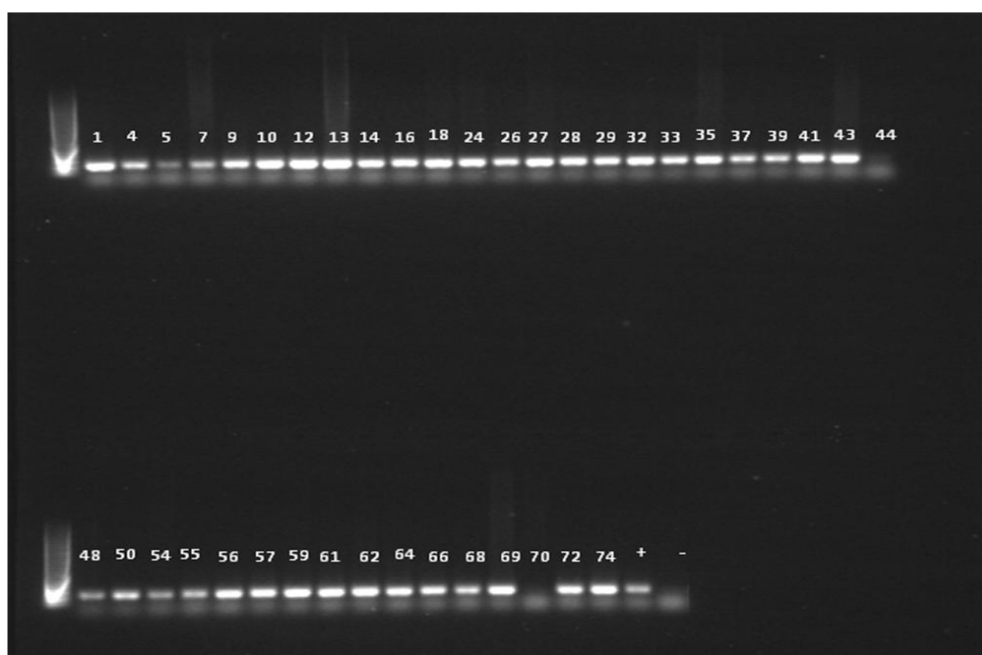


Figura 13

Foto di un gel 1,5% agarosio dopo elettroforesi. Si osservano alcuni amplificati del gene ALAS1 su alcuni campioni SC a 350 paia di basi.

Amplificazione di HPV (HPV-DNAtest)

Per identificare la presenza del virus HPV nei diversi campioni si è proceduto tramite l'utilizzo di due diverse tecniche di PCR che analizzano la regione L1: in particolare si sono utilizzati i primers MY09 5'-GCMCAGGGWCATAATAATGG 3' MY11 50 CGTCCMARRGGAWACTGATC per amplificare un frammento di 450bp e i primers FAP59 5'TAACWGTIGGICAYCCWTATT 3' e FAP64 5'CCWATATCWVHCATITCICCATC-3' per amplificare un frammento di 480 bp.

Un test HPV-DNA che analizza porzioni del virus differenti rende meno probabile la presenza di falsi negativi.

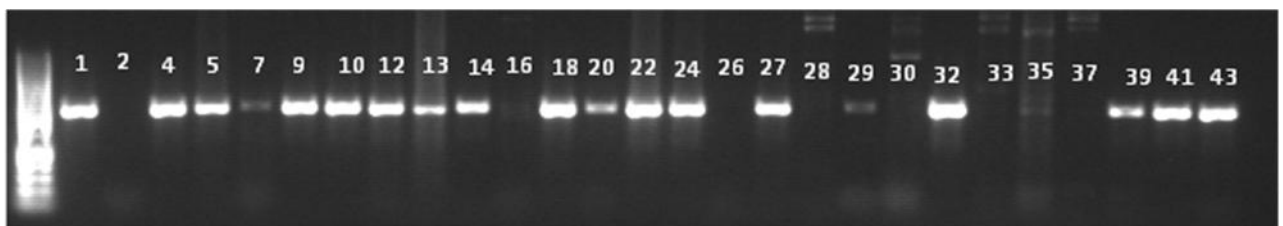
I frammenti di PCR sono quindi stati visualizzati su un 2% di Agarose gel e i campioni positivi sono stati successivamente genotipizzati tramite sequenziamento o ibridazione inversa.

La PCR clean up è stata fatta tramite Exosap (Sigma-Aldrich) o NucleoSpin Gen and PCR clean up kit (Machererey-Nagel).

Il sequenziamento è stato fatto tramite la metodica convenzionale di Sanger utilizzando come target una regione specifica L1 ORF del genoma al fine di identificare il genotipo di HPV in tutti i campioni risultati positivi.

A tale metodica si è inoltre affiancato una ulteriore caratterizzazione mediante Inno Lipa nei casi in cui si sospettava una infezione multipla.

a)



b)



c)

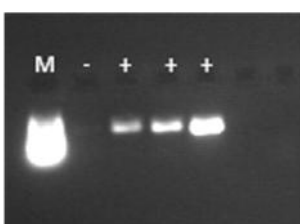


Figura 14

Foto di un gel 1,5% Agarosio dopo elettroforesi. Si osservano alcuni amplificati di HPV da campioni con primers MY09 e MY11. La lunghezza del frammento amplificato è di 450 paia di basi. Immagine

a) campioni SC, b) Urine e c) relativi controlli

7.3 Genotipizzazione HPV

Sequenziamento mediante metodo Sanger

Si è deciso di sequenziare mediante metodo Sanger alcune porzioni del genoma HPV. Questo approccio, a differenza del metodo di genotipizzazione mediante Kaspar consentirebbe di identificare anche variazioni de-novo degli SNPs e non solo gli SNP noti. Con il sequenziamento diretto, è inoltre possibile caratterizzare i diversi sottotipi virali in modo più fine (es. differenze nel genoma tra i ceppi del tipo 16) permettendo di studiare meglio i meccanismi di trasmissione del virus all'interno della coppia. Ad esempio se lo stesso sottotipo di HPV si riscontra nei campioni della coppia, è più probabile ipotizzare un meccanismo di trasmissione diretta. Per ogni campione positivo sono state allestite reazioni di amplificazione del DNA con nucleotidi fluorescenti per il sequenziamento del DNA. Le reazioni sono state corse sullo strumento ABI

Caratterizzazione dei ceppi di HPV mediante sequenza

Le sequenze sono state controllate utilizzando il software Finch e la caratterizzazione del tipo di ceppo HPV avviene mediante confronto, tra la sequenza virale ottenuta e sequenze virali già caratterizzate e depositate in un specifico database pubblico: <http://pave.niaid.nih.gov>.

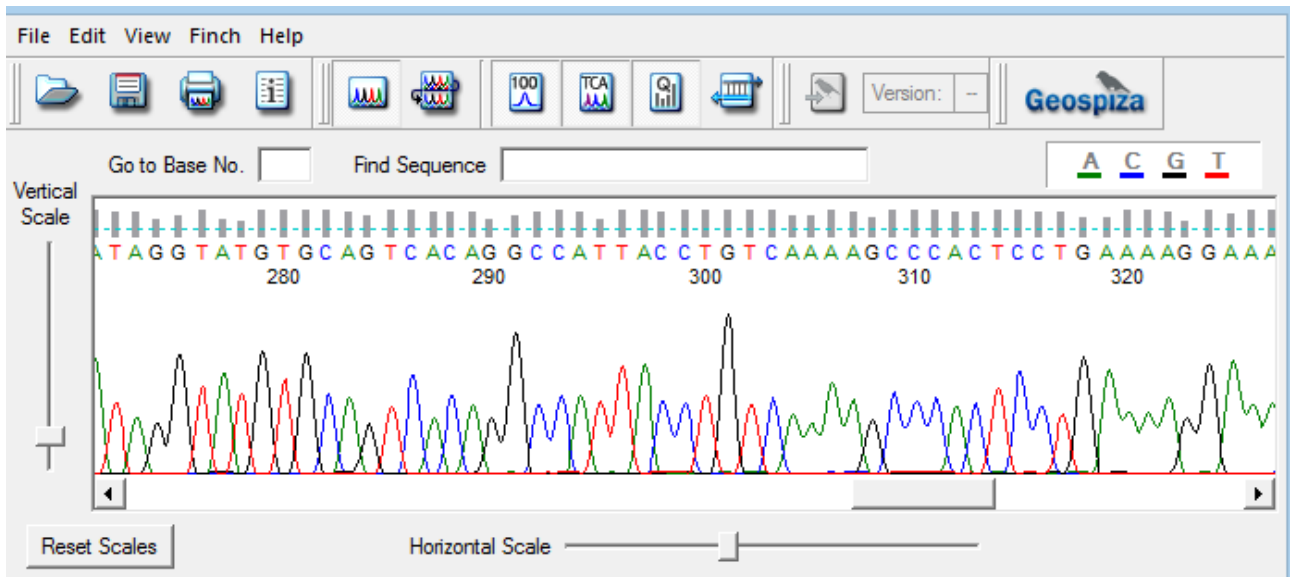


Figura 15

Esempio di una sequenza di HPV ottenuta mediante metodo di sequenziamento Sanger e visualizzata utilizzando il software Finch. E' possibile vedere la successione delle varie basi del DNA virale.

Figura 16

Database specifico utilizzato per la caratterizzazione dei ceppi di HPV

Blast Results

Display Result

Display Type

► Database and Query Information

[Download Raw BLAST Results](#)

Results

Query : SEQ1

[Select All](#) [Deselect All](#)

	Locus ID	Description	Score	Query Coverage	E Value	Max ident
▶ <input type="checkbox"/>	HPV16REF	Human papillomavirus 16 (HPV16), complete genome	839.0	99.1%	0.0	100.0%
▶ <input type="checkbox"/>	HPV59REF	Human papillomavirus 59 (HPV59), complete genome	123.0	28.6%	7.0E-29	87.7%
▶ <input type="checkbox"/>	HPV35REF	Human papillomavirus 35 (HPV35), complete genome	111.0	60.9%	3.0E-25	80.4%
▶ <input type="checkbox"/>	HPV52REF	Human papillomavirus 52 (HPV52), complete genome	109.0	34.4%	1.0E-24	84.4%
▶ <input type="checkbox"/>	HPV58REF	Human papillomavirus 58 (HPV58), complete genome	105.0	36.8%	2.0E-23	83.4%

Figura 17

Esempio di un risultato di caratterizzazione di HPV16. Nell'output dei risultati, la prima linea indica chiaramente che la sequenza del tipo HPV16 è identica al 100% alla sequenza del campione utilizzata per interrogare il database.

I dati di sequenziamento evidenziano la presenza di diversi ceppi virali in circolazione.

7.4 Caratterizzazione dei ceppi di HPV mediante InnoLipa

Il test Inno-Lipa Genotyping Extra si basa sul principio dell'ibridazione molecolare inversa: Reverse Dot Blot. Il test prevede amplificazione del DNA target mediante primers consensus che hanno come bersaglio una regione del genoma virale conservata tra i vari genotipi (regione L1) e una coppia di primers per l'amplificazione del gene umano HLA-DPB1; gli amplificati vengono ibridati a specifiche sonde nucleotidiche fissate su striscia di nitrocellulosa. Il test permette di distinguere 28 genotipi diversi. Questo test, a differenza del metodo di sequenziamento Sanger, è in grado di identificare la presenza contemporanea di più ceppi nel campione. Tuttavia, non permette di distinguere tutti i tipi virali conosciuti ma solo quelli presenti sulla striscia di nitrocellulosa. Inoltre non discrimina i diversi sottotipi virali e consente quindi un livello analisi meno preciso.

7.5 Analisi Statistica Dei Dati

Different variables were considered for the statistical analyses: gender, age, number of partners, oral sex, alcohol consumption per week, lesions etc. (Table X). Before analyzing the data, intervals were constructed for some variables: age, infection interval, alcohol consumption and smoking. The effect of the variables on the HPV infection status was assessed, by fitting a generalized model, using the GLM (General Linear Model) function in R software. The family "binomial" was used for the description of the error distribution and link function. As the number of samples was relatively small, the function `fisher.test` was used to perform Fisher's exact test as a verification test. The model was tested using the maximum likelihood to evaluate the effect of the inclusion of each parameter to the model. As a supplementary analysis, the correlations were calculated between all parameters.

8.RISULTATI

Nel corso dello svolgimento del progetto sono stati inviati al laboratorio della Piattaforma Genomica del PTP Science Park un totale di 215 campioni provenienti da 73 soggetti (44 femmine e 28 maschi di cui 26 coppie eterosessuali e una omosessuale).

	Cervical Swab (CS)	Oral Swab (OS)	Oral Rinse (OR)	Urine (U)	TOT
Female	43	44	44	0	131
Male	0	28	28	28	84
	43	72	72	28	215

Tabella 9

Campioni ricevuti per tipologia e genere.

Inoltre sono stati consegnati campioni positivi di DNA HPV con genotipo: 35, 18+52, 16, 31, 33+16 debole, 58 che sono stati utilizzati come controlli test positivi.

La tabella seguente (10) mostra l'elenco dei campioni raccolti. Le diverse colonne riportano in sequenza: il sesso del paziente campionato (f per femmina, m per maschio), la tipologia del campione per genere (CS cervical swab F: tampone cervicale di origine femminile; OS Oral swab F: tampone orale di origine femminile; OR Oral rinse F, sciacquo orale di origine femminile; U Urine, campioni di urine di origine maschile; OS Oral swab M, tamponi orali di origine maschile; OR Oral rinse, sciacqui orali di origine maschile).

	sex	CS Cervical swab F	OS Oral swab F	OR Oral rinse F	U Urine M	OS Oral swab M	OR Oral rinse M
1	f	x	x	x			
2	f	x	x	x			
3	m				x	x	x
4	f	x	x	x			
5	f	x	x	x			
6	m				x	x	x
7	f	x	x	x			
8	m				x	x	x
9	f	x	x	x			
10	f	x	x	x			
11	m				x	x	x
12	f	x	x	x			
13	f	x	x	x			
14	f	x	x	x			
15	m				x	x	x
16	f	x	x	x			

	sessò	CS Cervical swab F	OS Oral swab F	OR Oral rinse F	U Urine M	OS Oral swab M	OR Oral rinse M
17	m				x	x	x
18	f	x	x	x			
20	f	x	x	x			
21	m				x	x	x
22	f	x	x	x			
23	m				x	x	x
24	f	x	x	x			
25	m				x	x	x
26	f	x	x	x			
27	f	x	x	x			
28	f	x	x	x			
29	f	x	x	x			
30	f	x	x	x			
31	m				x	x	x
32	f	x	x	x			
33	f	x	x	x			
34	m				x	x	x
35	f	x	x	x			
36	m				x	x	x
37	f	x	x	x			
38	m				x	x	x
39	f	x	x	x			
40	m				x	x	x
41	f	x	x	x			

	Sesso	CS Cervical swab F	OS Oral swab F	OR Oral rinse F	U Urine M	OS Oral swab M	OR Oral rinse M
42	m				x	x	x
43	f	x	x	x			
44	f	x	x	x			
45	m				x	x	x
46	f		x	x			
47	m				x	x	x
48	f	x	x	x			
49	m				x	x	x
50	f	x	x	x			
51	m				x	x	x
n.d.	m				x	x	x
n.d.	m				x	x	x
54	f	x	x	x			
55	f	x	x	x			
56	f	x	x	x			
57	f	x	x	x			
58	m				x	x	x
59	f	x	x	x			
60	m				x	x	x
61	f	x	x	x			
62	f	x	x	x			
63	m				x	x	x
64	f	x	x	x			
65	m				x	x	x

	sessò	CS Cervical swab F	OS Oral swab F	OR Oral rinse F	U Urine M	OS Oral swab M	OR Oral rinse M
66	f	x	x	x			
67	m				x	x	x
68	f	x	x	x			
69	f	x	x	x			
70	f	x	x	x			
71	m				x	x	x
72	f	x	x	x			
73	m				x	x	x

Nella seguente tabella (11) sono invece riportati i risultati di positività per l'HPV-DNA test nelle diverse tipologie di campioni.

CS DNAtest: presenza del virus HPV nel campione CS (pos indica la presenza del virus e neg assenza).

CS type: risultati delle analisi di sequenziamento sui campioni CS (i numeri indicano i diversi genotipi di ceppi identificati nel campione: es. 6 indica la presenza di HPV di tipo 6 etc., "+altro" indica la presenza di altri ceppi non identificati),

OS DNAtest: presenza del virus HPV nel campione OS.

OS type: risultati delle analisi di sequenziamento sui campioni OS.

OR DNAtest: presenza del virus HPV nel campione OR.

OR type: risultati delle analisi di sequenziamento sui campioni OR.

U DNAtest: presenza del virus HPV nel campione U

CS Innolipa: risultati della genotipizzazione eseguita utilizzando il metodo InnoLipa.

Tabella 11

Risultati della analisi molecolari per HPV.

	sezzo	CS DNAtest	CS Type	OS DNAtest	OS Type	OR DNAtes t	OR Type	U DNAtest	CS InnoLipa*
1	f	pos	6	neg	–	neg	–	–	
2	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
3	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
4	f	pos	6+altro	neg	–	neg	–	–	C1++; C2++; 56+++; 66++; 06+++
5	f	pos	66	neg	–	neg	–	–	
6	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
7	f	pos	39	neg	–	neg	–	–	
8	m	–	–	pos	68	neg	–	neg	
9	f	pos	16+altro	neg	–	neg	–	–	C1+; 16+++
10	f	pos	16+altro	neg	–	pos	33	–	C1++; C2+-; 16+++; 31+-; 51++; 52+-
11	m	–	–	pos	n.a.	pos	66	neg	
12	f	pos	31	neg	–	neg	–	–	
13	f	pos	56	neg	–	neg	–	–	
14	f	pos	16	neg	–	neg	–	–	C2+; 16+++
15	m	–	–	pos	33	pos	33/147	neg	
16	f	pos	42	neg	–	neg	–	–	
17	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
18	f	pos	6	neg	–	neg	–	–	
20	f	pos	56	neg	–	neg	–	–	

	seesso	CS DNAtest	CS Type	OS DNAtest	OS Type	OR DNAtest	OR Type	U DNAtest	CS InnoLipa*
21	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
22	f	pos	58	neg	–	neg	–	–	C2+++; 58++-
23	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
24	f	pos	58+altro	neg	–	neg	–	–	C1+-; C2+++; 16++; 56++; 58++
25	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
26	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
27	f	pos	58+altro	neg	–	neg	–	–	C1++; C2+++; 39+; 58+++
28	f	pos	114	neg	–	neg	–	–	
29	f	pos	16	neg	–	neg	–	–	
30	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
31	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
32	f	pos	16	neg	–	neg	–	–	C1+-; C2++; 16+++; 53+
33	f	pos	53+altro	dpos	RTRX3- like L1 gene	neg	–	–	C1+; C2+
34	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
35	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
36	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
37	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
38	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
39	f	pos	59	pos	62	neg	–	–	
40	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
41	f	pos	61+altro	pos	22	pos	22	–	C1+++; 61+++; 89+-

	seesso	CS DNAtest	CS Type	OS DNAtest	OS Type	OR DNAtes t	OR Type	U DNAtest	CS InnoLipa*
42	m	-	-	neg	-	neg	-	pos.	C1+; C2+; 58+-; 61+++
43	f	pos	61/89+altro	neg	-	neg	-	-	C1+++; C2+; 16+++; 61+++; 89+
44	f	pos	31+altro	neg	-	neg	-	-	C1+++; C2+++; 16+-; 31+++; 89+
45	m	-	-	neg	-	neg	-	neg	
46	f	n.a.	n.a.	neg	-	neg	-	-	
47	m	-	-	neg	-	neg	-	neg	
48	f	pos	68	neg	-	neg	-	-	
49	m	-	-	dub	110	neg	-	neg	
50	f	pos	66	neg	-	neg	-	-	
51	m	-	-	pos	120	neg	-	neg	
n.d.	m	-	-	-	-	-	-	-	
n.d.	m	-	-	-	-	-	-	-	
54	f	pos	45	neg	-	neg	-	-	
55	f	pos	6	dub	6	neg	-	-	
56	f	neg	-	pos	145	neg	-	-	
57	f	pos	6+altro	neg	-	neg	-	-	C1+++; 6+++
58	m	-	-	pos	33	pos	33	neg	
59	f	pos	61	neg	-	neg	-	-	
60	m	-	-	neg	-	neg	-	neg	
61	f	pos	35+altro	neg	-	neg	-	-	C1+; C2++; 35+++; 68+-
62	f	pos	33/68	neg	-	neg	-	-	C1+; C2+; 33+++; 68+
63	m	-	-	neg	-	neg	-	neg	

	seesso	CS DNAtest	CS Type	OS DNAtest	OS Type	OR DNAtest	OR Type	U DNAtest	CS InnoLipa*
64	f	pos	51+altro	neg	–	neg	–	–	C1+++; 51++
65	m	–	–	pos	84	pos	84	neg	
66	f	pos	16	neg	–	neg	–	–	
67	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	
68	f	pos	6+altro	pos	145	neg	–	–	C1++; C2+++; 16+-; 31+; 39+-; 6+; 66+++; 62+-; 81+-
69	f	neg	–	neg	–	neg	–	–	
70	f	pos	53/42	neg	–	neg	–	–	C1+++; C2++; 39+++; 53+
71	m	–	–	pos	66	pos	66	neg	
72	f	pos	42	pos	58	neg	–	–	
73	m	–	–	neg	–	neg	–	neg	

* il campione 42 InnoLipa è da Urina, tutti gli altri da brush cervicali.

Dalle analisi eseguite sino ad ora si osserva una forte presenza del virus HPV nei tamponi cervicali, con una percentuale di positività dell'86%.

Si evidenzia inoltre una grande variabilità di genotipi: 6, 66, 39, 16, 31, 56, 42, 58, 114, 59, 61, 68, 45, 35, 33 e 53, 89, 114.

In alcuni campioni sono presenti più ceppi virali.

I campioni di urine invece sono tutti negativi tranne il campione 42.

In generale, il genotipo dei ceppi HPV presenti in OR/OS, U e SC sono diversi all'interno della coppia.

Solo in una coppia il campione di urine positivo nell'uomo conteneva lo stesso genotipo HPV trovato nel CS della compagna.

Le analisi statistiche, considerando la regressione delle variabili analizzate, hanno evidenziato tre fattori che sembrano essere correlati alla presenza del virus: il sesso, la pratica di sesso orale, l'uso di alcool (p value: 0,000224, 0.0119 e 0.0362 rispettivamente). In tal senso possiamo dire che il dato relativo al sesso è dovuto al tipo di popolazione esaminata: le donne presentavano infatti tutte una lesione causata da HPV diagnostica entro i sei mesi dalla visita mentre gli uomini erano tutti asintomatici sia a livello orale che genitale.

Le altre variabili come il numero di partner, il numero di rapporti, l'età, uso di contraccettivi orali non sembrano avere correlazioni con la presenza del virus.

La valutazione invece della presenza del virus solo a livello orale evidenzia una associazione significativa con il sesso (p value 0.04517) ma non con la pratica di sesso orale e l'utilizzo di alcool.

L'età e il fumo evidenziano un grado di correlazione statisticamente non significativo ma che mostra un trend verso la significatività (p value 0.0885 e 0.0901 rispettivamente).

In aggiunta a questo, la presenza del virus a livello cervicale risulta essere significativamente associata alla pratica di sesso orale e all'utilizzo di bevande alcoliche (p value 0.0492 e 0.0229 rispettivamente).

Gli altri fattori quali il numero dei partner, l'utilizzo di contraccettivi orali, il fumo e l'età non sembrano essere associati all'infezione a livello cervicale.

Abbiamo quindi considerato separatamente i soggetti femminili e quelli maschili.

Allo stesso modo sono stati calcolati due modelli di regressione distinti. Dai risultati si evidenzia come il sesso orale risulti essere significativamente associato nelle donne mentre negli uomini vi è solo un trend ma con un p value non significativo.

Altro aspetto importante da considerarsi è che le pratiche di sesso orale erano tre volte più frequenti nei soggetti maschili rispetto ai soggetti femminili.

Nell'uomo inoltre si evidenzia una significatività per il numero dei partner (p value 0,05) e un trend verso la significatività per quanto riguarda il numero di rapporti (p value 0,08).

Considerato che il numero di soggetti era relativamente ridotto, abbiamo controllato e confermato la significatività dell'associazione con le pratiche di sesso orale e l'utilizzo di bevande alcoliche tramite il test di Fisher.

Da un punto di vista prettamente clinico a livello del cavo orale sono state riscontrate solo due lesioni riconducibili direttamente ad HPV (condilomi sul dorso della lingua).

Altre lesioni quali afte, lesioni direttamente riconducibili a un trauma o ad altri fattori sono state segnalate ai pazienti ma non sono state considerate meritevoli di un ulteriore approfondimento diagnostico.

9. DISCUSSIONE

Ad oggi il Papilloma Virus, e le lesioni ad esso correlate, sono poco conosciuti dalla gran parte della popolazione e, spesso, i suoi effetti vengono sottovalutati.

Anche a livello scientifico, sebbene le lesioni da esso causate siano ben note, non sono ancora stati chiariti quelli che sono i possibili fattori di rischio predisponenti per l'infezione e per l'evoluzione delle possibili lesioni. Altro aspetto poco chiaro è da considerarsi dal fatto che, se da una parte la sua correlazione e patogenesi per quanto concerne le lesioni della cervice uterina e in generale dell'apparato genitale femminile sono ben note, d'altra parte poche sono ancora oggi le informazioni relative alla presenza del virus a livello dei tessuti del cavo orale sia della donna sia, ancor di più, dell'uomo.

Nel contesto scientifico internazionale, sta assumendo sempre più importanza la ricerca sull'HPV per conoscerlo, prevenirlo e combatterlo al meglio.

Come più volte detto in precedenza, l'infezione sessualmente trasmessa causata da questo virus rappresenta quella più diffusa a livello della popolazione mondiale. D'altra parte, a fronte di una nota trasmissibilità tramite contatto diretto tra le diverse mucose (genitali e orali su tutte), pochi sono gli studi che hanno valutato la compresenza del papilloma virus nelle mucosa genitali e orali dello stesso soggetto; ancora meno sono quegli studi che sono andati ad indagare la possibile correlazione del virus all'interno di coppie sessualmente attive.

In questo contesto si pone dunque il nostro progetto: cercare di meglio comprendere la possibile compresenza del virus all'interno delle mucose orali di soggetti che sono sicuramente già entrate in contatto con lo stesso (pap test positivo) e valutare se, all'interno della coppia, vi siano rischi tali per cui l'infezione possa essere compresente anche nelle mucose del partner.

La nostra scelta è stata inoltre quella di andare a valutare tale compresenza in soggetti che avessero un partner stabile nel corso degli ultimi 12 mesi in modo da poter valutare in modo più specifico l'eventuale correlazione all'interno della coppia.

Altro aspetto importante è quello che si è deciso di considerare soggetti HIV negativi. Se da un lato sono ben note le complicazioni legate alle sovra infezioni in soggetti già immunodepressi, d'altra parte la presenza di lesioni tumorali quali il ca orale interessano per

la maggior parte soggetti HIV negativi! Ecco dunque un ulteriore aspetto a favore della conduzione di studi su soggetti *sani* ma che possono altresì sviluppare lesioni HPV correlate. Nella letteratura internazionale sono pochi gli studi condotti atti alla valutazione della compresenza del virus a livello delle mucose orali e genitali:

negli ultimi dieci anni – dal 2006 al 2016 – si possono evidenziare un totale di 27 studi; di questi 1 è di tipo retrospettivo e 2 sono condotti in un pool di pazienti anche HIV+ (v. tabella 12).

Il numero degli stessi si riduce se si vanno a selezionare quelli condotti anche sugli uomini: 10 in tutto.

Il numero diminuisce ulteriormente considerando quelli che sono andati ad effettuare dei controlli all'interno di coppie: solo 8.

Per quanto concerne la distribuzione della popolazione studiata si evince che, seppur parlando sempre di numeri contenuti, il maggior numero di studi è stato condotto in Brasile. Vi sono poi studi condotti in diversi altri stati sia a livello Americano, Asiatico, Europeo e Africano.

Sono presenti anche due studi condotti in Italia ma nessuno di questi ha effettuato una valutazione relativa alla coppia ma si son sempre soffermati a valutare i soggetti femminili.

Nella maggior parte degli studi i campioni genitali dell'uomo sono stati condotti tramite tamponi, nessuno ha utilizzato le urine seppur questo possa risultare un metodo validato e sicuramente meno "invasivo" per il soggetto esaminato. Tale aspetto va sottolineato in quanto spesso, specie nell'uomo, vi è una forte reticenza al volersi sottoporre a visite andrologiche/dermatologiche più specifiche.

Quasi tutti gli studi selezionati hanno raccolto i campioni a livello delle mucose orali tramite l'utilizzo di brush. Solo due studi, uno solo di quelli nelle coppie, ha utilizzato una doppia tecnica di campionamento comprensiva di brush e oral rinse (sciacquo orofaringeo).

In due studi si è proceduto invece alla raccolta della saliva.

Noi abbiamo deciso di utilizzare la doppia tecnica di prelievo (brush + oral rinse) in quanto si è evidenziato come in tal modo si sia in grado di ottenere un campionamento più affidabile e completo, in grado di raccogliere materiale non solo dal cavo orale ma anche dalle mucose situate nella zona più posteriore.

La metodica di isolamento più utilizzata resta sicuramente quella che utilizza i primer MY09 e MY11. Nel nostro studio abbiamo deciso di utilizzare in aggiunta anche i primer FAP59/64 per poter avere una maggior sensibilità.

Lo stesso per la valutazione dei genotipi: tutti gli studi sono andati ad effettuare la genotipizzazione tramite kit predefiniti quali ad esempio l'INNOLIPA. Anche in questo caso

la nostra scelta è stata quella di utilizzare una tecnica inizialmente molto meno ristretta per poter essere in grado di ricercare la positività per tutti i possibili genotipi. Si è poi proceduto anche ad effettuare delle ulteriori analisi tramite INNOLIPA specie nei casi di sospetta positività e in quelli con infezioni multiple.

Tabella 12

Revisione degli articoli pubblicati nel corso degli ultimi dieci anni inerenti la valutazione della compresenza del virus HPV a livello genitale e orale di donne ed eventuali partner maschili.

ANNO	RIVISTA	PRIMO AUTORE	NAZIONE	MALE	FEMALE	M HPV ORALE	M HPV GENITALE	F HPV GENITALE	F HPV ORALE	GENO TIPO	METODO ANALISI	FATTORI DI RISCHIO	NOTE
2006	EJ of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology	Giraldo ³⁰	Brasile	X	70 sani + 70 pap test +	x	x	100% solo pap test +	37% Vs 4%	x	MY09 MY11	x	brush
2008	Journal of Medical Virology	Marais ³¹	South Africa	X	64	x	x	100%	25%	x	Roche Linear Array HP	X	brush
2009	Journal of Medical Virology	Termine N ³²	Italia	X	140 pap test +	x	x	54%	1%	31-18	INNOLIPA	X	brush
2010	Infect Agent Cancer	Sanchez-Vargas LO ³³	Mexico	X	46	x	x	100%	100%	x	MY09 MY11	X	brush
2010	Virology Journal	Saini R ³⁴	Malaysia	X	70	x	x	100%	6%	x	Digene HC2® assay	X	brush
2011	Oral Oncology	Termine N ³⁵	Italia	X	98	x	x	100%	14%	66-51-16	INNOLIPA	< age at sexual debut	rinse
2011	Journal of Oral Science	Peixoto A ³⁶	Brasile	X	100	x	x	100%	81%	x	MY09 MY11	alcohol	brush
2012	Sexually Transmitted Diseases	Edelstein Z ³⁷	USA	212	x	7,5%-12,3%	X	x	x	16-18-33-39	MY09 MY11 HMB01	frequency of sex	rinse+ brush + sensibil

ANNO	RIVISTA	PRIMO AUTORE	NAZIONE	MALE	FEMALE	M HPV ORALE	M HPV GENITALE	F HPV GENITALE	F HPV ORALE	GENO TIPO	METODO ANALISI	FATTORI DI RISCHIO	NOTE
													e!
2013	Gynecologic Oncology	Adamopoulos M ³⁸	Greece	X	43	x	X	51.2%	11.6%	16-31-81-84	MY09 MY11	genital infection	rinse
								60.5%	44.2%	16-31-53-73-6-77-81-84	NPCR	x	
2013	Front. Oncol	Vogt S ³⁹	South Africa	34	34	17%	59%	91%	11%	62-72	MY09 MY11	x	rinse- anche HIV+
2013	Journal of Infection	Mbulawa Z ⁴⁰	South Africa	221	221	13,5%	57%	55%	6,8%	72-55-62-61	Roche Linear Array HP	partner infection and female genital infection	brush- anche HIV+
2013	The Journal of Infectious Diseases	Widdice L ⁴¹	USA	25	25	rare	84%	82%	rare	x	Roche Linear Array HP		brush
2014	Clinical Oral Investigation	Beder Ribeiro CM ⁴²	Brasile	31	31	x	71%	58,1%	54,8%	x	MY09 MY11 GH20 PC04	> sexual partners for men, prostitute, non use of condom	brush
2014	Acta Odontol. Latinoam	Fuster-Rossello L ⁴³	Argentina	X	30	x	X	100%	30%	16 52 6	MY09 MY11	x	brush

ANNO	RIVISTA	PRIMO AUTORE	NAZIONE	MALE	FEMALE	M HPV ORALE	M HPV GENITALE	F HPV GENITALE	F HPV ORALE	GENO TIPO	METODO ANALISI	FATTORI DI RISCHIO	NOTE
2014	J Oral Pathol Med	Vidotti L ⁴⁴	Brasile	X	105	x	X	58%	24%	x	MY09 MY11 GP5/GP6	genital infection	brush
2014	International Journal of Gynecology and Obstetrics	Lima M ⁴⁵	Brasile	x	100	x	x	45%	2%	x	HPV DNA test (HC2; Digene)	x	brush
2014	Oral Oncology	Meyer FM ⁴⁶	Germania	15	129	0%	X	54%	5%	84	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen + NPCR)		Rinse +brush
2014	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Kero KM ⁴⁷	Finlandia	46	46	11%	23%	13%	13%	x	MY09 MY11 e GP5/GP6		brush
2015	Brazilian Journal of Microbiology	Gonzalez-Losa ⁴⁸	Mexico	X	383	x	X	x	15%	13-6-58-16	MY09 MY11 e GP5/GP6	NPCR molto + sensibile!	saliva
2015	Scientific Reports	Liu F ⁴⁹	China	2228	x	6%	17%	x	x	3 16	SPF1 GP6+	genital infection, multiple partners	brush
2015	J Oral Pathol Med	Marques AE ⁵⁰	Brasile	22	43	14%	X	100%	2%	x	MY09 MY11 e GP5/GP6		brush
2015	J Oral Pathol Med	Tatar TZ ⁵¹	Ungheria	34	40	18%	53%	82,5%	20%	16	MY09 MY11 e GP5/GP6	genital infection	brush

ANNO	RIVISTA	PRIMO AUTORE	NAZIONE	MALE	FEMALE	M HPV ORALE	M HPV GENITALE	F HPV GENITALE	F HPV ORALE	GENO TIPO	METODO ANALISI	FATTORI DI RISCHIO	NOTE
2016	JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.	Kedarisett y S ⁵²	USA	X	3463	x	X	45%	4%	16 59 55 62	RETROSPETTIVO	genital inf, multiple oral sex partners	rinse
2016	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	Kero K ⁵³	Finlandia	58	58	24%		22%	10%		MY09 MY11 e GP5/GP6	follow up 6 anni-regular oral sex practice	brush
2016	Eur Arch Otorhinolaryngol	Uken RB ⁵⁴	Germania	60	101	5%	X	100%	3%		MY09 MY11 e GP5/GP6	lifetime number of partners, smokers	brush
2016	Infectious Agents and Cancer	Visalli G ⁵⁵	Italia	X	100 25	x	X	100%	24% vs 8%	16-18- 45	MY09 MY11	cervical high risk-HPV lesions	saliva
2016	The Brazilian Journal of Infectious Diseases	Oliveira ⁵⁶	Brasile	X	76	x	X	9%	5%	6-17	My09 My11 FAP59/64		brush
2017	*	NOSTRO STUDIO	Italia	28	28+26 tutte pap test+	25%	1%	86%	20%	16-66	My09 My11 FAP59/64	Female: oral sex e alcol Male: n° rapporti partner	Rinse + brush+ urine

Andando più nello specifico si evince come i dati riportati dai vari studi siano spesso molto variabili e indefiniti. In particolare per quanto concerne la popolazione femminile si riportano valori percentuali della presenza del virus a livello delle mucose orali che variano dall'1 al 100%. Questo dato è sicuramente estremamente variabile in considerazione del fatto che la selezione dei soggetti è spesso fatta con parametri estremamente diversi a partire dalle caratteristiche demografiche, geografiche, presenza di lesioni a livello cervicale per proseguire poi con tutti quelli che possono essere fattori di rischio associati ad un maggior rischio di contrarre l'infezione (n° partner in primis).

Considerando invece i valori delle donne facenti parti di coppie il range si riduce tra 2 e 55%. Valutando le medie sia nel campione allargato sia in quello delle sole coppie si ottiene invece un dato simile pari al 21% e al 15% rispettivamente. Il valore da noi ottenuto consta in un 20% di soggetti femminili con infezione da HPV a livello delle mucose orali: tale dato si pone in media rispetto a quelli precedentemente evidenziati confermando dunque quella che sembra essere una stima indicativa affidabile.

Per quanto riguarda invece la mucosa orale dei partner i dati già presenti in letteratura variano dallo 0 al 24%. Il valore da noi riscontrato si attesta ad una positività pari al 25%.

In questo caso sembrerebbe che il nostro valore sia nettamente superiore rispetto alla media degli altri studi.

Per quanto concerne invece la mucosa genitale maschile, nel nostro gruppo di soggetti, tramite l'analisi dell'urina, si è riscontrato un solo uomo positivo il cui genotipo coincideva anche con quello presente a livello della mucosa della compagna. In tal senso sicuramente sembra esserci una correlazione ma, visto l'esiguo numero di soggetti analizzati e l'unica positività riscontrata, è impossibile poter parlare di un rischio generalizzato di trasmissione dello stesso virus all'interno della coppia.

Per quanto riguarda i dati relativi alla mucosa cervicale, come ipotizzabile vista la positività del pap test nel corso degli ultimi 6 mesi, il virus si è riscontrato in oltre l'80% dei soggetti.

In tal senso i dati ottenuti sia dalle donne sia dagli uomini evidenziano in percentuale valori leggermente superiori alla media di quelli riscontrati nelle altre coppie riportate nella letteratura scientifica internazionale. Questo può essere in parte dovuto all'attenta selezione del campione di studio, al metodo di campionamento e alla alta sensibilità delle tecniche di isolamento utilizzate.

Per quanto riguarda i genotipi riscontrati abbiamo ottenuto un'ampia variabilità e una assenza di correlazione significativa sia nelle mucose dello stesso soggetto sia all'interno dei partner

della coppia. Questo dato contrasta in parte quanto riportato nello studio condotto sempre in Italia nel 2011 in cui si evidenziava una concordanza nel 27% dei soggetti esaminati. Il nostro dato si allinea invece con quello espresso nella maggior parte degli altri studi in cui non vi è concordanza tra le due sedi di infezione.

Tra i diversi fattori di rischio valutati risulta esserci una correlazione tra l'infezione a livello della donna con l'attitudine alle pratiche di sesso orale e all'utilizzo di alcolici; nell'uomo invece sembra svolgere un ruolo negativo il numero delle partner avute.

Il principale limite del nostro studio è dato dall'assenza di un gruppo controllo. In tal senso purtroppo anche gli studi condotti in letteratura evidenziano quasi tutti l'assenza di un gruppo controllo. I pochi che hanno considerato anche dei soggetti totalmente sani (non pap test positivi o assenza lesioni maschili) hanno riportato dei valori di positività che si attestano sempre al di sotto del 10%.

Un dato di riferimento per quanto riguarda la popolazione femminile pubblicato nel 2016 dal gruppo di studio dell'Università di San Diego ha riportato a seguito di un'analisi retrospettiva su un ampio campione di soggetti (3463) come l'incidenza della presenza del virus a livello delle mucose del cavo orale si attesti al 4%. Altro dato interessante è quello che attesta al solo 7% la presenza del virus a livello del cavo orale del gruppo di donne che presentano lo stesso anche a livello cervicale. I dati da noi ottenuti si discostano in modo negativo andando ad evidenziare una netta maggior compresenza del virus nelle donne con positività a livello della mucosa genitale. In tal senso il nostro risultato è simile a quello ottenuto dal gruppo di ricercatori italiani dell'Università di Palermo in cui si evidenziava una compresenza del virus in circa il 15% delle donne esaminate.

Per quanto concerne la compresenza del virus nei soggetti sani di sesso maschile possiamo citare come uno degli studi effettuati su un ampio numero di soggetti quello pubblicato nel 2015 da un gruppo di ricercatori cinesi. In questo lavoro sono stati valutati 2228 uomini sani a cui è stata fatta una valutazione della compresenza del virus sia a livello genitale che orale. I risultati ottenuti hanno evidenziato una presenza del virus nelle mucose del cavo orale pari al 6,7%. Se consideriamo dunque questi dati come sommario riferimento possiamo evidenziare che le percentuali di positività, a livello del cavo orale dei soggetti di coppie in cui vi sia una lesione a livello cervicale, sono sicuramente più elevate e sembrano presupporre un aumentato rischio di compresenza del virus a livello orale.

D'altra parte bisogna anche evidenziare che non abbiamo riscontrato una correlazione più specifica in relazione ai genotipi presenti nei due distretti; questo quindi contrasta in parte l'affermazione precedente e pone l'attenzione su meccanismi di trasmissione che sembrano

essere più complessi, con una possibile sito specificità differente e con una sensibilità diversa da parte della mucosa orale rispetto a quella genitale.

Si ricordi inoltre che il cavo orale, fortunatamente, presenta un turn over cellulare molto più rapido rispetto a quello della cervice uterina, che è un ambiente aperto e costantemente in contatto con l'esterno, che ha al suo interno la saliva che rappresenta un fluido con spiccate funzioni protettive. Queste sono sicuramente delle caratteristiche che rendono la mucosa orale meno facilmente colonizzabile da parte del virus stesso.

Da un punto di vista clinico abbiamo riscontrato solo in due soggetti delle lesioni riconducibili al papilloma virus: in entrambi i casi (un uomo e una donna) si trattava di condilomi. I soggetti sono stati informati nel contesto della stessa visita.

In nessun altro soggetto sono state evidenziate lesioni HPV correlate.

Una donna presentava una lesione aspecifica, con aspetti ulcerativi di circa 1,5 cm. Anche lei, informata, è stata invitata a tornare a distanza di una settimana per un ulteriore controllo ma non si è presentata.

Un altro limite dello studio è da considerarsi anche nel non elevato numero di soggetti esaminati.

Un aspetto sicuramente interessante per poter meglio comprendere la patogenesi dell'infezione da papilla virus a livello delle mucose del cavo orale sarebbe quello di andare ad effettuare degli studi longitudinali su soggetti con presenza del virus. Solo in questo modo si sarebbe in grado di capire al meglio quelli che effettivamente possono essere dei fattori di rischio per lo sviluppo di lesioni HPV correlate e, dal canto opposto, individuare eventuali fattori protettivi.

10. CONCLUSIONI

La presenza dell'HPV nelle mucose orali dei soggetti di coppie che presentano una lesione cervicale risulta essere significativamente superiore rispetto ai valori riportati in soggetti sani.

Non sembra esserci una significativa correlazione in merito allo specifico genotipo presente a livello genitale e orale sia all'interno dello stesso soggetto sia nelle mucose del partner.

La presenza del virus a livello del cavo orale risulta essere nella quasi totalità dei casi asintomatica.

I fattori di rischio che sembrano essere correlati ad un aumentato rischio di infezione da parte di HPV sono l'uso di bevande alcoliche, la pratica di sesso orale e, specie nei soggetti maschili, un elevato numero di partner.

Rispetto alla possibilità di contrarre infezioni a livello della mucosa genitale, la mucosa orale risulta comunque essere meno recettiva per il virus; il turnover cellulare è diverso e inoltre vi è la presenza di numerosi fattori di protezione aspecifici contenuti in particolare nella saliva.

I dati ottenuti fanno riferimento ad un numero ancora troppo ridotto di soggetti per poter essere considerati quali dati certi. D'altra parte, a fronte di un aumento della casistica, sembra sicuramente da considerare utile il fatto di poter andare a controllare in modo preventivo anche le mucose del cavo orale in quei soggetti con lesioni cervicali e nei loro rispettivi partner.

Il rischio di presentare una infezione da HPV anche a livello del cavo orale non sembra essere correlato direttamente alla presenza del virus a livello genitale: in tal senso infatti non si è riscontrata una concordanza significativa tra i genotipi isolati. La compresenza del virus potrebbe dunque non essere causata da un contagio diretto dalla sede genitale a quella orale (o viceversa) ma sembra poter essere dovuto ad una suscettibilità intrinseca del singolo soggetto. A riprova ulteriore il fatto che l'utilizzo di contraccettivi orali o del preservativo non siano fattori che influenzano la presenza del virus a livello del cavo orale. Ciò significa che la trasmissibilità non sembra essere prettamente da ricercarsi a seguito dei rapporti sessuali.

Detto ciò è comunque auspicabile che vengano migliorate tutte quelle forme di prevenzione contro le infezioni da HPV considerando anche il ruolo del virus nel contesto dei tumori del cavo orale. In questo senso, come per la donna, riteniamo possa essere utile e giusto che vi sia una sensibilizzazione per il trattamento con il vaccino anche per i soggetti maschili.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1) Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29:4294–301.
- 2) Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010;11:781–9.
- 3) Hong AM, Grulich AE, Jones D, Lee CS, Garland SM, Dobbins TA, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine* 2010;28:3269–72.
- 4) Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1671–7.
- 5) Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013;31:4550–9.
- 6) Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29(32):4294–301.
- 7) Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB. The “new” head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;151(3):375–80
- 8) Murphy B, Day TA. MUSC ENT Update : Sept 2014
- 9) Centers for Disease Control and Prevention. How Many Cancers Are Linked with HPV Each Year? Available at: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm>. 2014.
- 10) D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944–56.

- 11) Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010;11:781–9.
- 12) Hong AM, Grulich AE, Jones D, Lee CS, Garland SM, Dobbins TA, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine* 2010;28:3269–72.
- 13) Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1671–7.
- 14) Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013;31:4550–9.
- 15) McIlwain WR, Sood AJ, Nguyen SA, Day TA. Initial symptoms in patients with HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140(5):441–7.
- 16) Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(4):261–9.
- 17) Haughey BH, Sinha P. Prognostic factors and survival unique to surgically treated p16+ oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012;122(Suppl. 2):S13–33.
- 18) Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5630–6.
- 19) Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363(1):24–35
- 20) Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:412–23
- 21) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

- 22) Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1133-45.
- 23) Marur S, D'souza G, Westra W, Forastiere A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncology* 2010;11(8): 781–9.
- 24) Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125–31.
- 25) Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772–83.
- 26) Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24:736-747.
- 27) Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol* 2010;39:166–81.
- 28) Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2007;120:825–32.
- 29) Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121:1813–20.
- 30) Giraldo P, Gonçalves AK, Pereira SA, Barros-Mazon S, Gondo ML, Witkin SS.
Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 May 1;126(1):104-6.
- 31) Marais DJ, Passmore JA, Denny L, Sampson C, Allan BR, Williamson AL.
Cervical and oral human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa.

- J Med Virol. 2008 Jun;80(6):953-9.
- 32) Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Perino A, Panzarella V, Ammatuna P, D'Angelo M, Campisi G.
- Low rate of oral human papillomavirus (HPV) infection in women screened for cervical HPV infection in Southern Italy: A cross-sectional study of 140 immunocompetent subjects.
- J Med Virol. 2009 Aug;81(8):1438-43.
- 33) Sánchez-Vargas LO, Díaz-Hernández C, Martínez-Martínez A.
- Detection of Human Papilloma Virus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices.
- Infect Agent Cancer. 2010 Dec 4;5(1):25.
- 34) Saini R, Khim TP, Rahman SA, Ismail M, Tang TH.
- High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children.
- Viol J. 2010 Jun 16;7:131.
- 35) Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Caleca MP, Bellavia C, Perino A, Campisi G.
- Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature.
- Oral Oncol. 2011 Apr;47(4):244-50.
- 36) Peixoto AP, Campos GS, Queiroz LB, Sardi SI.
- Asymptomatic oral human papillomavirus (HPV) infection in women with a histopathologic diagnosis of genital HPV.
- J Oral Sci. 2011 Dec;53(4):451-9.
- 37) Edelstein ZR, Schwartz SM, Hawes S, Hughes JP, Feng Q, Stern ME, O'Reilly S, Lee SK, Fu Xi L, Koutsky LA.
- Rates and determinants of oral human papillomavirus infection in young men.
- Sex Transm Dis. 2012 Nov;39(11):860-7.

- 38) Adamopoulou M, Vairaktaris E, Nkenke E, Avgoustidis D, Karakitsos P, Sioulas V, Nisyrios T, Yapijakis C.
Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women.
Gynecol Oncol. 2013 May;129(2):395-400.
- 39) Vogt SL, Gravitt PE, Martinson NA, Hoffmann J, D'Souza G.
Concordant Oral-Genital HPV Infection in South Africa Couples: Evidence for Transmission.
Front Oncol. 2013 Dec 12;3:303.
- 40) Mbulawa ZZ, Johnson LF, Marais DJ, Coetzee D, Williamson AL.
Risk factors for oral human papillomavirus in heterosexual couples in an African setting.
J Infect. 2014 Feb;68(2):185-9.
- 41) Widdice L, Ma Y, Jonte J, Farhat S, Breland D, Shiboski S, Moscicki AB.
Concordance and transmission of human papillomavirus within heterosexual couples observed over short intervals.
J Infect Dis. 2013 Apr 15;207(8):1286-94.
- 42) Beder Ribeiro CM, Ferrer I, Santos de Farias AB, Fonseca DD, Morais Silva IH, Monteiro Gueiros LA, Carvalho AT, Porter SR, Leao JC.
Oral and genital HPV genotypic concordance between sexual partners.
Clin Oral Investig. 2014 Jan;18(1):261-8.
- 43) Fuster-Rossello L, Ribotta E, Cuffini C, Fuster-Juan M.
Human papilloma virus in oral mucosa and its association with periodontal status of gynecologically infected women.
Acta Odontol Latinoam. 2014;27(2):82-8.
- 44) Vidotti LR, Vidal FC, Monteiro SC, Nunes JD, Salgado JV, Brito LM, Lopes FF.
Association between oral DNA-HPV and genital DNA-HPV.
J Oral Pathol Med. 2014 Apr;43(4):289-92.
- 45) Lima MD, Braz-Silva PH, Pereira SM, Riera C, Coelho AC, Gallottini M.

Oral and cervical HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women attending a sexual health clinic in São Paulo, Brazil.

Int J Gynaecol Obstet. 2014 Jul;126(1):33-6.

- 46) Meyer MF, Huebbers CU, Siefer OG, Vent J, Engbert I, Eslick GD, Valter M, Klussmann JP, Preuss SF.

Prevalence and risk factors for oral human papillomavirus infection in 129 women screened for cervical HPV infection.

Oral Oncol. 2014 Jan;50(1):27-31.

- 47) Kero K, Rautava J, Louvanto K, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S.

Genotype-specific concordance of oral and genital human papillomavirus infections among marital couples is low.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Apr;35(4):697-704.

- 48) Gonzalez-Losa Mdel R, Barrera ES, Herrera-Pech V, Conde-Ferrández L, Puerto-Solís M, Ayora-Talavera G.

Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico.

Braz J Microbiol. 2015 Mar 31;46(1):301-6.

- 49) Liu F, Deng Q, Zhang C, Pan Y, Liu Y, He Z, Sun M, Liu M, Li J, Li X, Zhang C, Hang D, Ning T, Guo C, Liang Y, Xu R, Zhang L, Cai H, Ke Y.

Human papillomavirus DNA positivity and seropositivity in rural Chinese men and women: a population-based cross-sectional study.

Sci Rep. 2016 May 23;6:26343.

- 50) Marques AE, Barra GB, de Resende Oyama CN, Guerra EN.

Low rate of oropharyngeal human papillomavirus infection of women with cervical lesions and their partners: new data from Brazilian population.

J Oral Pathol Med. 2015 Jul;44(6):453-8.

- 51) Tatár TZ, Kis A, Szabó É, Czompa L, Boda R, Tar I, Szarka K.

Prevalence of human papillomaviruses in the healthy oral mucosa of women with high-grade squamous intra-epithelial lesion and of their partners as compared to healthy controls.

J Oral Pathol Med. 2015 Oct;44(9):722-7.

52) Kedarisetty S, Orosco RK, Hecht AS, Chang DC, Weissbrod PA, Coffey CS.

Concordant Oral and Vaginal Human Papillomavirus Infection in the United States.

JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2016 May 1;142(5):457-65.

53) Kero K, Rautava J, Louvanto K, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S.

Genotype-specific concordance of oral and genital human papillomavirus infections among marital couples is low.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Apr;35(4):697-704.

54) Uken RB, Brummer O, von Schubert-Bayer C, Brodegger T, Teudt IU.

Oral HPV prevalence in women positive for cervical HPV infection and their sexual partners: a German screening study.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016 Jul;273(7):1933-42.

55) Visalli G, Currò M, Facciola A, Riso R, Mondello P, Laganà P, Di Pietro A, Picerno I, Spataro P.

Prevalence of human papillomavirus in saliva of women with HPV genital lesions.

Infect Agent Cancer. 2016 Aug 26;11(1):48.

56) Oliveira LH, Santos LS, Silva CO, Augusto EF, Neves FP.

Papillomavirus infections in the oral and genital mucosa of asymptomatic women.

Braz J Infect Dis. 2016 Nov 2.

PUBBLICAZIONI EFFETUATE NEL CORSO DEL DOTTARATO

1. **Cossellu G**, Farronato G, Farronato D, Ceschel G, Angiero F.
Space-maintaining management in maxillary sinus lifting: a novel technique using a resorbable polymeric thermo-reversible gel
Int J Oral Maxillofac Surg. 2017 Feb 10
2. **Cossellu G**, Lanteri V, Butera A, Laffi N, Merlini A, Farronato G.
Timing considerations on the shear bond strength of orthodontic brackets after topical fluoride varnish applications.
J Orthod Sci. 2017 Jan-Mar;6(1):11-15.
3. **Cossellu G**, Motta V, Dioni L, Angelici L, Vigna L, Farronato G, Pesatori AC, Bollati V.
Titanium and Zirconium Levels Are Associated with Changes in MicroRNAs Expression: Results from a Human Cross-Sectional Study on Obese Population.
PLoS One. 2016 Sep 9;11(9):e0161916.
4. **Cossellu G**, Persico N, D'Ambrosi F, Carbone F, Fabietti I, Boito S, Farronato G, Fedele L, Nicolaides KH.
Sphenofrontal distance on three-dimensional ultrasound in euploid and trisomy-21 fetuses at 16-24 weeks' gestation.
Ultrasound Obstet Gynecol. 2016 Aug;48(2):177-80.
5. **Cossellu G**, Farronato G, Nicotera O, Biagi R.
Transverse maxillary deficit and its influence on the cervical vertebrae maturation index.
Eur J Paediatr Dent. 2016 Jun;17(2):147-50.
6. Brini AT, Coccè V, Ferreira LM, Giannasi C, **Cossellu G**, Gianni AB, Angiero F, Bonomi A, Pascucci L, Falchetti ML, Ciusani E, Bondiolotti G, Sisto F, Alessandri G, Pessina A, Farronato G.

Cell-mediated drug delivery by gingival interdental papilla mesenchymal stromal cells (GinPa-MSCs) loaded with paclitaxel.

Expert Opin Drug Deliv. 2016 Jun;13(6):789-98.

7. Biagi R, **Cossellu G**, Sarcina M, Pizzamiglio IT, Farronato G.
Laser-assisted treatment of dentinal hypersensitivity: a literature review.
Ann Stomatol (Roma). 2016 Feb 12;6(3-4):75-80.
8. **Cossellu G**, Farronato M, Biagi R, Assandri F, Farronato G.
Idiopathic hypoplasia of the masseter muscle: A case report Cranio - Journal of
Cranio-mandibular Practice Article in Press
9. **Cossellu G**, De Luca S, Biagi R, Farronato G, Cingolani M, Ferrante L, Cameriere R.
Reliability of frontal sinus by cone beam-computed tomography (CBCT) for
individual identification.
Radiol Med. 2015 Dec;120(12):1130-6.
10. De Giuseppe R, **Cossellu G**, Vigna L, Dicorato F, De Vita C, Venturelli G, Bamonti
F, Maiavacca R, Farronato G.
Correlation between salivary and serum oxidized LDL levels: a pilot study on
overweight/obese subjects.
J Oral Pathol Med. 2015 Nov;44(10):884-7.
11. **Cossellu G**, Farronato G, Carrassi A, Angiero F.
Accidental aspiration of foreign bodies in dental practice: clinical management and
prevention.
Gerodontology. 2015 Sep;32(3):229-33.
12. **Cossellu G**, Biagi R, Faggioni G, Farronato G.
Orthodontic Treatment of Binder Syndrome: A Case Report With 5 Years of Follow-
up.
Cleft Palate Craniofac J. 2015 Jul;52(4):484-8.
13. **Cossellu G**, Biagi R, Sarcina M, Mortellaro C, Farronato G.

Three-dimensional evaluation of upper airway in patients with obstructive sleep apnea syndrome during oral appliance therapy.

J Craniofac Surg. 2015 May;26(3):745-8.

14. **Cossellu G**, Biagi R, Pisani L, Barbieri V, Farronato G.

Relationship between mandibular second molar calcification stages and cervical vertebrae maturity in Italian children and young adults.

Eur J Paediatr Dent. 2014 Dec;15(4):355-9.

15. **Cossellu G**, Angiero F, Farronato G.

Complete pre-eruptive idiopathic crown resorption.

Pediatr Dent. 2014 Nov-Dec;36(7):147-50.

16. Farronato G, **Cossellu G**, Miani A, Ceschel G, Tremolati M, Picozzi V, Angiero F.

Effect of thermosetting gel with Doxycycline Hyclate 3% + Ketorolac Tromethamine 0.5% on postoperative discomfort after third molar surgery: A prospective randomized study

Eur J Infl. 2014 1:203-208.

17. **Cossellu G**, Seramondi R, Benedicenti S, Farronato G, Olivi G, Angiero F.

Tooth developmental anomalies in severe combined immunodeficiency disease and juvenile myelomonocytic leukemia: common clinical features and treatment outcomes.

Eur J Paediatr Dent. 2013 Dec;14(4):328-32.

18. Farronato G, Storti E, Cuzzocrea ML, Lucchese A, **Cossellu G**, Assandri F, Biagi R.

Three-dimensional changes of the upper airway in patients with obstructive sleep apnea syndrome after a non-adjustable oral appliance treatment.

Minerva Stomatol. 2013 Apr;62(4):107-16.