

Studio delle infezioni virali nei porocarcinomi cutanei

Responsabile scientifico: Prof.ssa Daniela Massi
Sezione di Anatomia Patologica
Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale
Università degli Studi di Firenze
Viale Morgagni 85
50134 Firenze
Email: daniela.massi@unifi.it
Tel: +39 055 4478137
Fax: +39 055 4379868

Introduzione

I carcinomi cutanei sono i tumori maligni più frequenti nelle popolazioni Caucasiche. Essi includono il carcinoma a cellule basali (*basal cell carcinoma*, BCC), il carcinoma a cellule squamose (*squamous cell carcinoma*, SCC) ed i carcinomi degli annessi cutanei, tra cui il porocarcinoma che origina dalle ghiandole sudoripare ed è associato ad un elevato potenziale metastatico ed elevata mortalità (Kazakov et al, 2012). La prevalenza del porocarcinoma riportata in letteratura è compresa tra lo 0.005% e lo 0.1% (Mahalingam et al., 2012, Kazakov et al., 2012, Robson et al., 2001), ma la reale frequenza è controversa e verosimilmente sottostimata a causa delle difficoltà diagnostiche, sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista istopatologico (Urso, 2013). Il porocarcinoma insorge più spesso in età adulta-senile e nella razza Caucasica, senza apparente predilezione di sesso; le sedi anatomiche più coinvolte sono le estremità e la regione testa-collo (Busam, 2009, Kazakov et al., 2012, Mahalingam et al., 2012). Istologicamente esistono due forme di porocarcinoma: una forma *in situ* ed una forma *invasiva* (Robson et al, 2001; Busam et al, 2010; Kazakov et al, 2012). Il porocarcinoma *in situ* è una lesione confinata all'epidermide e rappresenta circa il 10% di tutti i porocarcinomi mentre il porocarcinoma invasivo è caratterizzato da un pattern di crescita invasivo nel derma e nell'ipoderma e potenzialità di disseminazione linfonodale ed a distanza (Kazakov et al, 2012)

Sebbene il più importante fattore di rischio coinvolto nell'insorgenza dei carcinomi cutanei sia l'esposizione ai raggi UV (Ramos et al., 2004), negli ultimi vent'anni si è accumulata l'evidenza che diversi agenti infettivi, in particolare i virus, possano avere un ruolo significativo nella patogenesi di questi tumori (Nindl et al., 2008).

I virus più studiati, per i quali è stata documentata una correlazione con i tumori cutanei, sono principalmente i papillomavirus umani (HPVs) ed il polyomavirus delle cellule di Merkel (MCPyV).

Gli HPV appartenenti alla famiglia *Papillomaviridae* e l'MCPyV incluso nella famiglia *Polyomaviridae* sono piccoli virus a DNA ampiamente ubiquitari e molto diffusi, altamente specie-specifici, isolati dall'uomo e da diverse specie animali. Sia i polyomavirus che i papillomavirus codificano una serie di oncoproteine che inducono l'immortalizzazione e trasformazione delle cellule

interferendo con l'attività di alcune proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

I papillomavirus causano lesioni proliferative benigne della cute (verruche) e delle mucose (papillomi e condilomi), ma anche tumori maligni.

I polyomavirus sono coinvolti nella patogenesi di vari tipi di tumori in diverse specie animali, ma solo occasionalmente sono stati associati ai tumori umani, principalmente nei pazienti immunocompromessi.

Alcuni papillomavirus mucosali ad alto rischio (HR-HPV) come l'HPV-16 o l'HPV-18, appartenenti al genere α -papillomavirus, sono stati riconosciuti come causa dell'insorgenza di circa il 10% dei tumori umani, soprattutto dei carcinomi a cellule squamose (SCC) della regione ano-genitale e della regione testa-collo (zur Hausen, 2009). Il ruolo di questi virus nella carcinogenesi cutanea resta controverso. Infatti, diversi studi riportano un'elevata prevalenza del DNA degli HR-HPV nei non melanoma skin cancers (NMSCs) (Harwood et al., 2000, Iftner et al., 2003, Reuschenbach et al., 2011), nei melanomi, nella cute perilesionale adiacente al tumore (Ruer et al., 2009) e nelle lesioni precancerose, quali la malattia di Bowen (Forslund et al., 2000, Nakajima et al., 2010). Inoltre l'HPV-16 è stato individuato sia nelle lesioni benigne che nei carcinomi a cellule basali (BCC) di un soggetto affetto da Epidermodisplasia Verruciforme (Hayashi et al., 2011). D'altra parte ci sono invece studi da cui risulta che i tipi mucosali sono solo raramente presenti, sia nei tumori cutanei che a livello cutaneo in generale (Antonsson et al., 2003, Asgari et al., 2008, Zakrzewska et al., 2012).

I β -HPV risultano molto diffusi nella popolazione generale, e causano soprattutto infezioni asintomatiche della cute (Nindl et al., 2007). Infatti il DNA virale è stato individuato nel 35-63% delle biopsie della cute sana (Astori et al., 1998, Forslund et al., 1999), nel 45-60% dei bulbi piliferi (Boxman et al., 1997, de Koning et al., 2007) e nel 69-80% dei tamponi cutanei (Antonsson et al., 2000, Hazard et al., 2007). L'associazione tra l'infezione da questi virus e i tumori cutanei è stata chiaramente riconosciuta nei pazienti con Epidermodisplasia Verruciforme (EV), che presentano una spiccata suscettibilità all'infezione da alcuni β -HPV una volta indicati come EV-HPV (Jablonska et al., 1972). E' stata anche dimostrata l'associazione dell'infezione da questi virus con l'insorgenza dei NMSCs, in particolare dell'SCC, nei soggetti immunocompromessi come i trapiantati d'organo (Berkhout et al., 1995, de Villiers et al., 1997, Berkhout et al., 2000). Più controverso rimane, invece, il loro ruolo nell'insorgenza dei tumori cutanei nella popolazione generale immunocompetente (Harwood et al., 2002, Karagas et al., 2006, Patel et al., 2008).

Lo stato attuale delle conoscenze indica che il polyomavirus delle cellule di Merkel (MCPyV), è fortemente associato all'insorgenza del carcinoma a cellule di Merkel (MCC), un raro tumore della cute a differenziazione neuroendocrina. Tale convinzione si basa su dati che dimostrano una elevata prevalenza dell'infezione nei tumori (24-85%) (Becker et al., 2009, Garneski et al., 2009), l'integrazione clonale del DNA virale nel genoma delle cellule tumorali e la presenza di peculiari mutazioni nel gene virale codificante l'antigene tumorale TL, che risulta maggiormente espresso nelle cellule tumorali (Feng et al., 2008, Shuda et al., 2008, Shuda et al., 2009).

I dati della letteratura relativi al ruolo del MCPyV in altri tumori cutanei, sono piuttosto controversi. Alcuni autori riportano una prevalenza dell'infezione

relativamente bassa sia nel BCC (12,5%) (Becker et al., 2009) che nell'SCC (13,3%) (Reisinger et al., 2010), mentre altri (Kassem et al., 2009) documentano la presenza del virus nel 32% e nel 62% dei NMSCs, rispettivamente nei soggetti immunocompetenti e negli immunocompromessi.

Attualmente non è noto se vi sia una correlazione patogenetica tra infezioni virali ed insorgenza dei porocarcinomi cutanei, in quanto questo argomento non è stato finora affrontato dalle ricerche scientifiche.

In un recente studio pilota abbiamo analizzato una serie limitata di porocarcinomi primitivi per indagare la presenza degli HPV e dell'MCPyV. In particolare la prevalenza dell'infezione da MCPyV nei porocarcinomi cutanei è risultata due volte superiore rispetto a quella riscontrata nei controlli, sebbene questa differenza non raggiunga la significatività statistica, forse a causa del basso numero di campioni esaminati. Gli HPV mucosali sono risultati raramente presenti sia nei porocarcinomi che nella cute sana. Tuttavia è importante sottolineare che il tipo trovato nel porocarcinoma è stato identificato come HPV-16, il più importante tipo ad alto rischio, mentre nella cute sana è risultato presente un tipo virale a basso rischio oncogeno. Il DNA dei β -HPV è stato identificato con una frequenza elevata sia nei tumori che nei controlli, ma il numero di tipi virali presenti nei porocarcinomi è risultato maggiore rispetto a quello riscontrato nella cute sana.

Sebbene i risultati ottenuti da questo screening preliminare non forniscono dati sufficienti per sostenere l'ipotesi che le infezioni dagli HPV e/o dal MCPyV svolgano un ruolo nella patogenesi del porocarcinoma, essi costituiscono un incoraggiante punto di partenza per successive ricerche da effettuarsi su una casistica più ampia.

Obiettivo del progetto

Obiettivo del progetto scientifico è quello di valutare la presenza di infezioni virali in un'ampia casistica di porocarcinomi cutanei primitivi e metastatici al fine di comprendere se tali infezioni abbiano un ruolo nella patogenesi di questo tipo di tumore.

Metodologie

Saranno oggetto dello studio campioni tissutali fissati in formalina ed inclusi in paraffina di porocarcinomi cutanei primitivi e da cute sana, prelevata da soggetti non affetti dal tumore (controlli). Nei pazienti con malattia metastatica verranno analizzati sia il tumore primitivo che il campione tissutale metastatico, qualora disponibile. La revisione istopatologica sarà effettuata presso il Servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Santa Maria Annunziata dell'Azienda Sanitaria di Firenze e presso la Divisione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Firenze. Per ciascun campione verranno raccolti dati relativi all'età, al sesso, alla regione anatomica dalla quale è stato effettuato il prelievo ed allo status immunitario del paziente.

I campioni verranno deparaffinati mediante ripetuti lavaggi con xilene. Per l'estrazione del DNA totale verrà utilizzato QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). Per valutare la qualità del DNA estratto i campioni verranno sottoposti ad una PCR con primer specifici per il gene della beta-globina.

La ricerca e la tipizzazione degli HPV cutanei verrà condotta mediante RHA Skin (beta) HPV kit (Diassay), in grado di individuare 25 principali tipi di β -HPV (HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93, 96). Il test prevede una PCR con una miscela di primer generici, che amplificano un frammento di 114 bp localizzato nella regione genomica E1 dei tipi virali sopraelencati. I prodotti dell'amplificazione verranno successivamente ibridati con sonde tipo-specifiche fissate su strip di nitrocellulosa.

Per la ricerca e la tipizzazione degli α -HPV verrà utilizzato un kit commerciale (Ampliquality HPV-type express test, AB ANALITICA) progettato per verificare la presenza di 40 genotipi mucosali, inclusi sia gli HPV ad alto rischio che quelli a basso rischio (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90). Il test consiste in una PCR con una miscela di primer generici, che amplificano una sequenza lunga 139-145 bp del genoma virale, e successiva ibridazione inversa dei prodotti dell'amplificazione con sonde tipo-specifiche depositate su strip di nylon. Nella PCR viene amplificato anche un segmento del gene house-keeping codificante la proteina thiosulfate sulfurtransferase rhodanese, TST (controllo interno della reazione).

La ricerca dell'MCPyV verrà effettuata mediante metodi molecolari basati su PCR real-time con sonde TaqMan, riportati in letteratura. La specificità dei prodotti della PCR verrà confermata mediante sequenziamento.

Oltre alla ricerca dei virus mediante metodiche molecolari tradizionali si prevede lo sviluppo di nuove metodiche per la ricerca e l'identificazione delle sequenze virali presenti nei campioni. In particolare, un gruppo selezionato di campioni verrà analizzato mediante tecnica Next-generation sequencing (NGS) allo scopo di confermare risultati ottenuti con i metodi molecolari classici e per individuare la presenza di tipi virali differenti, perfino quelli non ancora classificati.

Bibliografia

- ANTONSSON, A., FORSLUND, O., EKBERG, H., et al 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *Journal of Virology*, 74, 11636-11641.
- ANTONSSON, A., ERFURT, C., HAZARD, K., et al 2003. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *Journal of General Virology*, 84, 1881-1886.
- ASGARI, M. M., KIVIAT, N. B., CRITCHLOW, C. W., et al 2008. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 1409-1417.
- ASTORI, G., LAVERGNE, D., BENTON, C., et al 1998. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *Journal of Investigative Dermatology*, 110, 752-755.
- BECKER, J. C., HOUBEN, R., UGUREL, S., et al 2009. MC Polyomavirus Is Frequently Present in Merkel Cell Carcinoma of European Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 248-250.
- BERKHOUT, R. J. M., TIEBEN, L. M., SMITS, H. L., et al 1995. NESTED PCR APPROACH FOR DETECTION AND TYPING OF EPIDERMODYSPLASIA VERRUCIFORMIS-ASSOCIATED HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES IN CUTANEOUS CANCERS FROM RENAL-TRANSPLANT RECIPIENTS. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 690-695.
- BERKHOUT, R. J. M., BAVINCK, J. N. B. & TER SCHEGGET, J. 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2087-2096.
- BOXMAN, I. L. A., BERKHOUT, R. J. M., MULDER, L. H. C., et al 1997. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *Journal of Investigative Dermatology*, 108, 712-715.
- BUSAM, K. J. 2009. *Dermatopathology*, Elsevier Health Sciences.
- DE KONING, M. N. C., STRUIJK, L., BAVINCK, J. N. B., et al. 2007. Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *Journal of General Virology*, 88, 1489-1495.
- DE VILLIERS, E. M., LAVERGNE, D., MCLAREN, K. et al 1997. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *International Journal of Cancer*, 73, 356-361.
- FENG, H., SHUDA, M., CHANG, Y. & MOORE, P. S. 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 319, 1096-1100.
- FORSLUND, O., ANTONSSON, A., NORDIN, P., et al . 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *Journal of General Virology*, 80, 2437-2443.
- FORSLUND, O., NORDIN, P. & HANSSON, B. G. 2000. Mucosal human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the uterine cervix and subsequently on fingers. *British Journal of Dermatology*, 142, 1148-1153.

GARNESKI, K. M., WARCOLA, A. H., FENG, Q., et al . 2009. Merkel Cell Polyomavirus Is More Frequently Present in North American than Australian Merkel Cell Carcinoma Tumors. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 246-248.

HARWOOD, C. A., SURENTERAN, T., MCGREGOR, J. M., et al 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Journal of Medical Virology*, 61, 289-297.

HARWOOD, C. A. & PROBY, C. M. 2002. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15, 101-114.

HAYASHI, S., HATAMOCHI, A., SOUTOME, A., et al 2011. A case of epidermodysplasia verruciformis (EV) with human papillomavirus 16 (HPV16) DNA detected in the skin lesions: can HPV16 infect patients with EV? *International Journal of Dermatology*, 50, 1168-1170.

IFTNER, A., KLUG, S. J., GARBE, C., et al. 2003. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1972.

JABLONSKA, S., DABROWSKI, J. & JAKUBOWICZ, K. 1972. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Research*, 32, 583-589.

KARAGAS, M. R., NELSON, H. H., SEHR, P., et al 2006. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 389-395.

KAZAKOV, D. V., MICHAL, M., KACEROVSKA, D. et al. 2012. CUTANEOUS ADNEXAL TUMORS. *Voprosy Onkologii (St. Petersburg)*, 58, 843-844.

MAHALINGAM, M., RICHARDS, J. E., SELIM, M. A., et al. 2012. An immunohistochemical comparison of cytokeratin 7, cytokeratin 15, cytokeratin 19, CAM 5.2, carcinoembryonic antigen, and nestin in differentiating porocarcinoma from squamous cell carcinoma. *Human Pathology*, 43, 1265-1272.

NAKAJIMA, H., TERAISHI, M., TARUTANI, et al 2010. High prevalence of coinfection with mucosal high-risk type HPV (HR-HPV) and cutaneous HR-HPV in Bowen's disease in the fingers. *Journal of Dermatological Science*, 60, 50-52.

NINDL, I., GOTTSCHLING, M. & STOCKFLETH, E. 2007. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: Basic virology and clinical manifestations. *Disease Markers*, 23, 247-259.

NINDL, I. & ROESL, F. 2008. Molecular concepts of virus infections causing skin cancer in organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 8, 2199-2204.

PATEL, A. S., KARAGAS, M. R., PERRY, A. E. et al 2008. Exposure Profiles and Human Papillomavirus Infection in Skin Cancer: An Analysis of 25 Genus beta-Types in a Population-Based Study. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 2888-2893.

RAMOS, J., VILLA, J., RUIZ, A., et al 2004. UV dose determines key characteristics of nonmelanoma skin cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13, 2006-2011.

REISINGER, D. M., SHIFFER, J. D., COGNETTA, A. B., et al. 2010. Lack of evidence for basal or squamous cell carcinoma infection with Merkel cell polyomavirus in immunocompetent patients with Merkel cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63, 400-403.

REUSCHENBACH, M., TRAN, T., FAULSTICH, F., et al 2011. High-risk human papillomavirus in non-melanoma skin lesions from renal allograft recipients and immunocompetent patients. *British Journal of Cancer*, 104, 1334-1341.

ROBSON, A., GREENE, J., ANSARI, N., et al. 2001. Eccrine porocarcinoma (malignant eccrine poroma) - A clinicopathologic study of 69 cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 25, 710-720.

RUER, J. B., PEPIN, L., GHEIT, T., et al 2009. Detection of alpha- and beta-human papillomavirus (HPV) in cutaneous melanoma: a matched and controlled study using specific multiplex PCR combined with DNA microarray primer extension. *Experimental Dermatology*, 18, 857-862.

SHUDA, M., ARORA, R., KWUN, H. J., et al. 2009. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *International Journal of Cancer*, 125, 1243-1249.

SHUDA, M., FENG, H., KWUN, H. J., et al. 2008. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16272-16277.

URSO, C. 2013. Porocarcinoma: an exceedingly rare tumor or a tumor eclipse phenomenon? *Human Pathology*, 44, 448-449.

ZAKRZEWSKA, K., REGALBUTO, E., PIERUCCI, F., et al. 2012. Pattern of HPV infection in basal cell carcinoma and in perilesional skin biopsies from immunocompetent patients. *Virology Journal*, 9.

ZUR HAUSEN, H. 2009. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384, 260-265.