

## Infezioni da Papilloma Virus e genotipi MTHFRC677T in donne con ASCUS-LSIL

### Human Papilloma Virus Infection and MTHFR C677T genotypes in women with ASCUS-LSIL

#### Summary

In a group of 277 women presenting Atypical Squamous cervical Cells of Undetermined Significance-Low Grade Squamous Intra-epithelial Lesions (ASCUS-LSIL) we studied the coexistence of MTHFR C677T polymorphism and 15 Human Papilloma virus (HPV) types with high, moderate and low carcinogenic risk. The T allele is suspected to be a weak risk factor for atypical cervical patterns independent from HPV presence.

**Conclusions.** In spite of a homogeneous distribution of all HPV types in different MTHFR genotypes, we found a significant association between HPV type 16 and CC genotype in cervical cells from our patients in the South-Eastern part of Verona Province.

Battaglia P, Baritono E, Conti A. Human Papilloma Virus Infection and MTHFR C677T genotypes in women with ASCUS-LSIL. *Trends Med* 2012; 12(2):91-95.

©2012 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

**Paolo Battaglia, Elisabetta Baritono, Antonio Conti**

ASL 21, Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale "Mater Salutis" Legnago -VR-

Key words:

**Papilloma Virus  
ASCUS-LSIL  
MTHFR**

#### Introduzione

I due principali polimorfismi dell'enzima Metilen Tetra idrofolato Reduttasi (MTHFR) di interesse clinico sono dovuti a mutazioni nucleotidiche in posizione 677 del gene C → T<sup>1</sup> e in posizione 1298 A → C<sup>2</sup>. Ne derivano proteine termolabili con ridotta attività enzimatica (A1298C in misura inferiore rispetto a C677T), che causano accumulo di omocisteina (**figura 1**) e ipometilazione del DNA che può interessare sia il DNA cellulare che gli acidi nucleici esogeni come quelli virali<sup>3</sup>.

E' controverso il ruolo dell'enzima MTHFR nei processi di insorgenza di displasia cervicale<sup>4-6</sup>, patologia fortemente condizionata da variabili quali abitudini dietetiche con particolare riguardo all'apporto alimentare di folati e vitamine del gruppo B<sup>7</sup> e riboflavina<sup>8</sup>, dalla risposta immunitaria, e da infezioni di papillo-

mavirus la cui tipologia e prevalenza variano nelle diverse etnie<sup>9</sup>.

E' anche documentato che lo stato di metilazione genomica, dipendente anche dal polimorfismo MTHFRC677T, può condizionare l'infezione da papillomavirus<sup>10</sup>. Scopo del presente lavoro è la valutazione del polimorfismo di MTHFR C677T e la associazione tra possibili genotipi (CC, CT e TT) con 15 tipi di papillomavirus ad alto, medio e basso rischio cancerogeno, per verificare la loro predittività nell'insorgenza di precoci alterazioni cellulari dell'epitelio cervicale, in donne afferenti presso il nostro Ospedale.

#### Casistica

Si sono considerate 277 donne risultate positive per atipie cellulari dell'epitelio cervicale squamoso di incerto significato e lesioni epiteliali di basso grado



**Paolo Battaglia**

ASL 21, Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale "Mater Salutis" Via Gianella 1 - 37045 Legnago -VR- Tel 0442 622690 - Fax 0442 622705 E-mail: Paolo.Battaglia@aullslegnago.it

(ASCUS,LSIL) riscontrate all'esame citologico PAP test classico di primo livello (screening primario). La pazienti studiate risultano appartenere alla AULSS 21 di Legnago nel sud-est Veronese, con fascia di età compresa tra 25 e 45 anni. Tamponi cervicali sono stati indagati per la ricerca molecolare di papillomavirus (HPV) e del polimorfismo genetico dell'enzima Metilen Tetraidrofolato Reduttasi MTHFR C677T. Come controlli si è considerato un campione di 139 donne residenti in provincia di Legnago della stessa fascia di età dei casi studiati, con ricerca citologica cervicale risultata negativa al PAP test e tampone cervicale negativo per infezioni HPV con ceppi previsti dal nostro kit diagnostico.

In tutti i casi si è stato rilasciato un consenso informato per l'accettazione dell'esecuzione degli esami genetici, eseguiti presso il nostro laboratorio.

## Materiali e metodi

### Campioni cervicali

Si sono impiegati tamponi e terreno di trasporto forniti dalla ditta COPAN Italia (Brescia) (Cy-Mol Transport & Preservation for Cells and Nucleic Acids).I campioni sono stati conservati a 4 °C per non oltre 48 ore dalla raccolta all'esecuzione del test.

### Estrazione di DNA virale e determinazione di Papillomavirus

Si sono seguite le procedure raccomandate dalla Biodiversity Srl (Brescia, Italia) che fornisce il kit di estrazione del DNA virale ed i reagenti per l'amplificazione e la rilevazione in PCR Real-Time dei seguenti tipi HPV:

Gruppo A:16,18,31,33,35,45, 52,56,58 ceppi classificati IARC

ad alto rischio cancerogeno. Gruppo 2B:53,66,73 ceppi con possibile carcinogenicità. Il ceppo 61 a basso rischio di carcinogenesi. Gruppo 3: 6,11 agenti classificabili come non carcinogeni<sup>11,12</sup>.

Il metodo prevede la tipizzazione virale con l'impiego di sequenze nucleotidiche HPV specifiche, marcate con quattro diversi fluorocromi (Fam, Texas-Red, Hex, e Cy5 per la determinazione di beta-globina come controllo interno usato per accertare l'idoneità del DNA e della reazione PCR).

Per l'amplificazione genica si è impiegato il termociclatore MJR Cromo-4 della ditta Bio-Rad (Milano).

L'esame citologico PAP test è stato eseguito secondo i criteri e la terminologia del Bethesda System 2001<sup>13</sup>.

Per i calcoli statistici si è impiegato il programma Graph Pad disponibile su sito web (<http://www.graphpad.com>).

### Determinazione del polimorfismo dell'enzima Metilen Tetraidrofolato Reduttasi (MTHFR C677T)

Si è impiegato il kit di estrazione di DNA da cellule dei campioni cervicali della ditta Biodiversity

Srl (Brescia) e il kit della stessa ditta per la ricerca genetica, in PCR Real-Time con sonde fluorescenti, di varianti termolabili di MTHFR dovute alla mutazione da citosina (C) a timina (T) in posizione 667 del gene, con conseguente sostituzione di una alanina con una valina nella proteina finale.

La presenza di allele T è causa di riduzione dell'attività enzimatica del 30% nella forme eterozigote (genotipo CT) fino al 50% nella forma omozigote (genotipo TT).

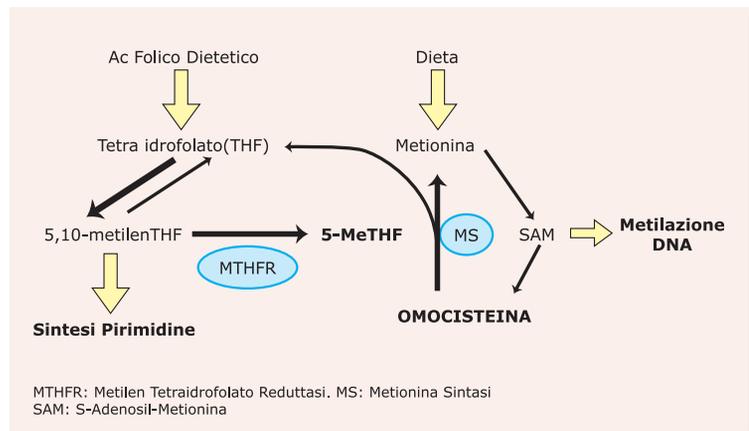
## Risultati

Nei 277 casi positivi al PAP test si è riscontrata presenza di HPV in 161 tamponi cervicali analizzati (58,1%).

Di questi, 22 casi (13,6%) risultavano portatrici di più di un ceppo HPV e 14 casi (8,7%) erano portatrici di HPV a basso rischio oncogeno (HPV 6,11).

La frequenza dei genotipi MTHFR677 CC, CT, TT nella pazienti e nel gruppo di controllo ha rispettato l'equilibrio di Hardy-Weinberg (P=0,9), confermando la adeguatezza dei campioni studiati. La frequenza dell'allele T nella nostra casistica è risultata 0,43 valore superiore a quel-

**Figura 1.** Ciclo dell'acido folico e sua importanza nei processi di sintesi del DNA.



**Tabella 1.** Determinazione di genotipi MTHFR nei casi ASCUS,LSIL in femmine residenti nel sud-est Veronese.

	Genotipi MTHFR 677		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Tutti i casi ASCUS, LSIL	88/277 (31,7)	141/277 (50,9)	48/277 (17,4)
<i>Frequenza allele T 0,43</i>			
Femmine con PAP test negativo HPV negative (controlli)	51/139 (36,8)	69/139 (49,6)	19/139 (13,6)
<i>Frequenza allele T 0,38</i>			

**Tabella 2.** Genotipi MTHFR nei casi in relazione alla presenza/assenza di HPV cervicale.

	Genotipi MTHFR 677		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Pazienti ASCUS, LSIL, HPV negative	33/116 (28,4)	60/116 (51,8)	23/116 (19,8)
Pazienti ASCUS, LSIL, HPV positive	51/161 (31,7)	90/161 (55,9)	20/161 (12,4)
<i>Test Chi-Quadrato P=0,07</i>			

la trovata nel gruppo di controllo di 0,38 (**tabella 1**).

La distribuzione genotipica di MTHFR C677T è stata studiata in: 1) gruppo di donne con PAP test positivo e HPV positivo e 2) gruppo con PAP test positivo e HPV negativo (**tabella 2**).

La differenza genotipica tra i due gruppi, determinata con il test Chi-quadrato, non è significativa ( $p=0,07$ ).

Alcuni ceppi 66,58,52 sono associati a genotipo CT, e sono frequenti in infezioni multiple. Per il ceppo HPV 16 si notano 17 pre-

senze in 51 casi con genotipo CC e 17 presenze in 110 casi con genotipo CT+TT: il test esatto di Fischer ha rivelato una differenza statisticamente significativa con  $p=0,002$  (**tabelle 3 e 4**). In **Tabella 5** è riportato il confronto casi/controlli in donne con

**Tabella 3.** Tipologia dei virus HPV in relazione al polimorfismo MTHFR C677T.

HPV	N.casi	Prevalenza%	N.di casi HPV per genotipo MTHFR		
			CC	CT	TT
16	34	21,12	17	11	6
52	18	11,18	4	14	0
31	17	10,56	8	7	2
61	15	9,32	9	4	2
53	15	9,32	6	8	1
6,11	14	8,70	3	9	2
58	13	8,07	2	10	1
66	10	6,21	0	10	0
73	7	4,35	1	5	1
18	5	3,11	0	5	0
35	4	2,48	1	2	1
33	4	2,48	0	3	1
45	3	1,86	0	1	2
56	2	1,24	0	1	1
<b>Totale</b>	<b>161</b>	<b>100</b>	<b>51</b>	<b>90</b>	<b>20</b>

atipie cellulari ma senza presenza di HPV e il gruppo di controllo caratterizzato da citologia cervicale normale e negatività di HPV cervicale. Si nota la significativa prevalenza dell'allele T nei casi con atipie cellulari, indipendentemente da infezioni HPV.

## Discussione

In tutti i nostri casi le frequenze genotipiche di MTHFR677T sono risultate compatibili con dati riportati per il Veneto<sup>14</sup>, regione con consumo adeguato di folati e vitamine del gruppo B. Abbiamo riscontrato un significativo aumento di frequenza della forma polimorfica T nel gruppo di pazienti con atipie cellulari e assenza di HPV cervicale rispetto a quella rilevata nel gruppo di

controllo. Pertanto l'allele T potrebbe costituire un fattore di rischio per atipie cellulari cervicali in fase iniziale, indipendentemente da infezioni HPV.

Per verificare il contributo di infezioni HPV nel determinismo di alterazioni cellulari cervicali iniziali abbiamo indagato la distribuzione dei ceppi HPV in cellule con diverso genotipo MTHFR C677T. I genotipi MTHFR nel gruppo 1) ASCUS,LSIL con infezione HPV e nel gruppo 2) ASCUS, LSIL senza infezione HPV, non presentano differenze significative, indicando una distribuzione omogenea dei ceppi HPV indagati nei diversi genotipi MTHFR677 CC, CT, TT. Tuttavia, analizzando i singoli ceppi si evidenzia come i tipi HPV 52,58 e 66 risultano presenti in 14 su

22 casi di infezioni miste, 3 casi su 9 con genotipo CC e ben 11 casi su 13 con genotipo CT. Non si sono riscontrate infezioni multiple in casi con genotipo TT. Sono necessari studi su casistica più ampia per verificare se queste distribuzioni siano dovute al caso. Di rilievo anche il riscontro del ceppo HPV 16, trovato in 9 su 22 casi di infezioni miste (Tabella 4).

Inoltre abbiamo evidenziato una significativa prevalenza del ceppo HPV 16 nei casi con genotipo CC (33% dei casi) rispetto ai genotipi CT+TT (15,4% dei casi). Questo rappresenta una novità in quanto a tutt'oggi non risulta in letteratura confronti tra tipologia HPV e genotipi MTHFR C677T.

Il ceppo 18 è stato riscontrato solo in 5 su 115 casi (4,3%) della nostra popolazione femminile, dati compatibili con quelli riportati in letteratura dai quali risulta una prevalenza di HPV 18 variabile dal 4% in casi senza anomalie cellulari cervicali<sup>9</sup> a 7,3% in casi di pazienti del nord Italia con diagnosi istologica di precancerosi<sup>15</sup>.

## Conclusione

L'allele T, forma polimorfica di MTHFR677T, sembra essere un fattore di rischio per atipie cellulari in fase precoce (ASCUS,LSIL), indipendente da infezione HPV. Lo stato di meti-

**Tabella 4.** Casi ASCUS,LSIL con infezione HPV multipla.

	MTHFR677CC	MTHFR677CT
<b>Combinazione di ceppi HPV</b>	16-31	16-52
	16-31	16-52
	16-58	16-66
	16-61	16-58
	16-52	18-66
	35-52	31-35
	31-61	45-66
	53-61	52-73
	53-61	52-58
		52-56
		58-53
		58-33
		66-53

**Tabella 5.** Distribuzione casi/controlli di genotipi MTHFR C677T.

	Genotipi MTHFR 677		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
1)Pazienti ASCUS, LSIL, HPV negative	33/116 (28,4)	60/116 (51,8)	23/116 (19,8)
2)Femmine con PAP test negativo HPV negative (controlli)	51/139 (36,8)	69/139 (49,6)	19/139 (13,6)

*Test Chi Quadrato: p<0,05*

lazione cellulare, dipendente dal polimorfismo MTHFR C677T, condiziona la presenza di alcuni ceppi HPV, come visto per il ceppo HPV 16 che interessa con

maggior frequenza cellule cervicali con genotipo CC. La nostra esperienza ha evidenziato che lo studio del polimorfismo MTHFR C677T in associazione

con la tipologia di HPV può incrementare la predittività nel rischio di precoci lesioni dell'epitelio cervicale, in donne della provincia sud-est di Verona. **TiM**

## Bibliografia

- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al.** A candidate genetic risk factor of vascular disease. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
- van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al.** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-1051.
- Badal V, Chuang LS, Tan EH, et al.** CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003; 71:6227-6234.
- Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, et al.** Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:1275-1280.
- Henao OL, Piyathilake CJ, Waterbort JW, et al.** Women with polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MS) are less likely to have cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 or 3. *Int J Cancer* 2005; 113:991-997.
- Lambropoulos AF, Agorastos T, Foka ZJ, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer Lett* 2003; 191:187-191.
- Tong S, Kim MK, LeeJK, et al.** Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in women with low serum folate and vitamin B12. *Cancer Causes Controls* 2011; 22:63-72.
- Piyathilake CJ, Azrad M, Macaluso M, et al.** The protective Association of MTHFR Polymorphism on Cervical Intraepithelial Neoplasia is Modified by Riboflavin Status. *Nutrition* 2007; 23:229-235.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence survey: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366:991-998.
- Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, et al.** Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell. *Epigenetics* 2011; 6:777-787.
- Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM.** Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer* 2009; 4:8.
- Wentzensen N, Wilson LE, Wheeler CN, et al.** Hierarchical Clustering of Human Papilloma Virus Genotype Patterns in ASCUS-L SIL Triage Study. *Cancer Res* 2010; 70(21):November 1.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, et al.** The 2001 Bethesda system:terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287:2114-2119.
- Zappacosta B, Romano L, Persichilli S, et al.** Genotype Prevalence and Allele Frequencies of 5,10 Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and A1298C Polymorphisms in Italian Newborns. *Labmedicine* 2009; 40:12.
- Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, et al.** Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: Prevalence and distribution of different genotypes. *Journal of Medical Virology* 2009; 81:271-277.

