



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

**Tattamento immunomodulante delle
lesioni pre-cancerose della cervice
uterina (LSIL) con beta-glucani**

Dottorato di ricerca in Oncologia Clinica e
Sperimentale applicata

.2013.

Autore:

Dott Alessandro Gullotti

Relatore:

Prof Eugenio Fiorentino

Indice

3. Abstract
4. Introduzione
HPV
5. Le proteine E2,E3,E4, E5
6. Le proteine E6
Le proteine E7
7. Associazione fra HPV e Tumori della cervice
8. HPV e risposta immunitaria
9. L'evasione immunitaria dell'HPV
10. Il PAP test
12. La colposcopia
13. HPV test
15. Evoluzione del carcinoma della cervice
18. Ruolo immunomodulante dei Betaglucani
20. Scopo del lavoro
Materiali e metodi
21. Risultati
22. Conclusioni
23. Bibliografia

Abstract

Il tumore della cervice uterina rappresenta oggi l'esempio più eclatante di neoplasia associata a fattori immunologici. Uno dei fattori di rischio principali di tale malattia è, infatti, l'infezione da HPV (Human papillomavirus). L'incidenza di tale infezione risulta essere direttamente proporzionale all'entità della lesione neoplastica arrivando a toccare quota 89% nel cancro invasivo della cervice. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di osservare come un aumento della risposta immunitaria cellulo-mediata indotta dai Beta-glucani possa influenzare la risoluzione delle lesioni precancerose di basso grado della cervice uterina (LSIL). Sono state prese in considerazione, dal 2009 al 2012, 40 donne tra i 18 e i 45 anni che non presentassero storia clinica di deficit immunitari e con al Pap test una diagnosi di LSIL e un HPV-test con genotipo ad alto rischio. Le pazienti si sono sottoposte a trattamento con Betaglucani per via vaginale dopo l'esecuzione della biopsia. Altre 40 pazienti sono state prese in considerazione come controlli e messe sotto regime di "wait and see" come da linee guida 2006. A distanza di 1 anno, 32 delle pazienti trattate presentavano una regressione della patologia contro i 24 dei controlli. Conclusioni: Il trattamento con betaglucani può essere una terapia adiuvante valida nel follow up delle pazienti con LSIL.

Introduzione

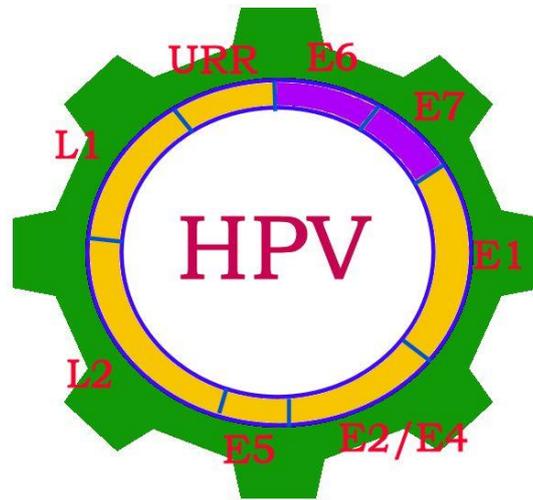
Il tumore della cervice uterina rappresenta oggi l'esempio più eclatante di neoplasia associata a fattori immunologici. Il tumore della cervice nel mondo è al 3° posto tra i tumori più frequenti e rappresenta circa il 9% del totale dei tumori femminili, con 529.800 nuovi casi e 275.100 morti nel 2008 con più del 85% dei casi nei Paesi in via di sviluppo¹ Il fattore di rischio principale di tale malattia è l'infezione da HPV (Human papillomavirus). L'incidenza di tale infezione risulta, infatti, essere direttamente proporzionale all'entità della lesione neoplastica arrivando a toccare quota 89% nel cancro invasivo della cervice²

HPV

I Papillomavirus umani (HPV) sono virus "nudi", ovvero privi di involucro esterno lipoproteico. Presentano un capsido icosaedrico di 55 nm di diametro di forma sferica, formato dal ripetersi di due proteine strutturali (L1 e L2). Il virus contiene un genoma costituito da DNA a doppio filamento circolare delle dimensioni di circa 8000 paia di basi. Il genoma degli HPV contiene otto "ORF" (open reading frames) che vengono trascritti utilizzando come stampo sempre lo stesso filamento di DNA. I Papillomavirus appartengono alla famiglia dei Papillomaviridae e sono suddivisi in 16 diversi generi in base alle proprietà biologiche e all'organizzazione del patrimonio genetico. I Papillomavirus che infettano l'uomo (HPV) si dividono in 5 grandi classi α , β , γ , μ , e ν . Ogni classe è suddiviso in specie e tipo, identificati in base a dati epidemiologici e di omologia di sequenza. Tale classificazione si basa sul tropismo specifico delle varie classi:

- α -HPV sono associati a lesioni mucoso-cutanee dell'area genitale;
- β -HPV sono prevalentemente associati a lesioni cutanee solo raramente si associano a lesioni mucose
- γ , μ e ν -HPV sono i più rari e si manifestano con lesioni cutanee lievi. Si possono manifestare in maniera più aggressiva in condizioni di immunodeficienza.

Il genoma è caratterizzato da tre parti principali: una "Early" region (E) della lunghezza di circa 4 kb, che codifica per le proteine non strutturali (E1,E2, E4, E5, E6 ed E7), una "Late" region (L) di circa 3 kb, che codifica per le due proteine del capsido (L1 e L2) e una regione di controllo non codificante (LCR)³



Le proteine E1, E2, E4 ed E5

La proteina E1 di circa 68 kDa riconosce e lega l'origine di replicazione con un'attività ATPasica ed elicastica 3'-5'⁴. E1 riconosce le sequenze ricche di AT delle origini di replicazione degli HPV in prossimità del promoter. La proteina E1 crea un complesso con la proteina E2 che permette di creare legami più forti con tali sequenze⁵. Le proteine E1 legano la DNA polimerasi α della cellula ospite attivando il processo di replicazione virale⁶. Dalla proteina E2, dipende sia la replicazione del DNA virale che la trascrizione genica⁷. La trascrizione dei primi geni è regolata da alcuni fattori di trascrizione presenti nella cellula ospite come TFIID e SP1 che si legano alle sequenze E2BS presenti nel promoter del DNA virale⁸. Le proteine E4 ed E5 vengono sintetizzate principalmente nelle fasi tardive del ciclo vitale del virus. E4 rappresenta la proteina maggiormente espressa tra tutte le proteine degli HPV⁹. Si ritiene che la proteina E4 svolga una funzione di sostegno del citoscheletro cellulare durante la fase produttiva del ciclo virale, infatti, la ridotta disponibilità di proteine cellulari strutturali rischia di causare il collasso cellulare¹⁰. Dati recenti indicano un coinvolgimento di E4 nei processi di regolazione virale basati sulla cooperazione di tale proteina con altre proteine virali¹¹. La proteina E5 degli HPV è una piccola proteina idrofobica (16 kDa) le cui funzioni non sono del tutto note. È localizzata nelle membrane endosomiali, nell'apparato del Golgi e, meno frequentemente, a livello delle membrane cellulari¹². Nei Papillomavirus dei bovini (BPV), E5 rappresenta la principale proteina con attività trasformante. Evidenze sperimentali suggeriscono che E5 sia in grado di interagire con la subunità 16k pompa protonica (V-ATPasi) lisosomiale bloccandone l'attività con conseguente alcalinizzazione del lisosoma¹³.

La proteina E6

La proteina E6 di tutti gli HPV costituita da circa 151 aminoacidi è uno dei principali oncogeni del virus e viene espressa precocemente nel corso del ciclo virale. Può causare immortalizzazione cellulare e, con l'ausilio di E7, condurre alla trasformazione cellulare. La principale azione anti-apoptotica del virus viene esplicata attraverso il legame di E6 con la proteina cellulare p53. E6 si lega a p53 attraverso un complesso ternario con una ligasiubiquitina, E6AP¹⁴. Tale complesso induce l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 mediante il proteosoma 26S. Ciò porta a una riduzione della vita media di p53 che passa da alcune ore a meno di 20 minuti nei cheratinociti infettati¹⁵.

La proteina E7

La proteina E7 è la principale responsabile dell'attività oncogena degli HPV ad alto rischio. Le proteine E7 dei virus HPV sono polipeptidi acidi di 98 aminoacidi e sono attive in forma dimerica. Il principale bersaglio intracellulare di E7 è la proteina del retinoblastoma, pRb. Le sequenze della regione CR1 rendono possibile la trasformazione cellulare mediante la degradazione di pRb. Le proteine della famiglia RB, chiamate "pocket proteins" (pRb, p107 e p130) nella forma attiva, regolano il ciclo cellulare inibendo l'entrata nella fase S¹⁶. Sono chiamate proteine "pocket" a causa di una "tasca" di legame con la quale legano fattori cellulari. Le oncoproteine virali come E7, riconoscono e si legano a tale dominio. E7, in particolare, è in grado di destabilizzare pRb inducendone la proteolisi con un meccanismo di ubiquitinazione e degradazione proteosomale¹⁷

Associazione fra HPV e Tumori della cervice

In base al grado di associazione con le forme invasive di carcinoma della cervice uterina, sono stati suddivisi in:

- HPV ad "alto rischio oncogeno" (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59)
- HPV a "basso rischio oncogeno" (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), associati a lesioni epiteliali benigne;
- HPV con un "probabile alto rischio" (HPV 26, 53, 66, 68, 73 e 82), in alcuni studi associati a carcinoma cervicale;
- HPV con un "rischio indeterminato" (HPV 2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91), il cui rischio di oncogenicità non è ancora noto¹⁸

Tuttavia l'infezione da HPV non è sufficiente da sola a determinare l'insorgenza della malattia, si stima infatti che circa il 75% delle donne sessualmente attive almeno una volta nella vita risulti positiva all'infezione da HPV¹⁹. Di queste donne solo una parte svilupperà delle lesioni displastiche legate all'infezione, e ancor meno una vera e propria patologia tumorale.

L'infezione da HPV deve essere quindi coadiuvata da altri fattori predisponenti per causare il carcinoma della cervice uterina.

Fattori di rischio per il carcinoma della cervice uterina:

- precoce attività sessuale <17 anni
- molteplici partners sessuali
- partners sessuali ad "alto rischio"
- basso livello socio-economico
- scarsa igiene personale
- fumo di sigaretta
- infezioni genitali
- Situazioni di deficit immunitari (AIDS)

Dai fattori di rischio elencati nella tabella I si evince che nel cancro della cervice vi è una stretta correlazione con i potenziali rischi di contagio di malattie sessualmente trasmesse e le situazioni di deficit immunitario²⁰

Nonostante la presenza di molteplici fattori di rischio, l'evoluzione della malattia subito dopo l'infezione è abbastanza lenta.

HPV e risposta immunitaria

HPV può essere presente all'interno della cellula sotto forma:²¹

a) RESIDENZIALE

- ❖ minima quantità
- ❖ può persistere non rilevato per anni
- ❖ può essere a basso rischio o alto rischio

b) EPISOMALE

- ❖ l'HPV è attivo localizzato nel nucleo della cellula
- ❖ è separato dal DNA umano
- ❖ può essere a basso rischio o ad alto rischio
- ❖ può causare pap test anormali

c) INTEGRATO

- ❖ HPV-DNA circolare: è aperto e s'integra nel DNA umano
- ❖ solo tipi ad alto rischio
- ❖ causa Pap test anormali

L'immunità innata è la prima risposta immunitaria²²

- ❖ L'interferone di tipo I esercita un effetto antivirale diretto
- ❖ La flogosi è un importante meccanismo di difesa che attiva la risposta immunitaria
- ❖ L'attività dei macrofagi e delle cellule NK

L'immunità adattativa

- ❖ L'attivazione dei Linfociti Th1 risulta molto efficace nella regressione delle lesioni papillomatose
- ❖ L'immunità anticorpale risulta molto specifica e protegge dalle reinfezioni ma spesso è poco aggressiva

L'evasione immunitaria dell'HPV

La infezione di HPV costituisce un bersaglio difficile per il sistema immunitario e solitamente le risposte anticorpali sono deboli.

Numerosi meccanismi sono implicati nella cosiddetta evasione immunitaria:

- HPV non è citolitico, ossia i virus non determinano lisi cellulare ma causano proliferazione cellulare e per tali motivi non inducono una risposta infiammatoria.
- HPV infetta esclusivamente le cellule epiteliali. I virioni completi si trovano nelle cellule squamose differenziate, a livello degli strati più esterni dell'epitelio genitale, a distanza dai centri immunitari situati nella sottomucosa ed implicati nella risposta immunitaria.
- HPV ostacola il riconoscimento da parte del sistema immunitario mediante il blocco della produzione di interferoni per garantire la sua replicazione. Questo è ottenuto mediante la produzione di due proteine precoci E6 ed E7, che si legano inattivando gli intermediari nella cascata degli interferon²³
- Non provoca infiammazione ("NESSUN SEGNALE" che attiva la risposta immune)
- Impedisce il riconoscimento degli antigeni capsidici da parte delle cell. di Langerhans²⁴
 - Altera il normale processo di presentazione dell'Ag (APC)
 - Altera il processo di attivazione dei linfociti T
 - Altera la risposta cellulo-mediata
 - Riesce ad evitare l'attacco dei linfociti T attivati
- Inibisce INF α e β
- Integrazione genomica

Il PAP test

L' esame citologico cervico-vaginale è un test di screening molto efficace per la valutazione del rischio del cancro della cervice. Fu ideato da George Papanicolau nel 1945 e consiste nell'asportazione attraverso idonea strumentazione ginecologica (speculum, spatola di Ayre, e spazzolino per cytobrush) di cellule esfoliative provenienti dalla cervice uterina. Le cellule vengono successivamente fissate in un vetrino ed analizzate all'esame microscopico. L'esame se ben condotto esprime lo stato di salute delle cellule pavimentose che rivestono la cervice uterina e delle cellule dell'epitelio cilindrico immediatamente prospicienti all'orificio uterino esterno. Dal 1945 si sono susseguite numerose metodiche di classificazione, ad oggi quella che ha acquisito maggiori consensi da parte della comunità scientifica è la classificazione Bethesda aggiornata alla versione 2001. L'idea è quella di poter prevedere l'evoluzione della patologia del collo dell'utero in base alle alterazioni citologiche delle cosiddette lesioni pre-neoplastiche.

Bethesda System 2001 review

TIPO DI CAMPIONE
Specificare se pap test convenzionale, in fase liquida o altro
ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE Soddisfacente per la valutazione Insoddisfacente per la valutazione Rifiutato/non processato Processato ed esaminato ma non soddisfacente per valutare anomalie di cellule epiteliali
CATEGORIZZAZIONE GENERALE (opzionale) <ul style="list-style-type: none">• Negativo per lesioni intraepiteliali o malignità• Anormalità delle cellule epiteliali squamose o ghiandolari• Altro
CELLULE SQUAMOSE Cellule squamose atipiche (ASC) Cellule squamose atipiche di significato indeterminato (ASC-US) Cellule squamose atipiche che non possono escludere HSIL (ASC-H) Lesione intraepiteliale di basso grado (LSIL) comprendente HPV/displasia lieve, CIN1 Lesione intraepiteliale di alto grado (HSIL) comprendente displasia moderata e grave, carcinoma in situ, CIS, CIN2, CIN3 Carcinoma squamoso invasivo
CELLULE GHIANDOLARI Cellule ghiandolari atipiche (AGC) Cellule ghiandolari atipiche suggestive di neoplasia Adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS) Adenocarcinoma :endocervicale, endometriale, extrauterino o non altrimenti specificato (NOS)
Altre neoplasie maligne

La colposcopia

La colposcopia è un' esame diagnostico di II° livello che consiste nel visionare a forte ingrandimento i genitali femminili (vulva, perineo, vagina, cervice uterina) servendosi di un particolare strumento: il colposcopio. E' un esame di II livello poichè viene generalmente eseguito in seguito alla visualizzazione diretta di lesioni durante una visita ginecologica oppure in seguito al riscontro di un pap test anomalo. Una volta evidenziata la portio con uno speculum vaginale, questa viene trattata con acido acetico per sciogliere le secrezioni che possano ostacolare la visione e successivamente con la soluzione iodata di Lugol. Il tessuto pavimentoso della vagina, ricco di glicogeno, tende ad assumere un colore scuro. Le lesioni invece, proprio per la scarsità di glicogeno in sede intracellulare, tendono a rimanere "iodo-negative" e quindi chiare. Una volta evidenziate le lesioni si può eseguire un prelievo bioptico mirato. Talvolta, nonostante un pap test "anomalo" non sono presenti delle chiare lesioni evidenziabili sotto guida colposcopica. In questi casi può essere utile eseguire delle biopsie random qualora il caso clinico lo rendesse necessario.

Una volta eseguita la biopsia, questa può confermare l'esito del pap test o, in alternativa, mostrare un quadro istologico di stadio più avanzato. Raramente si può incorrere nel contrario, ovvero un quadro istologico meno severo rispetto al Pap test. In questo caso va rivista tutta la catena diagnostica a partire dal riesame del vetrino del primo Pap test.

Correlazione tra quadro istologico dopo biopsia sotto guida colposcopica ed esito del pap test:

Istologia classica	Pap test	Colposcopia con biopsia
Alterazioni citologiche semplici	Coilocitosi	
Alterazioni citologiche indeterminate	ASCUS /AGUS	
Displasia lieve	LSIL (lesione intraepiteliale squamosa di basso grado)	CIN I
Displasia moderata	HSIL (lesione intraepiteliale squamosa di alto grado)	CIN II
Displasia severa (ca in situ)	HSIL	CIN III
Carcinoma invasivo	Ca invasivo	Ca invasivo

HPV TEST

Le metodiche di individuazione del genoma dell'HPV hanno indubbiamente rivoluzionato il campo della prevenzione del cancro della cervice. Le nuove conoscenze riguardo il rischio specifico di cancro associato ad un particolare genotipo virale, hanno permesso l'espansione e l'evoluzione di queste metodiche in tutto il mondo.

TECNICHE IMMUNOCITOCHIMICHE

Prevedono l'uso di Ab monoclonali o policlonali per la ricerca di Ag presenti sul capsido virale eseguita sia su sezioni biotiche che su materiale citologico fresco fissato.

Come limiti, questa metodica presenta una sensibilità non ottimale (ad es. nei casi in cui gli Ag del capsido non dovessero essere espressi).

TECNICHE MOLECOLARI

Sono tecniche che possono mettere in evidenza il DNA e/o l'RNA virale e forniscono informazioni sulla presenza di HPV ad alto e/o a basso rischio oncogeno e/o di uno specifico sottotipo.

Tecniche	Descrizione	Valutazione
Southern Blot	Ibridiz du DNA Digerito su un supporto	Specificità molto alta, molto laborioso
Dot Blot	Ibridiz su DNA purificato su filtro	Alta specificità, laborioso
Ibridazione in situ (ISH)	Ibridiz diretta su cellule O tessuti	Conservazione della morfologia
Hybrid Capture II	Ibridiz liquida con sonde RNA	Amplificazione del segnale
PCR	Amplificazione del DNA In vitro	

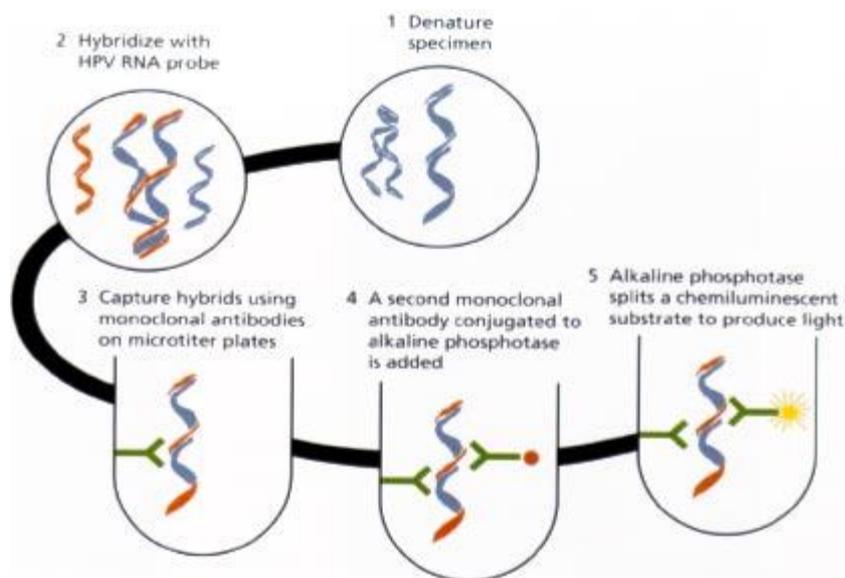
La tecnica ad oggi più utilizzata è l'HC2

I motivi sono:

- Procedura standardizzata
- Sensibilità ottimizzata per applicazioni cliniche
- Meno suscettibile a problemi di contaminazione e inibizione della PCR
- Più sensibile della ibridazione in situ

L'HC2 utilizza specifiche sonde a RNA per l'identificazione dei ceppi virali, riuscendo a distinguere tra "alto", "intermedio" e "basso rischio" oncogeno. Se il DNA dell'HPV è presente si formeranno degli ibridi RNA/DNA. Questi ibridi verranno catturati in una micropiastra da Ab universali. Il rilevamento avviene mediante un substrato luminescente.

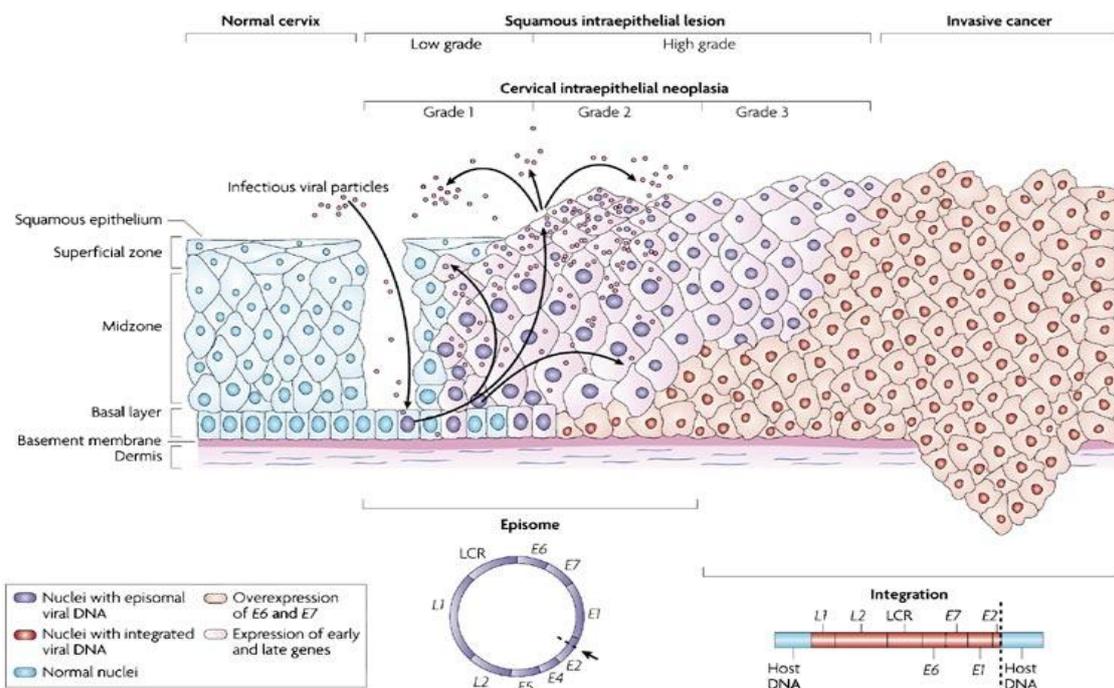
Il test HC2 ha una sensibilità del 96% e un valore predittivo negativo del 99%. Talvolta presenta scarsa specificità per la presenza di falsi positivi.



L'RNA endogeno viene degradato. Il DNA dell'HPV nel campione biologico viene ibridizzato con le sonde, si forma così un ibrido DNA-RNA. Gli ibridi reagiscono successivamente con anticorpi monoclonali specifici. Il composto DNA-RNA+Anticorpo specifico reagisce con una sostanza chemiluminescente. La defosforilazione di questo substrato produce una luce che verrà poi misurata da un apposito luminometro. L'intensità di luce espressa sarà direttamente proporzionale al quantitativo di DNA presente nel campione.

EVOLUZIONE DEL CARCINOMA DELLA CERVICE

Tutto inizia con l'infezione da parte del virus HPV delle cellule epiteliali della cervice uterina²⁵. Dopo l'infezione, si formano cellule che sfuggono ai normali meccanismi di controllo della crescita. L'infezione induce diverse alterazioni cellulari e genomiche che si manifestano con: (I) L'integrazione del DNA virale nel genoma umano con linearizzazione degli episomi virali. (II) L'over-espressione degli oncogeni E6/E7; (III) La deregolazione del ciclo cellulare con aumento della proliferazione cellulare; (IV) L'instabilità genomica ed aneuploidia, con la proliferazione di cellule displastiche. Si stima che il tempo che intercorre fra la displasia severa e il cancro invasivo possa richiedere anche tra i 10 e i 15 anni²⁶



*La formazione delle prime cellule tumorali apre la strada al cancro invasivo della
cervice, la cui evoluzione prognostica è ben rappresentata dalla stadiazione*

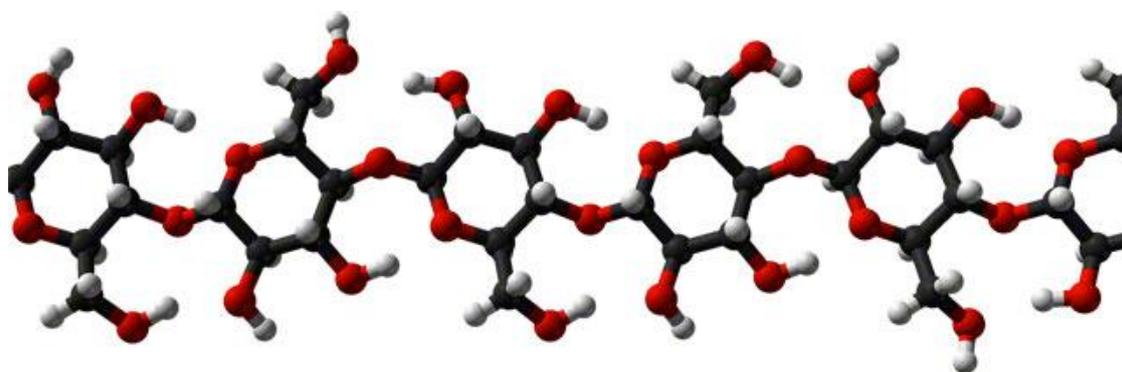
FIGO del 2009.

FIGO	CERVICCE	TNM
0	Carcinoma in situ (preinvasivo)	TisN 0
I	Carcinoma confinato alla cervice (l'estensione al corpo può essere tralasciata)	T1
Ia	Diagnosi solo microscopia	T1a
Ia1	Minima invasione stromale	T1a1
Ia2	Profondità \leq 5mm, diffusione orizzontale \leq 7 mm	T1a2
Ib	Lesione superiore a T1a2	T1b
II	Il carcinoma si estende oltre la cervice ma non alla parete pelvica o al 1/3 inf. della vagina	T2
IIa	Assenza di evidente coinvolgimento parametrico	T2a
IIb	Evidente coinvolgimento parametrico	T2b
III	Il carcinoma si estende alla parete pelvica. All'esplorazione rettale non vi è nessuno spazio libero dall'invasione del carcinoma tra la neoplasia e la parete pelvica. Il tumore coinvolge il terzo inferiore della vagina. Idronefrosi o alterata funzione renale sono inclusi, se non da altra causa.	T3
IIIa	Invasione del 1/3 inferiore della vagina senza estensione alla parete pelvica	T3a
IIIb	Estensione alla parete pelvica e/o idronefrosi o rene escluso	T3b
IV	Il carcinoma si estende oltre la pelvi vera o ha clinicamente coinvolto la mucosa della vescica o del retto. Un edema bolloso, in quanto tale, non permette di classificare la lesione allo stadio IV	T4
IVa	Diffusione agli organi adiacenti	T4
IVb	Diffusione agli organi a distanza	M1

Ruolo immunomodulante dei Beta-glucani

Il betaglucano è un polimero del Dglucosio i cui monomeri sono legati fra loro da legami beta-glicosidici²⁷. In natura è presente soprattutto nei lieviti e in altri organismi fungini. L'azione immunomodulante di tali composti è studiata da numerosi anni, in particolare la ricerca si è concentrata sulla possibile attività come terapia adiuvante nelle patologie tumorali²⁸.

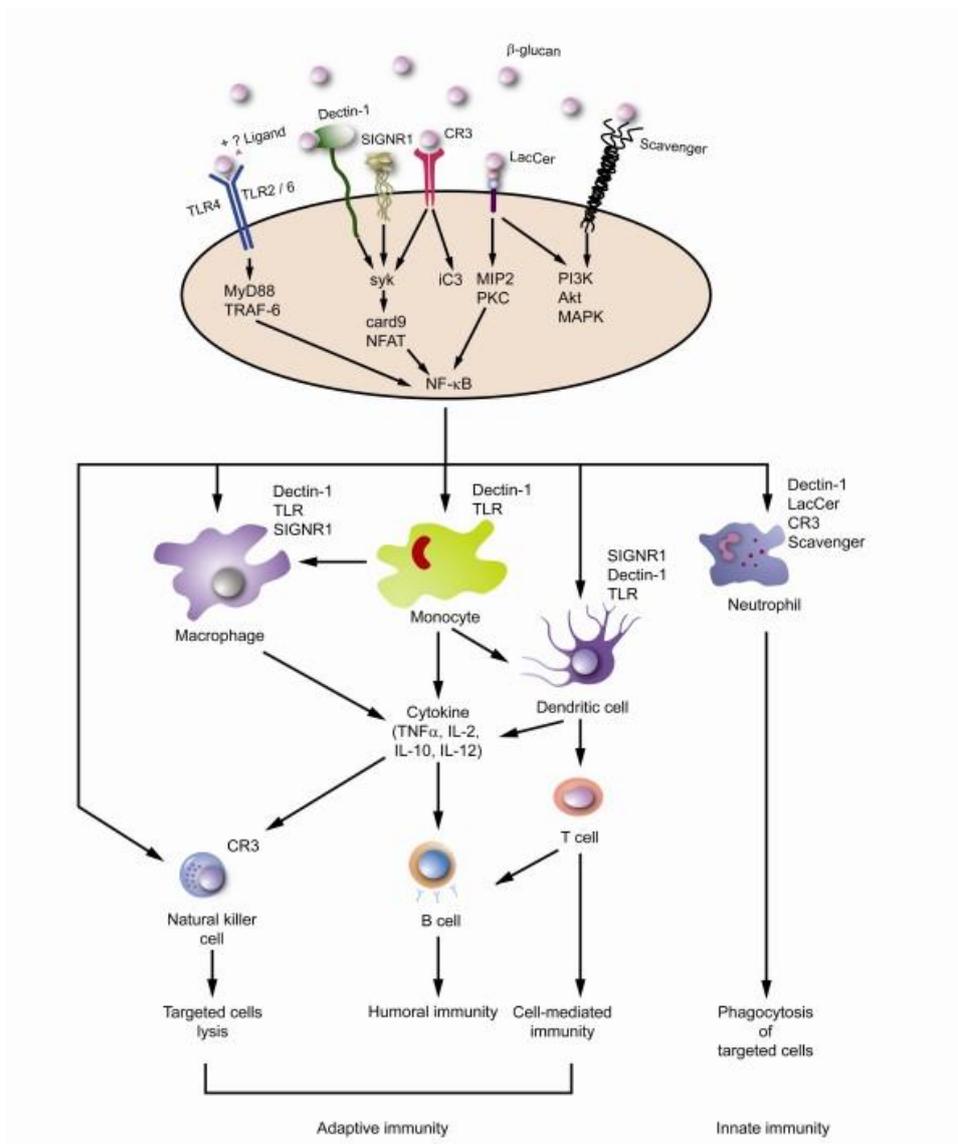
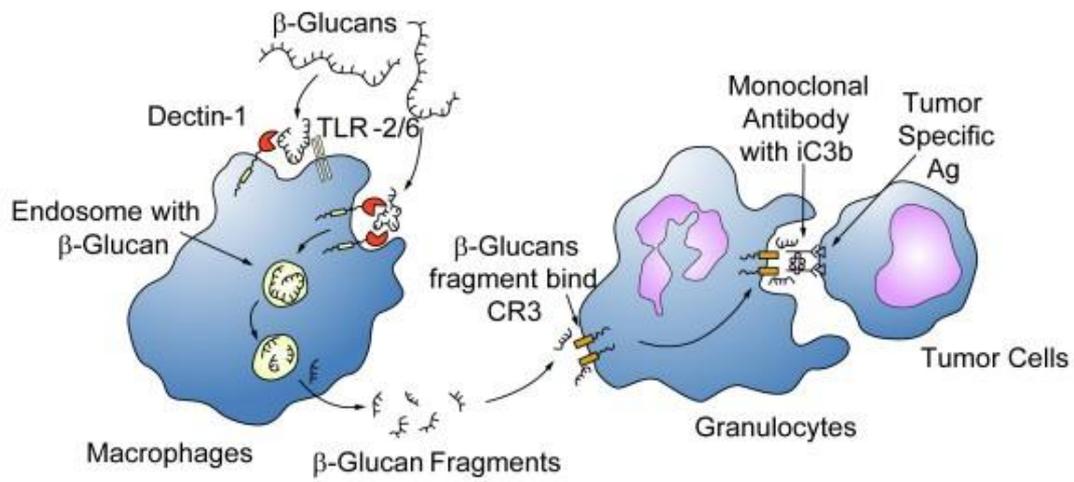
L'azione immunostimolante dei beta-glucani e la presenza di alcuni recettori di membrana a livello delle cellule tumorali è stata documentata da numerosi studi. In particolare alcuni composti con alti livelli di beta-glucani derivati da funghi hanno evidenziato un effetto citotossico diretto sulle cellule tumorali²⁹.



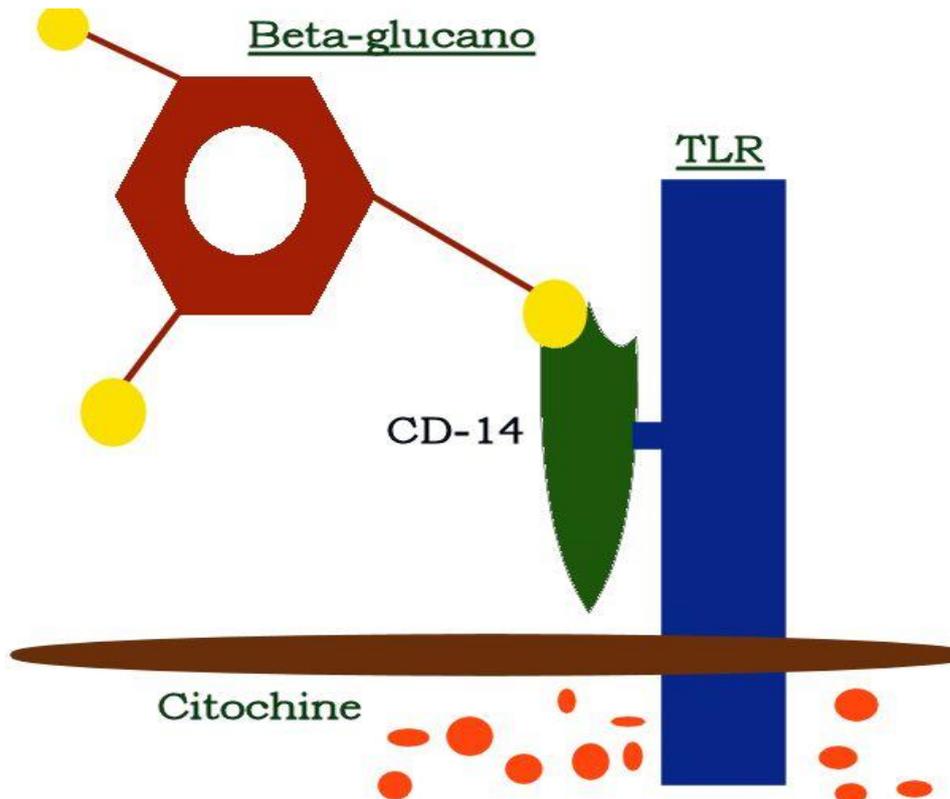
Tali sostanze sono state ampiamente utilizzate come terapie complementari antitumorali. In particolare sono state associate all'uso di anticorpi monoclonali per aumentarne l'efficacia nell'azione immunitaria contro le cellule tumorali^{28,30}.

L'azione di contrasto verso le cellule tumorali da parte dei betaglucani non è nota, tuttavia, secondo gli studi fino adesso proposti sembra avvenire mediante l'attivazione del sistema immunitario innato. In particolare sembrerebbero avere un ruolo nell'attivazione dei macrofagi agendo in maniera sinergica all'immunità umorale^{31,32}.

I beta glucani non sono naturalmente presenti nelle cellule umane. Secondo studi animali i macrofagi che entrano in contatto con tali sostanze si legano ad esse mediante recettori proteici transmembrana Dectin-1. La molecola di beta-glucano viene quindi internalizzata e frammentata in elementi più piccoli e vengono succesivamente immessi in circolo attraverso il reticolo endoteliale e il midollo osseo. Tali elementi vengono quindi captati dai granulociti, monociti e macrofagi presenti nell'organismo e attivano la risposta immunitaria contro gli anticorpi monoclonali legati alle cellule tumorali^{33,34,35}.



I dati correnti da studi sull'uomo indicano che i beta-glucani sono dei potenti attivatori della risposta immunitaria innata e adattiva, in particolare i recettori Dectin-1 sono presenti sia nei macrofagi che nei neutrofili e nelle cellule dendritiche. L'immunomodulazione oltre all'attivazione dei processi di fagocitosi permette il rilascio a cascata di numerose citochine quali IL12, IL6, IL 10 e TNF- α mediante il legame con il complesso dei recettori transmembrana TLR (Tool like receptor) e CD-14.



Scopo del lavoro

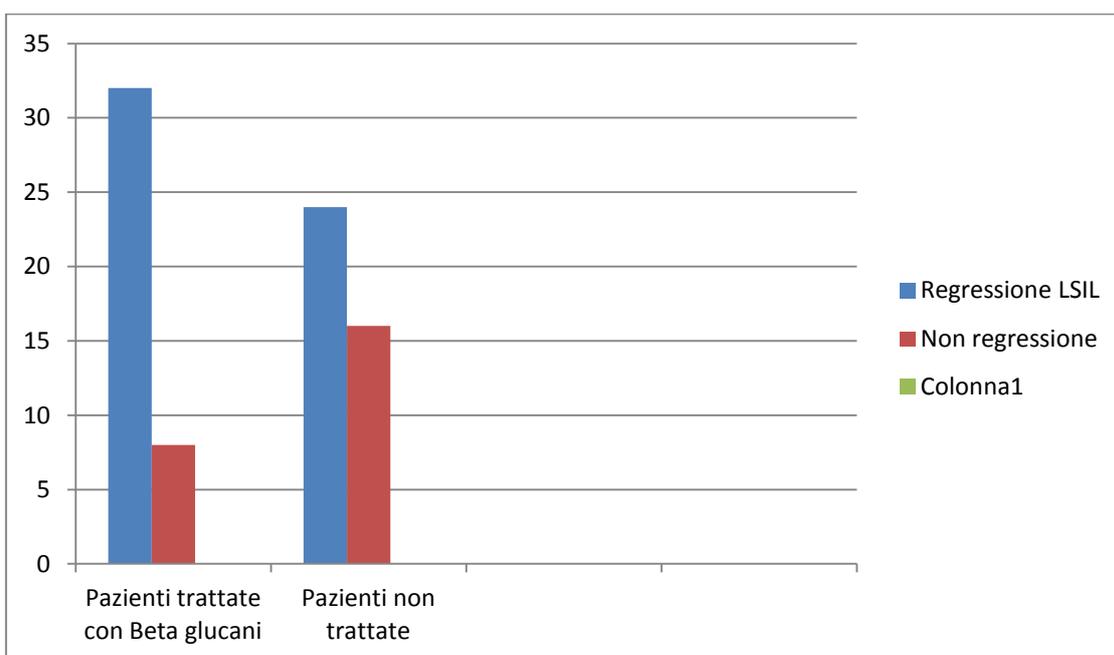
Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di osservare come i Beta-glucani potessero modulare la risposta immunitaria contro l'HPV nelle infezioni del collo dell'utero. In particolare ci siamo soffermati sulle infezioni da virus ad alto rischio che avessero procurato una lesione intraepiteliale squamosa di basso grado (LSIL). Partendo dal principio che i beta-glucani agiscono come immuno-modulatori e che alcuni studi hanno evidenziato come tali molecole possano essere dei buoni adiuvanti nelle terapie antitumorali, proprio le lesioni che predispongono al tumore della cervice HPV correlato potevano beneficiare di un trattamento con queste terapie. I Beta-glucani, inoltre, si prestano in modo specifico ad essere utilizzati per via vaginale sotto forma di ovuli, potendo essere associati ad altri composti che favoriscono i processi di riepitelizzazione della portio come l'acido 18-beta-glicirretico. Le lesioni LSIL hanno una evoluzione benigna nel 60% dei casi, tuttavia una parte di esse tende a persistere o addirittura ad aggravarsi nel corso del tempo. Tale evenienza si verifica più facilmente nelle donne con deficit immunitari sia permanenti che temporanei. L'idea è stata quindi di osservare come si comportavano le lesioni squamose di basso grado della cervice correlate ad infezione da HPV ad alto rischio nel momento in cui venivano trattate con Ovuli vaginali contenenti Beta Glucani.

Materiali e metodi

Dal 2008 al 2012 sono state prese in considerazione 80 donne di età fra i 18 e i 45 anni che all'anamnesi non presentassero storia clinica di deficit immunitari e che mostrassero una diagnosi al PAP test di LSIL confermata dal prelievo biotico sotto guida colposcopica. Queste pazienti dovevano, inoltre, presentare un HPV test, eseguito con tecnica HC2, positivo per HPV con genotipo ad "alto rischio". Le donne sono state poi divise in 2 gruppi. Un primo gruppo è stato seguito, secondo linee guida della società italiana di Colposcopia, mediante "wait and see". Il secondo gruppo è stato trattato con 1 ovulo vaginale di lalophil, Beta-glucano e ,Acido 18-Beta glicirretico per 20 giorni consecutivi. I due gruppi sono stati tenuti sotto controllo mediante l'esecuzione di Pap test a distanza di 6 mesi fino a 12 mesi. Nel gruppo delle pazienti trattate, quelle che presentavano una regressione spontanea dell' LSIL nei primi 6 mesi eseguivano solo un follow up clinico con l'esecuzione di un ulteriore pap test dopo 6 mesi. Le pazienti in cui vi era persistenza della lesione dopo 6 mesi venivano sottoposte ad un ulteriore trattamento con uvuli vaginali per altri 20 giorni.

Risultati

Al primo controllo, dopo 6 mesi, 16 delle pazienti non trattate hanno avuto una regressione spontanea della LSIL, tutte le altre anno avuto una persistenza di LSIL e nessuna un aggravamento ad HSIL. Nel gruppo delle pazienti trattate, 24 hanno avuto una regressione completa e 16 una persistenza della lesione. Anche in questo gruppo nessuna progressione verso HSIL. Tutte le pazienti, comprese quelle che avevano avuto una regressione completa della lesione al pap test, sono state sottoposte a nuovo controllo colpo citologico dopo altri 6 mesi. Le pazienti in cui vi era stata una persistenza della lesione hanno anche eseguito un controllo intermedio dopo 3 mesi. Le pazienti che erano state precedentemente trattate con terapia locale hanno fatto un ulteriore ciclo di terapia di 20 giorni. Dopo 12 mesi dalla prima osservazione 24 delle pazienti non trattate hanno presentato una regressione spontanea della lesione, 16 hanno presentato una persistenza della lesione. Nessuna delle pazienti non trattate è progredita verso HSIL. Delle pazienti trattate 32 hanno presentatato una regressione della LSIL, 8 pazienti hanno presentato una persistenza della lesione. Nesuna lesione è progredita in HSIL. A tutte le pazienti con persistenza della lesione è stata, quindi, proposta una conizzazione profilattica. Da evidenziare anche un caso nel quale una regressione completa della lesione in una paziente non trattata dopo 6 mesi ha ripresentato una LSIL dopo 12 mesi. Analizzando i dati osserviamo che l'80% delle pazienti con LSIL trattate si sono negativizzate contro il 60% dei controlli. L'analisi statistica eseguita con Test Chi quadro evidenzia una significatività di $P < 0,1$.



CONCLUSIONI

Il trattamento locale con Beta-glucani sembra essere dal nostro studio una terapia efficace che può migliorare l'evoluzione delle lesioni intraepiteliali di basso grado della cervice uterina. Considerando inoltre il basso costo e la assenza di effetti collaterali può essere proposta a tutte le pazienti con LSIL in alternativa al semplice "wait and see" proposto dalle linee guida. L'effetto sull'immunità innata dei beta glucani è molto probabilmente implicato nel progressivo miglioramento delle lesioni. Questo studio, inoltre, si integra in modo complementare con altri studi in corso riguardo la possibilità di vaccinare per l'HPV le pazienti che sono già entrate in contatto con il virus per aumentare la risposta immunitaria anticorpale e conseguentemente contrastare l'emergere di lesioni precancerose.

Bibliografia

- 1) Jemal A, Bray F et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011 Mar-Apr; 61(2):69-90. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 2011 Mar-Apr; 61(2):134
- 2) Guan P, Howell-Jones R et al. Human papillomavirus types in 115, 789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 2012 Feb 9. doi: 10.1002/ijc.27485
- 3) Fehrmann F., Laimins L. A. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 22:5201–5207.
- 4) Seo Y.S., Muller F., Lusk M., Hurwitz J. **1993**. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci. USA* **90**: 702–706.
- 5) Frattini M.G. and Laimins L.A. **1994**. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**: 12398–12402.
- 6) Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S. **1999**. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J. Biol Chem.* **274**: 2696–2705.
- 7) Laimins L.A. **1998**. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses,. *In* D. J. McCance (ed.) p. 201–223. Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 8) Steger G. and Corbach S. **1997**. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* **71**: 50–58.
- 9) Howley P.M. **1996**. Papillomaviridae: the viruses and their replication,. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. p. 947–978 Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, Pa.
- 10) Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. **1991**. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**: 824–827.
- 11) Roberts S. **2006**. The E4 protein-A late starter, *In* CAMPO S., *Papillomavirus Research*, Caister Academy Press, Wymondham: 83-96.
- 12) Conrad M., Bubb V.J., Schlegel R. **1993**. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* **67**: 6170–6178.

- 13) Di Maio D. and Mattoon D. **2001**. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* **20**: 7866–7873.
- 14) J M Huibregtse, M Scheffner, and P M Howley Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol*. 1993 February; 13(2): 775–784.
- 15) Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 13;273(11):6439-45.
- 16) Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243:934-937.
- 17) Sarah N. Boyer, David E. Wazer and Vimla Band: E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996 Oct 15;56(20):4620-4.
- 18) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518--27.
- 19) Weinstock H, Berman S, Caces W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004; 36: 6-10
- 20) Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE Prevalence of HPV infection among females in the United States *JAMA*. 2007 Feb 28;297(8):813-9
- 21) Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jan;7(1):11-22.
- 22) Mark Scott, Mayumi Nakagawa, Anna-Barbara Moscicki Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection *Clin Vaccine Immunol* March 2001 vol. 8 no. 2 209-220
- 23) Lucienne V. Ronco, Alla Y. Karpova, Marc Vidal, and Peter M. Howley Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity *Genes Dev*. 1998 July 1; 12(13): 2061–2072

- 24) Steven C. Fausch, Laura M. Fahey, Diane M. Da Silva and W. Martin Kast
Human Papillomavirus Can Escape Immune Recognition through Langerhans Cell
Phosphoinositide 3-Kinase Activation *The Journal of Immunology* June 1, 2005
vol. 174 no. 11 7172-7178
- 25) Walboomers J et al, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive
cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999; 189:12-19.
- 26) Evan R. Myers, Douglas C. McCrory, Kavita Nanda, Lori Bastian and David B. Matchar
Mathematical Model for the Natural History of Human Papillomavirus Infection
and Cervical Carcinogenesis *American Journal of Epidemiology* Vol. 151, No. 12
- 27) Wood PJ, Weisz J, Blackwell BA. 1994a. Structural studies of (1→3),(1→4)-β-D-
glucans by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of
cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography
of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chem* 71: 301-307.
- 28) Feng Hong, Jun Yan, Jarek T. Baran, Daniel J. Allendorf, Richard D. Hansen, Gary
R. Ostroff, Pei Xiang Xing, Nai-Kong V. Cheung, and Gordon D. Ross Mechanism
by Which Orally Administered β-1,3-Glucans Enhance the Tumoricidal Activity of
Antitumor Monoclonal Antibodies in Murine Tumor Models. *The Journal of
Immunology*, 2004,173: 797–806.
- 29) Godfrey CF Chan, Wing K Chan and Daniel MY Sze The effects of β-glucan on
human immune and cancer cells *Journal of Hematology & Oncology* 2009, 2:25
- 30) Jun Yan, Daniel J Allendorf & Brian Brandley Yeast Whole Glucan Particle β-
Glucan in Conjunction with Antitumour Monoclonal Antibodies to Treat Cancer,
Expert Opinion on Biological Therapy May 2005, Vol. 5, No. 5, Pages 691-702
- 31) Sun L, Zhao Y: The biological role of dectin-1 in immune response. *International
reviews of immunology* 2007, 26(5–6):349-364.
- 32) Herre J, Gordon S, Brown GD: Dectin-1 and its role in the recognition of beta-
glucans by macrophages. *Molecular immunology* 2004, 40(12):869-876.
- 33) Schorey JS, Lawrence C: The pattern recognition receptor Dectin-1: from
fungi to mycobacteria. *Curr Drug Targets* 2008, 9(2):123-129.
- 34) Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM:
Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-
like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* 2003, 197(9):1107-
1117.

- 35) Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S, Brown GD: Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 2004, 104(13):4038-4045.