

## DIMOSTRAZIONE ULTRASTRUTTURALE DEL VIRUS DEL PAPILLOMA UMANO (HPV) IN LESIONI PROLIFERATIVE ORALI

### Ultrastructural Demonstration of Human Papilloma Virus (HPV) in Oral Proliferative Lesions

G. Broich\*, T. Sasaki\*\*

**ABSTRACT** — The Human Papilloma Virus (HPV) has been found in a series of benign proliferative lesions of the skin and mucosa. The virus has also been found in verrucous laryngeal carcinoma and carcinomas of the oral cavity and other organs. DNA hybridization techniques have made it possible to classify 51 types of HPVs, some appearing to be associated with specific lesions.

In order to study the intracellular distribution of HPVs, an ultrastructural morphological analysis was performed with an electron microscope on 10 specimens taken from 5 patients. The specimens were obtained through large excisional biopsy, histologically classified as «fibropapilloma». For each patient specimens were taken from the clinically evident lesion and from the surrounding clinically normal mucosa. The specimens were fixed in glycerinaldehyde, washed in a cacodylate buffer, post-fixed in potassium ferrocyanide reduced-osmium tetroxide, stained with uranyl acetate and included in EPON 812. The tissue was subjected to amylase digestion prior to electron microscope examination.

A great number of viral particles were found in both the nucleus and the cytoplasm, without forming crystal array structures as typically described for the verruca vulgaris virus (HPV-2). No significant differences could be found between the cells derived from the clinical lesion and those derived from the surrounding mucosa. The passage of viral particles from infected to as yet uninfected cells through the intercellular space could be seen. The high intracytoplasmatic presence of the virus, and its clear abundance in those cells surrounding the clinical lesion, is felt to be of special interest.

Key words: *Human Papilloma Virus, HPV, Fibropapilloma.*

## INTRODUZIONE

Il virus del papilloma umano, generalmente noto come HPV (Human Papilloma Virus), è stato dimostrato in una serie di lesioni benigne proliferative della cute e delle mucose; inoltre è stato visto associato a forme di carcinoma della laringe, della cavità orale e della cervice uterina. Questo virus della famiglia delle papovaviridae è costituito da un capsido icosaedrico di circa 55 nm con DNA circolare a doppia elica di circa 8000 paia di basi, complessato con istoni ed

Ricevuto il 20.9.1988 / Accettato il 31.1.1989.

\*Divisione di Otorinolaringoiatria dell'Ospedale di Cremona.

\*\*I<sup>nd</sup> Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Showa University, Tokyo, Japan.

Richiesta estratti a: dott. Guido Broich - Divisione di Otorinolaringoiatria P.O.C., U.S.S.L. n. 51 - 26100 Cremona.

organizzato in nucleosomi. Esso è stato recentemente riconosciuto come facente parte di un gruppo tassonomicamente autonomo. Il virus veniva considerato non coltivabile in vitro; solo recentemente Taichman<sup>20</sup> è riuscito a coltivarlo in colture di cellule epiteliali in vitro. Il virus risiede prevalentemente in forma extracromosomica nel nucleo cellulare e solo in cellule in degenerazione carcinomatosa è stato visto integrato nel DNA cromosomico. Sono stati dimostrati finora 51 tipi di HPV (Nuovo et al.<sup>15</sup>). Il virus mostra uno spiccato tropismo per i cheratinociti (Taichman<sup>20</sup>), i fibroblasti ne sono sempre privi (Syrjanen<sup>19</sup>). La replicazione extracromosomica del DNA virale avviene prevalentemente nel 1/3 inferiore dell'epitelio nella sua parte suprabasale, mentre nello strato basale il virus rimane allo stato latente. Con il differenziarsi delle cellule in senso squamoso il virus passa all'espressione attiva, la produzione del capsido e l'assemblaggio dei virioni completi appaiono prevalentemente nello strato granuloso e corneo (Orth et al.<sup>16</sup>).

L'infezione da HPV di un epitelio squamoso provoca una proliferazione vascolare ed epiteliale con caratteristiche configurazioni istologiche che sono un'esagerazione della normale architettura tissutale. Tutti gli strati sono rappresentati, ma sono distorti da una crescita di capillari subepiteliali, proliferazione dello strato spinoso e caratteristica degenerazione delle cellule di superficie. Si osserva proliferazione dello strato parabasale (acantosi) e crescita dei capillari dermici (papillomatosi). La continua sintesi di DNA da parte delle cellule degli strati parabasali ed intermedi è vista microscopicamente come ipercromasia, discariosi e ritardata maturazione delle cellule di superficie. Negli strati superiori, l'ultimo evento nel ciclo del virus produce un caratteristico effetto citopatico, noto come coilocitosi, in cui è presente un'aggregazione degenerativa della cromatina, collasso nucleare e formazione di vacuoli intracitoplasmatici. È stato dimostrato che la coilocitosi è un buon marker indiretto per l'infezione con virus HP, specialmente nella mucosa genitale (16, 4, 11). Sono stati descritti 6 tipi di coilociti (Gross et al.<sup>7</sup>) e la lesione può essere divisa in stadi secondo Ferenczy<sup>4</sup>. La specificità della coilocitosi per infezioni con HPV anche nella mucosa orale è stata dimostrata recentemente (Madinier et al.<sup>13</sup>) in uno studio comparato di dimostrazione immunistochemica del virus e della presenza di coilocitosi.

Una diagnosi diretta dell'HPV può essere fatta con l'immunistochemica, l'ibridazione in situ del DNA e l'analisi ultrastrutturale con il microscopio elettronico. L'ibridazione in vitro richiede personale specializzato e rimane confinata per ora nei centri di ricerca. Come l'immunistochemica, non permette una valutazione della presenza del virus e dei suoi rapporti con le strutture intracellulari. La microscopia elettronica non consente una tipizzazione in genotipi dei virus, ma preservando l'ultrastruttura cellulare, permette di osservare la distribuzione intracellulare del virus. Alcuni virus, del resto, appaiono prediligere caratteristiche forme di aggregazione intracellulare, come la formazione di conglomerati ad aspetto cristallino in sede intranucleare descritta per il virus della verruca volgare (Lutzner et al.<sup>11</sup>). Per altri tipi di HPV sono comunque state descritte distribuzioni sparse intranucleari, specialmente in lesioni orali (12). Non risultano invece descrizioni in sede citoplasmatica. I rapporti con gli organuli intracellulari sono spesso insufficientemente visibili (Hills et al.<sup>8</sup>). Noi ci siamo preposti di analizzare: primo, la presenza e la distribuzione intracellulare del virus del papilloma umano in lesioni fibropapillomatose orali e, secondo, la presenza e distribuzione del virus nella mucosa circostante la lesione, clinicamente sana (Tab. I).

Tab. I - Tipi di HPV associati con lesioni specifiche della regione cervico-facciale.

1	verruca plantaris
2a-e	verruca vulgaris e plantaris
6a-f	papilloma laringeo
11a, b	papilloma laringeo
13a, b 32	iperplasia epiteliale focale (FEH)
30	carcinoma squamocellulare laringeo
40	carcinoma laringeo

#### MATERIALI E METODI

Sono state prelevate lesioni fibropapillomatose orali da 5 pazienti tramite ampia biopsia escissionale, tale da comprendere anche una zona di mucosa sana circostante. Subito dopo l'escissione la lesione clinicamente evidente è stata separata dalla mucosa circostante apparentemente sana. I campioni sono stati tagliati in fette sottili e divisi per l'analisi istologica di routine e l'analisi al microscopio elettronico. Per la microscopia elettronica i campioni sono stati sezionati in fette di 1 mm di spessore e fissati tramite immersione in glutaraldeide al 2,5% in tampone di cacodilato di sodio 0,1 M (pH 7,4) per 6 ore a 4°C. Dopo diversi lavaggi in soluzione tampone i campioni sono stati post-fissati in 1% tetrossido di osmio ridotto da 1,5% ferrocianuro di potassio per 3 ore a 4°C. Infine i campioni sono stati colorati in blocco con acetato di uranile all'1% etanolato, deidratati attraverso passaggi in etanolo graduato ed inclusi in EPON 812. Sezioni sottili sono state ottenute usando una lama di diamante su un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut OmU-4. Queste sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminate con un microscopio elettronico HITACHI HU-12A a 75kV. Alcune griglie con campioni sezionati sono state esposte ad una soluzione di amilasi per digerire il glicogeno. In più, HPV isolati sono stati montati direttamente su griglie coperte di Formvar, colorate con acido fosfotungstico al 1% ed esaminati al microscopio elettronico come descritto. Gli HPV isolati sono stati gentilmente forniti dal Dr. L. Taichman, Department of Oral Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook, USA (Tab. II).

Tab. II - Lesioni esaminate.

Numero	Nome	Età	Sesso	Aspetto clinico	Regione	Microscopia Luce
1	L.P.	51 a.	M	verrucoso, esofitico	guancia sn	pseudopolipo
2	V.R.	61 a.	F	soft, flat	marginie lingua	fibropapilloma
3	D.V.	37 a.	M	verrucoso, esofitico	velo	acantosi
4	G.G.	57 a.	F	esofit. peduncolato	velo	fibropapilloma
5	A.C.	57 a.	F	esofitico	velo	fibropapilloma

## RISULTATI

All'analisi istopatologica convenzionale al microscopio luce i campioni sono risultati variamente classificati (vedi tab. II). Purtroppo non è stato possibile ottenere maggiori informazioni specifiche riguardo alla presenza di coilocitosi. All'esame in microscopia elettronica, HPV isolati e colorati apparivano come particelle rotonde (Fig. 1). In tutti 10 campioni esaminati, analoghe particelle rotonde del diametro di 40-55 nm, compatibili con virus HP (8, 14, 18) sono stati trovati nelle cellule squamose. In sezioni trattate con amilasi, queste particelle elettrondense erano chiaramente distinte dalle particelle di glicogeno digerite, che formavano spazi elettron-trasparenti nel citoplasma (Fig. 2). Le particelle virali erano presenti sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule degli strati spinoso e granuloso, sia nei campioni derivanti dalla parte clinicamente evidente della lesione, sia in quelli della mucosa apparentemente sana circostante (Figg. 2, 3, 4). Particelle virali potevano essere viste negli spazi extracellulari dello strato granuloso, ma erano solo raramente visibili nello strato basale (Figg. 4, 5). La coesistenza di cellule infette e cellule ancora prive di particelle virali poteva essere notata (Fig. 5). Le particelle virali erano particolarmente abbondanti nel citoplasma ma non formavano mai agglomerati cristallini. In diverse cellule derivate dalla circostante mucosa apparentemente sana potevano essere viste ampie raccolte intracitoplasmatiche del virus senza presenza intranucleare.

## DISCUSSIONE

Il virus HPV è stato recentemente centro di crescente interesse per due motivi principali. In prima istanza si è potuto osservare che alcuni genotipi sono associati ad un crescente numero di carcinomi, specialmente della cervice uterina, sul quale è stato eseguito il maggior numero di ricerche (Giorgi et al.<sup>5</sup>). In seconda istanza il virus è presente con sempre maggiore frequenza in varie infezioni, specialmente in associazione con il virus HIV (Goisis et al.<sup>6</sup>). Nella Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) infezioni con virus, batteri e protozoi aumentano come aumenta l'incidenza di neoplasie. Ci sono segni che il virus HP possa essere attivamente coinvolto nello sviluppo di carcinomi. Con sempre maggiore frequenza è possibile vedere lesioni fibropapillomatose in sede orale. Esse sono state messe in rapporto con il virus HIV e la trasmissione dei due virus sembra avvenire prevalentemente per via sessuale. Finora comunque non risultano studi sull'associazione tra virus HPV e HIV per quanto riguarda la sede orale.

Il nostro intento era di analizzare l'effettiva presenza del virus HPV in queste lesioni sospette orali e nella mucosa circostante e studiarne la distribuzione intracellulare. Abbiamo potuto osservare la presenza del virus non solo nel nucleo delle cellule, ma anche in abbondante quantità nel citoplasma. La tecnica di preparazione è stata in grado di conservare l'ultrastruttura cellulare con la dimostrazione del passaggio di virus da una cellula all'altra. Le particelle virali apparivano in tutti i campioni nelle cellule suprabasali, mentre le cellule basali ne erano prive. Di particolare interesse è la dimostrazione del virus nelle cellule della mucosa apparentemente normale circostante la lesione. Analogamente a quanto suggerito in ginecologia, ove frequenti controlli sono ritenuti necessari in per-

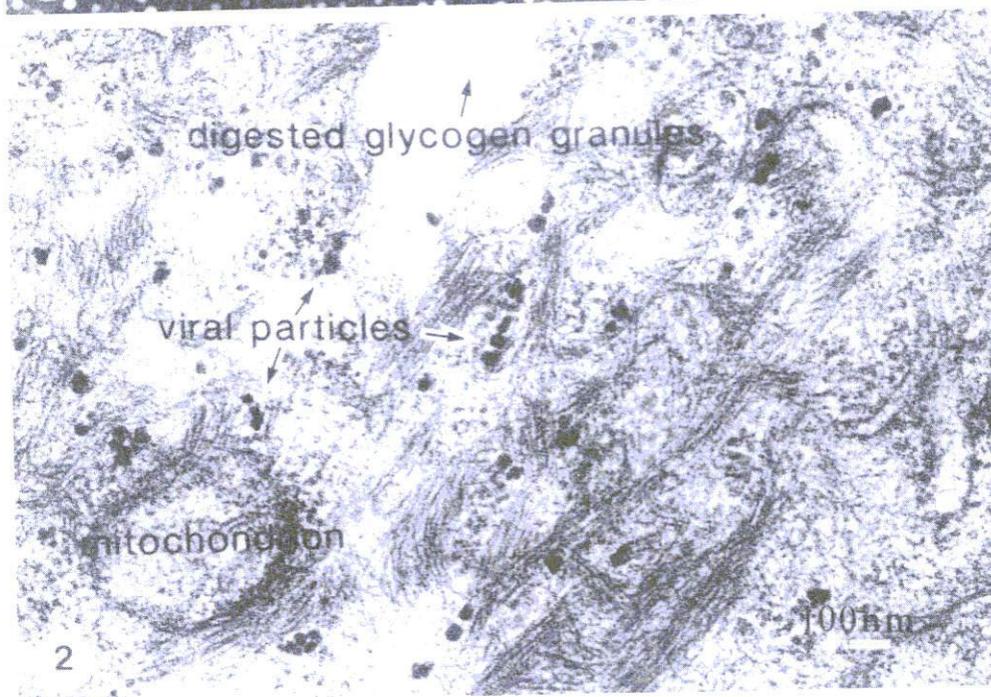
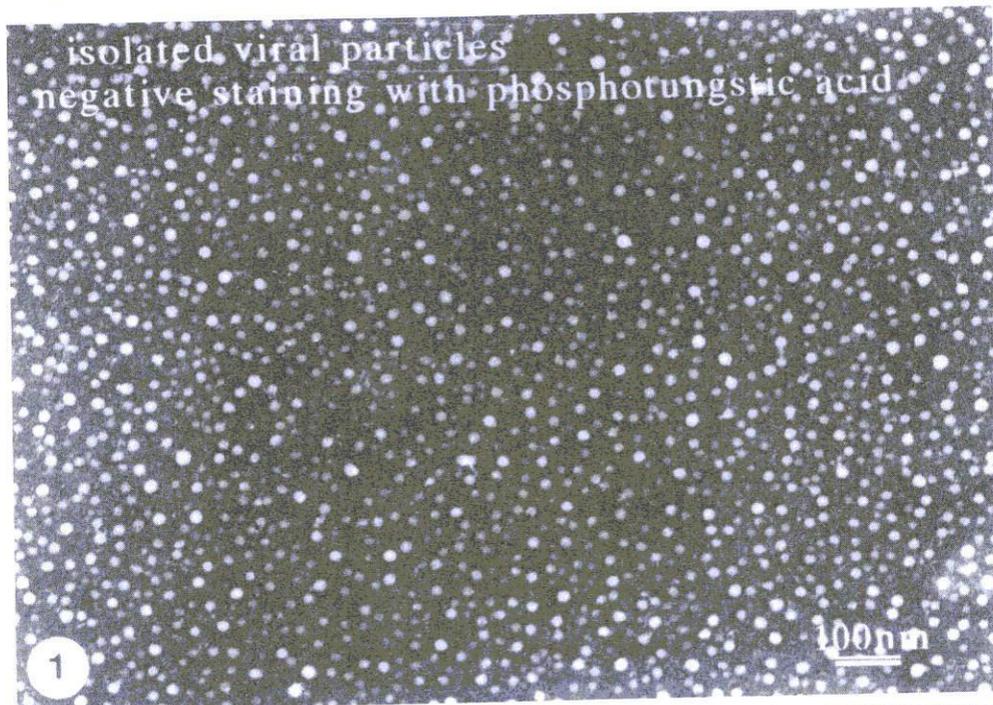


Fig. 1 — Colorazione negativa di HPV di controllo ( $\times 75000$ ).  
Fig. 2 — HPV e granuli digeriti di glicogeno ( $\times 50000$ ).

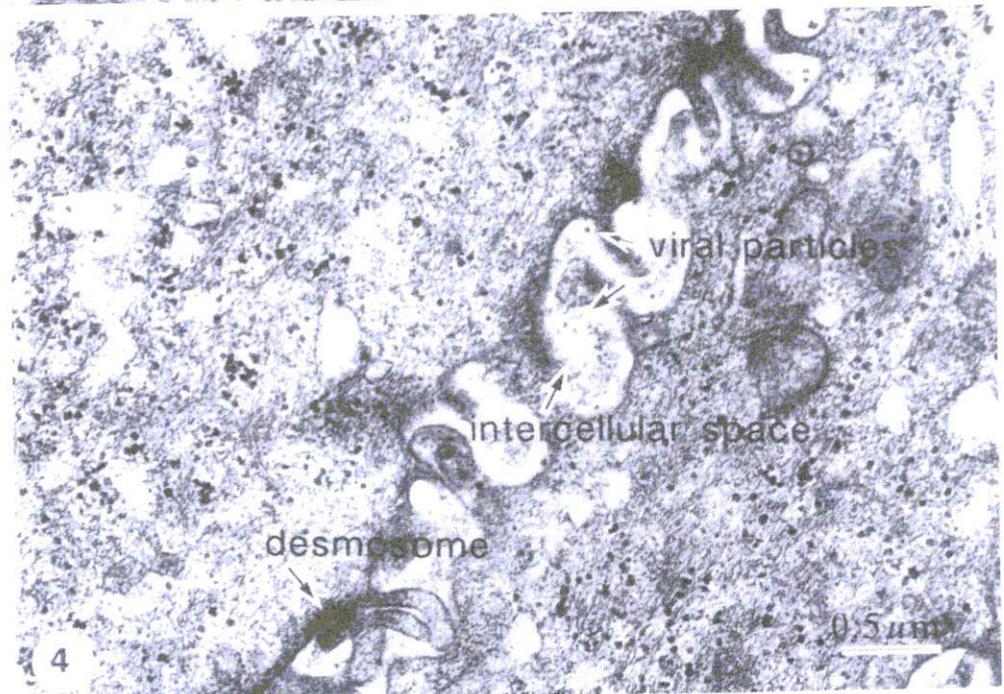
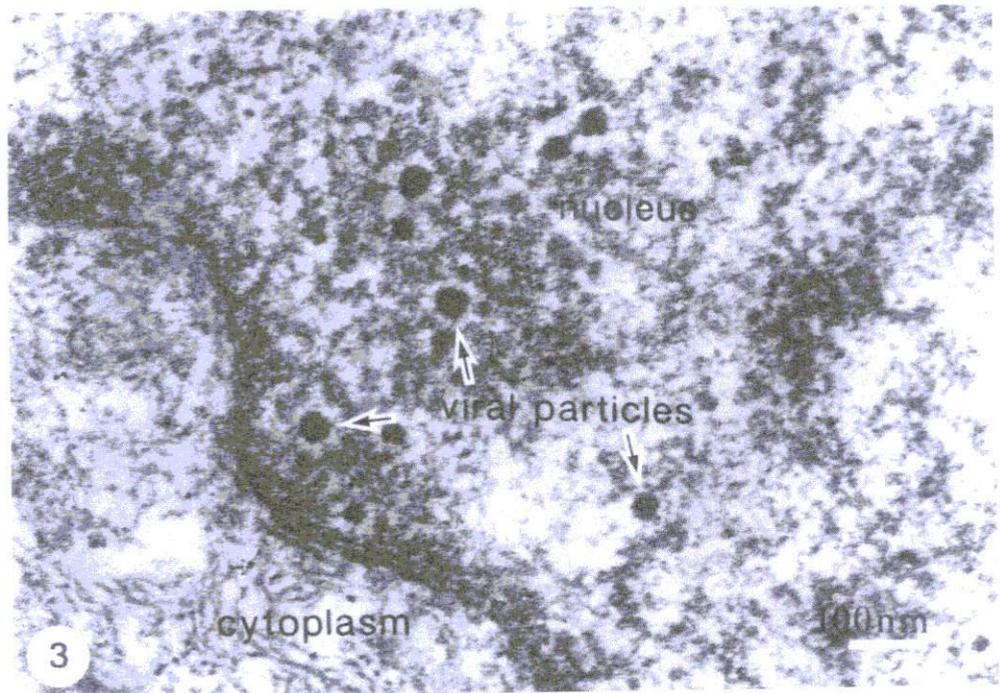


Fig. 3 — HPV nel nucleo ( $\times 75000$ ).

Fig. 4 — HPV nel citoplasma e negli spazi extracellulari ( $\times 25000$ ).

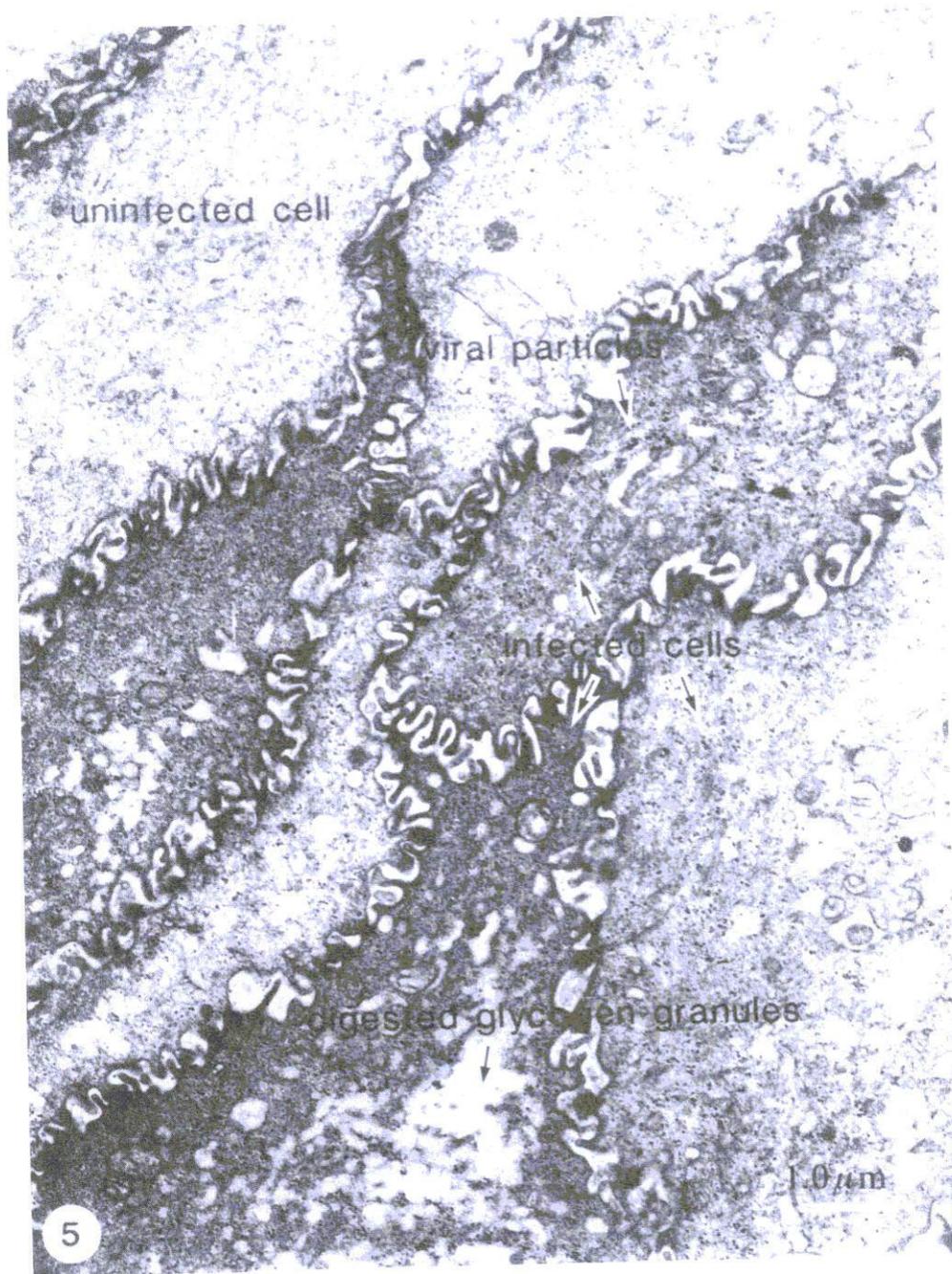


Fig. 5 — Cellule infette e non ( $\times 10000$ ).

sone positive per HPV cervicale, anche nella regione orale deve essere considerata la possibilità che il virus favorisca o sia comunque coinvolto nella degenerazione carcinomatosa della cellula squamosa. In ogni caso appaiono opportuni frequenti controlli dopo la rimozione chirurgica di fibropapillomi. Il virus rimane certamente presente nella mucosa, anche senza esprimere la sua capacità di indurre una proliferazione cellulare.

#### SINTESI

*Il virus del papilloma umano è stato dimostrato in una serie di lesioni benigne proliferative della cute e delle mucose. Esso è stato inoltre trovato nel carcinoma verrucoso della laringe ed in carcinomi della cavità orale e di altri organi. Tecniche di ibridazione del DNA hanno permesso di identificare 51 tipi di HPV, alcuni associati preferenzialmente con determinate lesioni. Per studiare la distribuzione intracellulare dell'HPV abbiamo eseguito analisi ultrastrutturali al microscopio elettronico di 10 prelievi tratti da 5 pazienti tramite ampia biopsia escissionale di lesioni classificate come fibropapillomi. Da ogni paziente sono stati analizzati campioni tratti dalla lesione clinicamente evidente e dalla mucosa apparentemente normale circostante. I campioni sono stati fissati in gliceraleide, lavati in tampone di cacodilato, post-fissati in ferrocianuro di potassio-tetrossido di osmio, colorati con acetato di uranile ed inclusi in EPON 812. Il tessuto è stato sottoposto a digestione amilasica prima di essere analizzato con il microscopio elettronico. Abbiamo potuto trovare una grande quantità di particelle virali in entrambi il nucleo ed il citoplasma, senza che si assista alla formazione di aggregati cristallini tipici per il virus della verruca volgare (HPV-2). Non era possibile osservare differenze significative tra le cellule tratte dalla lesione propria e cellule derivate dalla mucosa sana circostante. Il passaggio del virus attraverso lo spazio intercellulare da cellule infette a cellule ancora sane poteva essere visto. Riteniamo di particolare importanza il dato dell'elevata presenza intracitoplasmatica del virus e della sua presenza abbondante in cellule circostanti la lesione clinica.*

Parole chiave: *Virus del papilloma umano, HPV, Fibropapillomi.*

#### Ringraziamenti

Ringraziamo il Dr. L.B. Taichman, Department of Oral Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook, New York, USA, per averci messo a disposizione il virus HPV per i nostri controlli e la Dr.ssa Katia Barosi, Dipartimento di Farmacologia, Presidio Ospedaliero di Cremona, per l'assistenza nella preparazione delle soluzioni chimiche.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Adler-Storthz K.; Newland J.R.; Tessin B.A.; Yeudall W.A.; Shillitoe E.J.: Identification of human papillomavirus types in oral verruca vulgaris. *J. Oral. Pathol.*, 15, 230-, 1986.
2. Adler-Storthz K.; Newland J.R.; Tessin B.A.; Yendall W.A.; Shillitoe E.J.: Human papillomavirus type 2 DNA in oral verrucous carcinoma. *J. Oral. Pathol.*, 15, 472, 1986.
3. De Villiers E.M.; Weidauer H.; Otto H.; Zur Hausen H.: Papillomavirus DNA in human tongue carcinoma. *Int. J. Cancer*, 36, 575-578, 1985.
4. Ferenczy A.; Braun L.; Shah K.V.: Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of the cervix. A comparative ultrastructural and immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.*, 5, 661-670, 1981.

5. Giorgi C.; Leopardi O.; Goisis F.; Bolis P.F.; de Virgiliis A.; Broich G.: Immunohistochemical demonstration of human papillomavirus in the lower female genitry tract. International Workshop on Papillomavirus, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, U.S.A., Set. 1986.
6. Goisis F.; Giorgi C.; Buratti E.; Grossi F.; Argentiero M.L.; Leopardi O.: Cytohistocolposcopic correlations in 130 cases of HPV infection in the lower female genitry tract. *Perspectives in Gynaecology and Obstetrics*, 4, Suppl. 1, 61, 1987.
7. Gross G.; Pfister H.; Hagedorn M.; Gissmann L.: Correlation between human papillomavirus (HPV) type and histology of warts. *J. Invest. Dermatol.*, 78, 160-164, 1982.
8. Hills E.; Lavery C.R.: Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol.*, 23, 53, 1979.
9. Jenson A.B.; Lancaster W.D.; Hartmann D.P.; Shafer E.L.: Frequency and distribution of papillomavirus structural antigens in verrucae, multiple papillomas and condylomata of the oral cavity. *Am. J. Pathol.*, 107, 212, 1982.
10. Jin Y.T.; Toto P.D.: Detection of human papovavirus antigen in oral papillary lesions. *Oral Surg.*, 58, 702, 1984.
11. Lutzner M.; Kuffer R.; Blanchet-Bardon C.; Croissant O.: Different papillomaviruses as the causes of oral warts. *Arch. Dermatol.*, 118, 393, 1982.
12. Lutzner M.: The human papillomavirus. Editorial, *Arch. Dermatol.*, 119, 631, 1983.
13. Madinier I.; Monteil R.A.: Human papillomavirus in oral epithelial lesions. Comparative study between histopathology and immunohistochemistry in routine diagnosis. *J. Biol. Buccale*, 15, 105-110, 1987.
14. Nakajima T.; Tsumuraya M.; Morinaga S.; Shimosato Y.: Papillomavirus infection among Japanese: an immunohistochemical study for papillomavirus genus-specific antigen in human surface epithelial lesions. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76, 508, 1985.
15. Nuovo G.J.; Crum C.P.; De Villiers E.M.; Levine R.U.; Silverstein S.J.: Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virology*, 62, 1452, 1988.
16. Orth G.; Jablonska S.; Jarzabek-Chorzelska M.; Obalek S.; Rzeska G.; Favre M.; Croissant O.: Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. *Cancer Res.*, 39, 1074-1082, 1979.
17. Orth G.: Virus du papilloma humaine. 2° Congrès Mondial sur le Maladie Sexuelles Transmissible (M.S.T.), Paris, 1986.
18. Syrjanen K.: Human papillomavirus (HPV) infections and carcinoma of the uterine cervix (in press).
19. Syrjanen S.; Syrjanen K.; Mantyjarvi R.: Human papillomavirus (HPV) DNA sequences demonstrated by in situ DNA hybridization in serial paraffin-embedded cervical biopsies. *Arch. Gynaecol.*, 239, 39, 1986.
20. Taichman L.B.; Reilly S.S.; La Porta R.F.: The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J. Invest. Dermatol.*, 81, 137, 1983.