

## RASSEGNA

## Patogenesi ed epidemiologia dei tumori associati all'infezione da virus di Epstein-Barr

Maria Rosaria Sciarrone<sup>1</sup>, Pierluca Piselli<sup>2</sup>, Stefania Bellelli<sup>2</sup>, Lucia Fratino<sup>2</sup>, Giuseppe Ippolito<sup>2</sup>, Maria Rosaria Capobianchi<sup>1</sup>, Diego Serraino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Virologia

<sup>2</sup> Dipartimento di Epidemiologia, INMI "L. Spallanzani" IRCCS, Roma

**Parole chiave:** EBV, latenza, tumori

### Pathogenesis and epidemiology of tumours associated with Epstein-Barr virus infection

#### SUMMARY

The Epstein-Barr virus (EBV) is one of the most successful human viruses: it is ubiquitous worldwide, and more than 80% of people over the age of 30 show serological evidence of infection. In addition, EBV infection tends to be persistent, so that, once it has occurred, it remains for the lifetime, a feature that is common to many other herpesviral infections. EBV is strongly associated with the development of several cancers, in particular with Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, and lymphoproliferative disorders which complicate immune suppression conditions. These EBV-associated neoplasms are characterized by peculiar geographic distributions and distinctive epidemiologic features. This review refers to recent advances in the mechanisms of EBV-induced cell transformation, and is focused on the main epidemiological aspects of virus-associated malignancies.

#### INTRODUZIONE

Il *virus di Epstein Barr* (EBV), isolato per la prima volta nel 1964 da una coltura cellulare di tessuto con linfoma di Burkitt (17), è diffuso in tutto il mondo ed è l'agente eziologico della Mononucleosi Infettiva (IM). L'infezione primaria viene acquisita in età infantile ed è spesso asintomatica; oltre l'80% della popolazione mondiale sopra i 30 anni mostra evidenza sierologica di esposizione a EBV che, essendo uno dei più persistenti virus che infettano l'uomo (10, 18, 27, 45), permane per tutto il resto della vita dell'individuo in uno stato di latenza.

EBV è un virus linfotropo appartenente alla famiglia "*herpesviridae*", sottofamiglia "*gammaherpesvirinae*", denominato anche *Herpes virus umano 4* (HHV-4), il cui genoma è costituito da una molecola di DNA lineare a doppio filamento. Come gli altri virus della stessa famiglia, EBV possiede la capacità di causare infezioni latenti/persistenti (31, 40). Nelle varie fasi del ciclo vitale del virus vengono espressi, oltre agli antigeni precoci e tardivi, anche gli antigeni di fase latente.

L'infezione primaria da EBV ha inizio nelle cellule epiteliali dell'orofaringe che sono permissive nei confronti della replicazione virale. La prima fase è caratterizzata da una infezione produttiva con replicazione del virus in molti distretti epi-

teliali, quali le cellule epiteliali della lingua, i dotti delle ghiandole salivari e la parotide.

Successivamente, vengono infettati i linfociti B, nei quali si instaura un'infezione non produttiva in condizioni di latenza, con scarsa o assente produzione di progenie virale, senza provocare la morte della cellula ospite. I linfociti B infettati costituiscono la sede per il mantenimento dell'infezione nell'individuo, anche dopo che si è esaurita la fase florida dell'infezione, e costituiscono la fonte di diffusione del virus all'interno dell'organismo, determinando la re-infezione dell'epitelio. Inoltre, EBV elabora strategie per interferire nel processo di differenziazione delle cellule B, attraverso l'attuazione di un preciso programma di espressione o repressione dei molti geni regolatori, che porta a differenti profili di trascrizione. Oltre ai geni per le proteine strutturali, associate all'infezione litica, infatti, il genoma virale include molti geni accessori, che codificano gli antigeni nucleari (EBNA-1-6) e le proteine latenti di membrana (LMP-1, LMP-2A e LMP-2B), la cui espressione differenziale è responsabile del mantenimento del virus in varie forme di latenza, e che sono anche responsabili della interferenza con la differenziazione e la maturazione delle cellule B.

L'espressione genica varia considerevolmente: si può avere una completa espressione dei geni, che

avvia la produzione di progenie virale, o quella limitata ad un set di geni associati alla latenza (EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B) o una completa repressione dei geni virali (latenza).

A seconda del profilo di espressione dei vari geni virali, vengono individuate 3 diverse situazioni, che si ritrovano nelle varie fasi dell'infezione, e che vengono osservate nei diversi tumori associati all'infezione da EBV (tabella 1).

Secondo il corrente modello di infezione da EBV, l'infezione iniziale impegna le cellule epiteliali dell'orofaringe, che sono permissive nei confronti della replicazione virale, e queste, a loro volta, la trasmettono ai linfociti B *naïve* ancora immaturi dell'anello di *Waldeyer* (2, 42). Alcuni studi, tuttavia, suggeriscono che le cellule B stesse dell'orofaringe possano essere la sede primaria dell'infezione (5, 35). Indipendentemente dal fatto che i linfociti B *naïve* siano la sede primaria o che acquisiscano l'infezione dalle cellule epiteliali, in essi il virus stimola l'attivazione cellulare e la conseguente differenziazione, attraverso l'espressione di EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B. Queste proteine virali infatti simulano i segnali prodotti in una normale attivazione antigenica, inducendo le cellule B immature a differenziarsi in linfociti B *memory*. In queste cellule, che possono uscire dal tessuto linfoide e circolare, il virus può inibire gran parte dell'espressione genica e divenire latente, eludendo il riconoscimento e la reazione del sistema immunitario.

L'unico gene virale transitoriamente espresso in questo stato è EBNA-1, essenziale per assicurare la replicazione del genoma virale in parallelo con la replicazione del DNA cellulare, che avviene quando le cellule B della memoria si dividono (44). L'attivazione delle cellule B *memory* infettate da EBV porta alla loro differenziazione in plasmacellule, permissive per la replicazione del virus. Nelle plasmacellule, infatti, il virus riprende

l'espressione dei geni litici e la progenie virale può diffondersi o in altre cellule B, dove si stabilirà una nuova infezione latente, o nelle cellule epiteliali nelle quali il virus può iniziare nuovi cicli di riproduzione. Questi eventi sono essenziali per la trasmissione dell'infezione ad altri individui.

Quando la fase produttiva del ciclo di replicazione virale si instaura in individui immunocompetenti, i linfociti T8 citotossici e le cellule *natural killer*, attivati rapidamente, eliminano le cellule infettate che albergano il virus in fase produttiva. Le cellule T citotossiche sono responsabili anche dell'eliminazione delle cellule B infettate in maniera non produttiva, purché esprimano i geni virali responsabili dell'attivazione della proliferazione cellulare. La massiccia presenza di cellule T EBV-specifiche è la principale caratteristica della Mononucleosi Infettiva (IM), la comune malattia che può manifestarsi in seguito all'infezione da EBV in individui immunocompetenti.

Nei pazienti immunocompromessi, il difetto nella risposta immune specifica per gli antigeni di EBV è uno dei maggiori determinanti della comparsa di malattie linfoproliferative delle cellule B. Una risposta immune difettosa impedisce l'eliminazione dei linfociti B, i quali vengono stimolati indefinitamente alla proliferazione, perdendo la capacità di differenziarsi. Essi producono anticorpi, ma non raggiungono mai lo stadio di plasmacellule. D'altra parte le cellule B infettate sono mantenute da EBV in uno stato replicativo attivo; tale caratteristica porta a ritenere che il virus giochi un ruolo primario nella comparsa di malattie tumorali delle cellule B (tabella 2). Ossia, il potenziale oncogeno del virus è dovuto alla sua capacità di indurre la proliferazione incontrollata dei linfociti B.

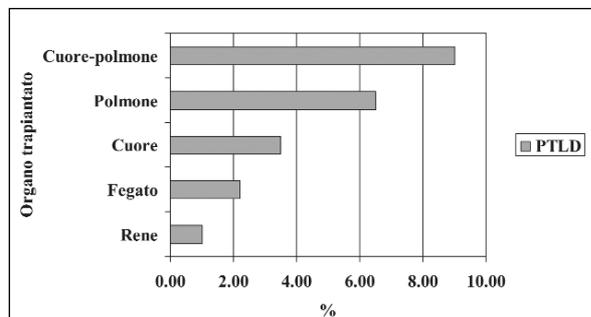
Nei seguenti paragrafi vengono illustrate l'epidemiologia e le principali caratteristiche dei tumori comunemente associati con l'infezione da EBV.

**Tabella 1.** Tumori EBV-associati e tipo di latenza

TUMORI EBV-ASSOCIATI	TIPO DI LATENZA (GENI ESPRESSI)
Linfoma di Burkitt	Latenza I (EBNA-1)
Malattia di Hodgkin Linfoma nasale a cellule T Carcinoma nasofaringeo	Latenza II (EBNA-1, LMP-1, LMP-2)
Linfoma immunoblastico Disordini linfoproliferativi post-trapianto	Latenza III (EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2)

**Tabella 2.** Tumori EBV-associati e popolazioni a rischio

TIPO DI TUMORE	POPOLAZIONI A RISCHIO
Linfoma di Burkitt	Bambini africani Soggetti HIV-positivi nei paesi occidentali
Linfoma non-Hodgkin correlato all'immunosoppressione	Soggetti HIV-positivi Soggetti con altri tipi di immunodeficienza
Malattia di Hodgkin	Giovani adulti e soggetti HIV-positivi nei paesi occidentali Bambini nei paesi in via di sviluppo
Carcinoma nasofaringeo	Cina meridionale (popolazioni cantonesi); gruppi di popolazioni cinesi in Hong Kong e Singapore; Arabi Mediterranei; Malesi in Singapore



**Figura 1.** Frequenza di PTLD secondo il tipo di organo trapiantato

### Epidemiologia dell'infezione da EBV

La maggior parte della popolazione infetta diffonde EBV attraverso la saliva, per cui l'infezione può essere trasmessa, per stretto contatto, ad individui sieronegativi. La via orale è sicuramente il più comune modo di trasmissione dell'infezione da EBV, ma sono stati documentati anche casi di trasmissione attraverso trasfusione di sangue o attraverso trapianto d'organo (27, 30).

L'età, la localizzazione geografica e le condizioni socioeconomiche influenzano fortemente l'epidemiologia dell'infezione da EBV (8, 10, 21, 27, 45). La sieroprevalenza di EBV nei giovani adulti è inversamente correlata con le dimensioni del nucleo familiare, le condizioni igieniche e lo sviluppo socioeconomico. Nei paesi in via di sviluppo e nei gruppi di popolazione svantaggiati delle aree sviluppate, il 95% dei bambini viene infettato attraverso esposizione intrafamiliare prima dell'età di 6 anni. Al contrario, nei paesi occidentali l'infezione tende a verificarsi più tardi, di solito nell'adolescenza. Si ritiene che i soggetti che non acquisiscono l'infezione durante l'infanzia sierconvertano negli anni successivi, principalmente attraverso il bacio, poiché la Mononucleosi Infettiva (IM) si sviluppa nel 50-75% degli adolescenti (33).

Per meglio delineare le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione da EBV, alcuni studi recenti hanno considerato i nuovi stili di vita e i cambiamenti geografici (27, 33). Due indagini, in particolare, hanno evidenziato la presenza di EBV nelle secrezioni genitali maschili e femminili (6, 29). Una indagine condotta sulle adolescenti svedesi ha rilevato, a questo proposito, che la sieropositività per EBV può essere associata all'attività sessuale (6). Un altro studio epidemiologico, condotto presso l'Università di Edimburgo su 1006 studenti di età inferiore ai 21 anni, ha osservato che la prevalenza di sieropositività per EBV era significativamente maggiore tra gli studenti sessualmente attivi (83%) rispetto a quelli non attivi (64%), e che un fattore di rischio altamente

significativo era rappresentato dall'alto numero di *partner* sessuali. Tale conclusione è stata interpretata come indicativa della trasmissione di EBV durante i rapporti sessuali o legata a comportamenti a questi associati, e ciò ha aiutato a chiarire l'epidemiologia dell'EBV, in particolare le modalità di trasmissione dell'infezione che precede IM.

La trasfusione di linfociti B infettati in forma latente presenti nel sangue di donatori sani a riceventi sieronegativi rappresenta un'altra via potenziale di trasmissione. Tale ipotesi ha riscosso particolare attenzione negli ultimi anni, a causa dell'incremento del numero di trasfusioni di sangue e di trapianti d'organo e di midollo (1, 20).

Sulla base dell'evidenza epidemiologica tratta da molte indagini su uomini e animali, l'Agenzia di Ricerca per il Cancro (IARC) ha classificato l'EBV quale agente cancerogeno di gruppo 1, perché strettamente correlato allo sviluppo del linfoma di Burkitt (BL), del carcinoma nasofaringeo (NPC), della malattia di Hodgkin (HD) e dei disordini linfoproliferativi correlati all'immunosoppressione (27, 33) (tabella 2).

Mettendo a confronto tra loro le popolazioni che presentano malattie EBV-associate, sono state osservate sostanziali differenze nell'età in cui l'individuo acquisisce l'infezione: le popolazioni ad alto rischio per BL (Uganda) si infettano in età molto precoce, le popolazioni ad alto rischio per NPC (Singapore ed Hong Kong) si infettano in età infantile e le popolazioni dei paesi sviluppati, dove l'IM è frequente ma il BL ed il PNC sono molto rari, si infettano nell'adolescenza avanzata.

### EBV e linfoma di Burkitt

Il linfoma di Burkitt (BL) è un tumore caratterizzato da una forma endemica che si manifesta nell'Africa equatoriale e da una forma sporadica presente nel resto del mondo.

Nella popolazione immunocompetente dei paesi occidentali, il BL è un tumore molto raro, con incidenza di circa 1/1.000.000 bambini di età compresa tra i 4 ed i 14 anni. Nell'Africa equatoriale, invece, il BL è responsabile del 30-70% dei tumori dell'infanzia e insorge con alta frequenza soprattutto nelle zone molto vicine all'equatore (quelle che presentano anche un'alta incidenza di malaria) (27). In Uganda, per esempio, dove l'infezione da EBV viene acquisita precocemente nella vita e la malaria è endemica, si stima che circa 12/100.000 bambini siano affetti da BL, rispetto a 1-2/100.000 bambini affetti in Algeria, paese dove l'infezione da EBV viene acquisita precocemente nella vita, ma la malaria non è endemica.

Come accennato precedentemente, l'EBV è stato

isolato nel 1964 nel tentativo di identificare un agente oncogeno infettivo quale causa del BL africano. Nel 1970, zur Hausen e Schulte-Holthausen (48) riuscirono per la prima volta ad individuare il DNA di EBV in una linea cellulare derivante da una biopsia di tessuto neoplastico, apparentemente priva di particelle virali, dimostrando che l'EBV è capace di rimanere all'interno della cellula in uno stato latente, senza produrre progenie virale. La presenza del DNA di EBV nel BL è stata utilizzata, da una parte, per dimostrare l'associazione tra EBV e BL e, dall'altra, per evidenziare le forti differenze emerse tra le diverse aree geografiche.

In Africa, i casi di BL che presentano il DNA dell'EBV o l'antigene nucleare (EBNA) vanno dal 50% al 96%, e questi pazienti hanno elevati titoli anticorpali contro gli antigeni di EBV. Al contrario, nelle popolazioni europee e americane soltanto il 10-30% dei casi di BL sembra essere associato con EBV. Dunque, ai fini dell'interpretazione dei risultati sierologici, nel confronto tra i casi di BL EBV-associati e i casi di BL EBV-negativi, questa associazione va tenuta in debita considerazione, in quanto soltanto i pazienti che albergano EBV nelle cellule tumorali presentano elevati titoli anticorpali contro il virus.

La consapevolezza che alcuni cofattori possono influenzare l'insorgenza di BL in persone con infezione da EBV -in particolare la malaria, l'età di infezione, i fattori socioeconomici, lo stile di vita e la presenza di specifiche anomalie cromosomiche- ha favorito la realizzazione di molti studi epidemiologici, volti a comprendere in maniera più approfondita i meccanismi che stanno alla base del BL.

Nel 1970 una coorte di 42.000 bambini della zona dell'Uganda ad ovest del Nilo è stata seguita per 5-8 anni (12). Durante il periodo dello studio sono stati registrati 14 casi di BL; da analisi approfondite si è desunto che la presenza di elevati titoli anti-VCA, marcatori di infezione persistente nel tempo, rappresenta un forte fattore di rischio per la malattia. Tuttavia, non è stato possibile riprodurre questi risultati in pazienti non africani, in quanto gli studi condotti negli Stati Uniti non hanno rilevato nei pazienti con BL titoli anti-VCA più elevati rispetto ai pazienti di controllo (23). Nel complesso, l'evidenza epidemiologica indica che l'infezione da EBV in età precoce (ad es. quella derivante dalla trasmissione madre-figlio) aumenta il rischio di BL di circa 20 volte, mentre la malaria aumenta il rischio di 100 volte; il rischio di BL, complessivamente, è maggiore di 200 volte in Africa rispetto ai paesi occidentali (13).

Nei pazienti con AIDS il 35-40% dei casi di BL è

EBV-associato. Il BL presente nei pazienti infettati da HIV ed EBV-positivi sembra essere simile, dal punto di vista patogenetico, al BL sporadico, dove la stimolazione cronica del compartimento delle cellule B del sistema immunitario sostiene un ruolo cruciale. Infatti, nei pazienti con danni lievi del sistema immunitario tendono a prevalere i casi di traslocazione specifica del gene *c-myc*, mentre nei pazienti con AIDS circa il 60% dei BL presentano mutazioni nel gene p53 (19).

### **EBV e linfomi associati a immunosoppressione**

Il virus di Epstein-Barr (EBV) svolge un ruolo molto importante nell'insorgenza dei linfomi nei pazienti con immunodeficienza congenita o acquisita. È noto che il virus EBV persiste nei linfociti B dopo l'esaurimento dell'infezione primaria e può essere riattivato, provocando la proliferazione di queste cellule, che vengono eliminate quando il sistema immunitario del paziente non è danneggiato. Quando, invece, le difese immunitarie sono compromesse per cause iatrogene o ad opera di farmaci (ad es. nei trapiantati) o, come accade nei pazienti HIV positivi, quando i linfociti T CD4 sono distrutti dal virus HIV, non si sviluppa una reazione immune specifica e i linfociti che albergano l'infezione riattivata non vengono eliminati, continuando a moltiplicarsi senza controllo fino a provocare l'insorgenza di linfoma.

La relazione tra immunodeficienza ed aumento della frequenza del linfoma non Hodgkin (NHL) fu notata, per la prima volta, circa 35 anni fa, quando Penn e colleghi descrissero l'inusuale alta frequenza di linfomi nei pazienti trapiantati (38). Il ruolo cruciale della immunosoppressione nell'eziologia delle malattie linfoproliferative diventò evidente quando il NHL fu riconosciuto come una delle prime malattie che hanno caratterizzato l'emergenza dell'epidemia di infezione da HIV nei primi anni 80 (47).

Negli individui infettati da HIV il grado di immunodeficienza è inversamente correlato alla durata dell'infezione da HIV. In tali pazienti l'infezione persistente da EBV è molto comune; è stato, inoltre, rilevato che il numero di cellule B infettate da EBV tende a aumentare (da 10 a 20 volte rispetto agli individui sani), in parallelo con l'aggravamento della immunodeficienza HIV-associata (9). Tali individui presentano anche un aumento da 10 a 100 volte del rischio di NHL, rispetto agli individui di stessa età e sesso della popolazione generale.

Nelle persone con infezione da HIV si riconoscono tre tipi di linfomi EBV-associati: il linfoma Burkitt-like (BLL), il linfoma primitivo del sistema nervoso centrale (PCNSL) ed il linfoma immunoblastico. Sebbene i tre i tipi di NHL pos-

sano essere tutti considerati statisticamente associati all'EBV, il PCNSL è quello che mostra l'associazione più forte, con incrementi di rischio dell'ordine delle migliaia di volte. Il virus è presente nel 100% dei casi di PCNSL, in contrasto con una prevalenza media del 40% nell'NHL sistemico (4, 27). Negli ultimi due decenni l'incidenza del PCNSL ha dimostrato una tendenza all'incremento parallelo a quello osservato per il NHL sistemico.

Comunque, il PCNSL rimane un tumore raro nella popolazione generale, responsabile dell'1-2% di tutti i casi di NHL e di meno del 5% dei tumori intracranici primitivi (cioè meno di 0,10% di tutti i nuovi casi all'anno di cancro nella popolazione generale dei paesi occidentali) (15). Viceversa, nella popolazione infettata da HIV, il PCNSL è piuttosto comune, ed è associato ad una immunodeficienza di grado severo (meno di 50 CD4+ cell/mm).

Nel primo decennio di epidemia HIV/AIDS il rischio di PCNSL era 1000 volte più alto negli individui HIV+ rispetto a quelli HIV- e, a livello autoptico, la presenza di PCNSL era osservata in più del 10% dei pazienti infetti (11). A giugno 2002, lo 0,6% dei circa 260.000 casi di AIDS diagnosticati in Europa presentava PCNSL come manifestazione iniziale di AIDS. In contrasto con gli altri tumori associati all'AIDS (ad es. il sarcoma di Kaposi), che hanno incidenza differente tra i vari gruppi di popolazione a rischio di AIDS, la frequenza di diagnosi di PCNSL presenta variazioni minime, dallo 0,5% tra i tossicodipendenti allo 0,7% tra gli eterosessuali e omosessuali (16). L'introduzione nella pratica clinica di una terapia antiretrovirale (HAART) fortemente attiva ha fatto registrare, nei paesi occidentali, una importante riduzione della progressione dell'infezione da HIV verso l'AIDS e la morte (37). In parallelo con tale riduzione, si è verificata una riduzione sostanziale anche nell'incidenza di PCNSL (28). Inoltre, in era HAART, nei pazienti con PCNSL è stata riscontrata una maggiore capacità di risposta alla chemioterapia e una più lunga sopravvivenza a seguito di terapia (26). Nonostante queste osservazioni suggeriscano che il miglioramento della prognosi dei pazienti con PCNSL potrebbe essere correlato con l'utilizzo dell'HAART, tuttavia la sopravvivenza di tali pazienti rimane ancora molto bassa (7).

È stato osservato, inoltre, che la persistenza dell'infezione da EBV nel corso della vita deriva dall'equilibrio tra il virus e la risposta immune dell'ospite. L'immunodeficienza caratteristica dei pazienti affetti da HIV e dei riceventi di cellule staminali o di trapianti d'organo e di midollo osseo conduce alla rottura dell'equilibrio e ad uno

sbilanciamento tra i linfociti T EBV-specifici ed i linfociti B EBV-infetti. Il sistema immunitario non controlla più né l'infezione litica di EBV, né l'espressione degli antigeni della fase di latenza, favorendo così la proliferazione incontrollata di cellule B infette, che conduce all'insorgenza dei disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) (39).

Bisogna sottolineare, inoltre, che il genoma di EBV si rileva in più del 90% delle cellule B dei soggetti con PTLT insorti nel primo anno dopo il trapianto (cioè nella fase precoce), mentre più del 45% dei PTLT tardivi possono essere EBV-negativi. Cosicché, il ruolo eziologico dell'infezione da EBV è ben riconosciuto nei casi di PTLT precoci, ma è incerto nei casi di PTLT tardivi (39). Il riconoscimento dei PTLT come una importante causa della riduzione della sopravvivenza dei pazienti trapiantati sta avendo sempre maggiori consensi. Se si manifestano precocemente nei primi 12 mesi dal trapianto, essi generalmente si presentano nella forma più maligna e progrediscono molto rapidamente. Il quadro della malattia più tardiva si presenta più benigno.

Sono stati identificati alcuni fattori correlati ad aumento del rischio dei PTLT precoci ed i pazienti ritenuti a rischio particolarmente elevato di PTLT possono essere oggetto di protocolli di monitoraggio e terapia preventiva. Tra questi fattori meritano ulteriore considerazione l'infezione primaria da EBV, il tipo di trapianto d'organo, la severità dell'immunodeficienza, la terapia immunosoppressiva, l'infezione da CMV e l'età del ricevente.

a) *Infezione primaria da EBV*: i pazienti trapiantati a rischio di infezione primaria da EBV, cioè i soggetti sieronegativi per EBV, presentano un rischio di PTLT da 10 a 70 volte più alto rispetto ai pazienti sieropositivi, mentre non si conosce il rischio relativo ai soggetti sieropositivi che presentano riattivazione dell'EBV rispetto a quelli che si reinfectano con un secondo ceppo (39).

b) *Tipo di trapianto d'organo*: oltre allo stato sierologico nei confronti dell'EBV, anche il tipo di organo trapiantato influenza il rischio di sviluppare PTLT, come dimostrato nella figura I. Il più basso rischio di PTLT si osserva in riceventi di allotrapianto renale (1%), mentre il più alto rischio si osserva nei riceventi di allotrapianto di cuore-polmone (9,4%). Nei soggetti che hanno subito un trapianto di cuore, il rischio di PTLT nel primo anno successivo al trapianto è approssimativamente 5 volte più alto che tra i riceventi di trapianto di fegato (36). Sebbene tali variazioni nel rischio di insorgenza di PTLT possano essere attribuite, almeno parzialmente, alla differente intensità dei protocolli immunosoppressivi, è pro-

babile che alcune peculiarità, ancora non ben definite, degli organi trapiantati possano predisporre questi soggetti ai PTLD (28).

c) *Gravità dell'immunodeficienza*: l'entità della immunosoppressione rappresenta un altro elemento cruciale nello sviluppo dei PTLD. Con i protocolli attuali, i PTLD si manifestano precocemente dopo il trapianto (nel 32% dei casi entro i 4 mesi) e la tendenza a coinvolgere l'organo e i linfonodi è aumentata, mentre è diminuito il coinvolgimento del sistema nervoso centrale. I motivi di questa evoluzione non sono ancora ben compresi, ma i protocolli per ridurre il rischio di PTLD vengono continuamente modificati ed aggiornati.

d) *Terapia immunosoppressiva*: attualmente, vi è sufficiente evidenza che l'uso di immunosoppressivi potenti ed efficaci (anticorpi antilinfociti) è associato ad un aumento dell'incidenza di PTLD precoci (43), sebbene, nel primo periodo post-trapianto, probabilmente il maggiore rischio di PTLD sia frutto dell'intensità cumulativa dell'immunosoppressione piuttosto che di un singolo agente (39).

e) *Infezione da Citomegalovirus (CMV)*: si è osservato che l'infezione sintomatica da CMV, in particolare nei trapianti donatore CMV-positivo e ricevente CMV-negativo, favorisce l'insorgenza di PTLD. Infatti, la malattia da CMV nei pazienti con infezione primaria da EBV è associata ad un rischio 7 volte maggiore di PTLD. Inoltre, sembra che l'infezione con altri virus erpetici, per es. HHV8, aumenti il rischio di PTLD precoci (14).

f) *L'età del ricevente*: l'età è un importante determinante del rischio di PTLD; i riceventi pediatrici sono a maggiore rischio di PTLD precoci, probabilmente perché sono più facilmente esposti ad infezione primaria da EBV (e da CMV), mentre i riceventi più anziani (di 50 e più anni) sono a maggior rischio di PTLD tardivi, con percentuali di 5 volte più alte rispetto ai pazienti al di sotto dei 20 anni (36).

Ai fini diagnostici, la ripresa dell'attività replicativa di EBV può essere confermata dall'aumento del titolo degli anticorpi anti-EBV e dall'aumento della carica virale nel sangue. La determinazione molecolare quantitativa della viremia, eseguita sia su cellule mononucleate del sangue, sia su siero/plasma, rappresenta una tecnica affidabile per ottenere informazioni che concorrano ad identificare i pazienti a rischio di PTLD.

### ***EBV e linfoma di Hodgkin***

Il linfoma di Hodgkin (HD) è uno dei tumori più comuni nella fascia giovane-adulta della popolazione dei paesi occidentali. L'andamento dell'incidenza di HD nei paesi del Nord Europa

(Danimarca, Svezia, Norvegia e Finlandia), nel periodo che va dal 1978 al 1997, ha evidenziato una riduzione per tutti i gruppi di età superiore ai 40 anni. Tuttavia, è stato osservato un significativo e concomitante aumento dell'incidenza tra gli adolescenti ed i giovani adulti, soprattutto per il sottotipo Sclerosi Nodulare (NS), con un importante impatto del HD sulla morbilità e sulla mortalità tra i giovani dei paesi occidentali (24).

L'epidemiologia del HD è caratterizzata da una curva di incidenza bimodale per età, con un picco iniziale intorno ai 15-35 anni ed un secondo picco intorno ai 50 anni (32). Questa peculiare distribuzione per età è ritenuta rappresentativa di una eziologia infettiva di HD, presumibilmente come risposta tardiva dell'ospite ad un agente largamente diffuso tra la popolazione infantile. A causa delle similitudini nella sintomatologia del HD e della IM, uno dei primi agenti infettivi considerati è stato l'EBV; la possibilità di associazione tra infezione da EBV e insorgenza di HD è stata supportata dall'osservazione di un aumento dei titoli anticorpali anti-antigeni di EBV in pazienti con HD e dalla presenza di dati che indicavano profili immunologici alterati per EBV prima dello sviluppo di HD (34).

Dopo l'identificazione, nel 1987, del genoma di EBV nelle cellule di *Reed-Sternberg*, la presenza di EBV fu dimostrata in circa il 50% di casi di HD nei paesi occidentali, con variazioni dall'80% nel sottotipo a cellule miste (MC) al 20% nel sottotipo sclerosi nodulare (NS). Negli ultimi trenta anni, molte indagini hanno supportato l'associazione tra infezione da EBV e HD. In particolare alcuni studi caso-controllo hanno evidenziato un aumento, sebbene debole, del rischio di HD in soggetti con una storia di IM, particolarmente in giovani adulti e in pazienti con sottotipo NS (41). Il rischio di HD in pazienti con una storia di IM è stato, inoltre, confermato da studi longitudinali che hanno rilevato un rischio di HD 3 volte più elevato per le persone che avevano manifestato IM (IARC 97). I dati sierologici, registrati prima dell'esordio di HD, hanno confermato un aumento del rischio legato all'infezione da EBV: è stato osservato un aumento di 6 volte del rischio di HD in pazienti con alti titoli di EBNA ed una riduzione in presenza di anticorpi IgM (in particolare nei campioni di siero raccolti negli ultimi tre anni prima della diagnosi di HD).

*Hjalgrim e coll.* (25) hanno paragonato il tasso d'incidenza di HD di due coorti di pazienti danesi saggiati per IM, che comprendevano 38.555 pazienti con evidenza sierologica di infezione da EBV e 24.614 pazienti EBV-negativi. La ricerca di EBV fu eseguita su campioni bioptici di HD raccolti durante il follow-up.

Poichè soltanto la IM confermata sierologicamente era associata ad un rischio persistentemente aumentato di HD, i risultati dello studio indicano fortemente un'associazione causale tra EBV e HD nel sottogruppo di giovani adulti EBV-positivi. In 16 di 29 tumori (55%) provenienti da pazienti con IM si riscontrava la presenza di EBV e, nei casi EBV-positivi, vi era aumento di 4 volte del rischio di HD. Al contrario, nei casi di HD negativi per EBV non si evidenziava alcun aumento di rischio dopo IM. Il tempo di incubazione medio da IM a HD è stato stimato in circa 4 anni (25).

Pertanto, si ritiene che EBV sia coinvolto nella insorgenza di alcuni casi di HD e, inizialmente, le curve di incidenza età-specifiche per HD hanno fatto supporre che si trattasse di due entità eziologicamente distinte. Tuttavia, in accordo con indagini e studi più recenti, non sembra appropriato ipotizzare che i due HD, EBV-positivo ed EBV-negativo, siano entità cliniche distinte ma, piuttosto, è probabile che nell'insorgenza di HD possano essere coinvolti meccanismi diversi. Si potrebbe comunque ipotizzare lo sviluppo di strategie preventive per HD in pazienti con IM (3).

### ***EBV e carcinoma nasofaringeo***

Il carcinoma nasofaringeo (NPC) è una neoplasia maligna dell'epitelio squamoso del rinofaringe, che presenta caratteristiche epidemiologiche peculiari. Nella maggior parte del mondo il NPC è un tumore raro, con tasso d'incidenza inferiore a 1/100.000 individui di entrambi i sessi, sebbene, in aree ad alto rischio, il tasso d'incidenza può essere fino a 20 volte più alto. Popolazioni a rischio molto alto per NPC sono state individuate nella Cina meridionale tra gli Inuit e gli altri indigeni della regione Artica; popolazioni cinesi emigrate in altre nazioni mantengono, almeno per 3 generazioni, una più alta probabilità di sviluppare un tumore nasofaringeo rispetto al resto della popolazione; le popolazioni del Sud Est dell'Asia e del Nord Africa sono considerate a rischio intermedio (27).

È stato evidenziato, sulla base di indagini sieroepidemiologiche, in relazione all'associazione tra infezione da EBV e comparsa di NPC, che i pazienti con NPC avevano elevati titoli di IgG e IgA anti antigene del capsido virale (VCA) e anti antigene precoce (EA), indicativi della presenza di EBV in fase replicativa, e che la presenza di questi fattori era predittiva di un tumore in atto, in remissione o ricorrente (22, 46). Questi dati sembrano dimostrare che la riattivazione e la replicazione di EBV influenzino lo sviluppo del NPC, mentre la risposta anticorpale persistente possa riflettere la presenza di NPC.

Successivamente, è stata evidenziata la presenza del genoma di EBV nelle cellule tumorali di pazienti affetti da NPC, con frequenza decrescente dal carcinoma indifferenziato al cheratinizzante. Dal punto di vista epidemiologico, EBV dovrebbe essere considerato un determinante del NPC, dal momento che il virus viene rilevato nella grande maggioranza dei tumori ed ogni cellula maligna risulta infettata da EBV. Tuttavia, le ampie variazioni geografiche nel tasso di incidenza del NPC suggeriscono che, probabilmente, molti e distinti fattori interagiscono con EBV nella patogenesi dell'NPC, tra i quali si pensa abbiano un ruolo importante la familiarità, l'ospite, la dieta ed i fattori ambientali (27).

Le abitudini alimentari di varie popolazioni cinesi, quali il consumo di pesce conservato sotto sale nella popolazione cantonese, sono implicate nell'eziologia del NPC, con un aumento del rischio da 2 a 7 volte quando questa abitudine alimentare viene acquisita in giovane età. L'associazione con NPC fu notata, inoltre, per altri tipi di pesce salato e per il consumo precoce di altri cibi conservati, sebbene l'evidenza di tale associazione non è così forte come quella per il consumo di pesce salato.

Diversi autori hanno ipotizzato che l'esposizione al fumo derivante da legno bruciato all'interno delle case senza camino o l'esposizione lavorativa a fumo, polvere e vapori fossero determinanti nella patogenesi di NPC, ma i risultati ottenuti non sono stati coerenti. Al contrario, studi epidemiologici recenti dimostrano che il fumo di sigaretta aumenta di circa 3 volte il rischio di NPC.

È stata osservata, infine, un'associazione tra profilo HLA e rischio di NPC, sia nelle popolazioni cinesi che nelle altre popolazioni. Un aumento di 2 volte del rischio di insorgenza di NPC è associato alla presenza di antigeni A2 e BW46 nella popolazione di Singapore, Malesia, Hong Kong e Guangzhou; un rischio di 20 volte maggiore è stato accertato in fratelli della Cina meridionale per geni strettamente legati all'HLA. Negli Americani Caucasicci, negli Europei e nei Tunisini non è stata osservata alcuna associazione con NPC, in quanto tali popolazioni presentano raramente il BW46. Tra le popolazioni non cinesi, le associazioni tra profilo HLA e rischio di NPC sono state osservate nei Caucasicci australiani (per la presenza di antigene A3) nei Tedeschi (per la presenza di antigene B5) e negli Statunitensi (per la presenza di antigene A2). [Per ulteriori informazioni sui cofattori per EBV associato con il NPC vedi IARC 97 (27)].

### ***EBV e altri tumori***

EBV è stato associato con molti altri tumori: il

linfoma nasale a cellule T/NK, la linfadenopatia angioimmunoblastica, la granulomatosi linfomatosa, il linfoma del sistema nervoso centrale nei pazienti immunocompetenti, i tumori dei muscoli lisci e il carcinoma gastrico nei pazienti trapiantati. Il genoma di EBV è stato inoltre ritrovato nei linfomi periferici a cellule T, che possono essere accompagnati da sindrome emofagocitica virus-associata.

Tuttavia, per stabilire definitivamente il ruolo patogenetico dell'EBV in tali tumori, è necessario attendere dati più definitivi e bisogna considerare anche la possibilità che EBV sia soltanto un ospite occasionale che accompagna queste malattie.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato sostenuto da finanziamenti per la Ricerca Finalizzata del Ministero della Salute, RF: 02.139, e dai finanziamenti per la Ricerca Corrente IRCCS L. Spallanzani di Roma.

### BIBLIOGRAFIA

- Alfieri C, Tanner J, Carpenter L, et al. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 1996; 87: 812-7.
- Allday MJ, Crawford DH. Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumours. *Lancet* 1988; 1: 855-7. 1999; 162: 1827-35.
- Ambinder R. Infection and Lymphoma. *N Engl J Med* 2003; 349: 1309-11.
- Ambinder RF, Sparano JA. Primary central nervous system lymphoma. In: HIV & HTLV-I associated malignancies. Edt Sparano JA, Kluwer Academic Publishers 2001; 231-46.
- Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995; 85: 744-50.
- Andersson-Ellstrom A, Svennerholm B, Forssman L. Prevalence of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in teenage girls. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 315-8.
- Antinori A, Lorenzini P, Cingolani A, et al. Survival analysis of HIV-infected neurologic patients: role of HAART and of specific neurologic disorders. XVI International AIDS Conference Barcelona 7-12 July 2002. Abstr WePeC6068.
- Biggar RJ, Henle G, Bocker J, et al. Primary Epstein-Barr virus in Africa Infants.II. Clinical and serological observations during seroconversion. *Int J Cancer* 1978; 22: 240-50.
- Birx DL, Redfield RR, Tosato G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 1986; 314: 874-9.
- Black FL, Woodall JP, Evans AS, Liebhaber H, Henle G. Prevalence of antibody against viruses in the Tiriyo, an isolated Amazon tribe. *Am J Epidemiol* 1970; 91: 430-8.
- Cote TR, Manns A, Hardy CR, Yellin FJ, Hartage P. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 675-9.
- De Thè G, Geser A, Day NE, et al. Epidemiological evidence for a causal relationship between EBV and Burkitt's Lymphoma: results of the Ugandan prospective study. *Nature* 1978; 274: 756-61.
- De Thè G. Epstein-Barr virus and Burkitt's Lymphoma. In: Infectious causes of Cancer: targets for intervention. Goedert JJ ed, Humana Press, 2000, 77-92.
- Dotti G, Fiocchi R, Motta T. Primary effusion lymphoma after heart transplant: a new entity associated with human herpes virus 8. *Leukemia* 1999; 13: 664-70.
- Eby NL, Grufferman S, Falnelly CM, Schold SC Jr, Vogel FS, Burger PC. Increasing incidence of primary brain lymphoma in the US. *Cancer* 1988; 62: 2461-5.
- ENAADS European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS: HIV/AIDS Surveillance in Europe. Quarterly Report No 67, Saint-Maurice, France, 2002.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-3.
- Evans AS, Niederman JC. Epstein-Barr virus. In: Evans AS, ed, *Viral Infections of Humans*, 3<sup>rd</sup> Ed. New York, Plenum, 1989; 265-92.
- Gaidano G, Dalla Favera R. Molecular pathogenesis of AIDS-related lymphomas. *Adv Cancer Res* 1995; 67: 113-53.
- Haque T, Thomas JA, Falk KI, et al. Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in trasplant organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J Gen Virol* 1996; 77: 1169-72.
- Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's Lymphoma and control groups. *J Nat Cancer Inst* 1969; 43: 1147-57.
- Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1976; 17: 1-17.
- Hirshaut Y, Cohen MH, Stevens DA. Epstein-Barr antibodies in American and African Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1973; 2: 114-6.
- Hjalgrim H, Askling J, Pukkala E, Hansen S, Munksgaard L, Frisch M. Incidence of Hodgkin's disease in Nordic countries. *Lancet* 2001; 358: 297-8.
- Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, et al. Characteristics of Hodgkin's Lymphoma after Infectious Mononucleosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 1324-32.
- Hoffmann C, Tabrizian S, Wolf E, et al. Survival of AIDS patients with primary central nervous system lymphoma is dramatically improved by HAART-induced immune recovery. *AIDS* 2001; 15: 2119-27.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/Human herpesvirus 8. Lyon, 1997; Volume 70: 82-4.
- International Collaboration on HIV and Cancer. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1823-30.
- Israele V, Shirley P, Sixbey JW. Excretion of the Epstein-Barr virus from the genital tract of men. *J Infect Dis* 1991; 163: 1341-3.

30. Jenkins FJ, Hoffman LJ. Overview of Herpesviruses. In: Infectious causes of cancer: targets for interventions, Goedert JJ Ed, Humana Press, Totowa NJ, 2000, 33-49.
31. Kieff E, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe DM, Howley PM eds. Fields Virology. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 2511-73.
32. MacMahon B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966; 26: 1189-200.
33. Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet Infectious Diseases* 2003; 131-40.
34. Mueller N, Evans A, Harris NK, et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 689-95.
35. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; 182: 151-9.
36. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993; 342: 1514-6.
37. Palella FJ, Delaney KM, Moorman Ac, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338: 853-60.
38. Penn I, Hammond W, Brettschneider L, Starzl TE. Malignant lymphomas in transplanted patients. *Transplantation Proc* 1969; 1: 106-12.
39. Preikasaitis JK, Cockfield SM. Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell or solid organ transplantation. In: *Transplant Infections*, 2<sup>nd</sup> Edition, Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, eds, Lippincott Williams & Wilkins, 2003, 326-49.
40. Rickinson AB, Kieff E. Epstein. Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM eds. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 2575-627.
41. Serraino D, Franceschi S, Talamini R, et al. Socioeconomic indicators, infectious diseases and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1991; 47: 352-7.
42. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984; 310: 1225-30.
43. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, et al. Increased incidence of lymphoproliferative disorders after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac transplant recipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-8.
44. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350: 1328-37.
45. Tischendorf P, Shramek GJ, Balagtas RC, et al. Development and persistence of immunity to Epstein-Barr virus in man. *J Inf Dis* 1970; 122: 401-9.
46. Traub NR. Epstein-Barr virus and Nasopharyngeal carcinoma. In: Infectious causes of cancer: targets for interventions, Goedert JJ ed, pg: 93-111, Humana Press, Totowa NJ, 2000.
47. Ziegler JL, Beckstead JA, Volberding PA, et al. Non-Hodgkin's Lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311: 565-70.
48. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H. Presence of EB virus nucleic acid homology in a virus-free line of Burkitt's tumour cells. *Nature* 1970; 227: 245-8.

**Maria Rosaria Capobianchi**

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "L. Spallanzani", IRCCS  
Via Portuense 292 - 00149 Roma  
Tel 06 55170434 - Fax 06 5582346  
E-mail: [capobianchi@inmi.it](mailto:capobianchi@inmi.it)