

**HPV e immunità** di Alessandro Lizioli Dipartimento di Prevenzione Asl Città di Milano

## Ruolo delle difese nell'infezione e protezione da vaccino

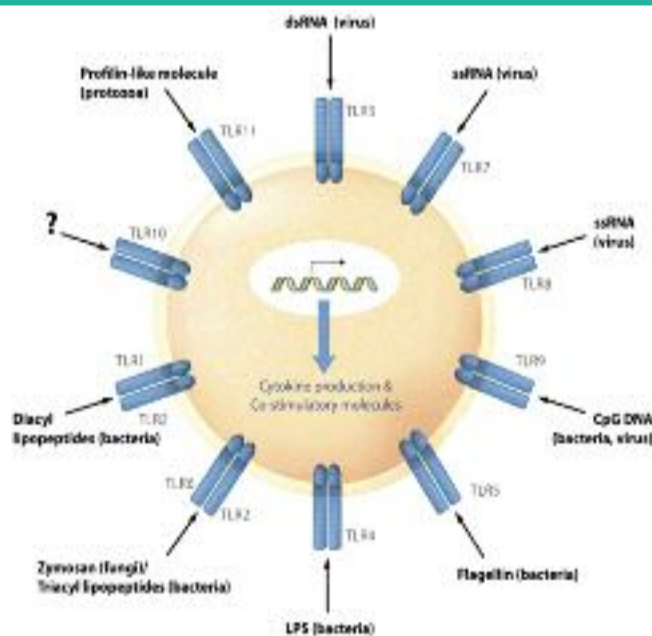
### Il sistema immunitario

La specie umana è ospite di un mondo popolato da numerosissime specie batteriche, virali, protozoarie e fungine la cui convivenza necessita di sofisticati metodi di difesa costituiti da processi di riconoscimento, interferenza biochimica, distruzione ed eliminazione. La selezione naturale ha consentito, nell'uomo, il raggiungimento di sofisticatissimi modelli di cooperazione tra cellule al punto che il sistema immunitario interagisce con tutti i tessuti e gli organi per ottimizzare i meccanismi di arginamento ed eliminazione di agenti infettanti. La prima linea difensiva dell'organismo umano è rappresentata dall'immunità innata, insieme di cellule (fagociti), molecole e proteine solubili in grado di respingere efficacemente la maggior parte degli attacchi microbici. La seconda linea difensiva è sostenuta dal sistema immunitario acquisito o adattativo, dotato di memoria immunologica, che fa capo principalmente alla linea cellulare linfocitaria T e B. Il sistema immunitario innato non possiede memoria, ma è necessario per l'attivazione del sistema adattativo. Nella tabella 1 sono mostrate le principali differenze tra i due sistemi.

Il sistema innato viene attivato ogni qualvolta avviene un danno cellulare non previsto o una morte cellulare non fisiologica; l'attivazione del sistema immunitario innato induce processi infiammatori che richiamano in situ cellule, denominate APC (antigen presenting cell), dotate di potere fagocitante, in grado di captare l'an-

**Il sistema immunitario dell'uomo è in grado di contrastare numerose infezioni attraverso diversi meccanismi innati o acquisiti, tuttavia nell'infezione da HPV tali sistemi appaiono inefficaci, consentendo al virus di evadere i meccanismi immunitari di difesa. Attualmente l'unica risorsa disponibile per impedire l'infezione è rappresentata dalla vaccinazione che deve possedere caratteristiche tali da garantire una protezione efficace nel lungo periodo. In questo articolo si analizzano i principali meccanismi di difesa nei confronti di HPV, di evasione della risposta immune e le caratteristiche che l'immunità indotta da vaccino dovrebbe possedere**

**Figura 1. Toll-like receptors e classi di antigeni**



tigene e degradarlo in tutte le sue sequenze proteiche di base. Le APC sono in grado di riconoscere potenziali noxae patogene attraverso recettori di proteine codice (cosiddetti Toll like receptors). I recettori Toll-like non possiedono singola specificità, ma specificità

per "classi" di antigeni e riconoscono molecole che in comune hanno la caratteristica di essere non self (figura 1) e vengono coinvolti nell'amplificazione del segnale immunologico aumentando le capacità di risposta dei linfociti (figura 2).

Il TLR, esposto esternamente alla membrana cellulare, riconosce il patogeno con le sue sequenze e lo internalizza; il riconoscimento e la degradazione attivano un meccanismo di traduzione, le APCs maturano in Cellule Dendritiche (DC), munite di estroflessioni citoplasmatiche (i dendriti), che migrano verso la paracortice del linfonodo più vicino, per interagire con un linfocita T vergine. Durante la fase di migrazione dalla cute o dalle mucose, la cellula dendritica spegne l'attività dei recettori per l'antigene estraneo (down regolazione) ed esprime i recettori per il riconoscimento dei linfociti T. Si osserva, quindi, uno switch funzionale, dapprima ottimale alla funzione di captazione, fagocitosi e degradazione del microorganismo e successivamente alla funzione di riconoscimento e attivazione dei linfociti T.

A sua volta, il linfocita T riconosce il segmento antigenico solo se questo è legato ad una molecola del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe II in maniera non covalente, espresso durante la fase di migrazione dalla cellula dendritica. A seguito di tale attivazione il linfocita T replica e produce cloni attivati verso l'epitopo antigenico per il quale è stato stimolato e, successivamente, si differenzia in CD8+ (citotossico) o in CD4+ (helper).

I linfociti CD4, a seguito del contatto con l'antigene, si differenziano a loro volta in TH1 o in TH2. Tale differenziazione è estremamente importante per la successiva risposta immune: infatti la linea TH1 produce Interferone  $\gamma$  e induce una risposta prevalentemente citotossica, mentre una differenziazione TH2 produce interleuchine che attivano i cloni di linfociti B con risposta prevalentemente anticorpale. Le citochine presenti nella paracortice del linfonodo durante le quattro ore successive all'incontro con l'antigene, determinano il destino del linfocita T vergine: IL-4 determina la differenziazione in TH2, mentre IL-12 determina la differenziazione in TH1. I recettori espressi dalle APC e le citochine secrete localmente de-

**Papillomavirus** comprendono un gruppo di piccoli virus a DNA del diametro di circa 55 nm. Infettano molti animali, dagli uccelli ai mammiferi, incluso l'uomo. Di norma i Papillomavirus causano forme tumorali benigne, ma alcuni sierotipi sono stati strettamente associati a tumori maligni della cervice uterina e dell'ano, al punto da essere classificati come virus ad alto rischio o oncogenici. In particolare HPV16 è associato al 58,9% dei tumori maligni della cervice.

finiscono la via di differenziazione TH1 o TH2, che si inibiscono a vicenda, ossia le citochine prodotte dalla via TH2 deprimono l'attivazione della via TH1 e viceversa.

L'interazione tra recettori e le citochine rilasciate dalle APC costituisce il ponte tra immunità innata e acquisita, in quanto comunica al linfocita T quale via e quale meccanismo di regolazione vanno attivati. Qualsiasi interferenza in questa cascata di segnali deprime la risposta immune rendendola inefficace.

### L'infezione da HPV

I Papillomavirus comprendono un gruppo di piccoli virus a DNA del diametro di circa 55 nm. Infettano molti animali, dagli uccelli ai mammiferi, incluso l'uomo. Di norma i Papillomavirus causano forme tumorali benigne, ma alcuni sierotipi di HPV, quali HPV16, HPV18 e HPV31, sono stati strettamente associati a tumori maligni della cervice uterina e dell'ano, al punto da essere classificati come virus ad alto rischio o oncogenici (hRHPV). (1). In particolare HPV16 è associato al 58,9% dei tumori maligni della cervice (2). I Papillomavirus replicano e

**Tabella 1. Principali differenza tra immunità innata e acquisita**

	Immunità innata	Immunità acquisita
caratteristiche	non specifica rapida (pochi minuti) assenza di memoria	antigene - specifica lento (giorni) memoria immunologica
componenti	barriere naturali (cute, epiteli) fagociti mediatori solubili (complemento) recettori dei profili molecolari (Toll Like Receptors)	linfociti B Cell Receptors/T Cell Receptors mediatori solubili (anticorpi)



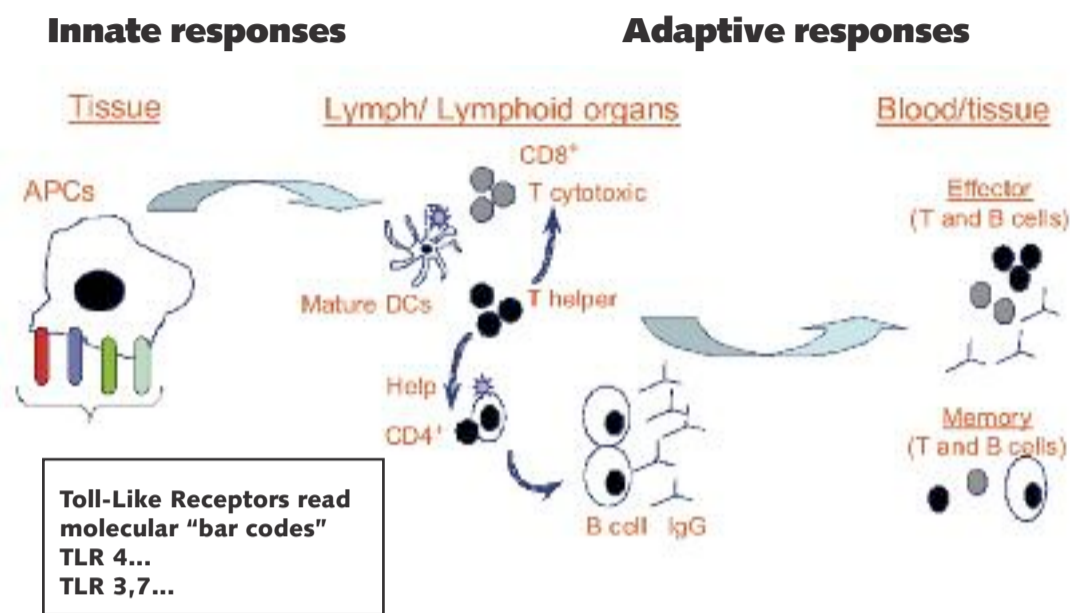
sono assemblati esclusivamente nel nucleo dei cheratinociti basali dell'epitelio squamoso. L'espressione dei geni virali si associa al grado di maturazione dei cheratinociti e, sebbene tale regolazione non sia ancora ben compresa, è in generale accettato che i geni virali esprimono, nelle prime fasi della replicazione virale che avviene nei cheratinociti indifferenziati o intermedi, 6 proteine regolatrici non strutturali (E1, E2, E4, E5, E6 ed E7) e, nelle fasi tardive di maturazione nei cheratinociti ben differenziati, 2 proteine strutturali (L1 e L2) costituenti il capsido virale.

Il tempo che il virus impiega a maturare e rilasciare nuove particelle si calcola essere di circa tre settimane, periodo analogo al tempo di maturazione dei cheratinociti per la completa differenziazione e desquamazione. Tuttavia, il periodo tra l'infezione e la comparsa delle lesioni può variare da alcune settimane a mesi, suggerendo una possibile strategia virale di evasione della risposta immunitaria (3).

Studi recenti hanno dimostrato la presenza di linfociti T memoria di tipo TH1 contro gli antigeni precoci E6 ed E7 nella maggioranza di soggetti sani sessualmente attivi, mentre tale memoria arriva ad essere addirittura assente nei pazienti con neoplasia cervicale da HPV16. (4, 5)

Una condizione caratteristica delle infezioni persistenti da hRHPV è il frequente riscontro di DNA virale integrato nel ge-

**Figura 2. Meccanismo a cascata di signalling dei TLRs**



Adattato da: T. Seya, T. Akazawa, T. Tsujita, M. Matsumoto, *Evid Based Complement Alternat Med* 3, 31 (2006), B. Pulendran, R. Ahmed, *Cell* 124, 849 (2006) e C. Janeway, *Immunobiology, the immune system in health and disease*. (Garland Science, 2004)

noma delle cellule cancerose quale risultato della disfunzione del gene regolatore E2. Alcuni dati di letteratura mostrano come la proteina cellulare anti-oncogenica p53 e le proteine soppressive tumorali pRb sono inattivate meno efficientemente dai geni E6 ed E7 di HPV a basso rischio rispetto ai geni E6 ed E7 di hRHPV (6).

Il gene E2 possiede le maggiori attività di regolazione e replicazione del ciclo virale e interagisce con E1, associato a DNA ligasi, elicasi e ATPasi, attraverso

smo umano. Tutti gli studi sulla risposta cellulomediata nei confronti di HPV hanno fatto emergere problemi di varia natura tra cui la dipendenza del ciclo virale dalla differenziazione dei cheratinociti e la localizzazione dell'infezione, confinata a livello di epitelio squamoso che possiede un elevato ricambio con morte cellulare fisiologica. Per quest'ultima ragione i siti di tale epitelio sono poco pattugliati da macrofagi e il livello difensivo è delegato alla produzione di citochine quali TGF- $\beta$ , TNF, IL-1 da parte dei cheratinociti stessi con potere di controllo sulla crescita di HPV (8, 9). Tuttavia è ampiamente dimostrata la resistenza a tali citochine in corso di trasformazione maligna delle cellule (10, 11).

La replicazione di HPV non causa danno cellulare e poiché la differenziazione dei cheratinociti è programmata per la morte cellulare non vi è nessun segnale di pericolo intercettabile dal sistema immunitario. La morte cellulare inaspettata, infatti, è il prerequisito per l'attivazione della risposta infiammatoria e in molte infezioni da HPV il ciclo virale non rilascia sostanze pro infiammatorie in grado di richiamare APC o cellule dendritiche (12). Molti DNA virali hanno sviluppato meccanismi di inibizione della sintesi di INF e della relativa catena di segnali. HPV non fa eccezione ed in particolare le proteine oncogene E6 ed E7 di HPV16 effettuano una down regolazione dell'espressione dei geni INF inducibili, abolendo la via di attivazione INF dipendente (13, 14). In sintesi, le cellule dendritiche

sono esposte a bassi livelli di proteine virali in un ambiente privo di segnali infiammatori, cosicché si stabilisce nel tempo una risposta immune iporesponsiva, attivando di fatto una tolleranza agli antigeni di HPV. L'infezione persistente sostenuta da hRHPV promuove l'espressione deregolata degli oncogeni E6 ed E7 deprimendo la risposta immune cellulomediata con la possibilità di invasione e progressione di HSIL e di CIN.

Nonostante ciò, la maggioranza delle infezioni da HPV viene controllata dal sistema immunitario con clivaggio del virus grazie ad una produzione locale di anticorpi diretti contro le proteine precoci E6 ed E7 e contro la proteina del capsido L1. Questi anticorpi, tuttavia, vengono prodotti a basso titolo e con picchi temporali molto brevi. Non essendo quella da HPV un'infezione sistemica con viremia, non vengono prodotti anticorpi serici protettivi ad alte concentrazioni.

Un'immunizzazione attiva attraverso un vaccino che produca anticorpi diretti contro le proteine capsidiche L1 e/o L2 è una delle possibili soluzioni per impedire al virus di aderire alle cellule cheratinocitiche basali. Dovendosi però tali anticorpi trovarsi in grande quantità nel sito di infezione, ossia il canale vaginale, il vaccino dovrebbe avere caratteristiche tali da indurre una risposta quantitativamente elevata per permettere, per gradiente di concentrazione, alti livelli di anticorpi nel trasudato vaginale e persistente nel tempo, in quanto l'esposizione a HPV è costante per tutta la durata della vita sessuale della persona.

## Come HPV riesca ad evadere la risposta immunitaria è la questione centrale della relazione tra il virus e l'organismo umano

la p97 (major viral promoter), nonché con E6 ed E7. La perdita di funzione di E2, osservata nei tumori ai primi stadi, porta all'espressione disregolatoria delle oncoproteine virali E6 ed E7 che rompono il ciclo cellulare dell'ospite e provocano il danno genomico con integrazione del DNA virale (7).

### HPV e risposta immune

Come HPV riesca ad evadere la risposta immunitaria è la questione centrale della relazione tra il virus e l'organi-

### Per saperne di più

1. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-265
2. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527
3. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971;47:1-13
4. de Jong A, van der Burg SH, Kwapenberg KM, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 2002;62:472-9
5. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003;63:636-41
6. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-228
7. Dietrich-Goetz, W.; Kennedy, IM.; Levins, B.; Stanley, MA.; Clements, JB. A cellular 65-kDa protein recognizes the negative regulatory element of human papillomavirus late mRNA. *Proc Natl Acad Sci; U.S.A.* 1997. p. 163-168.
8. Malejczyk, J, Malejczyk M, Kock A, Urbanski A, Majewski S, Hunzelmann N, Jablonska S, G. Orth, and T. A. Luger. Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:2702-2708
9. Malejczyk, J, Malejczyk M, Majewski S, Breitburd F, Luger TA, Jablonska S, and G. Orth. Increased tumorigenicity of human keratinocytes harboring human papillomavirus type 16 is associated with resistance. 1994
10. Braun, L., M. Durst, R. Mikumo, and P. Grappuso. 1990. Differential response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 50:7324-7332
11. De Marco F, Giannoni F, and Marcante M. L. 1995. Interferon-beta strong cytopathic effect on human papillomavirus type 16-immortalized HPK-1A cell line, unexpectedly not shared by interferon-alpha. *J Gen Virol* 76:445-450.
12. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 211-22
13. Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-Beta. *Virology* 1999;259:305-13
14. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998;12: 2061-72