UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

Scuola di Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale
XXXII Ciclo

Dipartimento di Medicina Molecolare
- Unità di Anatomia Patologica-

MECCANISMI MOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELL'ONCOGENESI HPV-MEDIATA IN CAMPIONI BIOPTICI OROFARINGEI

Tutor: Prof.ssa Patrizia Morbini

Tesi di Dottorato
Dott.ssa Giuseppina Ferrario
Matricola 451311

Anno accademico 2018/2019

“Ho sceso, dandoti il braccio, almeno un milione di scale
e ora che non ci sei è il vuoto ad ogni gradino.”

Eugenio Montale

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is a small virus responsible of one of the most frequent viral infections sexually transmitted in humans. It has been identified as a driving force in cancerogenesis in various cancer types. Its role in gynecological neoplasias is well known, but HPV has a great impact even in head and neck tumors. Not all HPV types have the same possibility to induce neoplastic transformation in normal tissues: only the high-risk genotypes are involved in cancer development.

Transcriptionally active HPV infection has been recognized as the driving force of a specific subtype of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC).

By now, the gold standard used to evaluate HPV-mediated carcinogenesis is viral oncogene E6 and E7 mRNA assessment with RT-PCR, but its technical complexity and the requirement of fresh or frozen samples do restrict its employment. As a surrogate technique, algorithms pairing p16 immunostaining (previously reported as an indirect evidence of E6 activity) and HPV DNA expression are currently applied, an innovation is represented by the introduction of the in situ viral mRNA detection on histopathological slides. Various Authors and guidelines propose p16 immunostaining as a stand-alone test to evaluate HPV presence and classify a tumor as HPV-related, possibly followed by molecular characterization, but it has been demonstrated that p16 sensitivity is not always optimal: some cancers may express p16 even in the absence of HPV infection.

The present work is focused on revising the current techniques available to assess HPV status, and finding the best alternative to RT-PCR, to make feasible a precise HPV characterization for all OPSCC, in order to correctly determine which one harbor transcriptionally active HPV infection and are effectively HPV-related. The long term goal of this study is to improve patients management, diagnosis and better determine prognostic factors.

This work has examined 87 patients (there were more patients, but some have been excluded from this study because of the insufficient material) both frozen and formalin fixed paraffin embedded (FFPE) resulting in 174 samples analyzed.

Various techniques have been employed, and are listed below:

- immunohistochemistry
- in situ hybridization, both with DNA probes and mRNA probes
- PCR and RT-PCR
- HPV genotyping with reverse hybridization on nitrocellulose strips (INNO-LiPA test)

The results obtained are very complex, and still need to be fully understood.

Intersecting the results of the various techniques applied, it has been possible stratify the patients/tumors in 4 groups:

- Group 1- HPV related → 41 (47,1%) tumors p16+ and HPV presence confirmed by various methodics;
- Group 2 - HPV not related → 36 (41,4%) tumors p16- and no evidence of HPV presence;
- Group 3 - HPV not related with p16+ → 4 (4,6%) tumors p16+ but HPV absence confirmed with the molecular tests.
- Group 4 - HPV not related but with HPV DNA presence → 6 (6,9%) tumors p16- but the molecular tests revealed the presence of HPV virus, probably not a driver infection but a transient one;

An interesting observation is that the vast majority of HPV-related cases (32 of 41, 78,0%) have been diagnosed on stage I-II, while among HPV not related cases 30 out of 36 (84,3%) were stage IV.

The immunohistochemical profiles of the four groups identified were quite different: group 1 tumors showed a normal expression of the proteins involved in cellular checkpoints (p53, pRB, CDK1) and a p16 overexpression; on the contrary group 2 tumors showed p16 negativity and p53. pRB and CDK1 alterations.

The results obtained are really important: firstly it would be beneficial even for diagnostic purposes to find a new algorithm to avoid the complexity and the waste of time of performing a RT-PCR, neglecting the need of fresh samples, not always available during a small biopsy such as those to which undergo OPSCC patients.

Secondly, it would be interesting to find the best approach to classify tumors as HPV-related or not using only the FFPE samples, but it would be even better to find if it is possible to apply this new algorithm to new materials, such as cytological samples, which are easier to obtain and with a less invasive procedure. Hopefully, this new approach should be applicable even in those centers which do not have a great expertise and the resources necessary to use the gold standard.

Finally, yet importantly, these results well represent the variety of tumors that may present in the general population: the four groups proposed in this work may suggest a new classification of various tumor entities. It is important for the patient to be classified correctly: different types of tumor have also different behaviors, resulting in different prognosis and therapeutic strategies.

INDICE

1. Introduzione.....1

A. I tumori dell'orofaringe.....2

a. Carcinomi squamocellulari dell'orofaringe (OPSCC) 5

B. Human Papillomavirus (HPV) 7

a. Ciclo replicativo di HPV.....9

b. Meccanismo oncogeno promosso da HPV.....11

c. Forme di infezione.....13

d. Vie di trasmissione.....13

e. Vaccini e immunologia.....14

C. Il ciclo cellulare ed i meccanismi regolativi.....19

D. Metodiche impiegate per la valutazione dello status di HPV.....21

a. Immunoistochimica.....23

b. Ibridazione in situ.....24

c. PCR e Real time-PCR.....24

d. Ibridazione inversa su strisce di nitrocellulosa (tecnologia INNO-LiPA).....26

e. Algoritmo diagnostico.....27

2. Scopo del lavoro.....28

3. Materiali e metodi.....30

A. Casistica.....31

B. Disegno dello studio.....31

a. Immunoistochimica.....32

b. HPV-ISH a DNA.....34

c. HPV-ISH a mRNA.....35

d. Metodica INNO-LiPA.....36

e. Amplificazione selettiva di HPV-16.....40

f. Estrazione degli acidi nucleici da materiale congelato.....41

g. Real time-PCR per DNA.....43

h. Real time-PCR per DNA.....44

4. Risultati.....47

A. Descrizione della casistica.....48

B. Analisi dei biomarcatori.....50

a. HPV-DNA.....50

b. Definizione del ruolo oncogenetico con criteri standardizzati.....50

1. p16.....50

2. HPV mRNA.....51

3. Stato di integrazione del genoma virale.....51

c. Analisi di espressione delle proteine controllate dagli oncogeni virali..52

5. Discussione.....54

6. Figure.....59

7. Bibliografia.....65

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

AJCC = American Joint Committee on Cancer

APC = Antigen Presenting Cell

ASCO = American Society of Clinical Oncologist

FFPE = Formalin Fixed and Paraffin Embedded

HPV = Human Papilloma Virus

IHC = ImmunoHistoChemistry

ISH = In Situ Hybridization

NGS =Next Generation Sequencing

OPSCC = OroPharyngeal Squamous Cell Carcinoma

ORF = Open Reading Frame

PCR = Polymerase Chain Reaction

RT-PCR = Real Time-PCR

WHO = World Health Organization

INTRODUZIONE

I TUMORI DELL'OROFARINGE

All'interno della classificazione WHO dei tumori del distretto testa-collo[1], i tumori dell'orofaringe occupano una posizione particolare, e ne costituiscono un nutrito sottogruppo, a loro volta ulteriormente suddiviso in base alla sede anatomica di origine (base della lingua, tonsille e adenoidi) ed alle caratteristiche istopatologiche della neoplasia.

In particolare, la classificazione WHO distingue:

Carcinomi squamocellulari • HPV-positivo • HPV-negativo
Tumori delle ghiandole salivari • Adenoma pleomorfico • Carcinoma adenoidocistico • Adenocarcinoma polimorfo

Tumori ematolinfoidi
• Linfoma di Hodgkin, *nodular lymphocyte predominant*
• Linfoma di Hodgkin classico
  o con sclerosi nodulare
  o a cellularità mista
  o ricco di linfociti
  o con deplezione linfocitaria
• Linfoma di Burkitt
• Linfoma follicolare
• Linfoma mantellare
• Linfoma/leucemia T-linfoblastico/a
• Sarcoma follicolare a cellule dendritiche

Tabella 1: Classificazione WHO dei tumori dell'orofaringe

Carcinomi squamocellulari dell'orofaringe (OPSCC)

I carcinomi squamocellulari dell'orofaringe rappresentano di gran lunga la neoplasia maligna più comune in questa sede anatomica.

A livello istologico, l'orofaringe (si veda Figura 1 per il riferimento anatomico) è caratterizzata dalla presenza di strutture anatomiche particolarmente soggette ad infezioni, anche da parte di virus oncogeni, quali HPV.

I carcinomi squamocellulari dell'orofaringe possono essere ulteriormente suddivisi in due entità tumorali diverse tra di loro: OPSCC HPV-correlati e OPSCC non correlabili all'infezione virale.

Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento nell'incidenza di OPSCC HPV-correlati[2-3], al punto che questa neoplasia è stata riconosciuta come un'entità a sé stante all'interno delle classificazioni internazionali.

Gli OPSCC HPV-correlati si distinguono dai loro analoghi non correlati all'infezione virale innanzitutto per una serie di fattori epidemiologici, tra cui differenze di natura geografica ed etnica.

In primo luogo, gli OPSCC HPV-correlati colpiscono prevalentemente uomini (rapporto ♂ : ♀ di 4:1) di razza caucasica, di età media di circa 50 anni, con uno status socioeconomico elevato[3-6] e una minor esposizione ai fattori di rischio tradizionali come fumo di tabacco e alcol. Il fattore di rischio principale è rappresentato dai comportamenti sessuali, tra cui i rapporti oro-genitali, anche se si è notata una correlazione tra il fumo di sigaretta e la progressione dall'infezione virale allo sviluppo del tumore.

A livello eziologico, gli OPSCC HPV-correlati si distinguono per la presenza nelle cellule neoplastiche del virus HPV, soprattutto dei genotipi a più alto rischio oncogeno, tra cui HPV-16, che risulta essere responsabile della maggior parte dei casi[4].

Anche dal punto di vista morfologico gli OPSCC HPV-correlati presentano delle peculiarità che consentono di distinguerli dalle forme tradizionali: tipicamente, pur trattandosi di carcinomi squamocellulari, presentano frequentemente una morfologia non-cheratinizzante (assenza di perle cornee), raramente hanno fenomeni di displasia a carico dell'epitelio superficiale; le cellule tumorali presentano un elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, come elevati sono anche l'indice mitotico e quello apoptotico, che spesso conferiscono alla neoplasia un aspetto basaloide. La crescita tumorale avviene in nidi e lobuli, con presenza frequente di fenomeni necrotici nelle aree centrali. I nidi tumorali si trovano spesso immersi in uno stroma ricco in linfociti, che talvolta infiltrano nel nido neoplastico. Recenti raccomandazioni suggeriscono di non applicare agli OPSCC HPV-correlati il tradizionale *grading* citomorfologico; inoltre,

queste neoplasie presentano uno spettro variabile di caratteristiche, con la possibilità di assumere fenotipo papillare, adenosquamoso, simil-linfoepitelioma, sarcomatoide o a piccole cellule. Tuttavia, il comportamento clinico di queste varianti è molto simile a quello dei casi con morfologia tradizionale. Esiste inoltre una variante di carcinoma neuroendocrino a piccole cellule HPV-correlato, dal comportamento aggressivo, e caratterizzato dalla presenza, a livello morfologico, di cellule anaplastiche di piccole dimensioni, con nuclei ipercromatici, numerose mitosi e fenomeni necrotici. Le marcate differenze morfologiche tra OPSCC HPV-correlati e non hanno portato a formulare l'ipotesi che, dal punto di vista biologico, gli OPSCC HPV-correlati originino dell'epitelio reticolato delle cripte tonsillari, mentre quelli non-correlati originerebbero dall'epitelio squamoso di rivestimento dell'orofaringe, indistinguibile dal restante epitelio del tratto aerodigestivo superiore. A conferma di questa ipotesi, gli OPSCC HPV-correlati si localizzano prevalentemente nelle strutture tonsillari alla base della lingua e nella tonsilla palatina.

La sopravvivenza a 3 anni dei pazienti affetti da OPSCC HPV-correlati è dell'82%. È cruciale specificare che soltanto un'infezione persistente e con virus trascrizionalmente attivo può dar luogo ad una neoplasia, e che comunque la formazione di lesioni pre-cancerose e la loro evoluzione in lesioni cancerose è un processo che ha luogo in diversi anni, addirittura decadi.

Gli OPSCC non correlati ad HPV invece colpiscono una popolazione con un'età media più avanzata (circa 70 anni), i fattori di rischio maggiori come già detto sono rappresentati dall'uso/abuso di alcol e fumo di tabacco. Si tratta di tumori con una morfologia spesso eterogenea, con cheratinizzazione, presenza di reazione stromale desmoplastica, ad origine dall'epitelio pluristratificato superficiale della mucosa. A differenza degli OPSCC HPV-correlati, è necessario applicare il *grading* citomorfologico. A livello molecolare è assente HPV, ma sono riscontrabili mutazioni somatiche a carico dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e della crescita tissutale, come *TP53* e *PIK3CA,* che risultano invece *wild-type* negli OPSCC HPV-correlati[7]. La sopravvivenza a 3 anni per questo tipo di tumore è decisamente inferiore, intorno al 57%.

Il marcatore che permette la distinzione dei tumori HPV-correlati da quelli non dovuti all'infezione virale a scopo diagnostico è in primo luogo l'immunocolorazione per p16 sui campioni bioptici e chirurgici di neoplasia. Gli OPSCC HPV-correlati risultano positivi all'immunocolorazione per p16, che è considerata marcatore surrogato della presenza di infezione oncogena da HPV.

Tuttavia, l'accuratezza diagnostica dell'espressione di p16 per l'identificazione degli OPSCC HPV-correlati non è ottimale: è stato dimostrato che in alcuni casi è possibile una perdita dell'espressione di p16 nonostante la presenza del genoma virale, inoltre è noto che esistono *pathways* HPV-indipendenti che possono portare all'espressione aberrante della proteina nelle cellule neoplastiche. È quindi fondamentale incrociare la valutazione morfo-istologica del carcinoma con l'immunocolorazione per p16, in particolare occorre verificare che, in assenza di espressione di p16, il dato istologico deponga per un tumore HPV non correlato. Da un punto di vista pratico, le linee guida diagnostiche raccomandano di affiancare la colorazione per p16 alla verifica diretta della presenza del virus nel tessuto qualora siano disponibili presso il laboratorio metodiche adeguate.

L'espressione di p16 è comunque il marcatore su cui si basa la più recente classificazione AJCC che per la prima volta, nel 2018, ha introdotto come due entità distinte il "cancro dell'orofaringe HPV-mediato (p16+)" e il "cancro dell'orofaringe (p16-)" [8]. Alla base di tale scelta, per molti versi rivoluzionaria in ambito oncologico, ci sono le evidenze cliniche, accumulate in più di un decennio di studi, che evidenziano come gli OPSCC HPV-correlati hanno peculiarità cliniche che li distinguono dalla controparte non virus-indotta, e soprattutto, a causa della loro minor aggressività biologica, richiedono un trattamento meno aggressivo. Per queste ragioni, la stadiazione TNM dei tumori HPV-correlati prevede, a parità di estensione tumorale, uno stadio meno avanzato per questi ultimi rispetto ai non HPV-correlati

Nello specifico, il sistema TNM si basa sulla stadiazione dei tumori in base a tre parametri fondamentali:

- T → la dimensione della massa tumorale
- N → la presenza di metastasi linfonodali
- M → la presenza di metastasi a distanza

A ciascuno di questi tre parametri viene assegnato uno *score*, e sulla base degli *scores* totali è possibile valutare infine lo stadio (*stage*) del tumore.

La stadiazione di una neoplasia è fondamentale ai fini prognostici e terapeutici, e fornisce indicazioni indispensabili per un corretto *management* del paziente.

Principalmente è possibile distinguere un TNM clinico, denominato cTNM, che viene valutato sulla base dei dati clinico-anamnestici ottenuti mediante esami strumentali, visite ed interventi

in pazienti non ancora sottoposti a terapia; ed un TNM patologico, o pTNM, di più stretta competenza anatomopatologica, utilizzato in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, di cui ci occuperemo principalmente.

La classificazione TNM secondo AJCC delle due entità riporta alcune differenze, che verranno in seguito trattate.

Per quanto concerne il parametro T nei tumori p16+ non esiste Tis corrispondente alla presenza di un carcinoma *in situ*, presente invece nei tumori p16-; inoltre T4 è unico (corrisponde a T4a dei tumori p16-), mentre nei tumori p16- viene ulteriormente distinto in T4a e T4b, dove con T4b si identifica una malattia localmente molto avanzata non riportata nella classificazione dei tumori p16+.

Enormi differenze riguardano invece il parametro N: molto più semplici sono sia la classificazione clinica sia la classificazione patologica dei tumori p16+, dove per nessuna delle categorie N vengono definiti dei sottogruppi. Al contrario, nei tumori p16-, la categoria N2 include le tre sottocategorie N2a, b e c, che si distinguono tra loro per la lateralità dei linfonodi coinvolti e per le loro dimensioni; analogamente la categoria N3 viene ulteriormente divisa in N3a e N3b.

Non vi sono differenze, invece, nella definizione del parametro M.

HUMAN PAPILLOMAVIRUS – HPV

Papillomavirus fu descritto per la prima volta nel 1933 dai due scienziati del Dipartimento di Patologia animale e vegetale del Rockefeller Institute, Richard Edwin Shope e Weston Hurst, i quali pubblicarono un lavoro riguardante una malattia che si presentava nei conigli selvatici. I roditori affetti presentavano verruche in varie parti del corpo, soprattutto a livello di cosce, addome, collo e spalle. Nell'articolo si faceva inoltre riferimento ad esperimenti di trasmissione condotti sia su animali selvatici sia su animali domestici. In particolare, veniva preparata una sospensione contenente le lesioni asportate dai conigli infetti, che veniva opportunamente allestita per l'inoculazione in animali sani, la quale veniva praticata mediante scarificazione. Dopo un tempo di incubazione di 6-12 giorni erano quindi macroscopicamente visibili le prime lesioni. Nel lavoro venivano quindi descritti una serie di esperimenti volti a studiare "l'agente inducente le verruche", che si dimostrò essere neutralizzato dai sieri ricavati da animali precedentemente infettati, che contenevano quindi gli anticorpi neutralizzanti l'agente infettivo, resistente al calore e che superava la filtrazione. L'agente causativo delle verruche fu quindi identificato come un virus, alla luce dei risultati dei numerosi test condotti.[9]

Papillomavirus Umano HPV (Figura 2) è un virus appartenente alla famiglia Papillomaviridae. Si tratta di un virus privo di *envelope*, con un capside icosaedrico del diametro di circa 55 nm e un peso molecolare di $5 \cdot 10^6$ Da , formato da 72 pentameri della proteina maggiore del capside L1 e da circa 12 molecole della proteina minore del capside L2. Il capside contiene un genoma circolare a doppio filamento di DNA della lunghezza compresa tra 5748 e 8607 bp [10-11].

A livello tassonomico, la famiglia si divide in due sottofamiglie: *Firstpapillomavirinae* e *Secondpapillomavirinae*. Di queste la seconda include un solo genere con una singola specie, mentre la prima consta di oltre 50 generi con più di 130 specie; ad oggi sono stati isolati oltre 200 genotipi diversi di HPV. Il nome del genere viene dato seguendo l'alfabeto greco (Alpha-, Beta-, ecc.)[10-12], mentre i genotipi sono indicati con un numero.

Il genoma del virus (Figura 3) è diviso in tre regioni funzionali:

- URR o LCR (Upstream Regulatory Region o Long Control Reagion), contenente l'origine di replicazione del DNA virale ed i siti di legame per i fattori di trascrizione;
- Regione precoce/*early* (E), contenente le *open reading frames* (ORFs) codificanti per le proteine deputate alla replicazione, alla trascrizione ad alla manipolazione della cellula ospite;

- Regione tardiva/*late* (L), contenente i geni che codificano per le proteine del capside L1 e L2.

La ORF L1 è quella, a livello evolutivo, maggiormente conservata (la seconda è E1), per questo motivo viene utilizzata a livello filogenetico per discriminare nuovi tipi virali: un nuovo tipo virale, di cui si dispone della sequenza genomica completa, deve avere un'omologia di sequenza di L1 inferiore al 90% rispetto al tipo ad esso più vicino. Differenze in omologia di sequenza di L1 comprese tra il 2% ed il 10% portano, invece, a definire un nuovo sottotipo, mentre una differenza inferiore al 2% definisce una variante[12-13].

Le ORFs o geni virali presenti nel genoma di HPV sono:

- E1 → codifica per un'elicasi virale. Contiene tre domini funzionali: il dominio N-terminale; il dominio centrale, responsabile della formazione del complesso con E2 e del legame con il sito di origine della replicazione; ed il dominio C-terminale. È parte di quest'ultimo a fungere da elicasi, che lega e svolge il DNA virale, rendendolo così accessibile al complesso di replicazione. Inoltre, contribuisce alla rottura del DNA nella cellula ospite, rendendo possibile l'integrazione;
- E2 → in forma intera codifica per un fattore di trascrizione; la forma troncata della proteina, che si origina da una fusione E8^E2, è un repressore di trascrizione per E6 ed E7. E2 contiene anche il sito di taglio del genoma circolare di HPV, l'avvenuto taglio porta alla linearizzazione del DNA virale, che può quindi essere integrato nel DNA della cellula ospite. E2 è inoltre coinvolta nel rimodellamento della cromatina della cellula ospite e nel trasferimento alle cellule figlie di copie episomali del DNA di HPV. E2 ed E1 formano un complesso che lega il sito di inizio della replicazione, infatti la loro presenza è necessaria affinché inizi la replicazione; dopo il legame E2 viene espulsa dal complesso, mentre E1 recluta gli attori necessari per la replicazione del genoma virale (enzimi quali topoisomerasi, DNA-polimerasi e la proteina RPA);
- E3 → presente solo in alcuni tipi di HPV, la sua funzione è ad oggi ignota
- E4 → lega i filamenti di citocheratina distruggendone la struttura e facilitando il rilascio dei virioni. Si pensa sia inoltre coinvolta nel meccanismo di evasione del virus dal sistema immunitario;
- E5 → codifica per una proteina transmembrana con ruolo nell'apoptosi e nell'evasione dalla risposta immunitaria. E5 interferisce con diversi *pathways* cellulari, avendo quindi ruoli nella crescita, nella sopravvivenza, nella differenziazione, nella motilità e nell'adesione

cellulare, promuovendo l'attività trasformante di E6 ed E7. E5 gioca un ruolo chiave nel "malfunzionamento" della presentazione degli antigeni virali (riduce l'espressione delle molecole di MHC sulla superficie delle cellule infette), nell'indebolimento della risposta infiammatoria antivirale (inibisce la risposta dell'interferone e riduce l'attività delle cellule Natural Killer), e contribuisce alla sopravvivenza delle cellule infette (inibisce l'apoptosi indotta dal ligando del TNF e dal ligando di CD95);

- E6 → codifica per una proteina che lega ed inattiva p53, PDZ e le telomerasi, causando l'immortalizzazione della cellula infetta recando danni a livello genomico;
- E7 → codifica per una proteina che lega e degrada pRB ed induce instabilità genomica, portando la cellula ad accumulare mutazioni senza entrare in apoptosi; considerata l'importanza di E6 ed E7 nell'oncogenesi HPV-mediata, maggiori dettagli riguardanti le due proteine verranno forniti in una sezione a parte;
- E8 → codifica per un repressore di replicazione e trascrizione di genotipi ad alto rischio oncogeno, è presente soltanto in alcuni tipi di HPV; come precedentemente menzionato si fonde con il dominio C-terminale di E2, svolgendo così il proprio ruolo di repressore;
- L1 ed L2 → codificano rispettivamente per la proteina maggiore e minore del capside. L1 lega i recettori per l'eparan-solfato presenti sulla membrana basale dell'epitelio; L2 è deputata al *packaging* del DNA virale nei nuovi virioni.

Ciclo replicativo di HPV

HPV, non essendo dotato di polimerasi endogene, è di per sé incapace di riprodursi spontaneamente, pertanto la replicazione del DNA virale è interamente dipendente dai meccanismi cellulari.

HPV entra nella mucosa attraverso delle microlesioni che raggiungono lo strato basale dell'epitelio squamoso pluristratificato (Figura 4), lì infetta le cellule staminali, che hanno un potenziale proliferativo e possono portare allo sviluppo di un'infezione persistente.

La proteina maggiore del capside, L1, lega l'eparan-solfato, proteoglicano presente sulla superficie della cellula ospite, inducendo un cambiamento conformazionale a livello del capside, nel quale si assiste al taglio del frammento N-terminale della proteina L2. Questo comporta una riduzione nell'affinità di legame con il recettore primario, ed il legame con i recettori cellulari per la laminina, le integrine α6, α6β4 e quelle che legano il collagene; l'entrata del virione nella cellula ospite avviene grazie al sistema dell'endocitosi mediata da recettori quali clatrina e

caveolina.

All'interno della cellula ospite il capside virale viene degradato, e resta libero il DNA, che inizia un primo ciclo di replicazione in forma episomale, ossia il genoma virale resta presente nel nucleo della cellula ospite in forma circolare, distinta dal genoma cellulare. Le proteine codificate dalle ORFs della regione precoce inducono la transizione della cellula ospite alla fase S del ciclo cellulare, in questo modo le polimerasi cellulari vengono rese disponibili per HPV. L'infezione quindi si propaga lateralmente ai cheratinociti dello strato basale.

Quando un cheratinocita infetto inizia la differenziazione, oltre alla replicazione del genoma virale si ha sia l'espressione dei geni contenuti nella regione precoce sia l'espressione dei geni contenuti nella regione tardiva, per arrivare alla formazione di virioni completi solo nello strato più superficiale dell'epitelio, dove vengono rilasciati.

Il virus in forma episomale può rimanere latente e non comportare nessun tipo di sintomatologia, oppure può portare, a distanza di tempo, alla formazione di lesioni che possono essere definite, nel caso di HPV ad alto rischio, pre-cancerose, in quanto recano un alto potenziale evolutivo in lesioni francamente maligne. Quando il genoma di HPV persiste nella cellula ospite in forma episomale, alcune delle cellule infette iniziano il processo maturativo, andando incontro a mitosi ed iniziando la sintesi di DNA virale assieme alla sintesi del proprio corredo genetico. Le proteine trascritte dai geni virali stimolano la cellula infetta, anche se appartenente agli strati più superficiali dell'epitelio, a proliferare.

Il genoma virale può però, in alcuni casi (studi hanno rivelato l'integrazione del DNA virale nel 10% circa dei casi di infezione da HPV ad alto rischio oncogeno), integrarsi nel genoma della cellula ospite. Questo meccanismo è prediletto dai virus ad alto rischio oncogeno, quali HPV-16. L'integrazione può portare in seguito allo sviluppo di un carcinoma, infatti nel 70% circa dei tumori HPV correlati è stata osservata integrazione tra il genoma virale ed il genoma della cellula ospite. L'integrazione di genomi virali nel genoma umano è resa possibile dalla presenza, all'interno del genoma umano, di corte sequenza microomologhe. L'integrazione comporta il taglio e la perdita di una parte di genoma virale, che non può più essere impaccato in virioni (prodotti con il DNA virale in forma episomale), ma per contro si ha la slatentizzazione del potenziale oncogenetico di E6 ed E7, le cui attività comportano incremento dell'instabilità genomica nella cellula infetta.

Meccanismo oncogeno di HPV

Una distinzione molto grossolana dei genotipi di HPV può essere fatta prendendo in considerazione il tropismo dei vari tipi virali: esistono virus che più frequentemente infettano la cute, mentre altri sono maggiormente proni ad infettare le mucose.

In modo approssimativo il tropismo è anche indice di "pericolosità" del virus: i virus con tropismo per la cute più facilmente hanno un basso potenziale oncogeno (LR-HPV), ossia sono in grado di dare delle lesioni che non hanno un elevato rischio evolutivo, quali le verruche che comunemente si trovano su mani e piedi. Al contrario i virus con tropismo per le mucose sono quelli che danno lesioni con un maggiore potenziale evolutivo, ossia quelli che vengono definiti "virus ad alto rischio oncogeno" o, più semplicemente HR-HPV.

Come precedentemente anticipato, in molti tumori HPV-correlati il genoma virale si trova in forma integrata nel genoma della cellula ospite. I due proto-oncogeni virali E6 ed E7 codificano per le due omonime proteine, che legano ed inattivano rispettivamente p53 e pRb, trascritti dei due geni oncosoppressori *TP53* e *RB*.

Gli effetti di tale inattivazione sulle cellule infette sono l'immortalizzazione delle cellule con mantenimento della capacità proliferativa, e la tendenza delle cellule infette a sviluppare mutazioni nel DNA, che non vengono riparate per l'alterazione dei meccanismi di riparo, e si propagano nelle cellule figlie, alimentando il meccanismo oncogenetico.

Più in dettaglio, E6 si lega all'oncosoppressore p53 e ne induce la degradazione mediante un processo ubiquitina-mediato. Si ha, quindi, un'inibizione dell'effetto oncosoppressivo di p53 (proteina definita il "guardiano del genoma"), con conseguente perdita della funzione di arresto del ciclo cellulare in fase G1 e di riparazione del DNA danneggiato, inoltre non vi è più induzione dell'apoptosi nelle cellule il cui corredo genetico risulta danneggiato, questo (assieme alla perdita della funzione di pRb) causa instabilità genomica[14].

E7 lega invece le proteine pRb, p107 e p130. Solitamente pRb è in forma ipofosforilata, questa è in grado di legare e sequestrare il fattore di trascrizione E2F, la cui funzione è quella di trascrivere i geni della fase S del ciclo cellulare. pRb iperfosforilata non lega E2F, che può così traslocare nel nucleo e compiere la propria funzione di regolatore negativo della progressione del ciclo cellulare. Il legame di E7 con pRb ipofosforilata impedisce il legame di quest'ultima con il fattore trascrizionale E2F, e comporta la perdita della funzione: il fattore di trascrizione

E2F può promuovere la trascrizione dei geni necessari alla cellula per l'ingresso nella fase S, indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (nella Figura 5 è schematizzato il *pathway* sopra descritto).

Il legame E7-pRb ha anche un effetto indiretto sull'espressione di altre proteine. p16 è un inibitore della chinasi ciclina-dipendente (*CDK*), il cui ruolo è quello di inattivare pRb mediante fosforilazione e di far progredire la cellula nel ciclo cellulare; pRb regola con un *feedback* negativo l'espressione di p16: cioè quando pRb è inibita da E7, viene meno anche questa regolazione, si ha quindi un'aumentata espressione dell'oncosoppressore p16, motivo per cui l'iper-espressione di p16 può essere utilizzata come marker surrogato di cancerogenesi HPV-mediata (Figura 6).

Nei genotipi LR-HPV, l'affinità delle proteine E6 ed E7 per p53 e pRb è minore, motivo per cui il loro legame con gli oncosoppressori è meno forte, e con un legame più debole tra la proteina virale e la proteina ospite, anche l'effetto è inferiore, spiegando così la minore "pericolosità" dei genotipi LR-HPV.

Studi di *Gene Expression Profiling* condotti su tumori sia positivi sia negativi per HPV hanno dimostrato che esistono differenze notevoli tra i due gruppi: i tumori positivi per HPV hanno perdita dell'espressione della ciclina-D1 e di pRb con iperespressione di p16, mentre, al contrario, i tumori HPV-negativi mostrano iperespressione della ciclina-D1 e di pRB, con perdita di espressione di p16[15].

Questo meccanismo biologico è alla base della scelta da parte di numerose linee guida nazionali e internazionali, tra cui quelle dell'ASCO[16] di utilizzare l'immunocolorazione per p16 come marker surrogato dell'infezione oncogena da HPV. I criteri di valutazione indicano come positiva un'espressione nucleare e citoplasmatica in almeno il 70% delle cellule, con una intensità variabile da moderata a forte; resta a discrezione del patologo o dell'oncologo la possibilità di eseguire ulteriori indagini, limitando però la determinazione dello status di HPV squisitamente ai carcinomi squamocellulari dell'orofaringe.

Negli ultimi anni sono emerse evidenze che, invece, mettono in discussione l'affidabilità di p16 come marker surrogato dell'azione oncogena di HPV in tumori che iperesprimono tale proteina. I risultati più interessanti riguardano indubbiamente tumori non-orofaringei. Non sono infrequenti casi in cui un tumore iperesprime p16 in assenza di altre prove che avvallino la presenza del virus nel tessuto, sia livello vulvare[17] che nel distretto testa-collo[18-19], e l'utilità di

impiegare p16 come marker surrogato della presenza di HPV pare quindi di interesse limitato all'ambito orofaringeo. Tuttavia molto resta ancora da chiarire in questo ambito: diversi meccanismi possono sottendere l'iperespressione di p16 in assenza di attività virale.

Forme di infezione

L'infezione da HPV può avvenire in forma acuta, latente o cronica a seconda di diversi fattori, quali il potenziale oncogenetico del virus e l'attività virale.

Per *infezione acuta* si intende quella particolare fase dell'infezione in cui il virus è in grado di replicare e di produrre virioni.

Generalmente il virus viene eliminato, ma quando resta all'interno delle cellule in forma inattiva genera la cosiddetta *infezione latente*, durante la quale il virus non manifesta la propria presenza causando una sintomatologia, tuttavia può andare incontro a riattivazione anche dopo un lungo periodo di tempo.

L'infezione cronica, detta anche *persistente*, si ha invece quando il virus si mantiene in stato attivo per lunghi periodi di tempo, questo meccanismo è piuttosto comune per i genotipi ad alto rischio oncogeno, e periodicamente si ha la produzione di ingenti quantità di particelle virali.

Si può distinguere inoltre un'infezione transitoria, che si ha quando, dopo il contagio con HPV, il DNA virale resta in forma episomale e viene eliminato dal sistema immunitario dell'ospite, meccanismo che avviene, fortunatamente, nella maggior parte dei casi.

Vie di trasmissione

Si distinguono, in primo luogo, una trasmissione orizzontale ed una trasmissione verticale delle infezioni da HPV.

La trasmissione verticale avviene dalla madre (infetta) al feto o al neonato, infatti la presenza di HPV è stata documentata anche nel latte materno, nel liquido amniotico, nella cavità orale dei neonati venuti alla luce anche tramite taglio cesareo, ciò porta a postulare una trasmissione transplacentare e perinatale, non solo tramite il canale del parto[20- 22.]

Molteplici sono le vie di trasmissione orizzontale, ossia tra individui. La trasmissione sessuale gioca un ruolo predominante, tuttavia non è da dimenticare l'esistenza della trasmissione non-sessuale del virus. Il contatto della cute durante un rapporto sessuale (non solo il contatto

genitale/anale/orale, ma anche il contatto con le mani) espone il soggetto al contatto con il virus, si stima che l'80% delle donne ed il 90% degli uomini sessualmente attivi sviluppino infezione da HPV nel corso della loro vita. Tuttavia, nell'ambito della trasmissione non sessuale, si è avuto modo di rilevare la presenza di HPV anche su strumenti medici, in luoghi pubblici e si è avuto modo di osservare una via di trasmissione intra-familiare[23- 24].

Vaccini e immunologia

Il meccanismo molecolare promosso da HPV comporta una riduzione delle difese immunitarie dell'ospite al fine di mantenere l'infezione. HPV infatti porta ad una downregolazione dell'immunità innata con un ritardo nella risposta dell'immunità adattativa, in questo modo viene inibita l'eliminazione delle cellule infette.

Quanto vi è fino ad ora di noto riguardante le interazioni tra HPV ed il sistema immunitario dell'ospite è stato ricavato da studi su modelli murini, con dati confermati in pazienti affette da infezione a livello della cervice uterina, ma tale meccanismo è traslabile anche sui carcinomi orofaringei.

All'immunità innata appartengono la barriera anatomica costituita dall'epitelio, la cascata del complemento, macrofagi, granulociti neutrofili, cellule *natural killer* (NK), cellule presentanti gli antigeni (APC) e alcuni prodotti ad attività antimicrobica.

HPV è in grado di evadere i meccanismi di risposta dell'immunità innata in due modi: grazie alla capacità di replicarsi senza indurre morte cellulare, e grazie al controllo esercitato dall'espressione di proteine virali sulle APC[25].

L'attivazione parziale o la non attivazione delle APC dendritiche, risultante dal mancato effetto citolitico di HPV, comporta la tolleranza immunologica delle cellule epiteliali infette. Il numero di cellule di Langerhans, APC dendritiche residenti negli epiteli, viene ridotto dall'espressione di alcune proteine virali, e allo stesso modo si assiste ad una modificazione nel loro fenotipo in caso di infezione da HPV, rendendo così fallaci le loro risposte. Inoltre è stato osservato che l'espressione di E6 ed E7 porta una downregolazione nell'espressione del *Toll-Like Receptor 9* (*TLR9*), il cui compito è quello di indurre l'espressione di geni codificanti per fattori proinfiammatori, con il fine ultimo di indurre una risposta immunitaria.

I principali attori che intervengono, invece, nel meccanismo dell'immunità adattativa, o immunità specifica, sono i linfociti T ed i linfociti B. In particolare i linfociti T citotossici $CD8^+$ ed i linfociti *helper* $CD4^+$ (immunità cellulo-mediata), che dovrebbero essere in grado di riconoscere ed uccidere le cellule che producono proteine virali, quali E2, E6 ed E7. Il

meccanismo di evasione immunitaria promossa da HPV comporta una scarsa presentazione degli epitopi delle oncoproteine virali da parte delle APC (come sopra menzionato), risultando così in una scarsa attivazione dei linfociti T. Un'altra faccia dell'immunità adattativa è costituita dalla produzione di anticorpi da parte dei linfociti B, i target anticorpali possono essere E2, E6, E7, L1 e L2; anticorpi diretti contro le proteine del capside sono in grado di impedire l'ingresso del virus nella cellula ospite.

Gli effetti dell'infezione da HPV comportano alterazioni nella differenziazione dei macrofagi tumore-associati e nella soppressione dell'attivazione e della maturazione delle cellule dendritiche; il risultato netto è l'inefficienza della risposta immunitaria che si attiva, che aumenta la probabilità che le cellule infette subiscano la trasformazione indotta dal virus, che le porta quindi a diventare cellule con un fenotipo pre-neoplastico.
L'infezione da HPV, come molte altre, può essere contrastata in modo relativamente facile ed efficace dall'impiego di vaccini, che sono già ad oggi in commercio in diversi Paesi.
Si distinguono due tipi di vaccini, sviluppati contro HPV con due scopi differenti: i vaccini profilattici ed i vaccini terapeutici[10; 26].

I vaccini terapeutici devono invece essere diretti contro le proteine virali E6 ed E7, il loro scopo è quello di indurre una risposta immunitaria in grado di identificare ed eliminare le cellule infette.

I vaccini profilattici devono essere in grado sia di generare cellule B della memoria sia di evocare una risposta immunitaria con la formazione di anticorpi neutralizzanti, che riconoscano e leghino la proteina maggiore del capside L1, impedendo al virus l'entrata nella cellula target. Perciò i vaccini profilattici vengono realizzati utilizzando particelle *virus-like* auto-assemblanti, di modo da avere virioni privi di materiale genetico al loro interno. Si stima che la vaccinazione profilattica sia in grado di prevenire il 90% circa delle infezioni da HPV, con un effetto protettivo nei confronti dello sviluppo di neoplasie HPV-associate[27].
Fondamentale, ai fini di un'ottima campagna vaccinale profilattica, è l'andare a coprire la popolazione che non è ancora entrata in contatto con il virus, per questo motivo è utile vaccinare la popolazione più giovane (dai 9 ai 26 anni), più verosimilmente non ancora in attività sessuale.

Ad oggi esistono in commercio 3 diversi vaccini profilattici: Cervarix®, Gardasil® e Gardasil®9, quest'ultimo è attualmente il più utilizzato. Tutti e tre vengono prodotti utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante e vengono somministrati per via intramuscolare con una

posologia ben precisa e schedulata.
Cervarix® è un vaccino bivalente, commercializzato a partire dal 2008; è diretto contro HPV-16 e HPV-18, viene prodotto impiegando un sistema di espressione di Baculovirus con cellule Hi 5 derivate da *Trichoplusia ni*. Gli effetti protettivi di questa formulazione possono arrivare a superare i 10 anni. Nei soggetti dai 9 ai 14 anni vengono somministrate due dosi, la seconda dose tra i 5 e i 13 mesi dopo la prima (la somministrazione di una terza dose si rende necessaria se la seconda viene somministrata prima del quinto mese dopo la prima); nei soggetti dai 15 anni in su si somministrano invece 3 dosi a 0, 1 e 6 mesi[28].
Gardasil® è nato come vaccino quadrivalente nel 2006, ha un effetto protettivo contro HPV-16, 18, 6 e 11, ma offre una parziale cross-protezione contro le infezioni da HPV-31, 33, 35, 45, 52 e 58. Viene prodotto in *Saccharomyces cerevisiae.* Conferisce protezione per un periodo inferiore di tempo rispetto a Cervarix®. Nei soggetti dai 9 ai 13 anni vengono somministrate due dosi a 0 e 6 mesi (la somministrazione di una terza dose si rende necessaria se la seconda viene somministrata prima del sesto mese dopo la prima); nei soggetti dai 14 anni in su si somministrano invece 3 dosi a 0, 2 e 6 mesi[29].
Nel 2015 è entrato in commercio Gardasil®9, che conferisce immunità protettiva contro 9 genotipi di HPV: HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58, prodotto analogamente alla versione tetravalente. Si stima che l'utilizzo di Gardasil®9 possa ridurre il rischio di tumori ano-genitali di circa il 90%. Nei soggetti dai 9 ai 14 anni la posologia è la medesima riportata nell'analogo caso per Cervarix®; nei soggetti dai 15 anni in su si somministrano invece 3 dosi a 0, 2 e 6 mesi[30].

Ad ora esistono numerose evidenze a supporto dell'efficacia dei vaccini nella riduzione dell'incidenza nello sviluppo di lesioni pre-cancerose e cancerose; è da sottolineare il fatto che molti altri dati potrebbero emergere in futuro con il proseguo dei *follow-up*, dal momento che le prime pazienti vaccinate stanno raggiungendo l'età tipica di incidenza del cancro della cervice uterina. Molti studi dimostrano l'azione protettiva nei confronti dello sviluppo di lesioni pre-neoplastiche non solo in ambito genitale, ma anche in altri distretti corporei, quali appunto il distretto cervico-cefalico. In alcuni casi la riduzione nello sviluppo di lesioni si attesta attorno al 90%, per arrivare addirittura a superarlo, giungendo, come dimostrato da alcuni Autori, ad una riduzione del 100% nello sviluppo di determinate lesioni.

Tra i Paesi in cui dati preliminari sono già disponibili si annoverano il Canada, il Giappone e l'Australia; dove si è assistito ad una riduzione della prevalenza dell'infezione da HPV nella

popolazione vaccinata; questi dati fanno ben sperare, infatti con un'implementazione delle campagne vaccinali, anche ai soggetti di sesso maschile, in diversi Paesi, si potrebbe arrivare ad avere una copertura tale da abbattere l'incidenza di alcuni tipi di tumore[27; 31-36].

Molto più complesso è invece il discorso riguardante i vaccini terapeutici, dei quali esistono diversi prototipi tra loro molto differenti. Diverse sono infatti le strategie alla base del disegno di vaccini terapeutici, la cui efficacia deve essere testata su adeguati modelli animali. Ad oggi i modelli di infezione da HPV che meglio mimano l'infezione umana sono il modello di topo transgenico ed i modelli murini di xenotrapianto di tumore esprimente gli antigeni di HPV ad alto rischio; impiegati non solo per studiare meglio il meccanismo immunitario coinvolto nell'infezione da HPV, ma anche per testare l'efficacia di alcuni vaccini.
Un vaccino terapeutico efficace deve essere disegnato utilizzando come *target* molecolare le oncoproteine virali dei virus ad alto rischio oncogeno, coinvolti nella cancerogenesi, spesso i *target* utilizzati sono E6 ed E7, ma anche E2. Alcuni dei prototipi fino ad ora sviluppati sono stati inseriti in *trial* clinici; questi si differenziano principalmente per l'approccio impiegato per lo sviluppo. Di seguito sono riportati i tipi di vaccino ad oggi in sviluppo con relativi vantaggi e limitazioni[26].

Tipo di vaccino	Vantaggi	Svantaggi
Vettori batterici vivi (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, …)	• somministrazione per os • alta immunogenicità • molti vettori	• tossicità soprattutto per pazienti immunocompromessi • possibile immunità preesistente • anticorpi neutralizzanti possono limitare l'efficacia di un secondo utilizzo
Vettori virali (adenovirus, alpha virus, …)	• alta immunogenicità • molti vettori • possibilità di ricombinazione, con caratteristiche differenti in differenti vettori • capacità di dirigere la risposta immunitaria	• tossicità soprattutto per pazienti immunocompromessi • possibile immunità preesistente • anticorpi neutralizzanti possono limitare l'efficacia di un secondo utilizzo • predominanza della risposta immunitaria contro il vettore rispetto a quella contro gli immunogeni d'interesse
Repliconi a RNA (Sindbis virus, Semliki Forest Virus, Kunjin flavivirus …)	• alta immunogenicità • molti vettori • autoreplicazione con stabilità nell'espressione antigenica • amplificazione in cellule transfettate • non-infettività • repliconi a DNA/RNA si sono dimostrati particolarmente efficaci in studi pre-clinici	• scarsa stabilità • difficoltà di preparazione, produzione, conservazione ed utilizzo • ridotta immunogenicità in cellule transfettate per inizio dell'apoptosi (a seconda del vettore)

Peptidi sintetici	• stabilità • sicurezza • facilità di produzione • molti epitopi • possibilità di modificazioni per migliorare il legame con MHC	• necessaria mappatura degli epitopi (eventuale "personalizzazione" del vaccino implica un prolungamento dei tempi • bassa immunogenicità • restrizione HLA
Proteine ricombinanti	• stabilità • sicurezza • facilità di produzione • assenza di restrizioni MHC I	• bassa immunogenicità • predominanza della risposta umorale • difficoltà per isolazione, purificazione, trasporto e conservazione (mantenimento della catena del freddo)
DNA plasmidico	• stabilità • sicurezza • facilità di produzione, trasporto e conservazione • risposta immunitaria più forte e duratura • assenza di risposta immunitaria contro il vettore, con possibilità di somministrazioni ripetute • possibilità di costruire plasmidi con sequenza target e sequenze di adiuvanti nella risposta immunitaria, o di eliminare domini potenzialmente dannosi	• bassa immunogenicità • limitato livello di espressione per mancanza di diffusione ai tessuti limitrofi • potenziale rischio di integrazione nel DNA della cellula ospite • eventuale risposta autoimmune
Cellule APC	• alta immunogenicità • adiuvante naturale • molteplici metodi per caricare gli antigeni	• applicabile ad un unico paziente • laboriosità • costo • assenza di controlli di qualità
Cellule tumorali allogeniche	• utilizzo di antigeni tumore-associati	• scarsa presentazione degli antigeni • introduzione di cellule tumorali inattivate in pazienti (scarsa sicurezza) • necessità di cellule tumorali del paziente o di coltura cellulare analoga • non applicabilità alle condizioni pre-cancerose (assenza di cellule tumorali) • complessità

Tabella 5: Vaccini terapeutici ad oggi in studio

IL CICLO CELLULARE ED I MECCANISMI REGOLATIVI

Al fine di meglio comprendere quanto finora detto è, a questo punto, fondamentale spiegare, almeno a grandi linee, i sottili meccanismi che regolano il ciclo cellulare, e che abbiamo visto essere alterati, sebbene in modo diverso, sia durante l'infezione da HPV sia nella cancerogenesi "classica", in cui i principali attori sono invece alcol e fumo.

Il ciclo cellulare può essere definito come l'insieme ordinato di eventi che portano alla divisione controllata (incontrollata in caso avvengano le alterazioni caratteristiche della crescita tumorale) di una cellula madre per dar luogo a due cellule figlie. È un sistema molto delicato e molto finemente controllato: affinché la cellula possa progredire nel ciclo cellulare, ossia passare alla fase seguente, è necessario il superamento di *checkpoint*: "punto di controllo" durante il quale viene valutato se la cellula dispone delle caratteristiche necessarie per poter proseguire la divisione, o se invece presenta delle alterazioni che non permettono che ciò possa avvenire.

Il ciclo cellulare (Figura 7) può essere diviso in quattro fasi:
- G1;
- S (la fase in cui viene sintetizzato il DNA);
- G2;
- M (la fase in cui avviene la divisione cellulare vera e propria).

In ciascun checkpoint vengono valutate caratteristiche specifiche della cellula in divisione: durante il checkpoint tra G1 ed S vengono valutate le dimensioni della cellula, la sufficiente presenza di fattori di crescita e di nutrienti e la presenza di danni al DNA, in caso i requisiti non vengano rispettati, la cellula entra momentaneamente in quiescenza (fase G0). In caso siano presenti danni riparabili al DNA si ha l'attivazione dei meccanismi di riparo, mentre viene innescato il processo apoptotico quando si tratta di danni non riparabili. Lo scopo finale è quello di impedire che le cellule con DNA danneggiato possano dividersi e trasmettere le mutazioni alle cellule figlie. Durante il *checkpoint* interno alla fase S viene verificata la presenza di danni al DNA e la corretta replicazione dello stesso, che viene ulteriormente verificata nel corso del *checkpoint* successivo per passare dalla fase G2 a M. L'ultimo *checkpoint* avviene durante la fase M e verifica il corretto svolgimento della mitosi.

I *checkpoints* sono regolati da due tipi di proteine: le cicline e le chinasi ciclina-dipendenti (CDK). Le CDK sono enzimi che fosforilano alcune proteine mediante il trasferimento di gruppi fosforici, per compiere la propria funzione necessitano della presenza della ciclina: solo

la formazione del complesso ciclina-CDK può portare la cellula ad avanzare nel ciclo: in assenza della ciclina la CDK resta inattiva.

In presenza di alterazioni a carico dei fattori necessari per il superamento del *checkpoint*, si ha l'intervento di proteine inibitorie delle CDK, che quindi impediscono la formazione dei complessi e bloccano la progressione cellulare.

Ad esempio, l'oncosoppressore pRb (che ricordiamo essere inibito da E7 di HPV, ma deficitario anche in molti *pathways* classici di cancerogenesi) viene fosforilato dal complesso ciclina D - CDK4, pRb fosforilato non lega il fattore trascrizionale E2F, e si ha quindi la trascrizione dei geni necessari per l'avanzamento della cellula in fase S.

In questo processo interviene anche p53, il cui ruolo è quello di rilevare i danni al DNA: durante le fasi G1 e G2 p53 effettua questo controllo. Nel caso identifichi la presenza di un danno al DNA p53 attiva p21, una degli inibitori delle CDK.

METODICHE IMPIEGATE PER LA VALUTAZIONE DELLO STATUS DI HPV

La presenza di HPV nei tessuti può essere determinata mediante diverse metodiche, sia molecolari che non, queste differiscono tra loro in termini di complessità, accuratezza, sensibilità, specificità e di applicabilità sul materiale biologico preso in esame.

Una prima distinzione si ha tra test immunoistochimici e test molecolari.

I test molecolari a loro volta possono essere divisi in:

- metodi con identificazione diretta
    - ibridazione in situ (ISH)
    - southern blot
- metodi basati sull'amplificazione di un segnale
    - ibridazione in soluzione (hybrid capture)
    - Catalyzed Signal Amplification ISH (CASH)
- metodi basati sull'amplificazione di un target
    - PCR + metodiche di rilevazione o genotipizzazione.

Nella tabella sottostante sono riassunte le principali metodiche impiegate per la rilevazione della presenza del virus in neoplasie HPV-correlate reperibili in commercio[37-41].

Test	Tecnologia	Vantaggi	Svantaggi
Colorazione immunoistochimica per p16/CDKN2A	Rilevazione colorimetrica dell'avvenuto legame antigene-anticorpo	• rapidità • economicità • veloce interpretazione secondo linee-guida • localizzazione sul tessuto	• soggettività • no rilevazione diretta del virus (marker surrogato) • no genotipizzazione
Ibridazione *in situ* a DNA	Rilevazione colorimetrica dell'avvenuto legame sonda-target	• rapidità • economicità • localizzazione sul tessuto • identificazione del trascritto virale	• soggettività • no genotipizzazione • bassa sensibilità analitica • potenziale cross-reazione
Ibridazione *in situ* a RNA per E6/E7	Rilevazione colorimetrica dell'avvenuto legame sonda-target	• localizzazione sul tessuto • identificazione di forma episomale vs forma integrata del genoma virale • minima genotipizzazione	• costo • laboriosità • soggettività • potenziale cross-reazione • minore sensibilità analitica

PCR genotipo-specifica	Amplificazione di segmenti di DNA/RNA d'interesse mediante PCR *multiplex*	• sensibilità • semplicità • rapidità • facilità di interpretazione	• risultati "limitati" ai genotipi studiati • laboriosità e limiti tecnici (per più genotipi occorrono più reazioni)
RT-PCR	Amplificazione di segmenti di DNA/RNA d'interesse	• altissima sensibilità • rapidità • applicabilità a molteplici tipi di campione • possibile quantificazione del carico virale	• impossibilità di distinguere infezione tra tumore e tessuto sano adiacente al tumore (ovviabile in campioni FFPE dissezionando tessuto tumorale)
Qiagen Digene HC2 High-Risk HPV DNA Assay (Hybrid Capture® 2)	Ibridazione di sonda a RNA con DNA virale; ibridi DNA-RNA catturati da anticorpi specifici immobilizzati su supporto, l'aggiunta di anticorpi secondari (che riconoscono gli ibridi) coniugati con un enzima e rilevazione chemioluminescente	• rilevazione di 13 genotipi di HPV (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)	• assenza di controllo sull'adeguatezza dei campioni • volume del campione (ne serve molto) • potenziale cross-reazione • no genotipizzazione • impossibilità di discriminare infezioni transienti da oncogeniche
Hologic Cervista HPV HR Assay o 16/18)	Rilevazione fluorescente dell'avvenuto legame sonda-DNA virale	• variante "HR Assay" rileva 14 genotipi virali (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) • variante 16/18 usa sonde specifiche per i due genotipi	• no genotipizzazione • impossibilità di discriminare infezioni transienti da oncogeniche
Roche Cobas HPV Test	RT-PCR multiplex	• ideale per screening • rapidità • rileva 14 genotipi virali (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	• no genotipizzazione • impossibilità di discriminare infezioni transienti da oncogeniche
Hologic Aptima HPV e 16 18/45	Rilevazione chemioluminescente dell'avvenuto legame sonda mRNA virale con amplificazione del *target* e retrotrascrizione	• prima variante rileva 14 genotipi virali (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) • seconda variante permette genotipizzazione di HPV-16 e HPV-18 e/o 45	• no genotipizzazione

INNO-LiPA	Ibridazione inversa su strisce di nitrocellulosa	• altissima sensibilità • rapidità (relativa 2-3 giorni) • applicabilità a molteplici tipi di campione • genotipizzazione • rilevazione di co-infezioni	• impossibilità di discriminare infezioni transienti da oncogeniche • laboriosità
Sequenziamento massivo parallelo	Sequenziamento mediante *Next Generation Sequencing* (possibilità di *Sanger sequencing*)	• identificazione di tutti i genotipi e di tutte le eventuali mutazioni rispetto alle sequenze di riferimento • impiego per ricerca	• costo elevato • laboriosità • complessa interpretazione (fornisce anche informazioni inutili a fini diagnostici) • impossibilità di discriminare infezioni transienti da oncogeniche
Pannello di metilazione	PCR metilazione-specifica di DNA post trattamento con bisolfito o sequenziamento di geni frequentemente metilati (impiego NGS)	• altissima specificità per lesioni pre-neoplastiche	• laboriosità • complessa interpretazione

Tabella 6: Metodiche impiegate per la rilevazione di HPV

Di seguito verranno trattate soltanto le metodiche impiegate per lo svolgimento di questo studio.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica (IHC) è una tecnica messa a punto negli anni '70 del Novecento.

Mediante questa metodica è possibile evidenziare la presenza di una determinata molecola (antigene) all'interno di materiale di varia natura.

La rivelazione dell'antigene viene eseguita utilizzando un anticorpo primario che si lega ad esso, all'anticorpo primario si legherà in seguito un anticorpo secondario facente parte di un sistema di rivelazione con amplificazione del segnale.

Tale sistema di rivelazione è spesso composto, oltre che dall'anticorpo secondario diretto contro l'anticorpo primario, da un enzima coniugato all'anticorpo secondario, un enzima comunemente impiegato è la perossidasi di rafano, che all'aggiunta del proprio substrato (perossido d'idrogeno)

e di un cromogeno porta alla formazione di precipitato in corrispondenza del punto di legame anitigene-anticorpo.

Uno dei più comuni cromogeni impiegati in immunoistochimica è la 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB), che dà un precipitato di colore marrone.

Ibridazione in situ (ISH)

L'ibridazione in situ (ISH) è una metodica che permette di rivelare la presenza di materiale genetico riconducibile ad HPV nel tessuto in esame su preparati istologici. Si utilizzano delle sonde (genotipo-specifiche oppure dei *cocktails* di sonde a seconda di cosa si voglia cercare) marcate, che riconoscono e si legano a specifiche sequenze target di DNA (nel caso di cerchi il genoma virale) o RNA (se invece si vuole verificare la presenza del trascritto).

Il primo passaggio è la denaturazione del materiale genetico (presente sul tessuto) e delle sonde, ciò avviene scaldando ad alta temperatura i vetrini. Segue poi un raffreddamento, che consente alla sonda marcata di ibridarsi nel tessuto con la sequenza ad essa complementare.

L'avvenuta ibridizzazione viene visualizzata per determinazione indiretta: ad esempio utilizzando un anticorpo diretto contro un enzima coniugato ad un sistema cromogeno/substrato (simile a quanto descritto per l'immunoistochimica). Questo porta alla formazione di un precipitato colorato nel sito del legante della sonda.

PCR e Real time-PCR

La PCR è una metodica basata sull'amplificazione enzimatica di una specifica sequenza nucleotidica, consente di amplificare fino a 10^8 volte la specifica di interesse, che può essere presente anche in minima quantità nel campione di partenza.
Il primo passaggio, dopo aver selezionato la sequenza da amplificare, è quello di scegliere la giusta coppia di *primers* necessari per l'amplificazione. I *primers* sono delle corte sequenze oligonucleotidiche che delimitano agli estremi la sequenza da amplificare. I *primers* vengono disegnati in modo da essere complementari a sequenze vicine al frammento da amplificare, e sono disposti con orientamento opposto sui due filamenti (*primer forward* 5'-3' e *primer reverse* 3'-5').
L'enzima che attua l'amplificazione è una DNA-polimerasi termostabile, che lega il complesso *primer*-sequenza sul filamento e copia il filamento stampo. Per l'esecuzione della reazione è necessaria la presenza di alcuni fattori: deossi-nucleotidi, cloruro di magnesio ed un tampone

contenente i fattori necessari per il funzionamento dell'enzima.

Per l'identificazione del DNA di HPV si possono usare diversi tipi di *primers*, che possono essere genotipo-specifici oppure dei *consensus primers,* questi ultimi amplificano gruppi di genotipi senza discriminare il singolo genotipo virale. I più utilizzati sono i *primers* che amplificano porzioni della regione L1 del virus (già discussa in precedenza). In particolare, esistono tre tipi di *primers*:

- *consensus primers* degenerati MY09/MY11[42], permettono l'individuazione, in un unico esperimento, dei genotipi HPV-6, 11,16, 18,26, 31, 33, 35, 39, 40 ,42, 45, 51, 58, 59, senza però discriminarli singolarmente. Amplificano una sequenza di 450bp, quindi non sono impiegabili per l'amplificazione del DNA frammentato proveniente tessuto fissato e incluso;
- primers GP5/GP6, disegnati da Van Den Brule[43], amplificano frammenti di 150bp di DNA, amplificano i genotipi HPV-6, 11, 18, 31, 33, senza discriminarli;
- primers SPF-10, disegnati da Kleter[44], amplificano segmenti di 65bp, identificano contemporaneamente e discriminano più genotipi.

La real-time PCR è una variante, o meglio un'evoluzione, della PCR classica. Questa metodica permette sia l'amplificazione sia la quantificazione del materiale genetico di partenza. Spesso viene combinata con la RT-PCR, dove RT significa *Reverse-Trascriptase*. Questa ulteriore variante trova un larghissimo impiego, in quanto, a differenza degli altri tipi di PCR, utilizza come stampo il trascritto a RNA, che viene quindi retro-trascritto in un DNA a doppio filamento, chiamato cDNA (c = complementare). La reazione di amplificazione segue quindi la retro-trascrizione. Per la valutazione in tempo reale dell'amplificazione è necessario l'impiego di sostanze fluorescenti. Esempi di queste sostanze sono il SYBR Green, intercalante fluorescente che lega il DNA a doppio filamento indipendentemente dalla sua sequenza; e le sonde Taq-Man, corte sequenze oligonucleotidiche complementari ad una parte della sequenza che deve essere amplificata, queste sonde sono costruite avendo alle estremità un *reporter* fluorescente ed un *quencher* che spegne la fluorescenza del *reporter*, durante l'amplificazione la DNA-polimerasi stacca il *quencher*, permettendo al *reporter* di emettere fluorescenza; esistono inoltre altri tipi di sonde costruite utilizzando lo stesso principio.

Ad oggi, la real time-PCR con amplificazione del messaggero degli oncogeni virali E6 ed E7 rappresenta il *gold standard* per la determinazione della presenza di HPV trascrizionalmente attivi in un campione; il grosso limite della metodica è che può essere usata soltanto con materiale fresco o congelato, in quanto l'estrazione di RNA da materiale fissato ed incluso è

piuttosto indaginosa, e che il materiale che eventualmente si ottiene è frequentemente molto degradato, inficiando così il risultato delle seguenti analisi. Negli ultimi anni si è assistito però allo sviluppo di una serie di kit utilizzabili per l'estrazione di RNA da materiale d'archivio fissato e incluso.

Un'ulteriore applicazione della RT-PCR nello studio dello *status* HPV è la valutazione dell'integrazione del DNA virale nel DNA della cellula ospite. Questo viene reso possibile dall'utilizzo di *primers* genotipo-specifici per gli oncogeni virali E2 ed E6: partendo dalla quantificazione dei due geni mediante RT-PCR si procede nel valutare il rapporto tra le loro quantificazioni, andando così a definire, a seconda del risultato di tale rapporto, se il virus si trovi in forma integrata o meno.

Ibridazione inversa su strisce di nitrocellulosa (tecnologia INNO-LiPA)

La tecnologia INNO-LiPA prevede l'accoppiamento di una PCR multiplex con un'ibridazione inversa selettiva con delle sonde oligonucleotidiche immobilizzate su una membrana (striscia) di nitrocellulosa.
Il test INNO-LiPA sfrutta un *pool* di *primers* SPF-10 degenerati, che possono amplificare anche il DNA altamente frammentato che si trova in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina[44].
Il kit di genotipizzazione attualmente in commercio è INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II, della Fujirebio (ex Innogenetics). È stato approvato dalla Comunità Europea per uso diagnostico. Ha una sensibilità analitica del 96%, ed è possibile mediante questo kit rilevare la presenza più genotipi in un unico campione partendo anche da un basso numero di copie di DNA virale. La specificità analitica (capacità di rilevare la presenza/assenza del genoma virale) è del 100% ed ha un'accuratezza (grado di concordanza della media dei risultati ottenuti con quelli veri) del 96.5%.
Il kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II permette l'identificazione di 32 genotipi virali distinti tra rischio oncogeno alto, intermedio, basso e non classificabile.

Esiste quindi una pletora di metodiche che, in maniera diretta o indiretta, consentono di individuare un'infezione oncogena da HPV.
L'immunocolorazione per p16, rapida, economica, di semplice esecuzione anche su campioni FFPE, permette l'osservazione della morfologia tissutale; presenta però i limiti dell'essere legata alla soggettività dell'operatore in lettura, dell'essere non sempre direttamente legata

all'infezione da HPV (esistono infatti altri *pathways* oncogenetici che potrebbero portare alla sua sovraespressione soprattutto in siti diversi dall'orofaringe) e del non permettere una genotipizzazione.
L'ibridazione *in situ* a DNA e RNA, relativamente veloci, di semplice esecuzione anche su campioni FFPE, che permettono di valutare anche la morfologia del tessuto; risentono però dell'esperienza dell'operatore nella lettura e del fatto che non è possibile genotipizzare i virus coinvolti.
L'analisi mediante RT-PCR e la sua variante per valutare l'integrazione del DNA virale, metodiche indubbiamente eccellenti nella rilevazione di infezioni oncogene, che presentano però il grosso limite di avere la necessità, almeno per ora, di partire da materiale fresco o congelato, e che permettono una parziale genotipizzazione (ricordiamo che occorre utilizzare dei *primers* genotipo-specifici).
L'ibridazione inversa su strisce di nitrocellulosa, saggio INNO-LiPA, validissimo per molti aspetti e versatile, talmente sensibile, però, da non discriminare tra infezioni oncogene e transienti.
Questa enorme variabilità ha quindi reso necessario l'impiego di algoritmi diagnostici, per superare i limiti ed unire i vantaggi delle varie metodiche.

Algoritmo diagnostico

Secondo i dati riportati in letteratura, non esistono metodi che abbiano singolarmente un'accuratezza sufficiente per determinare la presenza di una infezione oncogena da HPV nei campioni di routine di carcinomi squamocellulari orofaringei, sia a scopo di diagnostica sia a scopo di ricerca, dal momento che lo *standard* di riferimento è l'amplificazione dell'mRNA di E6/7 che richiede che il materiale sia fresco e non può essere applicata su campioni fissati.
Per questo motivo sono stati proposti diversi algoritmi diagnostici, che utilizzano due o più dei metodi sopracitati. In armonia con le linee guida, il test iniziale è rappresentato dall'immunoistochimica per p16 seguito poi, nei casi p16-positivi, dalla ricerca di DNA virale con ISH e/o diverse metodiche basate sulla PCR per HPV.[45] (Figura 8).

SCOPO DEL LAVORO

I carcinomi HPV correlati costituiscono un sottogruppo riconosciuto della categoria generale dei carcinomi squamocellulari dell'orofaringe. Secondo le linee guida internazionali, al momento della diagnosi è necessario distinguere i carcinomi dell'orofaringe HPV correlati da quelli indotti da altri fattori di rischio, perché i pazienti possono beneficiare di un trattamento meno aggressivo.

Per definizione in maniera univoca un carcinoma dell'orofaringe come HPV-correlato è necessaria l'identificazione di mRNA degli oncogeni virali mediante RT-PCR nelle cellule neoplastiche, metodo a tutt'oggi considerato lo standard di riferimento diagnostico, ma difficilmente applicabile nella routine diagnostica. Le tecniche di laboratorio alternative disponibili per l'identificazione dell'infezione da HPV sono estremamente eterogenee per complessità e accuratezza, e nessuna di esse, da sola o in combinazione, è stata riconosciuto come ottimale. Sebbene nella pratica clinica le linee guida raccomandano la valutazione dell'espressione della proteina p16 mediante immunocolorazione, l'accuratezza diagnostica del test è subottimale.

Partendo dalla revisione delle metodiche di laboratorio disponibili, e dall'analisi dell'interazione tra virus e cellula ospite nel processo di trasformazione neoplastica, lo scopo di questo lavoro è stato la ricerca di biomarcatori maggiormente efficaci (rispetto alla convenzionale valutazione dell'espressione di p16) per la determinazione dell'infezione trascrizionalmente attiva da HPV in campioni provenienti da pazienti con OPSCC.

MATERIALI E METODI

Casistica

Lo studio ha coinvolto 87 pazienti con diagnosi di carcinoma squamocellulare dell'orofaringe diagnosticati presso la Clinica Otorinolaringoiatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia tra il 2013 ed il 2018. Per ciascuno dei pazienti sono state raccolte due tipologie di campioni:

- materiale fissato e incluso, destinato primariamente a scopo diagnostico
- prelievi "a fresco" destinati ai fini sella ricerca.

Gli studi correlati alla presenza di infezione da HPV nelle neoplasie della regione testa-collo sono stati approvati dal comitato etico dell'Ospedale e sono conformi al trattato di Helsinki. Tutti i soggetti o i loro rappresentati legali avevano fornito il consenso alla conservazione dei campioni e all'impiego a scopo di ricerca.

I campioni diagnostici sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente inclusi in paraffina secondo il protocollo in uso presso l'unità di Anatomia Patologica. I blocchetti in paraffina contenenti il materiale non utilizzato dopo la diagnosi sono stati conservati presso gli archivi dell'U.OC.. Per gli scopi della ricerca i campioni paraffinati di archivio sono stati tagliati al microtomo, sono quindi stati allestiti dei vetrini silanati con sezioni istologiche di 3μm per ciascuno dei campioni.

I prelievi a fresco, dopo essere pervenuti presso il laboratorio dell'Unità, sono stati congelati in azoto liquido all'interno di appositi *criovials* opportunamente etichettati e catalogati, e conservati in azoto liquido fino al momento dell'impiego.

Per tutti i pazienti sono state revisionate le cartelle cliniche e i dati disponibili fino all'ultimo follow-up. Le informazioni anagrafiche (genere, età), i dati relativi a esposizione a fattori di rischio (fumo, alcol), quelli relativi al trattamento subito, e quelli relativi all'*outcome* clinico sono stai raccolti e tabulati in maniera anonimizzata per le successive analisi statistiche.

Disegno dello studio

Lo studio è stato svolto come segue:

1) Allestimento dei preparati istologici da materiale FFPE – 15 vetrini per campione
    a. Caratterizzazione immunoistochimica dei campioni
    b. Caratterizzazione e tipizzazione dell'infezione da HPV nei campioni FFPE
        i. Ibridazione in situ con sonde a DNA
        ii. Ibridazione in situ con sonde a RNA
        iii. Genotipizzazione mediante metodica INNO-LiPA
        iv. Amplificazione del gene E6 di HPV-16

2) Taglio al criostato dei campioni congelati
    a. Estrazione di DNA e RNA
    b. Real time-PCR

1.a Immunoistochimica

Le colorazioni immunoistochimiche, ad eccezione di p16, sono state eseguite sulla piattaforma *BenchMark XT IHC/ISH* della *Ventana Medical Systems* (*Roche*, Tucson, Arizona, USA); il kit di rivelazione utilizzato è *ultraView Universal DAB (Roche)*. L'immunocolorazione per p16 è stata invece eseguita sulla piattaforma Dako Omnis (*Dako; Agilent Technologies*, Santa Clara, California, USA).

I risultati delle reazioni sono stati valutati da un patologo esperto mediante analisi con microscopio ottico; in tutti i casi, il segnale positivo corrisponde alla formazione di un precipitato di color marrone nel sito di legame antigene-anticorpo, presente a livello nucleare o citoplasmatico, a seconda della localizzazione dell'antigene all'interno della cellula.

Gli anticorpi utilizzati sono stati:

- p16 (*BD Biosciences;* Allschwil, Svizzera) → diluito 1:25. p16 è un oncosoppressore, il suo ruolo fisiologico è quello di inibire la chinasi ciclina-dipendente 4 partecipando all'arresto del ciclo cellulare nello stesso *pathway* in cui interviene pRb, non viene espresso in modo rilevante sulle cellule epiteliali terminalmente differenziate. É stato osservato che in molti tumori si ha un'inattivazione della trascrizione del gene che codifica per p16, questo porta alla disregolazione del ciclo replicativo e di conseguenza alla proliferazione cellulare; per contro, nei tumori associati ad HPV è stata notata una sovraespressione della proteina p16. Tale sovraespressione è dovuta al fatto che l'oncoproteina virale E7 inattiva il complesso pRb-E2F, questa inattivazione è il fulcro della disregolazione del ciclo cellulare, che porta quindi alla sovraespressione di p16 con un meccanismo di feed-back negativo, e alla trasformazione delle cellule epiteliali da normali a cancerose. L'espressione di p16 è attualmente considerata il più efficace indice indiretto di infezione da HPV *driver*, trascrizionalmente attiva;
- p53 (*Dako*) → diluito 1:100. Il gene *TP53*, che codifica per la proteina p53, è considerato un oncosoppressore in quanto ha un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo e della crescita cellulare, della senescenza, del riparo dei danni al DNA e dell'apoptosi, p53 è stata definita "il guardiano del genoma". p53 riconosce che è avvenuto un danno al DNA e può attivare di conseguenza due *pathways* diversi: se il danno è riparabile si ha l'arresto della progressione del ciclo cellulare nel checkpoint durante il quale è stato rilevato il danno e si

attivano di conseguenza i meccanismi di riparo del DNA mediante l'attivazione della trascrizione dei geni che codificano per i meccanismi di riparazione; quando invece il danno al DNA non è riparabile viene attivato il processo di apoptosi. Nei tumori correlati ad infezione da HPV p53 viene inattivata dal legame con l'oncoproteina E6 in assenza di mutazioni inattivanti nel gene;

- Ciclina D1-Bcl2 (*Dako*) → diluito 1:50. La Ciclina D1 è una delle proteine che partecipano nella regolazione del ciclo cellulare; il complesso ciclina D - CDK4 è responsabile della fosforilazione dell'oncosoppressore pRb che porta alla sua inattivazione in molti *pathways* classici di cancerogenesi.
- pRb (Abcam®) → diluito 1:1000. Il gene che codifica per questa proteina è un oncosoppressore, principale regolatore della progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. La proteina funzionale lega il fattore di trascrizione E2F1, questo non può quindi traslocare nel nucleo, impedendo la trascrizione dei geni controllati da E2F1 che sono coinvolti nella progressione del ciclo cellulare. Nei tumori correlati ad infezione da HPV pRB è inattivata dal legame con l'oncoproteina virale E7; in molti *pathways* classici di cancerogenesi pRB è inattivata a monte mediante iperfosforilazione regolata dal complesso ciclina D - CDK4.

Prima di procedere con le reazioni sui campioni in studio, è stato necessario mettere a punto i parametri ottimali di reazione, mediante utilizzo di appropriati campioni di controllo positivo come indicato dalla ditta produttrice di ciascun anticorpo.

I protocolli messi a punto sulla piattaforma *BenchMark XT* variavano leggermente da un anticorpo all'altro per quanto riguarda la durata del *cell conditioning*, il tipo di *cell conditioning* utilizzato ed il tempo di incubazione dell'anticorpo.

Per ogni vetrino sono stati aggiunti 100 µL di anticorpo opportunamente diluito con il diluente *Dako REAL ™ Antibody Diluent* (*Dako*).

La colorazione eseguita su piattaforma Dako Omnis prevedeva uno smascheramento antigenico fatto con tampone ad alto pH a 97°C per 30 minuti, seguito da incubazione dell'anticorpo primario per 30 minuti ed amplificazione del segnale mediante *LINKER*.

Le reazioni immunoistochimiche sono state esaminate al microscopio e il livello di espressione di ciascun marcatore è stato valutato e registrato in base ai seguenti criteri.

- p16: è stata considerate come positiva l'espressione intensa a livello citoplasmatico e nucleare in almeno il 70% delle cellule neoplastiche. La positività in una percentuale inferiore di cellule, valutata come negativa, è stata comunque registrata[16].

- p53: è stato utilizzato il sistema di *scoring* proposto da Lassus et al.[46], che tiene in considerazione non solo le mutazioni missenso di p53, che producono una proteina stabile che corrisponde ad una intense marcatura nucleare nella maggior parte delle cellule neoplastiche, ma anche le mutazioni nonsenso, che annullano la sintesi della proteina e determinano una completa assenza di marcatura nelle cellule neoplastiche. Sulla base di questi criteri, abbiamo considerate come evidenza di mutazione di p53 sia la sovraespressione (intensa marcatura nucleare in almeno il 50% delle cellule neoplastiche) che la completa assenza di marcatura nel tumore a fronte di normale espressione (intensità più debole, percentuale variabile di cellule) nei tessuti normali circostanti (epitelio normale, tessuto linfatico) che fungono da controllo positivo interno; la marcatura in meno del 50% delle cellule neoplastiche è stata considerata espressione di p53 *wild-type*.

Per le proteine di regolazione del ciclo cellulare CDK1 e pRB, abbiamo considerato come soglia di normalità la percentuale di espressione osservata nell'epitelio delle cripte tonsillari normali, e valutato come positivi i casi con espressione superiore alla soglia stabilita. Le soglie sono state stabilite al 50% per CDK1, e al 30% per pRB.

1.b.i HPV-ISH a DNA

Le reazioni sono state eseguite sui vetrini silanati precedentemente allestiti, mediante la stessa piattaforma *BenchMark XT IHC/ISH*. Per l'esecuzione della ISH sono state utilizzate le sonde *INFORM HPV III Family 16 probes*. Le sonde del kit INFORM HPV III sono costituite da un cocktail di *probes* specifici per i più comuni genotipi ad alto rischio, marcate con dinitro-fenolo e diluite in un tampone a base di formamide. Queste sonde hanno dimostrato di ibridarsi con HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 66. Come controllo positivo al fine di verificare l'efficacia del sistema di rivelazione e l'integrità del DNA cellulare è stata impiegata la sonda *Alu Positive Control*, anch'essa forniti da Ventana Medical Systems.

Il kit di rivelazione utilizzato al fine di evidenziare l'avvenuta ibridazione è *ISH iVIEW$_{Blue}$ Detection Kit*, Ventana. Sul vetrino finito è possibile evidenziare la presenza del DNA virale come una macchia blu-viola nel nucleo delle cellule neoplastiche, data dalla formazione del precipitato, che indica l'avvenuto legame sonda-*target*. Secondo il produttore, la presenza di un pattern puntiforme di positività è indicazione indiretta di possibile integrazione del DNA virale nel genoma cellulare, mentre una colorazione uniforme dell'intero nucleo indica un possibile stato episomale del virus.

1.b.ii HPV-ISH a mRNA

La tecnica è stata eseguita sui vetrini silanati precedentemente allestiti (durante l'allestimento dei preparati per la ISH a RNA su ciascun vetrino sono state poste 3 sezioni del medesimo campione sufficientemente distanziate tra di loro) mediante le sonde del kit *RNAscope® 2.5 VS Probe- HPV-HR18*, (che riconosce l'mRNA di 18 genotipi di HPV, HPV-16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73 e 82) e il sistema di rivelazione *RNAscope® 2.5 HD—BROWN* commercializzato dalla ditta ACD – Bio-Techne (Newark; California; USA). La metodica è stata eseguita manualmente, utilizzando lo strumento *HybEZ™ II Hybridization System* per le fasi di incubazione a temperatura controllata.

Il protocollo è stato svolto come segue:

- allestimento delle sezioni
- riscaldamento dei vetrini in stufa a 60°C per un'ora
- sparaffinatura standard (2x5 minuti in xilolo; 2x1 minuto in etanolo assoluto; asciugatura all'aria a temperatura ambiente)
- riscaldamento dell'*HybEZ™* II a 40°C,
- incubazione delle sezioni con *RNAscope® Hydrogen Peroxide* (quanto basta a coprire il preparato) per 10 minuti a temperatura ambiente
- immergersione dei vetrini in *1X Target Retrieval solution* in ebollizione per 15 minuti
- risciacquo in acqua distillata
- risciacquo in etanolo assoluto e asciugatura all'aria
- creazione di una barriera idrofobica attorno a ciascuna sezione sul vetrino usando la penna *Imedge™ hydrophobic barrier*
- aggiungere la proteasi e incubare a 40°C per 30 minuti
- nel frattempo preparazione di tutti i reagenti necessari
    - scaldare a 40°C 60 mL di 50X Wash Buffer e diluirli in 2,94 L di acqua distillata
    - scaldare le sonde a 40°C per 10 minuti e lasciare raffreddare a temperatura ambiente
    - equilibrare a temperatura ambiente i componenti del sistema di rivelazione
- aggiungere su sezioni adiacenti sullo stesso vetrino le sonde DapB (controllo negativo), PoliA (controllo positivo) e la sonda *HPV-HR18*, incubare 2 ore a 40°C in *HybEZ ™*
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- ibridare con *AMP 1* a 40°C per 30 minuti in *HybEZ ™*
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- ibridare con *AMP 2* a 40°C per 15 minuti in *HybEZ ™*
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente

- ibridare con *AMP 3* a 40°C per 30 minuti in *HybEZ* ™
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- ibridare con *AMP 4* a 40°C per 15 minuti in *HybEZ* ™
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- ibridare con *AMP 5* a temperatura ambiente per 30 minuti
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- ibridare con *AMP 6* a temperatura ambiente per 15 minuti
- lavare in *1X Wash Buffer* a temperatura ambiente
- preparare una soluzione 50:50 di *DAB-A e DAB-B*, dispensare 120 µL per sezione ed incubare 10 minuti a temperatura ambiente
- lavare in acqua distillata
- controcolorare ematossilina
- disidratare e montare i vetrino con vetrino coprioggetto

I vetrini sono stati poi osservati a microscopio ottico da un patologo esperto. Anche in questo caso, la positività del segnale viene riconosciuta a livello del nucleo, con un pattern di marcatura puntiforme. Importante è la valutazione delle sezioni di controllo positivo e negativo comprese sul vetrino, per confermare la specificità del segnale (negatività del controllo negativo) e la presenza di RNA valutabile nel campione a conferma di un risultato negativo con la sonda specifica (positività del controllo positivo)

1.b.iii Metodica INNO-LiPA

Estrazione del DNA da materiale fissato ed incluso mediante digestione enzimatica

L'estrazione del DNA prevede una digestione enzimatica per eliminare le altre molecole biologiche al fine di isolare e purificare esclusivamente il DNA d'interesse.

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato un estrattore automatico di acidi nucleici: l'estrattore Maxwell® 16 (*Promega*, Madison, Wisconsin, USA) ed il kit *Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit* (*Promega*), contenente tutti i reagenti impiegati per l'estrazione.

Il protocollo di estrazione ha previsto i seguenti passaggi:

- sparaffinatura: i vetrini sono stati scaldati con aria calda e immersi in BioClear per un primo lavaggio, poi sono stati incubati in BioClear per 10 minuti, in seguito sono stati reidratati in alcol 100° e in alcol 95° (2 passaggi per ciascun alcol da 5 minuti ciascuno), infine sono stati sciacquati in acqua;
- le sezioni adese sul vetrino sono state grattate con un bisturi e il materiale così raccolto è stato depositato all'interno di una provetta da 1,5 ml (sono state usate una lama e una provetta diverse

per ciascuno dei campioni), in cui sono stati aggiunti 180 µl di Incubation Buffer (*Promega*) e 20 µl di Proteinasi K (C= 20 mg/ml); le provette sono state quindi incubate overnight a 70°C;
- la mattina seguente sono stati aggiunti 200 µl di *Lysis Buffer* (*Promega*) a ciascuna delle provette e si è proceduto all'estrazione mediante l'apposito kit.

Nel carrello dell'estrattore è stata messa una cartuccia contenente i reagenti per ciascuno dei campioni da estrarre, nel primo pozzetto disponibile sono stati messi i 400 µl di campione e tampone di lisi, nell'ultimo pozzetto di ciascuna strip è stato messo un puntale e nell'apposito spazio sul carrello sono state preparate le provette di eluizione contenenti ciascuna un volume finale che andava da 50 a 100 µl di *Nuclease-Free Water* a seconda della quantità di materiale di partenza, fornita sempre con il kit. L'estrattore è stato quindi avviato con il programma apposito per l'estrazione del DNA da materiale fissato in formalina e incluso in paraffina. La corsa d'estrazione è durata circa 30 minuti, al termine dei quali la qualità del DNA estratto è stata controllata mediante elettroforesi.

Controllo della qualità del DNA estratto

Il controllo della qualità del DNA estratto è stata eseguita mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8%.

L'elettroforesi è una metodica che permette la separazione delle molecole biologiche in base alla loro carica ed al loro peso molecolare. Questa separazione avviene grazie all'applicazione di un campo elettrico, nel caso specifico di 120 V, per circa 20 minuti.

Il gel d'agarosio è il risultato di una polimerizzazione che porta ad ottenere un setaccio molecolare costituito da una rete formata dai monomeri che polimerizzano. L'ampiezza delle maglie della rete influenza la velocità di migrazione delle molecole che vengono caricate e fatte correre sul gel: molecole con maggiore peso molecolare incontrano resistenze maggiori, e di conseguenza migrano più lentamente rispetto a molecole di minori dimensioni, che invece possono attraversare più agevolmente le maglie del gel. Molecole di carica negativa, come appunto il DNA, all'applicazione del campo elettrico migrano verso il polo positivo della cella elettroforetica; più vicine al polo positivo si troveranno le molecole di minor peso molecolare, che hanno corso più velocemente, mentre quelle più vicine al polo negativo sono quelle di maggior peso molecolare; caricando in uno dei pozzetti un marcatore di peso molecolare è inoltre possibile determinare il peso molecolare dei frammenti che hanno corso. Aumentando la concentrazione del gel è possibile aumentare il suo potere risolutivo, ossia la capacità di discriminare molecole di dimensioni diverse, maggiore è il potere risolutivo del gel e minore è la differenza, in termini di dimensioni, tra le molecole che esso separa.

Il gel è stato preparato sciogliendo 0,8 g di agarosio in polvere in 100 mL di tampone TAE 1X (TRIS-HCl; Acido borico; EDTA) e scaldando a microonde per circa 1 minuto a 600W. Sono quindi stati aggiunti 2 µl di etidio-bromuro, un colorante che si intercala tra due coppie seguenti di basi della doppia elica di DNA, che, in seguito a stimolazione con luce ultravioletta, emette una fluorescenza che permette di evidenziare l'avvenuta corsa del DNA.
Il gel è stato caricato mettendo in ciascun pozzetto 1 µL di colorante blu di metilene e 5 µL del DNA estratto di ciascun campione; al termine della corsa (avvenuta con le condizioni indicate in precedenza) il gel è stato valutato con il transilluminatore a raggi UV.
Dopo aver verificato l'adeguatezza del materiale estratto, i campioni sono stati congelati a -20°C fino alle successive analisi.

Amplificazione mediante PCR multiplex

La PCR è una metodica molecolare che permette di amplificare degli specifici frammenti di DNA.
Ogni ciclo di amplificazione è diviso in tre fasi:
- denaturazione del DNA;
- appaiamento dei *primers* tramite le sequenze complementari;
- estensione dei *primers*, durante la quale da DNA polimerasi sintetizza la nuova catena di DNA complementare.

La PCR viene eseguita in appositi termociclatori programmabili, per questo studio è stato utilizzato il termociclatore *GeneAmp® PCR System 9700* della Applied Biosystems (Whaltam, Massachusetts, USA) ed il kit *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp*, fornito dalla ditta *Fujirebio Europe* (Gent, Belgio).
Il kit INNO-LiPA Extra II è stato progettato utilizzando un set di *primers* SPF-10 in grado di amplificare una frammento di 65bp della regione L1, tale kit permette l'identificazione di 32 genotipi virali.
La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50µl contenente:
- 40 µL di AMP MIX (Kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II);
- 10 µL di campione.

Sono stati eseguiti 40 cicli di amplificazione
Il profilo termico della reazione è stato il seguente:
- 94°C per 10 minuti

- 94°C per 30 secondi
- 52°C per 45 secondi } per 40 cicli
- 72°C per 45 secondi
- 72°C per 5 minuti

Nel corso di ogni reazione di PCR sono stati inseriti un campione privo di DNA come controllo negativo ed uno contenente un HPV-6 come controllo positivo.

Ibridazione inversa su cellulosa (LiPA, Line Probe Assay)

Il test INNOLiPA HPV Genotyping Extra II si basa sull'ibridazione inversa di sonde specifiche per ciascuno dei genotipi virali identificati con il kit; tali sonde sono adese a delle strisce di nitrocellulosa.

L'ibridazione inversa può essere eseguita manualmente oppure in modo automatizzato mediante un apposito strumento programmabile; in questo studio è stato utilizzato lo strumento Tendigo, fornito dalla ditta *Fujirebio Europe* (Gent, Belgio).

I prodotti amplificati sono sottoposti a:

1) denaturazione → 5 minuti a temperatura ambiente (unico passaggio che avviene sul bancone, il resto viene eseguito tutto dallo strumento sopra menzionato);
2) ibridazione con sonde oligonucleotidiche specifiche → a 49°C per un'ora
3) lavaggio di stringenza → a 49°C per 30 minuti, questo serve per impedire tutti gli appaiamenti non perfettamente complementari tra l'amplificato denaturato e le sonde su nitrocellulosa, tali appaiamenti comporterebbero la presenza di risultati non corretti;
4) incubazione con coniugato → legame degli ibridi ad un coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina, avviene in un tempo di 30 minuti;
5) incubazione con substrato → viene usato il cromogeno BCIP/NBT, che produce un precipitato di color violaceo nelle strisce risultanti positive per HPV.
6) analisi dei risultati. → Il pattern di ibridazione è stato analizzato tramite un software specifico (LiRAS) per HPV e i risultati sono stati confermati da due lettori indipendenti.

Il saggio INNO-LiPA permette di rilevare e contemporaneamente distinguere:

- 13 genotipi ad alto rischio: HPV-16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 68;
- 6 genotipi a probabile alto rischio o rischio intermedio: HPV-26; 53; 66; 70; 73; 82;
- 9 genotipi a basso rischio: HPV-06; 11; 40; 42; 43; 44; 54; 61; 81;
- 4 genotipi a rischio non classificato: HPV-62; 67; 83; 89.[47]

1.b.iv Amplificazione selettiva di HPV-16

L'amplificazione selettiva di HPV16, il genotipo più comunemente associato a OPSCC, è stata introdotta per dare una risposta all'interrogativo rappresentato da una serie di risultati discordanti osservati nel corso della nostra iniziale esperienza con i tumori orofaringei HPV-correlati. In dettaglio, in svariati casi si è osservata inequivocabile positività per p16 in casi con morfologia "tipo" HPV, senza che il test INNO-LiPA individuasse la presenza di DNA virale, oppure la presenza di DNA virale ma non uno specifico genotipo ad alto rischio. Alcuni di questi casi testati con DNA-ISH erano risultati positivi (questi dati si riferiscono ad un periodo precedente la messa in commercio del test per RNA-ISH). Riflettendo sulla biologia del virus, e sulle caratteristiche del test INNO-LiPA, abbiamo ipotizzato che la mancata amplificazione di DNA virale dipendesse dal fatto che l'integrazione del genoma virale in questi casi avesse comportato la perdita della porzione del gene L1 amplificata dai *primers* SPF10, che si traduceva in un falso risultato negativo alla PCR. Per verificare questa nostra ipotesi abbiamo recuperato dei *primers* specifici per il gene E6 di HPV16, precedentemente disegnati ed impiegati nel nostro laboratorio agli albori degli studi dell'oncogenesi HPV-correlata in ambito ginecologico[48], che sono stati usati per amplificare il DNA estratto dai campioni discordanti. Questo approccio ci ha permesso di identificare la presenza di HPV16 integrato nella maggior parte dei campioni, e ci ha quindi portato ad eseguire questo test in tutti i casi con espressione di p16 che risultavano negativi o con genotipo non caratterizzabile al test LiPA in questo studio (e nella routine diagnostica come integrazione dell'algoritmo).

Tale metodica, a differenza della PCR precedentemente descritta, si basa sull'utilizzo di *primers* disegnati utilizzando come target il gene E6 del genoma di HPV-16, ed amplificano una regione di 201 bp all'interno del gene E6; che, insieme con la regione E7, ha una sequenza di basi diversa a seconda del genotipo virale che ne garantisce la specificità, ma è sempre mantenuta nelle infezioni responsabili di trasformazione neoplastica.

Il termociclatore utilizzato per l'amplificazione è stato il *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems; Whaltam, Massachusetts, USA)

La sequenza dei primers utilizzati è la seguente[48]:

- F → 5' - GAACAGCAATACAACAAACCG - 3'
- R → 5' - CCATGCATGATTACAGCTGG - 3'

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µL contenente:

- 2,5 µL di 2mM dNTPs
- 1,75 µL di 25 mM $MgCl_2$
- 2,5 µL di 5 µM *primer forward*

- 2,5 µL di 5 µM *primer reverse*
- 0,2 µL a 5 U/µL di Taq polimerasi
- 2,5 µL di tampone di corsa Rm
- 8 µL di acqua bidistillata
- 5 µL di DNA.

Il profilo termico della reazione è stato il seguente:

- 94°C per 10 minuti
- 95°C per 30 secondi
- 60°C per 15 secondi } per 35 cicli
- 72°C per 30 secondi
- 72°C per 5 minuti

Durante l'amplificazione è stato inserito un controllo positivo, costituito da cellule SiHA contenenti un numero noto di copie di DNA di HPV-16.

Al termine dell'amplificazione i prodotti amplificati sono stata controllati su un gel Agarosio-NuSieve al 2%, preparato sciogliendo 2g di NuSieve in polvere e 1 g di Agarosio in polvere in 100 ml di tampone TAE 1X scaldato in microonde a 600 W per circa 1 minuto, con l'aggiunta di bromuro di etidio.

L'analisi visiva del gel ha portato a determinare quali campioni fossero risultati positivi, ossia in quali era avvenuta l'amplificazione.

2.a Estrazione degli acidi nucleici da materiale congelato

Per l'estrazione di acidi nucleici da materiale congelato è stato utilizzato l'estrattore automatico Maxwell® 16 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) con due differenti kit: per l'estrazione di DNA il kit *Maxwell® 16 LEV Blood DNA Purification Kit*, per l'estrazione di RNA il kit *Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification Kit*, entrambi commercializzati dalla stessa ditta produttrice dello strumento e contenenti tutti i reagenti impiegati per l'estrazione.

Il protocollo di estrazione sia per DNA sia per RNA ha previsto, in prima istanza, l'inclusione in resina O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) dei campioni conservati in azoto, che sono stati immediatamente tagliati al criostato a -20°C avendo cura di sostituire tutta la strumentazione usa-e-getta impiegata per ogni campione, e di bonificare la parte strutturale del criostato con uno spray che elimina gli acidi nucleici prima del campione successivo allo scopo di evitare contaminazioni.

Per ciascun campione sono state preparate due provette da 1,5 mL opportunamente identificate, una per DNA ed una per RNA. I campioni sono stati quindi tagliati, per ciascuna provetta sono

state necessarie 15-20 sezioni a seconda delle dimensioni del campione (prelevate con pinze sterili e poste nella provetta corrispondente) dello spessore di 16 μm. Le provette sono state conservate in ghiaccio durante tutta la procedura di taglio.

Per l'estrazione di DNA tutte le soluzioni necessarie erano fornite già pronte nel kit. Alla provetta di estrazione di ciascun campione sono stati aggiunti 300 μL di Lysis Buffer e 20 μL di Proteinasi K, i campioni tagliati e poi messi nella corrispondente provetta mediante l'ausilio di pinze sterili, utilizzando un mini-potter il tessuto è stato sminuzzato e la soluzione resa omogenea. Dopo l'omogeneizzazione la soluzione è stata messa nel primo pozzetto della cartuccia posizionata sul carrello dell'estrattore, (precedentemente preparato come descritto per l'estrazione di DNA da materiale fissato ed incluso), nella provetta di eluizione sono stati aggiunti 50 μL di *Nuclease-Free Water*. La corsa di estrazione è durata circa 50 minuti, al termine la qualità il DNA estratto è stata verificata mediante elettroforesi ed il DNA è stato conservato a -20°C.

Per l'estrazione di RNA sono state preparate, prima di iniziare, le soluzioni necessarie.

La soluzione di omogeneizzazione è stata preparata aggiungendo 20 μL di 1-tioglicerolo a 1 mL di *Homogenization Solution* fornita nel kit, per ciascun campione sono necessari 200 μL di soluzione di omogeneizzazione (dopo la preparazione la soluzione può essere conservata in frigorifero a 2-10°C ed è stabile per 30 giorni), che è stata posta sul fondo della provetta conservata in ghiaccio.

La soluzione di DNasi I è stata preparata aggiungendo 275 μL di *Nuclease-Free Water* alla provetta contenente la DNasi liofilizzata, agitando e capovolgendo la provetta, ed aggiungendo 5 μL di *Blue Dye*.

Dopo aver posto le sezioni tagliate all'interno della provetta già contenente la soluzione di omogeneizzazione, il materiale è stato accuratamente mixato con la soluzione, di modo da prelevare tutto quanto fosse rimasto adeso alle pareti, e mediante un mini-potter il tessuto è stato ulteriormente sminuzzato finché la soluzione non è diventata chiara.

Sono stati aggiunti 200 μL di Lysis Buffer e le provette sono state vortexate per 15 secondi, dopodiché tutto il contenuto di ciascuna provetta è stato trasferito all'interno del primo pozzetto della cartuccia posizionata sul carrello dell'estrattore, (precedentemente preparato come descritto per l'estrazione di DNA da materiale fissato ed incluso), nel quarto pozzetto sono stati aggiunti 5 μL di DNasi I, nella provetta di eluizione sono stati aggiunti 30 μL di *Nuclease-Free Water*. La corsa di estrazione è durata circa 50 minuti, al termine la qualità dell'RNA estratto è stata verificata mediante elettroforesi, e l'RNA è stato conservato a -20°C.

Controllo della qualità degli acidi nucleici estratti

La qualità del DNA e dell'RNA estratti è stata verificata mediante elettroforesi su gel d'agarosio 0,8%, preparato come precedentemente descritto.

Prima della corsa l'RNA è stato denaturato a 65°C per 10 minuti.

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 100 V per 15 minuti, il gel è stato quindi valutato con transilluminatore a raggi UV.

Per un'ulteriore sicurezza, il DNA estratto da materiale congelato è stato amplificato, sempre con il fine di valutarne l'adeguatezza, con una PCR standard per l'amplificazione del gene della β-globina.

Utilizzando *primers* PCO3/BETA II (le cui sequenze sono riportate sotto) [49] ed il termociclatore *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems; Whaltam, Massachusetts, USA):

- PCO3 F 5' - ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'
- BETA II R 5' - GTC TCC TTA AAC CTG TCT TG - 3'

Il profilo termico della reazione è stato il seguente:

- 95°C per 10 minuti
- 95°C per 1 minuto
- 65°C per 1 minuto } x 40 cicli
- 72°C per 2 minuti
- 72°C per 10 minuti

2.b.i Real time-PCR per DNA

Lo scopo della metodica è quantificare i geni virali E2 ed E6 per andare a valutare, mediante il rapporto tra le loro quantificazioni, l'integrazione del DNA virale nel genoma ospite.

Il DNA estratto dal materiale congelato è stato amplificato mediante real time-PCR per i geni E2 ed E6 di HPV-16 utilizzando il kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) ed il termociclatore *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi).

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µL:

- 12,5 µL di 2X *GoTaq® qPCR Master Mix*
- 2 µL di *primer* F a 0,9 µM
- 2 µL di *primer* R a 0,9 µM
- 3,5 µL di *Nuclease-Free Water*
- 5 µL di DNA

Il profilo termico della reazione è stato il seguente:

- 95°C per 10 minuti

- 95°C per 30 secondi
- 60°C per 45 secondi } per 40 cicli
- 72°C per 45 secondi
- 72°C per 5 minuti

Le sequenze dei *primers* utilizzati per le reazioni sono state le seguenti:

- HPV-16 E6
  - F → 5' – TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA - 3'
  - R → 5' – CTTGTCCAGCTGGACCATCTATTT - 3'
- HPV-16 E2
  - F → 5' – AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG - 3'
  - R → 5' – CCAAGGCGACGGCTTTG - 3'

Per l'analisi dei risultati è stato adottato il metodo della quantificazione assoluta, che prevede il disegno di una curva di calibrazione, la quale riporta sull'asse delle *x* la concentrazione (logaritmo in base 10 del numero di copie iniziali) del target, e sull'asse delle *y* i valori di C_T (ciclo soglia, ossia il numero di cicli dopo il quale diventa rilevabile la fluorescenza). La curva è stata disegnata amplificando dei campioni a concentrazione nota di DNA a diverse diluizioni. Interpolando i valori di C_T (corrispondenti a ciascun campione) con la curva di calibrazione è stato possibile determinare il carico virale iniziale di ciascuno.

2.a.ii Real time-PCR per RNA

Per la real time-PCR comprensiva di RT-PCR è stato utilizzati il kit *GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System*, che a sua volta includeva il kit *GoScript™ Reverse Trascription System* ed il kit *GoTaq® qPCR Master Mix*, entrambi commercializzati da Promega, (Madison, Wisconsin, USA); lo strumento impiegato è stato un termociclatore *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi).

il templato a RNA è stato preparato come segue:

- 2 µL di RNA (d'interesse)
- 1 µL di Oligo (dT)15 *Primer* a 0.5µg/µl
- 1 µL di Random *Primers* a 0.5µg/µl
- 3 µL di *Nuclease-Free Water*.

La soluzione è stata quindi scaldata in un termoblocco a 70°C per 5 minuti e poi conservata in ghiaccio.

La reazione di trascrizione inversa è avvenuta in un volume finale di 20 µL, la mix di reazione è stata preparata come segue:

- 4,9 µL di *Nuclease-Free Water*
- 4 µL di GoScript™ 5X Reaction Buffer
- 1,6 µL di $MgCl_2$
- 1 µL di PCR Nucleotide Mix
- 0.5 µL di Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor
- 1 µL di 40 GoScript™ Reverse Trascriptase
- 7 µL del templato a RNA precedentemente preparato.

Il profilo termico della reazione è stato il seguente:

- 25°C per 5 minuti
- 42°C per 45 minuti
- 70°C per 15 minuti

Il cDNA così ottenuto è stato in seguito amplificato mediante real time-PCR con dei *primers* E6/E7 ed E2 genotipo-specifici.

Di seguito sono riportate le sequenze delle coppie di *primers* impiegate. I *primers* sono stati disegnati sulla base delle sequenze genomiche virali genotipo-specifiche riportate in GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) da PaVE - *Papillomavirus Episteme* (https://pave.niaid.nih.gov/) utilizzando il *software Primer Express Software Version 2.0* (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA), la loro specificità è stata confermata utilizzando BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast); le coppie di *primers* sono state in seguito sintetizzate dalla ditta *metabion international AG* (Planegg/Steinkirchen, Germania).

Primer	Sequenza F (5' - 3')	Sequenza R (5' - 3')
HPV-16 E6/E7	TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA	CTTGTCCAGCTGGACCATCTATTT
HPV-16 E2	AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTAT TAG	CCAAGGCGACGGCTTTG
HPV-31 E7	ATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG	CACTTGGGTTTCAGTACGAGGTTCT
HPV-31 E2	CTATTGGAAACATATTCGACT	CTTGTAAGGCTTTGGCCTTT
HPV-33 E6	AAACCTTTGCAACGATCTGAGGTA	GTTTACATATTCCAAATGGATTTCCCTC TCT
HPV-33 E2	TTTACCATCACAAATTGAACATT	CCATTTGTAGTTCAATTACTT
HPV-35 E6	CAAGAATTACAGCGGAGTGAGGTA	TCCATATGGCTGGCCTTCTCTATA
HPV-35 E2	GTTTGTCTGATCACATACAGTATTGG	TTGCTTGCATTGCTTTGGCTTT
HPV-51 E6	TTATGTGAAGCTTTGAACGTT	TGTTTGCATACTGCATATGG
HPV-51 E2	GTTACGATATGAAGCTGCTATTG	GTTAAGCGATTGTAAGGCCATGT
HPV-52 E6	GTGCATGAAATAAGGCTGCAG	GTAGGCACATAATACACACGCCA
HPV-52 E2	TTGACTCGAATGGAATGTGTTTTG	TGCCTCCAATGCCAATTGTAGTT
HPV-53 E6	TGCAACTTGGCTGTGTGTT	TTGTAATATCTTAATTTTCGGACCTT
HPV-53 E2	GTGTCTTCTGCAGTAAGCTATG	TGTGCCTTTACACCCATATTTGG

Tabella 7: Sequenze dei *primers* impiegati per la real time-PCR

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µL

- 10 µL di 2X *GoTaq® qPCR Master Mix*
- 1 µL di *primer* F a 1 µM
- 1 µL di *primer* R a 1 µM
- 8 µL di *Nuclease-Free Water*
- 5 µL di templato/cDNA

Il profilo termico della reazione è stato il seguente:

- 95°C per 10 minuti
- 95°C per 30 secondi
- 60°C per 45 secondi } per 40 cicli
- 72°C per 45 secondi
- 72°C per 5 minuti

Tutte le reazioni sono state ottimizzate al fine di ottenere la migliore cinetica di amplificazione mantenendo invariate le condizioni di PCR.

La concentrazione di RNA di ciascun campione è stata determinata mediante il metodo della quantificazione relativa, che prevede la normalizzazione del target rispetto ad un gene di controllo endogeno costitutivamente espresso, nel caso specifico la β-actina (ΔC_T). Si sono quindi confrontati tutti i ΔC_t ottenuti con i ΔC_t di un campione di controllo definito calibratore (cb – nel caso specifico le cellule SiHA infettate da HPV, il cui carico virale era noto), ed utilizzando la formula $2^{-(\Delta Ct\ x - \Delta Ct\ cb)}$ è stato possibile valutare la quantificazione relativa del target rispetto al calibratore e normalizzato rispetto all'espressione del gene di riferimento.
Un alto valore di C_T indica una bassa espressione di RNA, in modo particolare, per quanto un consenso sul valore numerico da considerarsi "soglia" non sia ancora stato raggiunto, si reputa che un valore di C_T superiore a 37,1 indichi assenza di espressione per il target preso in esame: infatti il valore di C_T è inversamente proporzionale al carico virale e all'espressione genica.

RISULTATI

DESCRIZIONE DELLA CASISTICA

Le caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati al momento della diagnosi sono riportate in tabella 8. L'età media della popolazione analizzata era di 65,1 ± 10,7 anni, con un *range* che compreso tra 40 e 85 anni. Nella sere erano compresi 25 femmine (28,7%) e 62 maschi (71,3%). L'età media della popolazione femminile era 62,8 ± 8,8 anni (*range* 40-77) mentre l'età media della popolazione maschile era 65,5± 11,4 anni (*range* 43-85 anni).

Per quanto riguarda la sede di insorgenza della neoplasia (parametro solo parzialmente determinabile con le indagini strumentali in caso di neoplasie localmente avanzate), 32 (36,7%) originavano dalla tonsilla palatina, 30 (34,4%) dalla tonsilla linguale, 7 (8%) dalla mucosa della loggia tonsillare e dei pilastri palatini, 7 (8%) dalle strutture superolaterali (palato molle, ugola, trigono), 5 (5,7%) dalle strutture postero-inferiori (vallecula glosso-epiglottica, solco amigdalo-glosso); infine in 6 (6,9%) casi l'estensione locoregionale della neoplasia non consentiva di determinare la sede di origine.

Applicando l'algoritmo diagnostico precedentemente pubblicato[45], 41 (47,1%) OPSCC sono stati classificati come HPV-correlati, in base all'espressione di p16 e alla presenza di DNA di genotipi virali ad alto rischio (gruppo 1), e 36 (41,4%), negativi per entrambi i marcatori, sono stati classificati come HPV-negativi (gruppo 2). In armonia con quanto osservato nei nostri precedenti studi, e con i dati della letteratura, un numero minore ma consistente di casi (10; 11,6%) ha presentato un profilo di marcatori ambiguo, o perché positivo per p16 in >75% delle cellule neoplastiche in assenza di DNA di genotipi ad alto rischio (4 casi, gruppo 3), o perché, in 6 casi, negativo per p16 ma positivo per DNA di genotipi ad alto rischio (gruppo 4). Questi due ultimi gruppi sono quindi stati confrontati con i primi due a fenotipo certo, allo scopo di definire con precisione lo stato trascrizionale di HPV nelle cellule tumorali, di individuare nuovi marcatori informativi per la definizione dello stato di HPV, e di determinare il correlato prognostico di questi casi a fenotipo ambiguo.

La stadiazione di ogni singolo caso è stata rivista applicando i criteri pubblicati nell'ultima edizione del TNM[8]. Per la prima volta questo sistema di stadiazione prevede l'impego di un diverso *set* di criteri per gli OPSCC HPV-correlati e HPV-negativi. Per questa ragione, abbiamo tenuto conto dello stato di HPV/p16 in associazione con estensione tumorale, interessamento linfonodale e metastatizzazione a distanza per attribuire a ciascun caso lo stadio corretto. Ventitre casi erano in stadio I, 22 dei quali HPV-correlati; 10 casi, tutti positivi per p16 e HPV-

DNA, erano in stadio II; 7 casi in stadio III, di cui 6 p16 e HPV-DNA positivi; 32 in stadio IV, dei quali solo 2 HPV-correlati. I 30 casi rimanenti HPV-negativi erano così suddivisi: 22 stadio IVa, 5 stadio IVb e 3 stadio IVc. La stadiazione dei 10 casi a fenotipo ambiguo è ovviamente dipendente dalla determinazione dello stato di HPV: in quattro casi variava tra stadio II e III, in uno tra stadio II e IVa; in 3 casi (M1) tra stadio IV e IVc. In 4 casi infine non è stato possibile ricavare la stadiazione dalla documentazione disponibile (tabella 8). Gli stadi iniziali (I e II) sono risultati statisticamente più frequenti nel gruppo di neoplasie HPV-correlate ($p<0.05$).

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunte in tabella 8.

	Gruppo 1	**Gruppo 2**	**Gruppo 3**	**Gruppo 4**
n. pazienti	41	36	6	4
Genere (M/F)	30/11	27/9	4/2	3/1
Età (M±ds)	62±9 (40-85)	64±11 (43-85)	67±8 (60-82)	66±14 (48-79)
Sede				
-Tonsilla palatina	22	13	1	0
-Tonsilla linguale	13	13	2	2
-parete laterale	2	2	0	0
-palato molle	0	3	1	1
-pavimento	1	2	0	1
-multiple/non codificate	3	3	2	0
Stadio				
-I	22	1		
-II	10	0	2	3
-III	6	1	2	2
-IV	2	30	3	1

Tabella 8: Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati

I quattro gruppi non differivano per distribuzione di età e genere; anche la distribuzione delle sedi anatomiche di neoplasia non risultava significativamente differente. Non è stato possibile risalire alle informazioni relative ai fattori di rischio noti (fumo/alcol) per una gran parte dei pazienti dello studio.

Il trattamento e l'*outcome* dei pazienti sono riassunti in tabella 9.

	Gruppo 1	**Gruppo 2**	**Gruppo 3**	**Gruppo 4**
n. pazienti	41	36	6	4
Terapia				
-CT-RT	27	26	2	2
-RT e chirurgia su N	0	2	0	0
- CT-RT e chirurgia su N	2	2	0	0
-chirurgia su TN e CT-RT	2	2	0	0
-chirurgia su TN e RT	1	1	0	0
-chirurgia	1	0	1	1
-RT	0	1	1	0
-palliazione	2	1	0	0
-ignoto	6	1	2	1

Outcome				
-guarigione	25 (61%)	13 (50%)	3 (50%)	2 (50%)
-recidiva	3 (7%)	6 (16%)	0	0
-mancata guarigione	8 (19%)	5 (14%)	1 (17%)	1 (25%)
-non dati	5 (7%)	5 (14%)	2 (33%)	1 (25%)

Tabella 9: Trattamento e *outcome* dei pazienti arruolati per ciascun gruppo

ANALISI DEI BIOMARCATORI

1. HPV-DNA

Gruppo 1. Con la genotipizzazione di HPV mediante amplificazione, 33 casi sono risultati positivi solo per HPV-16 (per 3 di essi il test LiPA aveva fornito un esito negativo o non tipizzabile, e l'identificazione di HPV-16 è stata ottenuta mediante amplificazione con *primers* specifici); in 4 casi HPV-16 era presente in associazione con altri genotipi virali ad alto rischio (HPV-35, HPV-33, HPV-52 e 53, HPV-31 e 51). Solo in 4 casi sono stati identificati esclusivamente genotipi ad alto rischio non-16 (HPV-33, HPV-31, HPV-18, HPV-52 e 53). L'ibridazione *in situ* per DNA virale è risultata positiva in 32 casi.

Gruppo 2. Tutti i 36 casi sono risultati negativi per genotipi di HPV ad alto rischio. In 3 casi è stata osservata la presenza di HPV-6, in 1 caso di HPV-67, ed in 4 casi di genotipi non tipizzabili. I test di ibridazione *in situ* a DNA hanno dato esito negativo in tutti i casi del gruppo.

Gruppo 3. Quattro casi sono risultati positivi ai test di genotipizzazione per HPV-16, uno per HPV-33 ed uno per HPV-35. I test di ibridazione *in situ* a DNA hanno dato esito negativo in tutti i casi del gruppo.

Gruppo 4. Tutti i 36 casi sono risultati negativi per HPV-DNA sia con amplificazione che con ibridazione *in situ*.

2. Definizione del ruolo oncogenetico con criteri standardizzati

2.1 p16

Gruppo 1. Tutti i casi esprimevano p16 in almeno il 70% delle cellule neoplastiche.

Gruppo 2. Ventisette casi erano completamente negativi per p16, mentre 9 casi esprimevano p16 in una percentuale di cellule compresa tra il 5 ed il 30%

Gruppo 3. Tutti i casi erano completamente negativi per p16

Gruppo 4. Tutti i casi esprimevano p16 in almeno il 70% delle cellule neoplastiche

2.2 HPV mRNA

Gruppo 1 L'amplificazione del messaggero di E6 ha dato esito positivo, con un valore di Ct inferiore alla soglia stabilita per la negatività in 37 casi (90,2%). In due casi il Ct era superiore alla soglie, ed in 2 casi non è stato possibile ottenere mRNA amplificabile (campioni inadeguati). Nei casi positivi per genotipi non-16 l'amplificazione di mRNA di E6 specifico del genotipo 16 ha dato esito negativo, confermando indirettamente la specificità dei *primers* utilizzati, mentre l'amplificazione con i *primers* specifici per il genotipo presente ha dato sempre esito positivo. Inoltre, nei casi caratterizzati da coinfezioni, è stata osservata espressione del messaggero di tutti i genotipi presenti. Il Ct dei casi positivi per HPV-16 è risultato significativamente inferiore (p:0.02) a quello dei casi positivi per altri genotipi ad alto rischio, indicando una minor quantità di messaggero. Analogamente, il Ct dei messaggeri dei singoli genotipi nei casi positivi coinfezioni è risultato significativamente inferiore (p:0.0018) a quello dei casi positivi per un solo genotipo.
La ricerca di mRNA con ibridazione *in situ* utilizzando sonde universali in grado di riconoscere il messaggero di E7 di tutti i genotipi ad alto rischio identificati ha dato esito positivo in 38 casi (92,7%). I tre casi negativi (con controlli adeguati) erano tutti positivi per HPV-16 con presenza di messaggero amplificabile; l'ibridazione *in situ* ha inoltre dato risultato positivo nei 4 casi negativi o inadeguati alla PCR.

Gruppo 2. Tutti i 36 casi sono risultati negativi sia alle reazioni di PCR per mRNA di E6 di HPV-16, senza alcun prodotto di amplificazione, sia alle reazioni di ibridazione *in situ* per mRNA di E7 (con controlli adeguati).

Gruppo 3. L'amplificazione del messaggero di E6 ha dato esito positivo, con un valore di Ct inferiore alla soglia stabilita per la negatività in 2 casi (33%), uno positivo per HPV-16 ed uno per HPV-35. Tutti i 6 casi sono risultati negativi alle reazioni di ibridazione *in situ* per mRNA di E7 (con controlli adeguati)

Gruppo 4. Tutti i 4 casi sono risultati negativi sia alle reazioni di PCR per mRNA di E6 di HPV-16, senza alcun prodotto di amplificazione, sia alle reazioni di ibridazione *in situ* per mRNA di E7 (con controlli adeguati).

2.3 Stato di integrazione del genoma virale

Gruppo 1. E' stato possibile valutare lo stato di integrazione nei 37 casi con infezione isolata o coinfezione da HPV-16. Trentaquattro casi (92%) hanno evidenziato un *pattern* misto integrato

ed episomale, 2 casi (5%) una forma completamente integrata, ed un caso (3%) uno stato esclusivamente episomale.

Gruppo 3. I 3 casi con infezione da HPV-16 hanno evidenziato una forma mista integrata ed episomiale.

3. Analisi di espressione delle proteine controllate dagli oncogeni virali

I risultati dei test immunoistochimici sono riassunti nella tabella 10 in funzione dei gruppi di pazienti.

	Mutato/sovraespresso	Normale	Borderline
Gruppo 1			
-p53	7 (17,1%)	34 (82,9%)	
-pRB	10 (24,4%)	30 (73,1%)	1 (3,2%)
-CDK1	10 (24,4%)	29 (70,7%)	2 (6,4%)
Gruppo 2			
-p53	29 (78,4%)	8 (21,6%)	0
-pRB	34 (91,9%)	0	2 (8,1%)
-CDK1	34 (91,9%)	0	2 (8,1%)
Gruppo 3			
-p53	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
-pRB	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
-CDK1	3 (50%)	3 (50%)	
Gruppo 4			
-p53	4 (100%)	0	0
-pRB	2 (50%)	2 (50%)	0
-CDK1	2(50%)	1 (25%)	1 (25%)

Tabella 10: Risultati di espressione delle indagini immunoistochimiche

Tutti i biomarcatori mostravano una significativa differenza di espressione tra gruppo 1 e gruppo 2 (p53 mut *vs* wt, pRB pos *vs* neg, CDK1 pos *vs* neg: $p < 0.001$); Si è quindi proceduto con il confronto dei profili di marcatori tra i gruppi 1 e 2, e alla valutazione dell'accuratezza diagnostica di quelli maggiormente rilevanti. I risultati del confronto tra frequenze sono riassunti in tabella 11

	Gruppo 1 p16+	Gruppo 2 p16-	p
p53 WT/pRB neg/CDK1 neg	23	0	<0.001
p53 WT/pRB neg/CDK1 pos	4	0	NS
p53 WT/pRB pos/CDK1 neg	4	0	NS
p53 mut/pRB neg/CDK1 neg	1	0	NS
p53 mut/pRB pos/CDK1 neg	1	0	NS
p53 mut/pRB neg/CDK1 pos	1	0	NS
p53 mut/pRB pos/CDK1 pos	2	28	<0.001
P53 WT/pRB pos/CDK1 pos	3	6	NS

Tabella 11: Risultati dei confronti di espressione dei biomarcatori

Allo scopo di individuare un profilo di biomarcatori in grado di classificare correttamente i carcinomi orofaringei in assenza di test molecolari, si è proceduto alla determinazione dell'accuratezza diagnostica di ciascun profilo.

	Sens	95% CI	Spec	95% CI	+LR	-LR	PPV	NPV	Acc	95% CI
p53 wt	85.0	70.2-94.3	77.8	60.8-89.9	3.83	0.19	81	82.4	81.6	71-89.5
pRB neg	75.0	58.8-87.3	100	89.6-100		0.25	100	77.3	86.5	76.5-93.3
CDK1 neg	74.4	57.9-86.9	100	89.6-100		0.26	100	77.3	86.3	76.2-93.2
p53 wt AND pRB neg AND CDK1 neg	57.5	40.9-72.9	100	89.6-100		0.43	100	66.7	77	65.6-86
Any neg	95	83.1-99.4	77.7	60.8-89.9	4.28	0.06	82.6	99.3	86.8	77.1-93.5
p53 wt AND pRB neg AND CDK1 any	67.5	50.9-81.4	100	89.6-100		0.32	100	72.3	82.4	71.8-90.3
p53 wt AND pRB any AND CDK1 neg	67.5	50.9-81.4	100	89.6-100		0.32	100	72.3	82.4	71.8-90.3
p53 any AND pRB neg OR CDK1 neg	87.5	73.2-95.8	100	89.7-100	8	0.0	87.2	100	93.2	84.9-97.8

Tabella 12: Confronto della *performance* diagnostica dei profili immunoistochimici (Sens=Sensibilità; Spec=Specificità; Acc=Accuratezza; CI=Confidence Interval; +LR=Positive Likelihood Ratio; -LR=Negative Likelihood Ratio; PPV=Positive Predictive Value; NPV=Negative Predictive Value)

Dall'analisi emerge che l'accuratezza più elevata per la discriminazione tra OPSCC HPV-correlati e non si ottiene dalla assenza di espressione di un marcatore tra pRB e CDK1, indipendentemente dallo stato di p53, che permette di riconoscere con una sensibilità dell'87.5% e una specificità del 100% gli OPSCC correlati al virus.

Analizzando l'espressione degli stessi marcatori nei gruppi 2 e 3, tutti sono risultati positivi per pRb e CDK1; i casi positivi per p53 erano 1 (16,7%) nel gruppo 3 e 4 (100%) nel gruppo 4.

DISCUSSIONE

L'identificazione dei carcinomi dell'orofaringe HPV correlati si basa su algoritmi diagnostici che comprendono sia marcatori immunoistochimici che dati molecolari. Le attuali linee guida in merito sono discordanti: mentre secondo l'AJCC la classificazione si basa sullo stato di espressione di p16 (che deve essere necessariamente determinato), e l'ibridazione *in situ* per DNA di genotipi ad alto rischio viene proposta come alternativa, la WHO ritiene requisito necessario l'espressione di p16 e/o la determinazione della presenza di DNA virale con PCR o ISH. Alla luce di quanto esposto sulla biologia del virus e sull'oncogenesi virus-mediata, nonché sui risultati del presente e dei nostri precedenti studi[45], entrambi gli approcci soffrono di severe limitazioni: per quanto riguarda l'esclusiva determinazione di p16, il rischio principale è quello di diagnosticare erroneamente un tumore dell'orofaringe come HPV correlato: è ormai chiaro che la sovraespressione di p16 non dipende esclusivamente dall'espressione degli oncogeni virali, ma può avvenire attraverso *pathways* indipendenti. Altrettanto evidente è il rischio insito nell'affidare la diagnosi alla sola ISH a DNA: innanzitutto la sensibilità del test è risultata subottimale (solo il 78% degli OPSCC HPV-correlati sono risultati positivi nella nostra serie); inoltre la presenza di DNA virale pur evidenziata *in situ* non fornisce informazioni sull'attività oncogenetica del virus. A maggior ragione risulta criticabile l'indicazione WHO che cita "o test molecolare positivo per HPV DNA" facendo esplicito riferimento alla PCR: nella serie in studio 6 casi (7%) sono risultati positivi per genotipi di HPV ad alto rischio, pur essendo negativi per marcatori diretti o indiretti di oncogenesi. Sulla base dei nostri precedenti studi[45], la presenza di infezione virale "incidentale" o "passeggera", comunque non oncogena, è relativamente frequente, in particolare quando si va a investigare la presenza del virus in sedi anatomiche diverse dall'orofaringe (cavo orale, laringe, ecc).

Le implicazioni di una scorretta classificazione di un carcinoma dell'orofaringe non devono essere sottovalutate, sia dal punto di vista del paziente, che da quello della ricerca scientifica. Sul piano clinico, la classificazione scorretta si può tradurre in un trattamento inadeguato per la malattia: si sta ormai consolidando l'attitudine a de-intensificare il trattamento sia chirurgico che non per i pazienti affetti da tumore HPV-correlato[50-55], quindi una classificazione inappropriata porterebbe o al trattamento insufficiente di un tumore indipendente da HPV, o viceversa al trattamento troppo aggressivo di un tumore HPV correlato, con effetti collaterali non necessari di severità non prevedibile. Dal punto di vista scientifico, è evidente che la corretta classificazione dei tumori/pazienti è il prerequisito essenziale su cui basare tutti gli studi dedicati a indagare, tra gli altri, la risposta del sistema immunitario al virus e il potenziale impatto della terapia con immune *checkpoints inhibitors* in questa classe di neoplasie.

Mentre l'impiego esclusivo di test molecolari basati sul DNA virale va stigmatizzato in tutti i contesti (anche se purtroppo risulta ancora utilizzato in moltissima letteratura scientifica anche recente), e l'indicazione relativa nell'ultima edizione WHO appare assolutamente inappropriata e fuorviante, quella relativa all'uso di p16 come unico criterio classificativo ha un *background* da non sottostimare, in un contesto più ampio rispetto al centro specializzato con elevato livello tecnologico come quello in cui ci troviamo ad operare. La scelta di basare la classificazione dei carcinomi dell'orofaringe sulla presenza/assenza di espressione di p16 si fonda infatti sul fatto che il test immunoistochimico, a differenza di qualsiasi determinazione molecolare, richiede una tecnologia facilmente reperibile presso la maggior parte dei laboratori di anatomia patologica anche in contesti di limitate risorse economiche, e il costo relativo alla singola indagine, sia in termini economici di acquisizione che di impegno tecnico e di lettura è inferiore a qualunque altro tipo di test. Quindi la scelta è stata fatta allo scopo di garantire la più ampia diffusione e applicazione della classificazione per uniformare la pratica clinica e raccogliere anche una mole di dati omogenei e quindi confrontabili.

Come già sottolineato, tuttavia, l'espressione di p16 ha una specificità relativamente bassa come marcatore indiretto di oncogenesi virale, e per superare questo limite ne viene raccomandato l'uso, ove possibile, in associazione a test molecolari in genere riservati ai casi positivi per p16, appunto perché è noto che l'espressione di p16 può essere indotta attraverso *pathways* indipendenti dalle oncoproteine del virus. Gli algoritmi comprendenti test basati sul DNA del virus raggiungono elevati livelli di accuratezza, ma non riconoscono il 100% dei casi. Al contrario, stando a quanto affermato in letteratura, il *gold standard* per l'identificazione di oncogenesi virus-correlata è l'espressione del messaggero dei due oncogeni virali (essendoci limiti tecnici non superati relativi che impediscono la determinazione della relativa espressione proteica). Per molti anni l'estrazione e l'amplificazione di mRNA degli oncogeni virali è stato l'unico metodo disponibile per campioni tissutali, con tutti i limiti relativi alla complessità tecnica e alla necessità di strumentazione dedicata. Successivamente, con lo sviluppo di tecniche di ibridazione *in situ* adeguate alla determinazione di RNA a livello cellulare/tissutale, è stata messa a punto una serie di sonde specifiche per mRNA di E7 dei più comuni genotipi ad alto rischio, la cui accuratezza diagnostica è stata validata in confronto all'amplificazione del messaggero[56-58] su serie relativamente ampie, fino al punto che è stato proposto come singolo test standard per la corretta individuazione dei carcinomi dell'orofaringe HPV-correlati, anche se l'accuratezza maggiore, soprattutto tenendo conto del significato prognostico del test, viene raggiunta quando associato a p16[59].

Dall'analisi dei pochi studi che hanno confrontato le due metodiche di determinazione dell'mRNA degli oncogeni virali, si osserva che la corrispondenza tra i risultati non è comunque assoluta, con la presenza di casi caratterizzati da un profilo di espressione discordante. Risultati simili ma non completamente sovrapponibili sono stati osservati nel nostro studio: nello studio precedentemente citato[59] viene definito "falso positivo" un caso positivo con mRNA ISH ma negativo per amplificazione di mRNA e per p16; nella nostra serie tutti i casi positivi per mRNA ISH erano anche positivi per p16, inclusi i 4 casi positivi o inadeguati per l'amplificazione del messaggero; anche nella nostra serie erano presenti casi che possono essere classificati come falsi negativi per mRNA ISH, cioè postivi per amplificazione e p16. Per quanto riguarda l'evenienza di casi positivi per amplificazione di mRNA e negativi per mRNA ISH, tutti quelli da noi osservati (gruppo 3) erano negativi per p16, a differenza di quanto riportato nello studio citato; infine, il numero di casi postivi per p16 in assenza di HPV era maggiore nella nostra serie (gruppo 4, 4,6% vs 2%).

Dal confronto dei risultati ottenuti da due studi molto simili risulta evidente che nessun test, incluso lo stesso test considerato come riferimento per l'identificazione di una infezione oncogena da HPV non ha una accuratezza assoluta. In particolare, dai nostri casi emerge in maniera inattesa che anche nelle infezioni apparentemente non oncogene (senza espressione di p16) si rileva mediante amplificazione l'espressione di un numero variabile di copie di messaggero di E6, mentre l'ibridazione per il messaggero di E7 risulta negativa. Questo dato mette in discussione l'utilizzo dell'amplificazione di mRNA come *gold standard*, ed evidenzia come non siano ancora definiti, al di fuori dell'ambito ginecologico, dei criteri univoci per il riconoscimento dell'attività oncogenica di HPV. La maggior accuratezza mostrata dal test mRNA ISH, soprattutto se abbinato a p16, suggerisce la possibilità di utilizzarlo come test di riferimento, come già proposto da alcuni Autori[59], tuttavia non è possibile trascurarne i limiti che abbiamo riscontrato nella nostra esperienza pratica su un numero ormai elevato di casi, tra cui la necessità di impiego di controlli per ogni caso per riconoscere i frequenti risultati falsi negativi, la necessità di ripetizione del test a conferma dei risultati dubbi, la complessità e la laboriosità dei test, che richiedono circa 8 ore complessive di lavoro per un numero massimo di 19 casi (impiegando come nel nostro caso un solo vetrino per test e controlli grazie alle scarse dimensioni dei campioni), e infine il costo elevato dei reagenti. Tali limiti rendono improponibile al momento l'introduzione dell'ibridazione a mRNA nella routine diagnostica dei carcinomi dell'orofaringe nella nostra realtà di laboratorio.

Con l'obiettivo di cercare di superare le criticità descritte nei paragrafi precedenti, osservate con le metodiche correntemente utilizzate, abbiamo analizzato l'espressione di altri marcatori controllati da HPV nel processo oncogenetico virus-mediato in maniera differenziale rispetto all'oncogenesi indotta da fattori di rischio chimici. Abbiamo preso in esame p53, pRB e CDK1 perché rappresentano dei *target* diretti degli oncogeni virali, e perché la loro disfunzione è uno *step* cruciale nella maggior parte dei processi di trasformazione neoplastica. Considerando come HPV-correlati solo i casi positivi per p16 e DNA virale (tutti positivi anche per mRNA), abbiamo osservato che tutti i casi non correlati al virus coesprimevano CDK1 e pRB, verosimilmente come risultato di eventi mutazionali (pRB) o sovraregolazione (CDK1), mentre solo nei casi virus-dipendenti si osservava la mancata espressione di uno o dell'altro marcatore. Al contrario, l'espressione di p53 si correlava più debolmente con la presenza di infezione oncogena. Questi risultati, pur con molti limiti che verranno riassunti nel successivo paragrafo, suggeriscono che l'utilizzo di marcatori immunoistochimici potrebbe essere una valida alternativa alle determinazioni molecolari di HPV nei casi in cui esse non fossero disponibili, aumentando l'accuratezza diagnostica della sola espressione di p16.

Questo studio ha molti limiti, che rendono necessarie ulteriori conferme dei dati ottenuti e un complessivo approfondimento del significato dei risultati finora descritti. Oltre alla relativa limitatezza numerica dei casi e alla loro eterogeneità in termini di sede di origine, va rilevata l'impossibilità di definire il peso dell'esposizione ai fattori di rischio convenzionali (fumo e alcol) di cui è nota l'interazione con i *pathways* studiati. Purtroppo le modalità di gestione dei pazienti non ci hanno consentito di raccogliere dati affidabili per un numero significativo di casi. Analogamente, non è stato possibile correlare i risultati con l'*outcome* clinico dei pazienti, sia per l'elevato numero di pazienti persi al follow-up, sia anche per l'eterogeneità dei trattamenti cui sono stati sottoposti (che tengono anche conto dell'evoluzione dei protocolli terapeutici). Mentre il tasso di recidive è in linea con quanto atteso (più frequente nei tumori HPV non-correlati), l'occorrenza di un maggior numero di mancate guarigioni tra i casi HPV-correlati indica la necessità di approfondimenti in merito e in particolare di una correlazione tra profilo di biomarcatori, fattori di rischio, scelta terapeutica ed *outcome*.

FIGURE

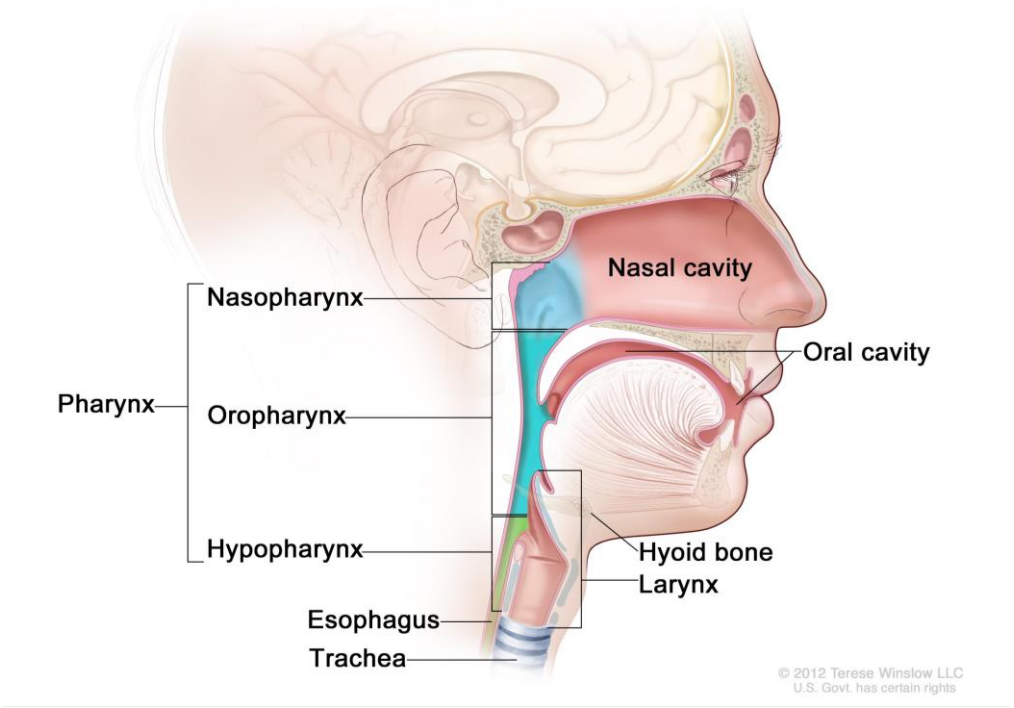

Figura 1: Anatomia del distretto cervico-cefalico [da *National Cancer Institute - Visual Online* *https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9254*]

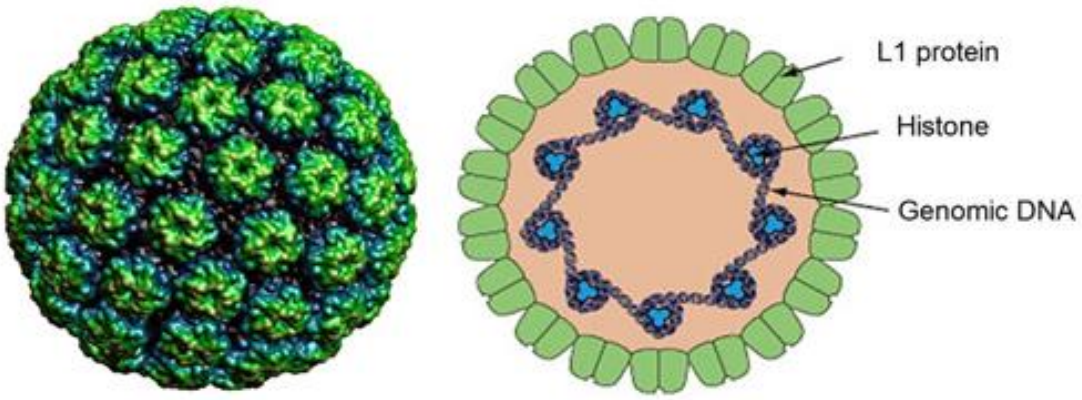

Figura 2: Ricostruzione 3D basata su studi di microscopia elettronica e struttura di HPV [da Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53 Suppl 2:S166-71.]

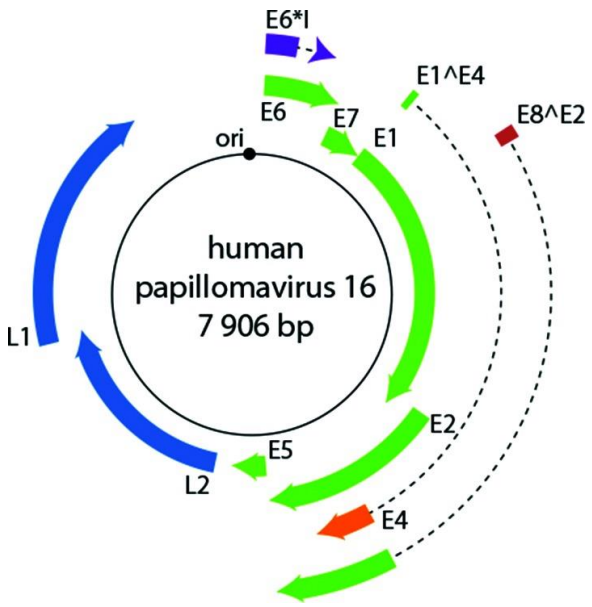

Figura 3: Rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di HPV [da Journal of General Virology 2018;99:989–990]

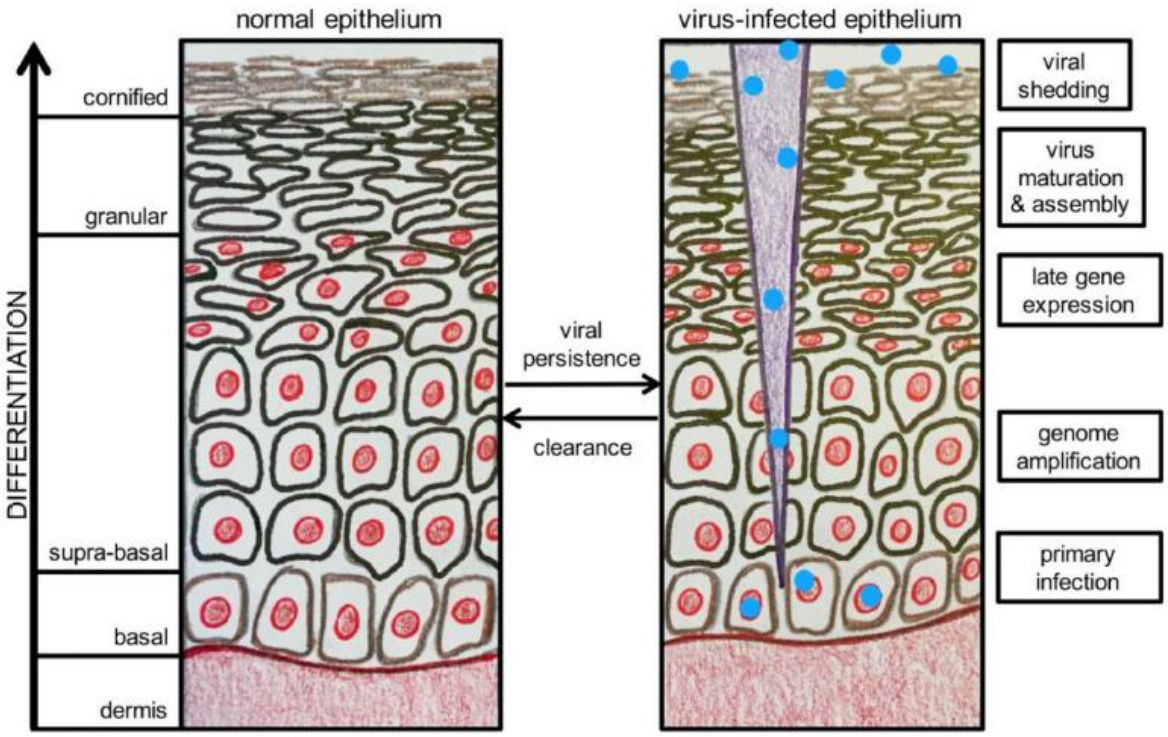

Figura 4: Ciclo vitale di HPV nell'epitelio squamoso [da Mutat Res. 2017 ; 772: 3–12.]

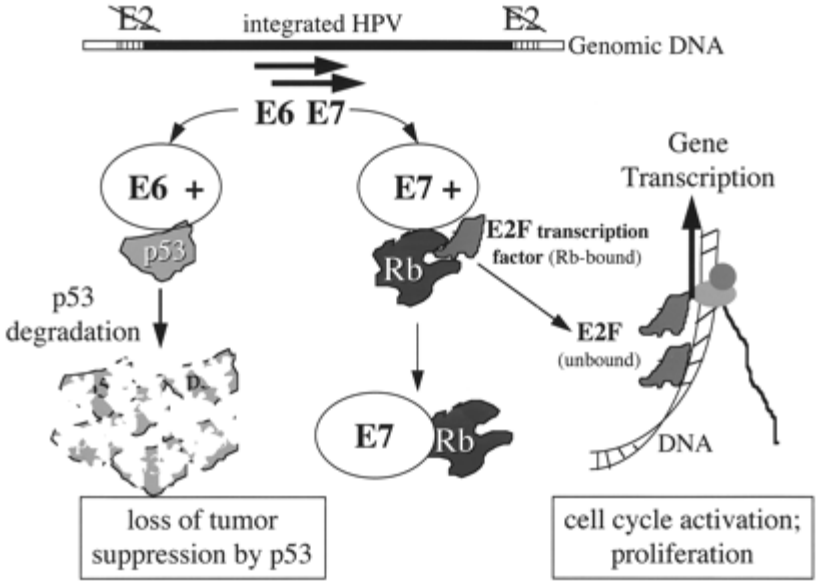

Figura 5: Meccanismo oncogenetico mediato da E6 ed E7 [da Mohammed EL MZIBRI et al. *The Molecular Basis of Viro-Induced Carcinogenesis*, Frontiers in Science and Engineering - Vol. 8 - Supplement 2 – 2019]

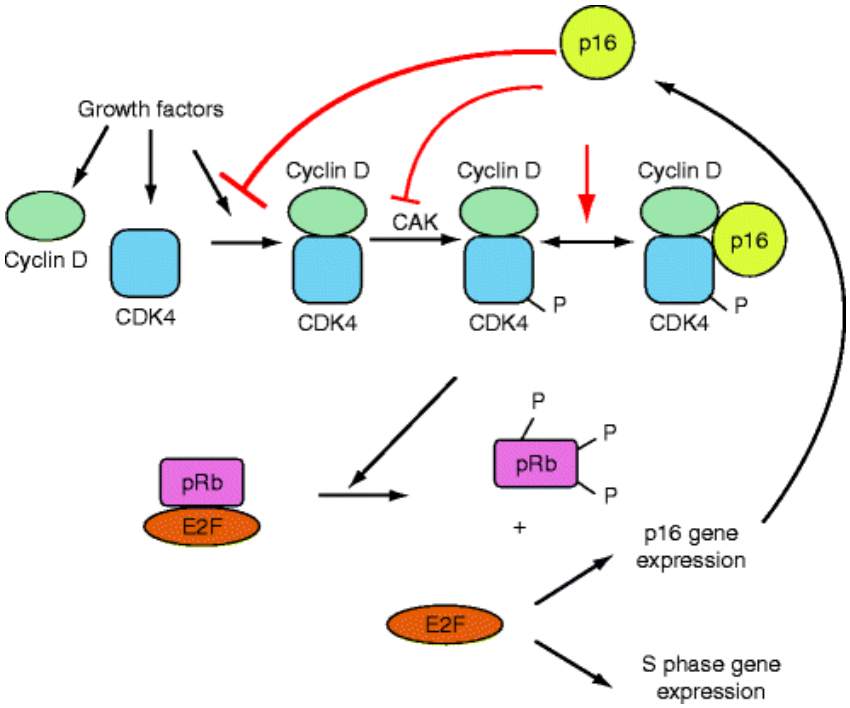

Figura 6: Ruolo di p16 nel *pathway* di oncogenesi HPV-mediata [da CDKN2A. In: Schwab M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg; *https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_966*]

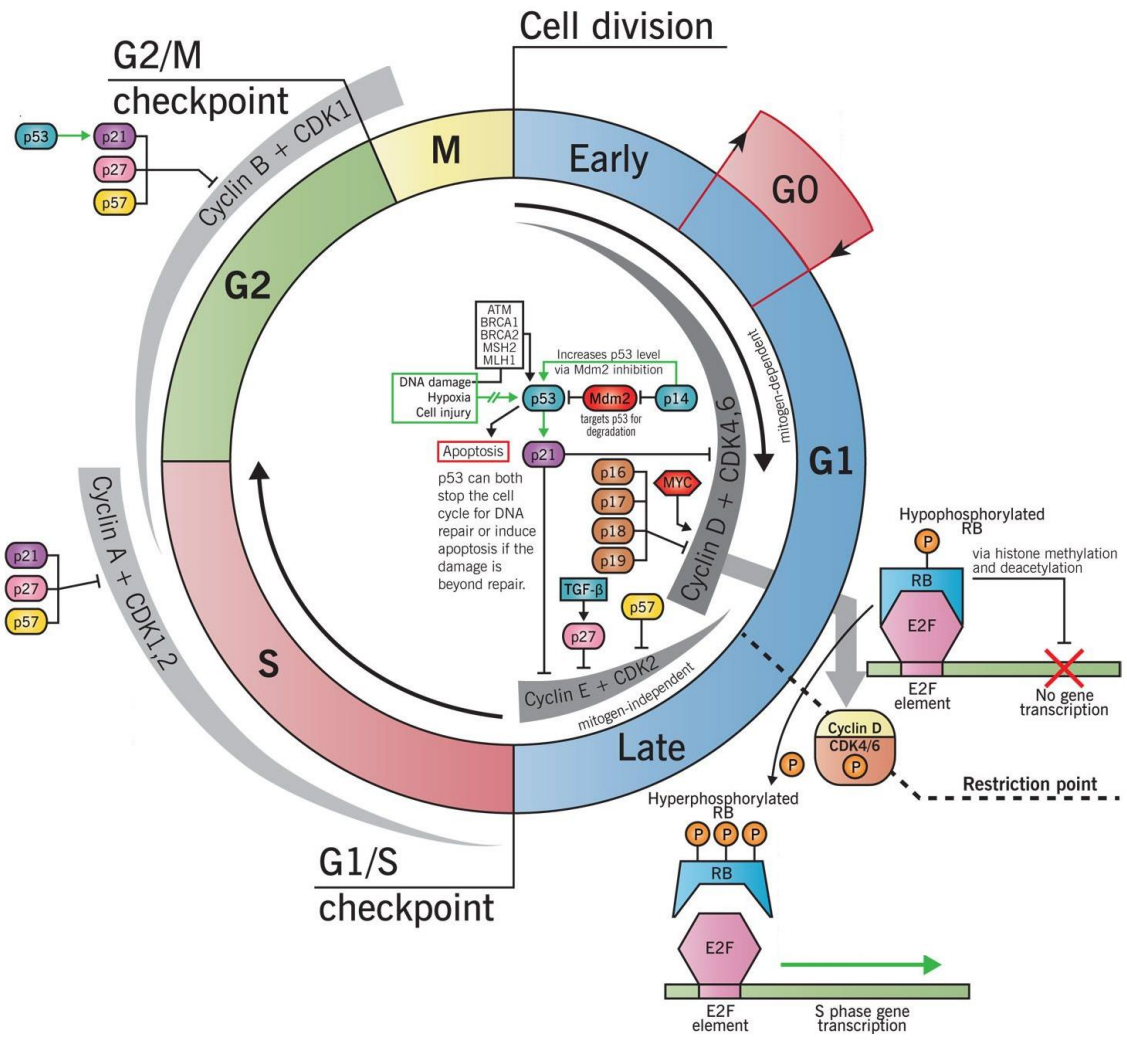

Figura 7: Il ciclo cellulare ed i *checkpoints* [da *http://www.pathophys.org/introneoplasia/*]

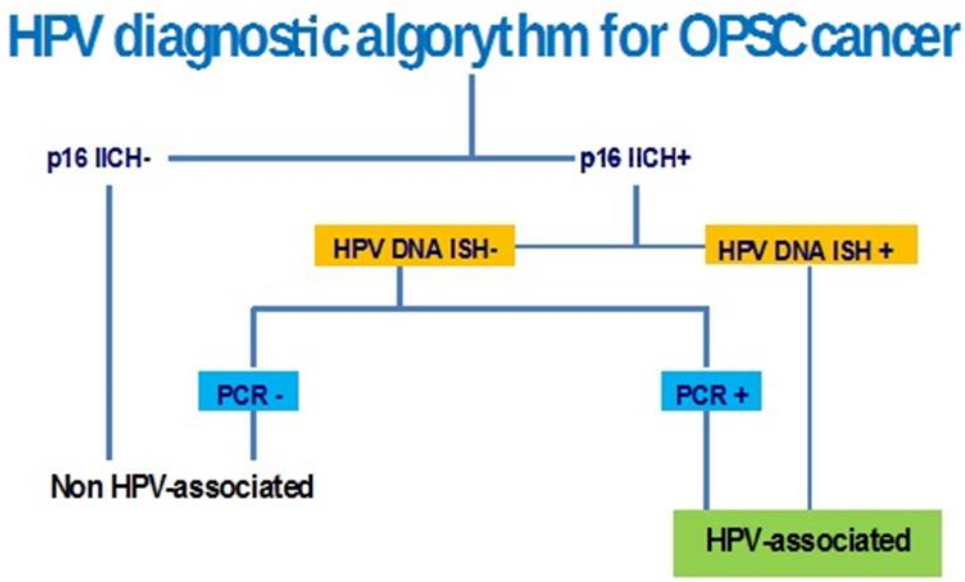

Figura 8: Algoritmo diagnostico [da Human Pathology 2015;46. 681-689.]

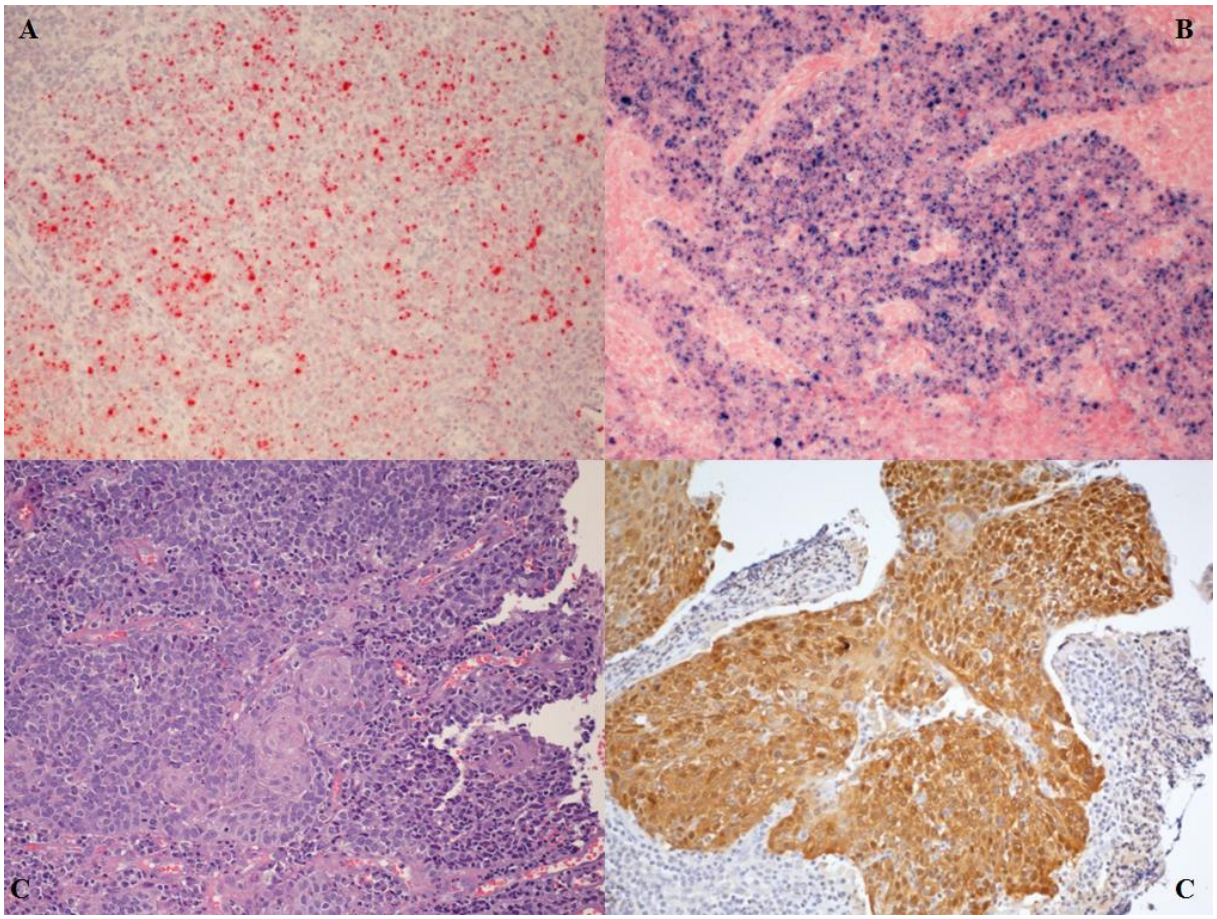

Figura 9: Ingrandimento 20x di A) mRNA ISH positiva; B) DNA ISH positiva; C) colorazione con ematossilina-eosina; D) immunoistochimica per p16 positiva [immagini fotografate dai casi in studio]

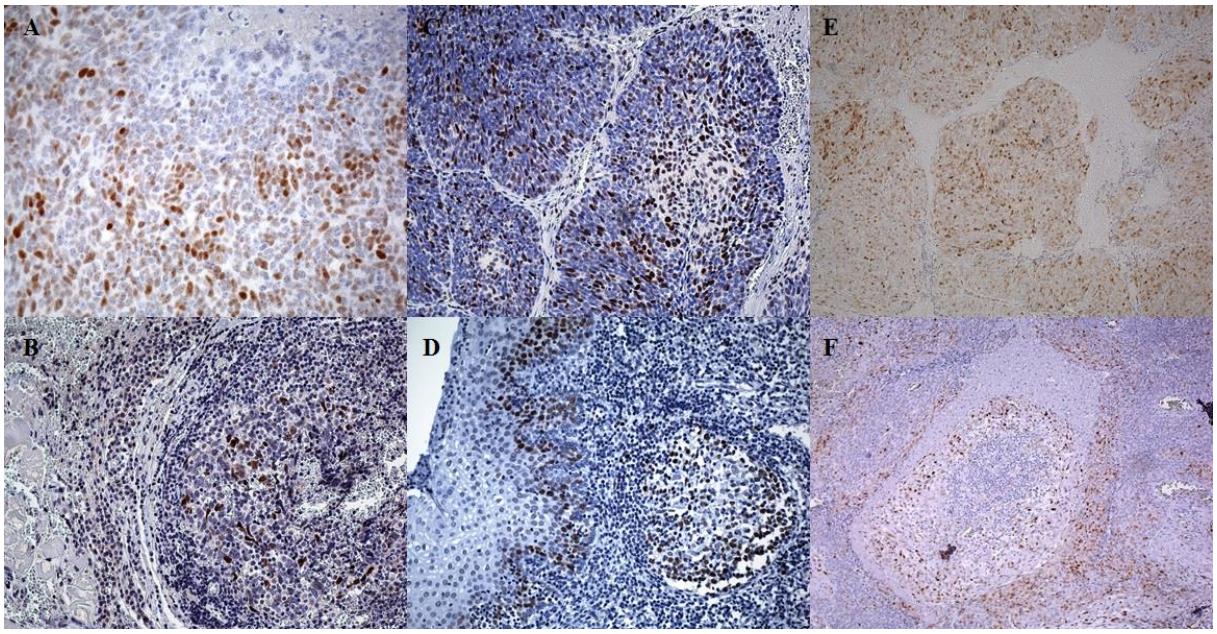

Figura 10: Colorazioni immunoistochimiche A) p53+; B) p53-; C) pRB+; D) pRB-; E) CDK1+; F) CDK1- [immagini fotografate dai casi in studio]

BIBLIOGRAFIA

1. Tumours of the oropharynx. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO classification of tumours of the head and neck, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017;133–8.
2. Chaturvedi A.K. et al. *Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers*. J Clin Oncol. 2013 Dec 20;31(36):4550-9.
3. Chaturvedi A.K. et al. *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. J Clin Oncol. 2011 Nov 10;29(32):4294-301.
4. Gillison M.L. et al. *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst. 2008 Mar 19;100(6):407-20.
5. Mehanna H. et al. *Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus*. BMJ. 2010 Mar 25;340:c1439.
6. El-Naggar A.K., Westra W.H. *p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency*. Head Neck. 2012 Apr;34(4):459-61.
7. Cancer Genome Atlas Network. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. Nature. 2015 Jan 29;517(7536):576-82.
8. Chapters 10 & 11. In: AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York: Springer; 2017; 113-21.
9. Shope RE, Hurst EW. *Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology*. J Exp Med. 1933 Oct 31;58(5):607-24.
10. Vonsky M. et al. *Carcinogenesis Associated with Human Papillomavirus Infection. Mechanisms and Potential for Immunotherapy*. Biochemistry (Mosc). 2019 Jul;84(7):782-799.
11. Van Doorslaer K. et al. Ictv Report Consortium. *ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae*. J Gen Virol. 2018 Aug;99(8):989-990.
12. De Villiers E.M. et al. *Classification of papillomaviruses*. Virology 2004;324:17–27.
13. Harden M.E., Munger K. *Human papillomavirus molecular biology*. Mutat Res Rev Mutat Res. 2017 Apr - Jun;772:3-12.
14. Scheffner M. et al. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell 1990;63:1129-1136.
15. Garbuglia A.R. *Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer*. Cancers 2014;6:1705-1726.

16. Fakhry C. et al. *Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists Guideline*. J Clin Oncol. 2018 Nov 1;36(31):3152-3161.
17. Sznurkowski J.J. et al. *The overexpression of p16 is not a surrogate marker for high-risk human papilloma virus genotypes and predicts clinical outcomes for vulvar cancer*. BMC Cancer. 2016 Jul 13;16:465.
18. Lechner M. et al. *Frequent HPV-independent p16/INK4A overexpression in head and neck cancer*. Oral Oncol. 2018 Aug;83:32-37.
19. Dreyer J.H. et al. *pRb and CyclinD1 Complement p16 as Immunohistochemical Surrogate Markers of HPV Infection in Head and Neck Cancer*. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017 May/Jun;25(5):366-373.
20. Kasihina, E. I. *Papillomavirus infection today: clinical diversity, treatment, and prevention*. Lechashchii Vrach, 2011, 10, 6-8.
21. Smith E.M. et al. *Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants.* Infect Dis Obstet Gynecol. 2010;2010:326369.
22. Sarkola M. et al. *Human papillomavirus DNA detected in breast milk*. Pediatr Infect Dis J. 2008 Jun;27(6):557-8.
23. Liu Z. et al. *Penises not required: a systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration*. Sex Health. 2016 Feb;13(1):10-21.
24. Zarochentseva V. et al. *Papillomavirus infection and HPV-associated diseases*. Lechashchii Vrach, 2017, 4, 56-63.
25. Einstein M.H. et al. *Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns*. Lancet Infect Dis. 2009 Jun;9(6):347-56.
26. Vonsky M.S. et al. *Therapeutic Vaccines Against Human Papilloma Viruses: Achievements and Prospects*. Biochemistry (Mosc). 2019 Jul;84(7):800-816.
27. Arbyn M. et al. *Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors.* Cochrane Database Syst. Rev., 5 (2018), p. Cd009069
28. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cervarix-epar-product-information_it.pdf
29. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-epar-product-information_it.pdf
30. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information_it.pdf

31. Dilley S. et al. *Human papillomavirus vaccination: Ongoing challenges and future directions*. Gynecol Oncol. 2019 Dec 14. pii: S0090-8258(19)31602-6.
32. de Oliveira C.M. et al. *HPV Vaccine: Updates and Highlights.* Acta Cytol. 2019;63(2):159-168.
33. Giuliano A.R. et al. *Nine-valent HPV vaccine efficacy against related diseases and definitive therapy: comparison with historic placebo population*. Gynecol Oncol. 2019 Jul;154(1):110-117.
34. Matsumoto K. et al; MINT Study Group. *Reduction in HPV16/18 prevalence among young women with high-grade cervical lesions following the Japanese HPV vaccination program*. Cancer Sci. 2019 Dec;110(12):3811-3820.
35. Harper D.M., DeMars L.R. *HPV vaccines - A review of the first decade*. Gynecol Oncol. 2017 Nov;147(2):489.
36. Patel C. et al. *The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent?* Euro Surveill. 2018 Oct;23(41).
37. Leal S.M. Jr, Gulley M.L. *Current and Emerging Molecular Tests for Human Papillomavirus-Related Neoplasia in the Genomic Era*. J Mol Diagn. 2017 May;19(3):366-377.
38. Madrigal E. et al. *Head and Neck Cytopathology: Human Papillomavirus-Positive Carcinomas, Including Diagnostic Updates, Testing Modalities, and Recommendations.* Surg Pathol Clin. 2018 Sep;11(3):501-514.
39. Jalaly J.B. et al. *Current Status of p16 Immunohistochemistry and HPV Testing in Fine Needle Aspiration Specimens of the Head and Neck.* Acta Cytol. 2020;64(1-2):30-39.
40. Bussu F. et al. *HPV as a marker for molecular characterization in head and neck oncology: Looking for a standardization of clinical use and of detection method(s) in clinical practice*. Head Neck. 2019 Apr;41(4):1104-1111.
41. Kim K.Y.et al. *Current status of clinical testing for human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma*. J Pathol Clin Res. 2018 Oct;4(4):213-226.
42. Manos M.M. et al. *The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papilloma viruses*. Im: Molecular Diagnosics of human cancer, NY, Cold Spring Harbor Press, 209-2014. 1989.
43. van den Brule A.J. et at. *Rapid human papilloma virus detection in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction*. J. Clin. Microbiol 1990;28:2739-2743.

44. van Doorn L.J. et al. *Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay in the SPF10 line probe assay*. J. Clin. Microbiol. 2002;40:979-983.

45. Morbini P. et al. *Identification of transcriptionally active HPV infection in formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies of oropharingeal carcinoma*. Human Pathology 2015;46. 681-689.

46. Lassus H., Butzow R. *The classification of p53 immunohistochemical staining results and patient outcome in ovarian cancer*. Br J Cancer. 2007 May 21;96(10):1621-2; author reply 1623-4.

47. The designation of HR, pHR or LR for information use only, and is based on publications of IARC Monographs Volume 100B (2012)

48. Tenti P. et al. *Analysis and clinical implications of K-ras gene mutations and infection with human papillomavirus types 16 and 18 in primary adenocarcinoma of the uterine cervix*. Int J Cancer 1995;64:9-13.

49. Liu J. et al. *Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples*.1993; Diagnostic Molecular Pathology 2(4):241-7.

50. Wang M.B. et al. HPV-positive oropharyngeal carcinoma: a systematic review of treatment and prognosis. Otolaryngol Head Neck Surg 2015; 153 (5): 758-769.

51. Windon M.J. et al. Treatment preferences in human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. Future Oncol. 2018 Oct;14(24):2521-2530.

52. Taberna M. et al. *Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer*. Ann Oncol. 2017 Oct 1;28(10):2386-2398.

53. De Felice F. et al. Advances in the Management of HPV-Related Oropharyngeal Cancer. J Oncol. 2019 Apr 14;2019:9173729.

54. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical practice guidelines in oncology. Head and neck cancers, version 2.2019. http://www.nccn.org.

55. Parvathaneni U. et al. Advances in Diagnosis and Multidisciplinary Management of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: State of the Art. Radiographics. 2019 Nov-Dec;39(7):2055-2068.

56. Gao G. et al. *A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis*. Int J Cancer. 2013 Feb 15;132(4):882-90.

57. Schache A.G. et al. *Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer. 2013 Apr 2;108(6):1332-9.
58. Mirghani H. et al. *Diagnosis of HPV-driven head and neck cancer with a single test in routine clinical practice*. Mod Pathol. 2015 Dec;28(12):1518-27.
59. Mirghani H. et al. *Diagnosis of HPV driven oropharyngeal cancers: Comparing p16 based algorithms with the RNAscope HPV-test*. Oral Oncol. 2016 Nov;62:101-108.