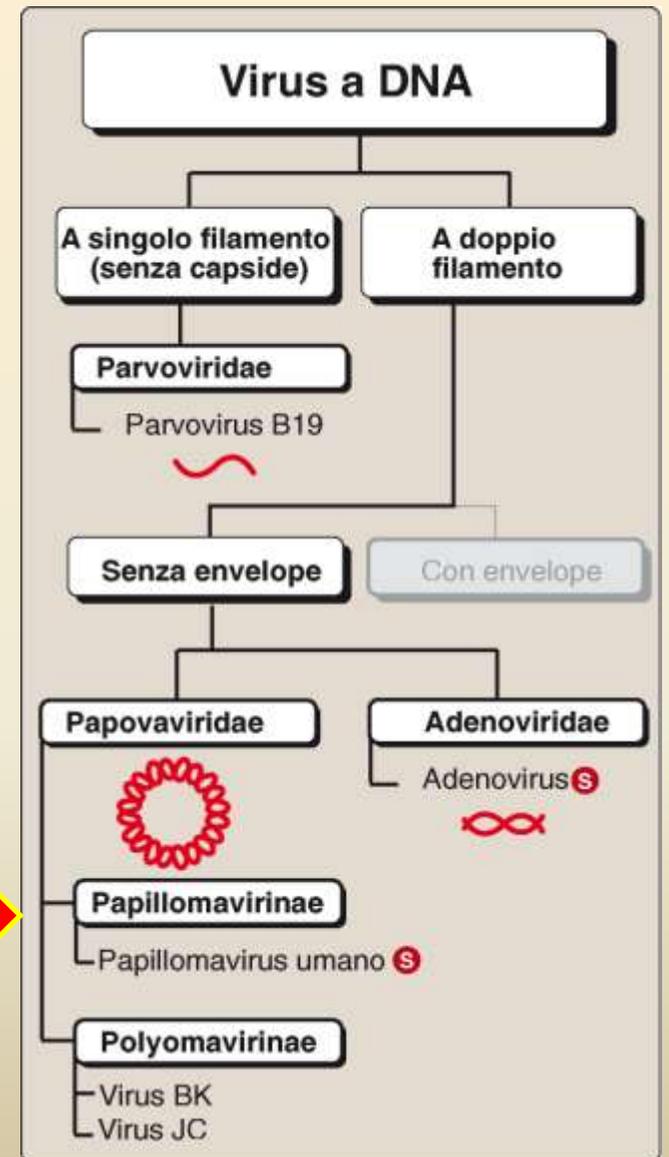


# PAPILLOMAVIRIDAE

## Virus a DNA senza envelope

La famiglia *Papillomaviridae* prima era uno dei 2 generi della vecchia famiglia *Papovaviridae* (l'altra è quella *Polyomaviridae*). Il nome *Papovaviridae* derivava da: Pa = *Papillomavirus*, Po = *Polyomavirus*, e Va = "vacuolating agent" (SV40).



# PAPILLOMAVIRUS: CARATTERISTICHE

Antica famiglia di virus **non-enveloped** a **dsDNA**.

Se ne conoscono diverse **centinaia di specie (tipi)**, che infettano mammiferi, ma anche uccelli e rettili. L'infezione, a seconda del tipo, può essere **asintomatica** (es. La maggioranza dei Beta-PV) e causare piccoli tumori benigni, conosciuti come **papillomi** o **verruche** (es. human papillomavirus1, HPV6 o HPV11). I papillomi causati da alcuni tipi, come HPV 16 e 18, possono invece evolvere in **tumori maligni**.

Sono virus con **tropismo specifico di tessuto e di specie**, e raramente possono essere trasmessi a specie diverse da quella naturale.

Replicano esclusivamente nello **strato basale dei tessuti di rivestimento** (cute e mucose).

Sono stati identificati all'inizio del XX secolo, quando si osserva che le verruche potevano essere trasmesse da individuo a individuo attraverso un agente filtrabile.

Nel 1935 Francis Peyton Rous, che aveva scoperto il virus del sarcoma dei polli, dimostra che un PV poteva causare tumori della cute in conigli infettati: questa è la prima dimostrazione che un virus poteva causare tumori in un mammifero.

# PAPILLOMAVIRUS UMANI (HPV)

- Oltre **118 genotipi**, definiti in base all'omologia del DNA, alcuni con potenziale oncogeno.
- Classificati in molti generi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ...  $\pi$ ), sulla ciascuno comprendente diversi tipi virali.
- Tessuto specifici (cutanei, mucosali)
- Spesso infezione asintomatica subclinica, persistente o latente.

**TRASMISSIONE:** contatto diretto o indiretto con superfici contaminate, rapporti sessuali.

Scoperti da Giuseppe Ciuffo, 1907, mediante inoculazione di se stesso

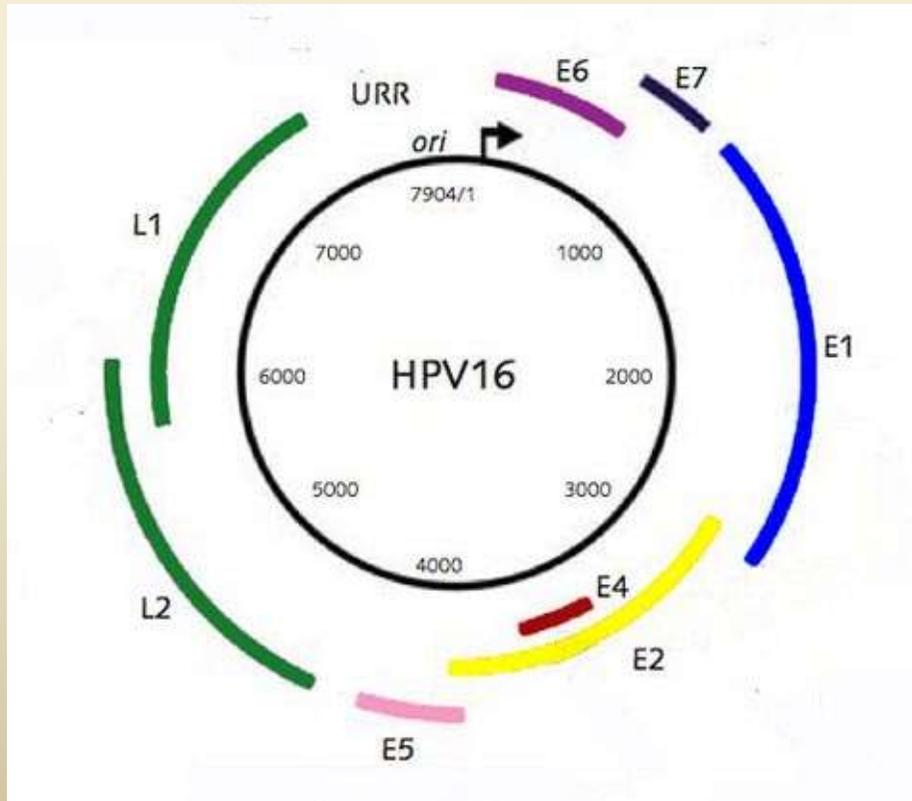
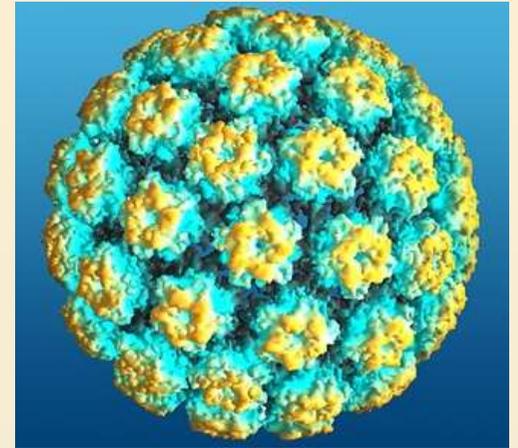
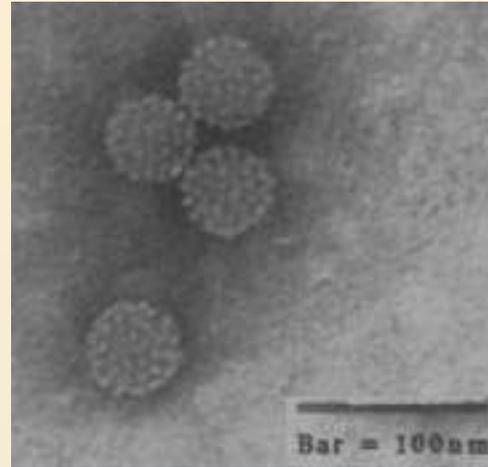


# PAPILLOMAVIRUS: STRUTTURA

Diametro circa 50 nm.

Capside **nudo**, formato da 72 capsomeri.

Genoma: **dsDNA**, **circolare**, circa 8 kb, diviso in Early e Late.



## Geni codificati e loro funzione:

- E1:** Replicazione plasmidica
- E2:** Regolazione trascrizione
- E4:** Modulaz. espressione tardiva
- E5:** Attivazione mitosi (?)
- E6:** Trasformazione
- E7:** Trasformazione
- L1, L2:** Proteine capsidiche
- URR:** Regione regolatoria

# Replicazione HPV

La replicazione di HPV è **controllata dalla trascrizione della cellula ospite** (differenziamento cellule cute o epitelio mucosale).

Il virus raggiunge lo strato basale attraverso lesioni.

I **geni E** del virus stimolano la crescita delle cellule, portando alla formazione di escrescenze epidermiche (papillomatosi).

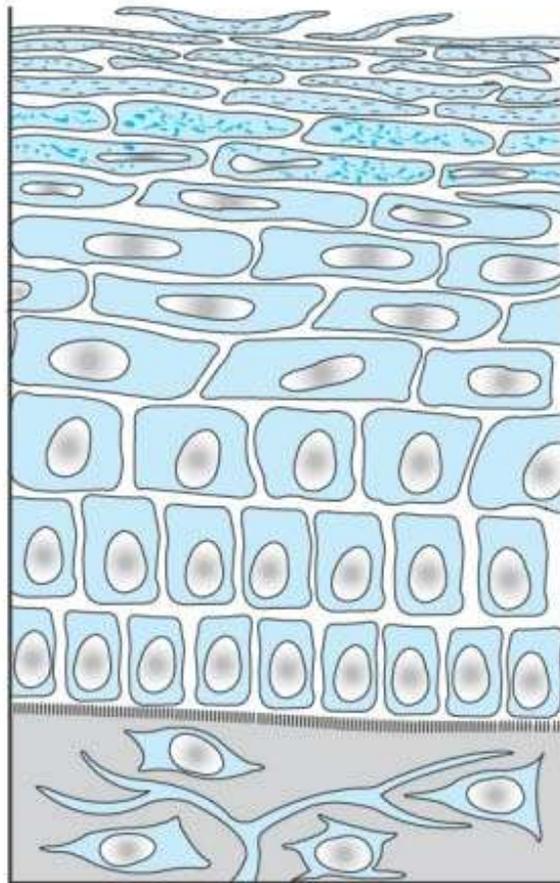
La crescita cellulare facilita la replicazione del genoma virale.

L'aumento del n° delle cellule causa ispessimento dello strato basale e spinoso. Mentre la cellula si differenzia,

i fattori cellulari specifici espressi nei diversi strati e tipi di pelle e di mucose

promuovono la trascrizione dei geni virali. **L'espressione di geni virali correla con quella di specifiche cheratine.** I

**geni L** sono espressi solo nello strato superiore completamente differenziato, ed il virus viene liberato con le cellule morte dello strato più superficiale.



| KERATINOCYTE DIFFERENTIATION   | PAPILLOMAVIRUS REPRODUCTION  |
|--|--|
| Stratum corneum  | Mature virions shed  |
| Granular Layers<br>Nuclear degeneration, cornification<br>Filaggrin : keratin aggregation                  | Mature virions   |
| Upper Spinous Layers<br>Keratins 1 & 10  | Virion assembly<br>Late capsid proteins L2 and L1<br>Vegetative DNA amplification<br>High levels of early & differentiation-dependent proteins, notably E4<br>Koilocytosis of productive keratinocytes |
| Lower Spinous Layers<br>Keratins 1 & 10  | Differentiation-dependent E6 & E7 proteins<br>Early proteins E1, E2, E4 & E5   |
| Transit Amplifying Cells<br>Keratins 1 & 10<br>Frequent cell division                                      | Possible alternative site of infection<br>Immediate early proteins E1, E2 (& E5)   |
| Basal Stem & Reserve Cells<br>Occasional division to replenish transit amplifying cells<br>Keratins 5 & 14 | Primary infection<br>Establishment replication<br>Immediate early proteins E1, E2 (& E5)   |
| Basement Membrane  |  |
| Dermis<br>Connective tissue (collagen),<br>Fibroblasts, Lymphocytes,<br>Vascular endothelium               |  |

# PAPILLOMAVIRUS: replicazione e meccanismo patogenetico

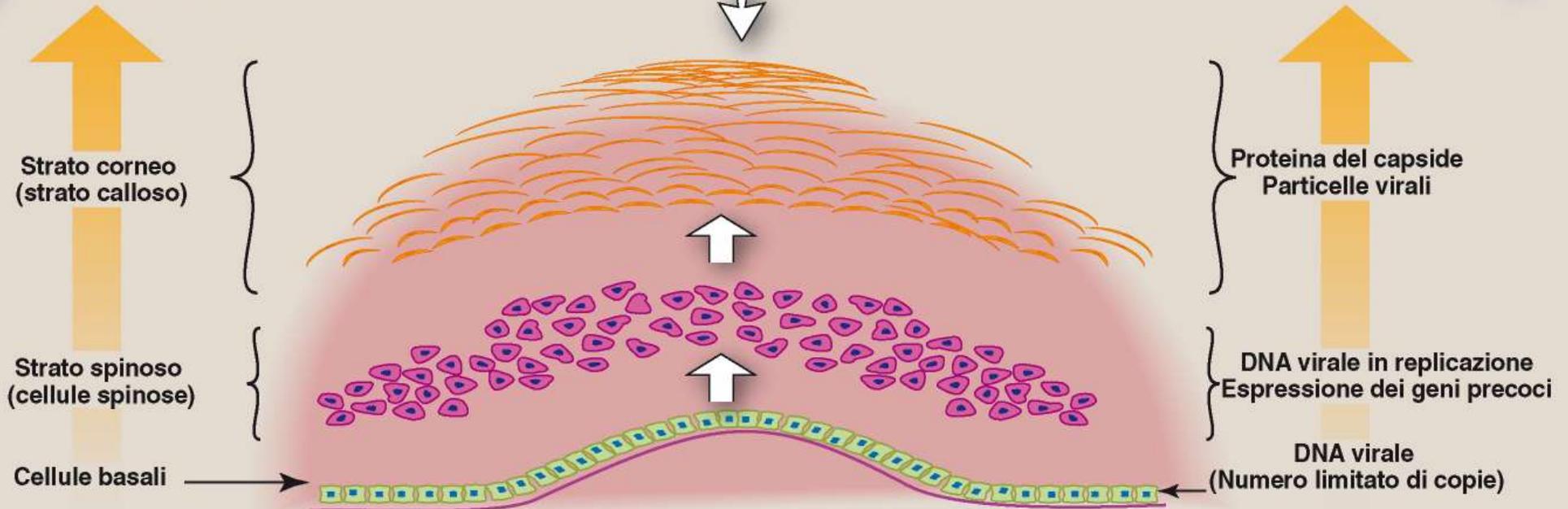
La cellula dello strato basale, non appena infettata, inizia a moltiplicarsi e a diffondere lateralmente. Inoltre le cellule figlie iniziano a migrare verso la superficie, pur continuando a moltiplicarsi nello strato di cellule spinose sotto l'influenza delle proteine precoci virali.

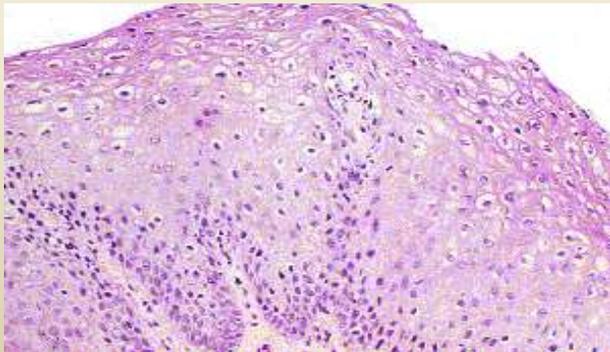
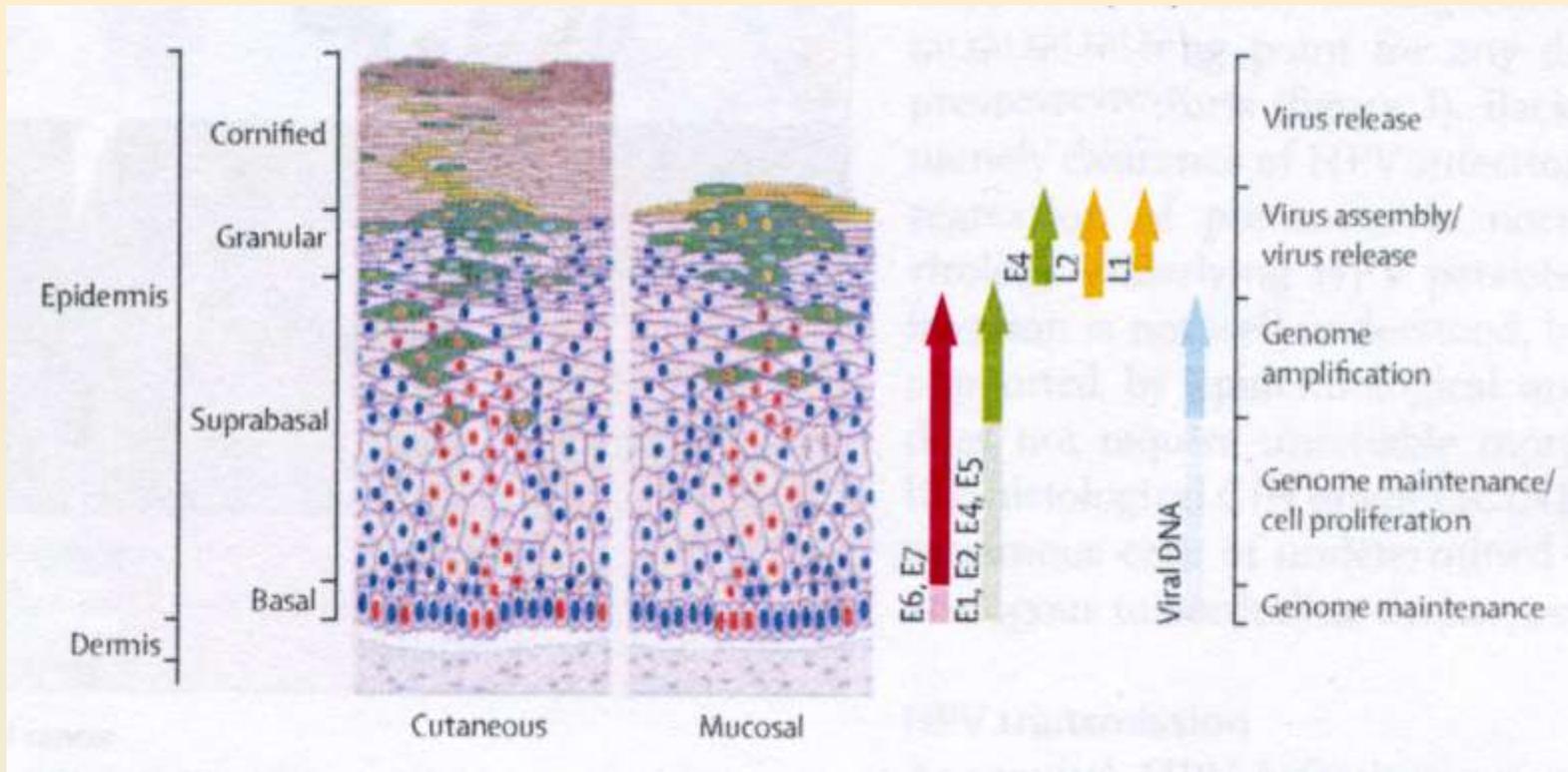
Viene sintetizzata cheratina in eccesso che, continuando la proliferazione cellulare, porta alla formazione di uno strato corneificato ispessito di cellule morte contenenti la progenie virale infettante.

Il ciclo di replicazione inizia con l'espressione dei geni precoci virali, seguita dalla moltiplicazione del genoma virale, e infine dall'assemblaggio della progenie virale negli strati più superficiali della verruca.

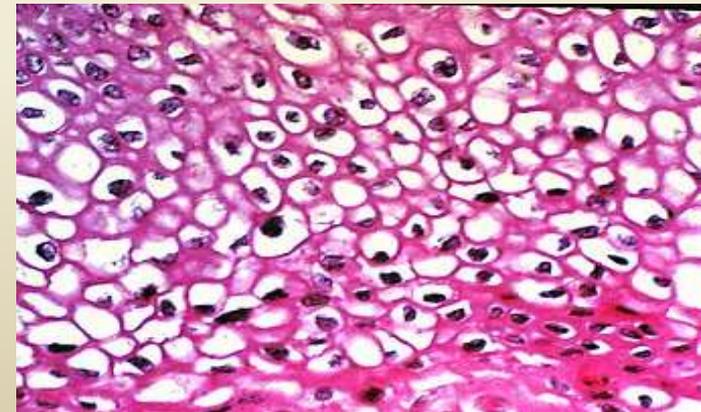
**Differenziazione delle cellule epidermiche in aumento**

**Ciclo vitale del virus**

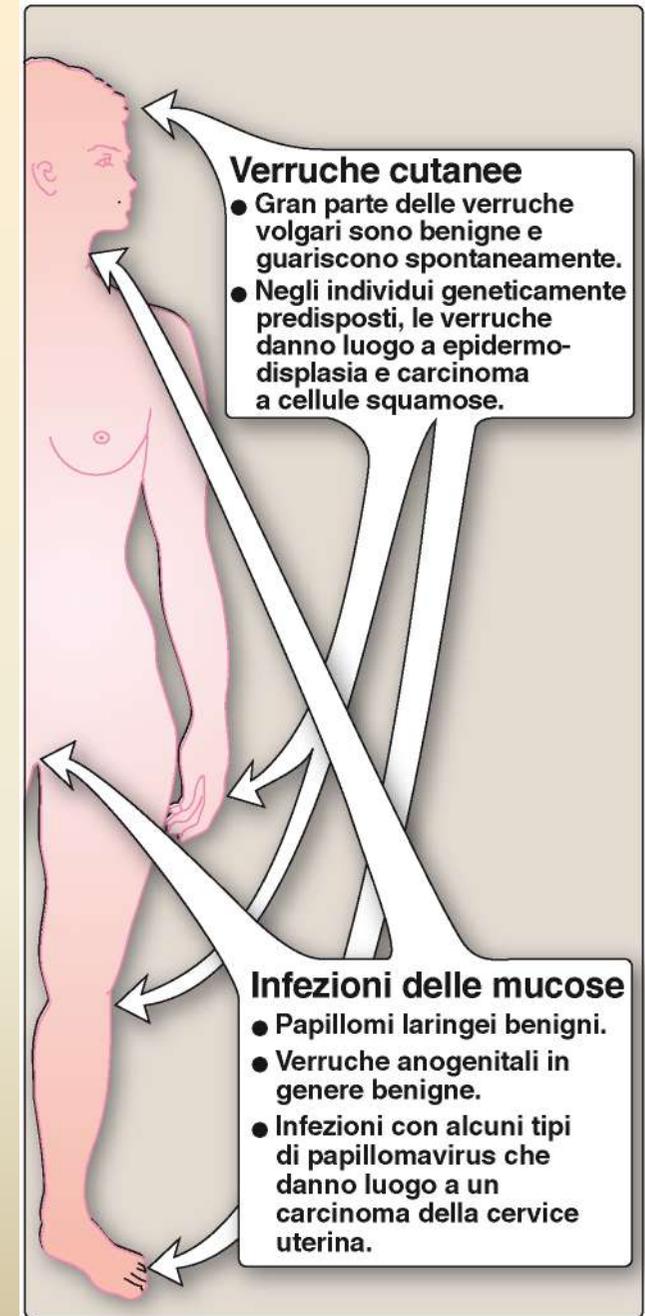




**Danno cellulare**  
**caratteristico: COILOCITOSI.**  
 Le cellule (soprattutto dello strato spinoso) presentano nuclei picnotici, raggrinziti, circondati da aloni chiari, con estesa vacuolizzazione



# PAPILLOMAVIRUS: MALATTIE



# PAPILLOMAVIRUS: MALATTIE

**VERRUCHE COMUNI:** lesioni esofitiche circoscritte, singole o multiple, benigne. Infezione tramite microlesioni della cute, abrasione o macerazione della pelle (verruche plantari in frequentatori di piscina).

**LESIONI PAPILLARI** del cavo orale (HPV 2, 6, 11, ecc).



**EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME:** rara malattia ereditaria, con difetti nell'immunità cellulo mediata. HPV 5, 8 e altri. Verruche diffuse su tutto il corpo → sviluppo di carcinomi squamosi nelle zone esposte al sole.

**IPERPLASIA FOCALE EPITELIALE** della mucosa orale; frequente nelle popolazioni amerindie (HPV 13, 32), lesione persistente senza caratteri di malignità.

# PAPILLOMAVIRUS: MALATTIE

**PAPILLOMI LARINGEI:** HPV 6 e 11; di solito in bambini; infezione perinatale durante il parto.

Infez. Benigna, ma resistente al trattamento → problemi respiratori.

**CONDILOMA ACUMINATO O PIANO:** lesione benigna della mucosa ano-genitale, trasmissione sessuale. HPV 6, 11, 16, 18, ecc.

**NEOPLASIA INTRAEPITELIALE E CARCINOMA CERVICE UTERINA:** associato a HPV 16, 18, 31, 33, ecc. Nei carcinomi il DNA è frequentemente integrato → Alterazione dell'espressione genica. Necessità di cofattori.

# Tipi di Papillomavirus nelle lesioni cliniche

## Pelle

|               |                             |
|---------------|-----------------------------|
| 1, 4          | Verruche plantari (benigne) |
| 2, 26, 28, 29 | Verruche comuni (benigne)   |
| 3, 10, 27     | Verruche piane (benigne)    |

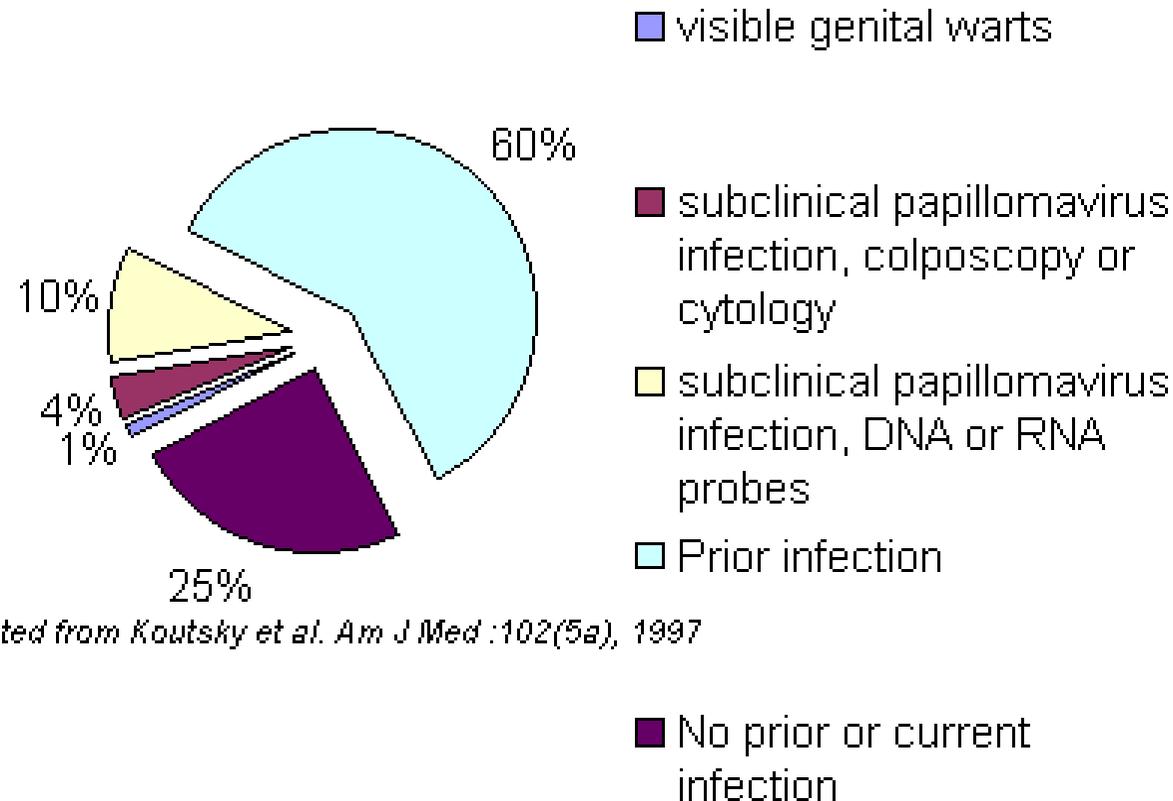
## Epidermodisplasia verruciforme

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| 9, 12, 15, 17<br>19-25, 46-50 | Lesioni maculari, perlopiù benigne)<br>(HPV a basso rischio)               |
| 5, 8, 14                      | Lesioni maculari con possibile evoluzione maligna<br>(HPV ad alto rischio) |

## Mucosa

|   |  |
|---|--|
| 6, 11, 34, 39, 42, 55<br>56, 59, 61, 62, 64, 67 | Condilomi acuminati e piani (rara<br>evoluzione maligna) (HPV a basso rischio)                 |
| 16, 18, 31, 33, 35<br>39, 45, 51, 66, 68        | Condilomi, neoplasia intraepiteliale con possibile<br>evoluzione maligna (HPV ad alto rischio) |

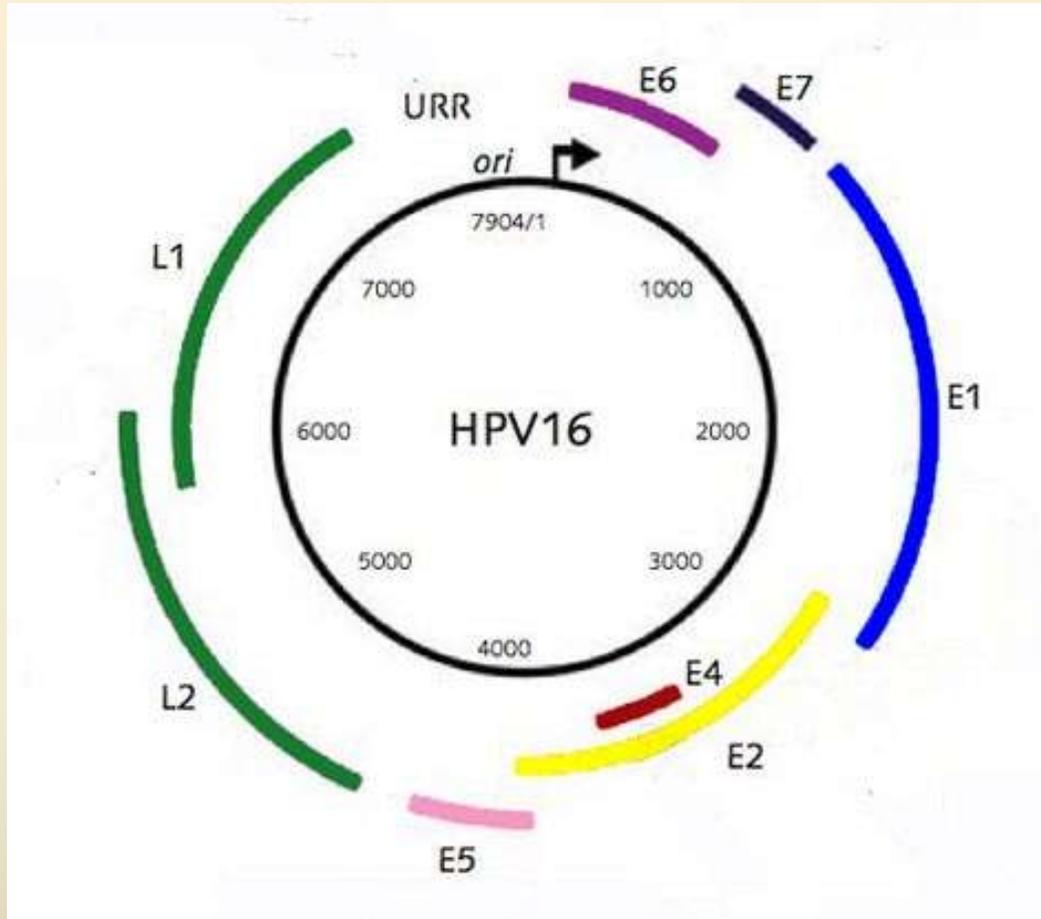
**Estimated prevalence of genital HPV infection among men and women 15-49 years of age in the US (1994)**



*adapted from Koutsky et al. Am J Med :102(5a), 1997*

**Spesso si verifica infezione asintomatica subclinica, persistente o latente.**

# HPV e Oncogenesi



- E1**: Replicazione plasmidica
  - E2**: Regolazione trascrizione
  - E4**: Modulaz. espressione tardiva
  - E5**: Attivazione mitosi (?)
  - E6**: Trasformazione
  - E7**: Trasformazione
  - L1, L2**: Proteine capsidiche
- URR**: Regione regolatoria

I geni **E6** e **E7** dei tipi a rischio oncogeno si legano alle proteine **p53** e **Rb**.

# HPV e Oncogenesi

Alcuni tipi di HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66; probabilmente anche 26, 53, 68, 73, 82) sono associati al carcinoma della cervice uterina (neoplasia più comune nelle donne dei Paesi del Terzo Mondo, circa 500.000 nuovi casi all'anno). HPV18 è particolarmente presente in adenocarcinomi.

**Oltre il 90% dei carcinomi squamosi della cervice uterina contiene DNA di HPV**

Diverse zone del mondo hanno diverse prevalenze di HPV ad alto rischio (globalizzazione, immigrazione)



**Prof Harald zur Hausen, scopritore di HPV16 e 18 e del loro ruolo nell'oncogenesi genitale, premio Nobel 2008**

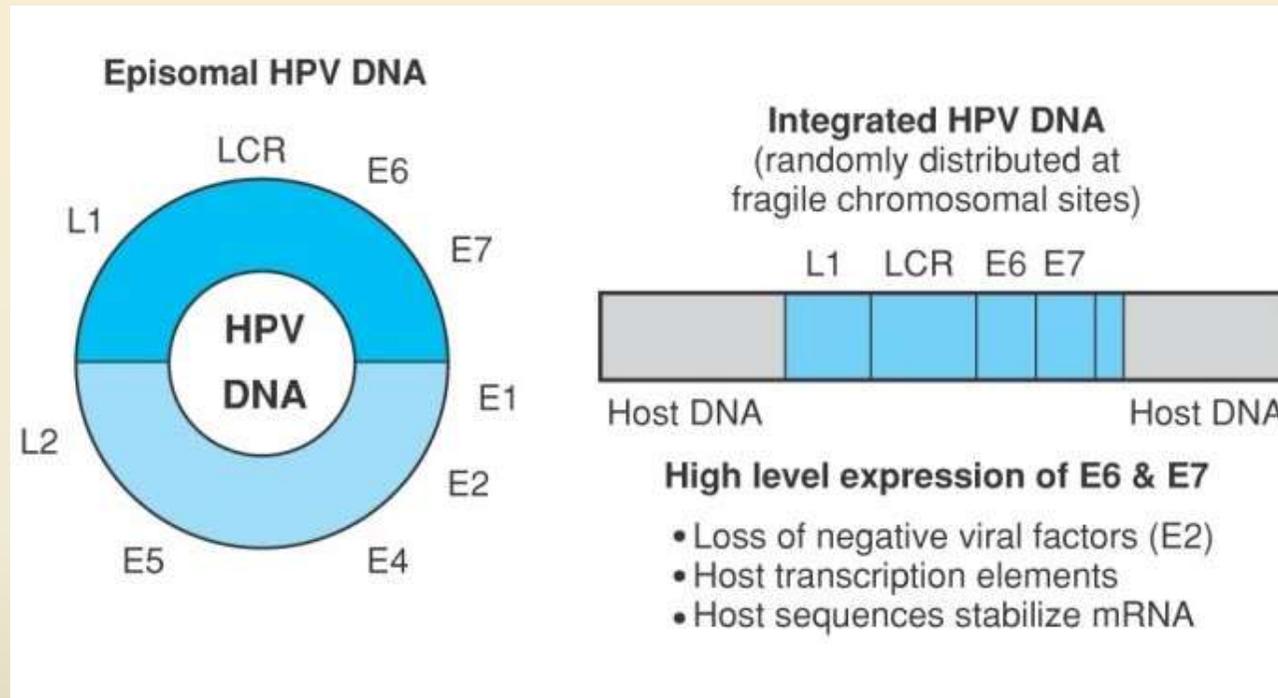
|                    | Proportion of cervical cancers caused | Cumulative total |
|--------------------|---------------------------------------|------------------|
| HPV16              | 54.6%                                 | 54.6%            |
| HPV18              | 15.8%                                 | 70.4%            |
| HPV33              | 4.4%                                  | 74.8%            |
| HPV45              | 3.7%                                  | 78.5%            |
| HPV31              | 3.5%                                  | 82.0%            |
| HPV58              | 3.4%                                  | 85.4%            |
| HPV52              | 2.5%                                  | 87.9%            |
| HPV35              | 1.8%                                  | 89.7%            |
| HPV59              | 1.1%                                  | 90.8%            |
| HPV56              | 0.8%                                  | 92.2%            |
| HPV51              | 0.7%                                  | 92.9%            |
| HPV39              | 0.7%                                  | 93.6%            |
| HPV73              | 0.5%                                  | 94.1%            |
| HPV68              | 0.5%                                  | 94.6%            |
| HPV82              | 0.2%                                  | 94.8%            |
| No type identified | 5.2%                                  | 100%             |

Table 2: Proportion of cervical cancer caused by the carcinogenic HPV types

# HPV e Oncogenesi

Nei condilomi il DNA virale è **libero**, nei carcinomi è **integrato** nel genoma cellulare.

L'integrazione può avvenire in qualsiasi zona del genoma della cellula ospite,



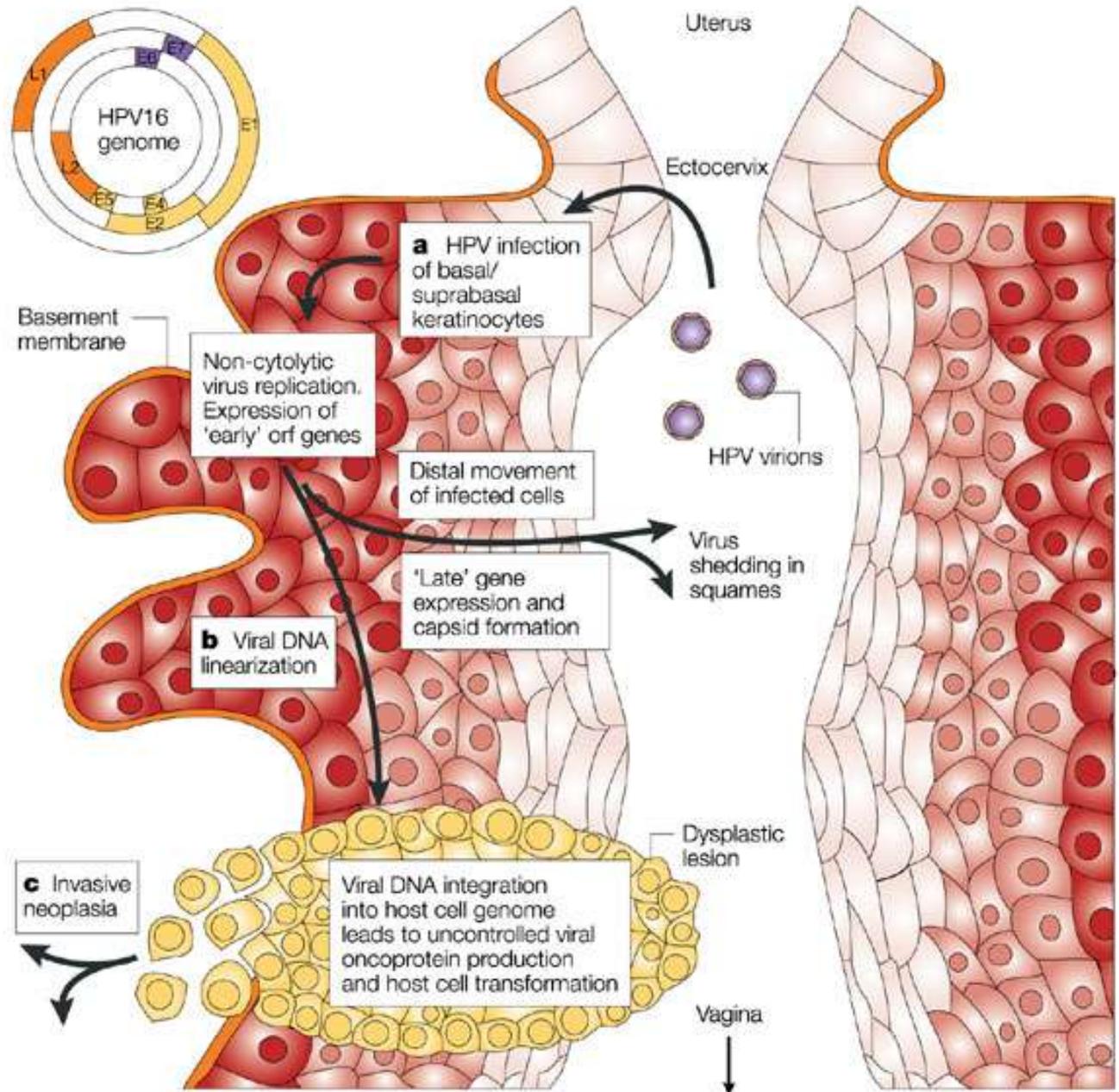
L'integrazione interrompe l'organizzazione lineare del genoma; di solito avviene nella zona di E1-E2, mentre **E6 ed E7** (gli oncogeni) rimangono intatti. **E2** ha la funzione di regolare la trascrizione di E6 e E7; la sua interruzione ne permette una **alta, incontrollata espressione**.

# HPV e Oncogenesi

Integrazione del DNA virale:  
produzione incontrollata  
delle oncoproteine virali →  
induzione proliferazione  
cellulare.

➤ CIN I-II-III

➤ Invasivo

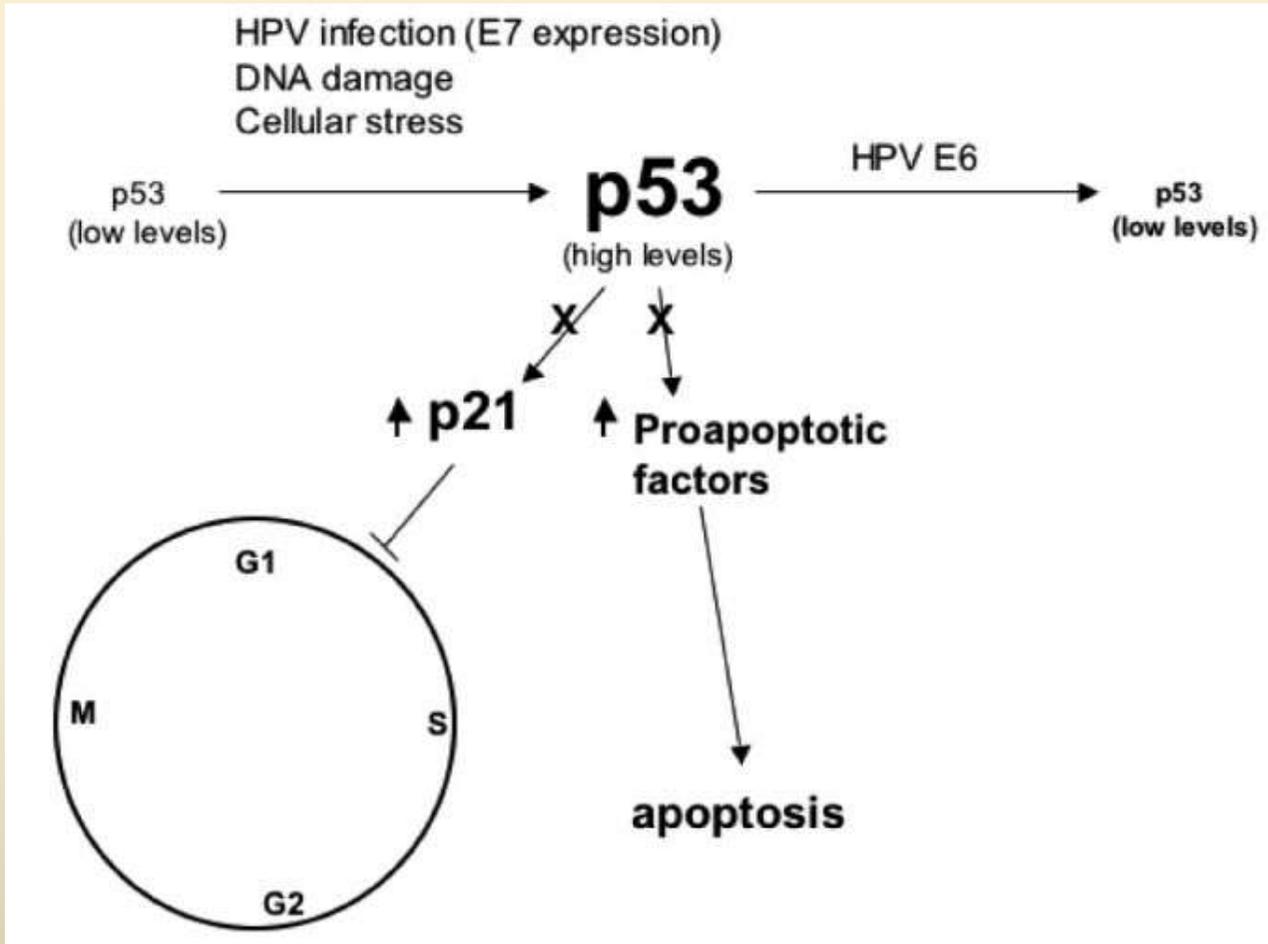


# HPV e Oncogenesi

## Ruolo E6/E7:

- E6/E7 immortalizzano colture primarie;
- inducono trasformazione completa di linee già immortalizzate;
- cooperano con l'oncogene **c-ras** nella trasformazione neoplastica;
- E6 forma un complesso con **p53** e la degrada, promuovendo l'apoptosi;
- E7 lega **Rb**, ne neutralizza le funzioni, impedendo l'arresto del ciclo cellulare.

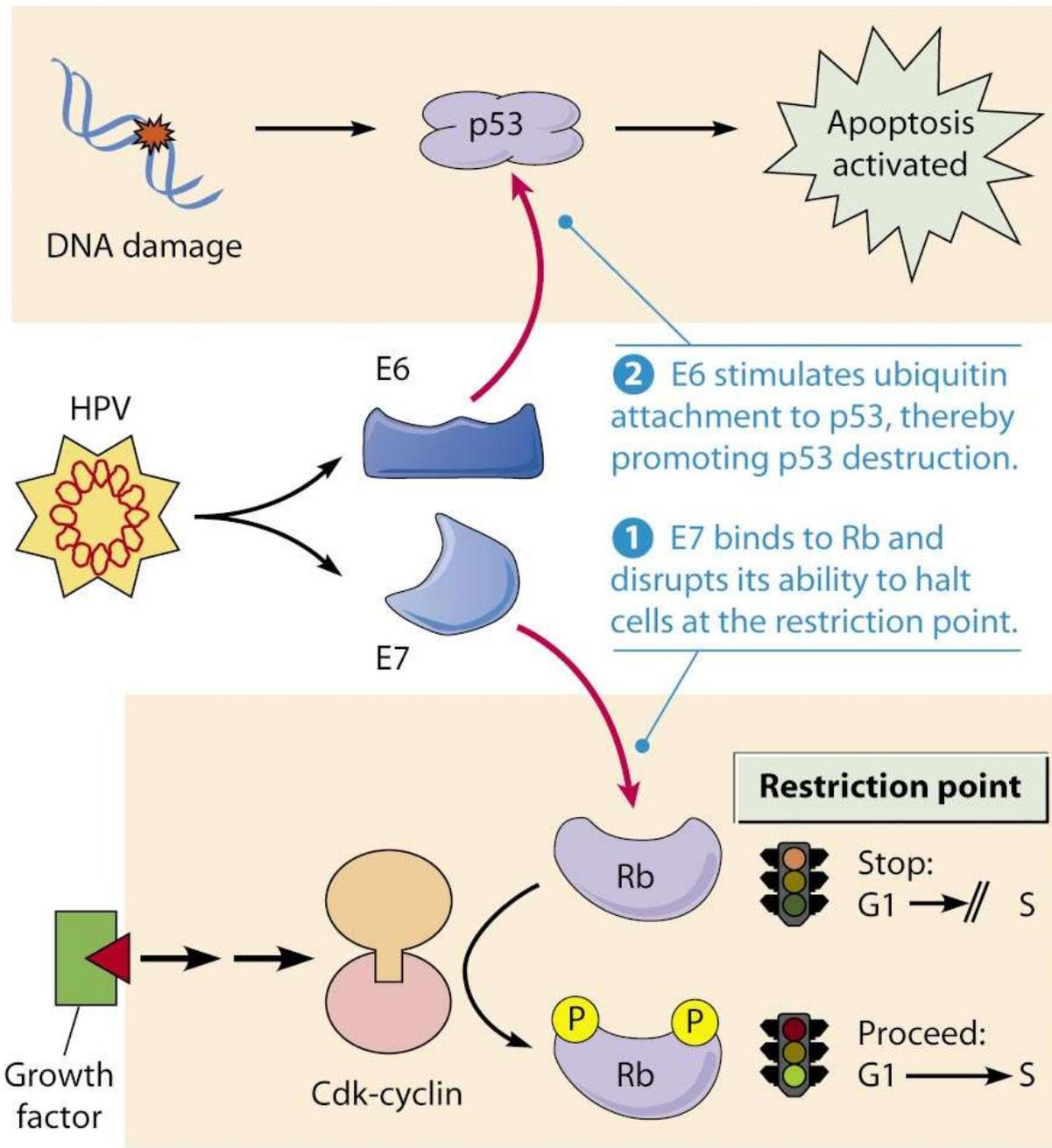
## E6 di HPV ad alto rischio



In condizioni normali i livelli di p53 sono bassi, ma aumentano in seguito a danni causati da stress cellulare e da infezioni virali.

Alti livelli di p53 possono causare apoptosi, o arresto del ciclo cellulare in fase G1, per consentire di riparare il danno prima della replicazione del DNA.

**E6 degli HPV ad alto rischio si lega a p53, causandone la degradazione e riportandola a bassi livelli → NO apoptosi.**



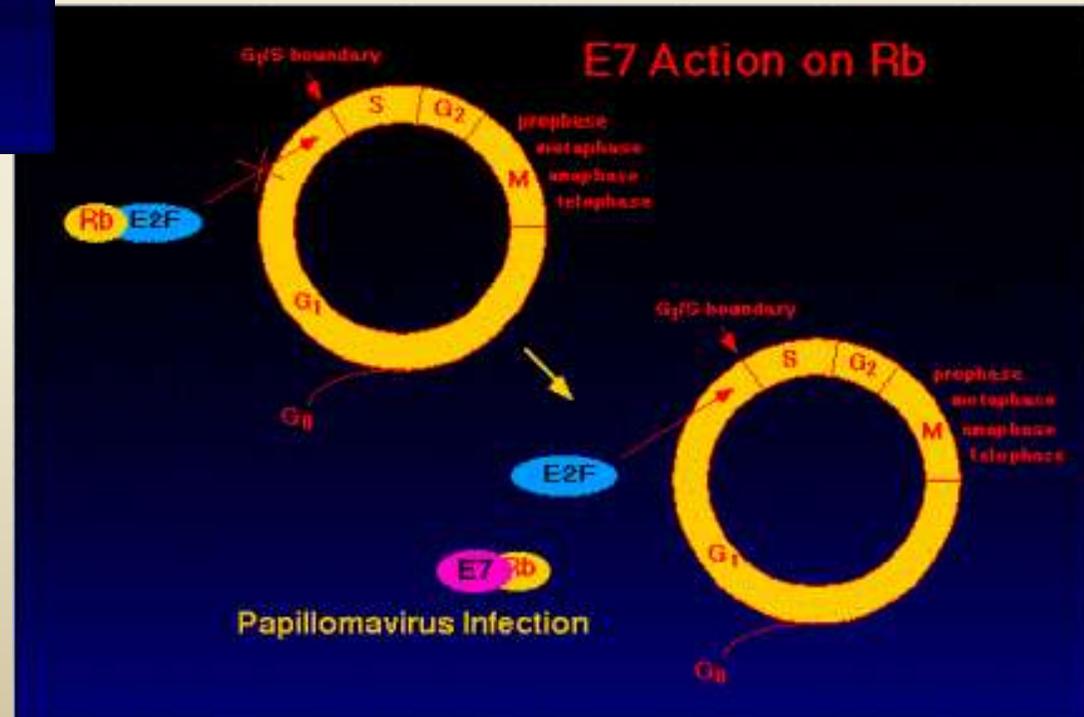
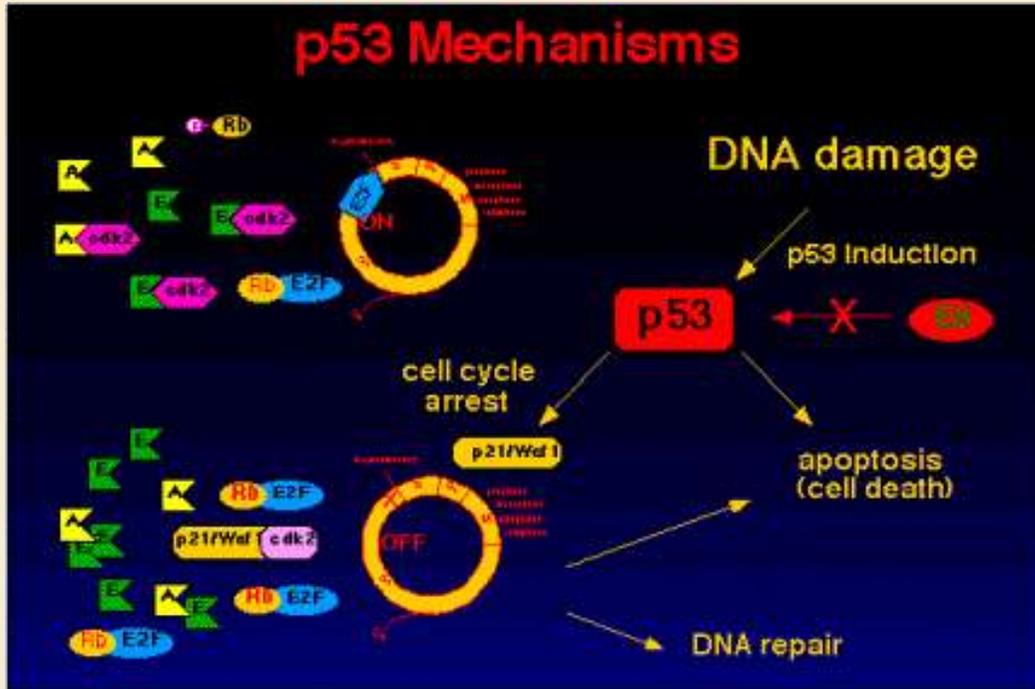
## E6/E7 di HPV ad alto rischio

In condizioni normali i livelli di p53 sono bassi, ma aumentano in seguito a danni causati da stress cellulare e da infezioni virali → l'aumento di p53 induce apoptosi. **E6 degli HPV ad alto rischio si lega a p53, causandone la degradazione → NO apoptosi.**

E7 lega Rb e impedisce la sua funzione di bloccare le cellule in fase G0/G. Rb è attiva quando è poco fosforilata (presente in fase G0/G), e arresta il ciclo cellulare perchè lega i fattori cellulari necessari per attivare la trascrizione. Quando Rb viene fosforilata, si ha l'attivazione del ciclo cellulare, in quanto si scinde il legame fra Rb e i fattori trascrizionali, che promuovono la progressione del ciclo.

**E7 degli HPV ad alto rischio lega la forma attiva poco fosforilata, degradandola e causando il rilascio dei fattori trascrizionali.**

# E6/E7 di HPV ad alto rischio



# Necessità di cofattori per l'oncogenesi da Papillomavirus:

- Papilloma del coniglio: conversione maligna dopo applicazione di catrame.
- Papillomatosi esofagea del bovino: conversione maligna negli animali nutriti con felci fermentate (contengono una tossina immunosoppressiva e radiomimetica).
- Epidermodisplasia verruciforme: conversione maligna solo delle lesioni con tipi ad alto potere oncogeno, in siti esposti alla luce del sole.
- Papilloma laringeo: andamento maligno in seguito a terapia con raggi X.

**I papillomavirus da soli non sono in grado di indurre oncogenesi.**

Anche gli HPV oncogeni del tratto genitale esplicano il loro potenziale maligno in associazione ad **altri fattori**, che devono ancora essere individuati con precisione.

**Fra quelli più probabili:**

- ormonali (sono ugualmente diffusi negli uomini, ma scarsa incidenza di tumori) ,
- chimici (fumo di tabacco, metaboliti della popolazione microbica vaginale),
- Infettivi (virus dell'herpes simplex 2, clamidia trachomatis).



**Coniglio con papilloma di Shope. Lesione virale benigna, puo' subire trasformazione neoplastica, dopo esposizione a cofattori chimici (es. catrame)**



**Nel 1775, Percival Pott, medico inglese, ha associato i tumori dello scroto negli spazzacamini alla natura del loro lavoro e alla presenza di agenti cancerogeni nella fuliggine.**

**Oggi si sa che la sostanza cancerogena della fuliggine è il 3,4-benzopirene. La stessa sostanza si trova nelle secrezioni genitali di donne fumatrici.**

JOURNAL OF VIROLOGY, Jan. 2008, p. 1053-1058  
0022-538X/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JVI.01813-07  
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 82, No. 2

## The Cigarette Smoke Carcinogen Benzo[*a*]pyrene Enhances Human Papillomavirus Synthesis<sup>∇</sup>

Samina Alam,† Michael J. Conway,† Horng-Shen Chen, and Craig Meyers\*

*Department of Microbiology and Immunology, Pennsylvania State University College of Medicine, 500 University Drive, Hershey, Pennsylvania 17033*

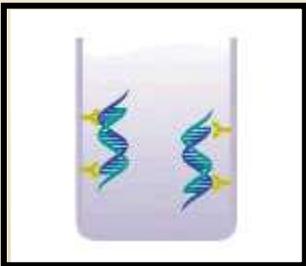
# HPV: DIAGNOSI



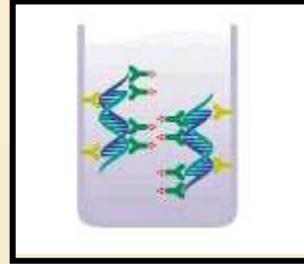
**Lisi del campione e denaturazione, per esporre il DNA**



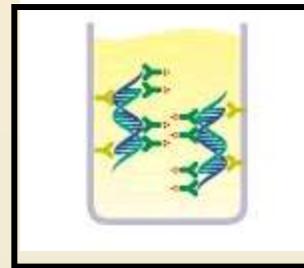
**Ibridazione con sonde specifiche di RNA, formando ibridi DNA:RNA**



**Cattura degli ibridi, su supporto solido, mediante anticorpi che reagiscono solo con gli ibridi**



**Marcatura degli ibridi con anticorpi coniugati ad enzimi.  
(Ampl > 3000 volte)**



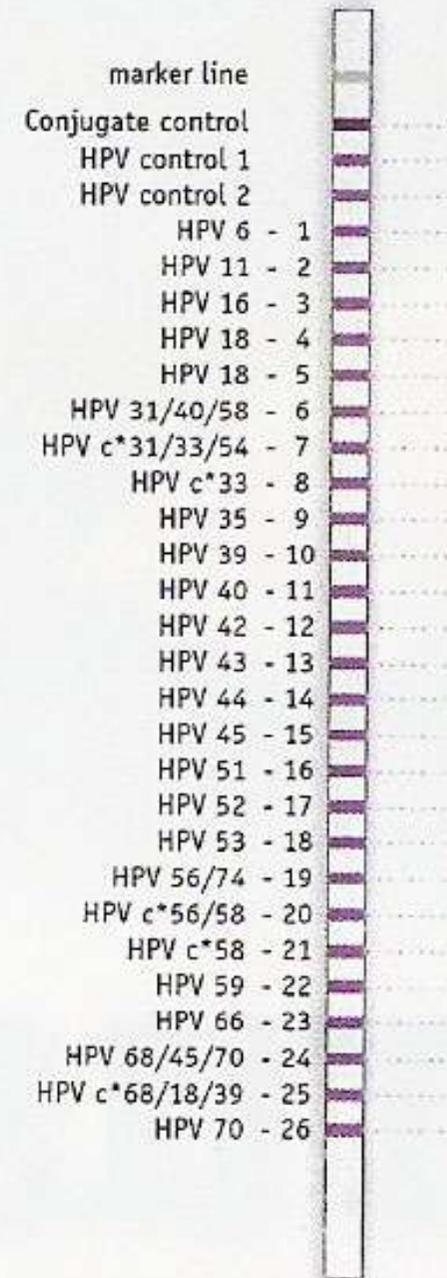
**Aggiunta del substrato, che sviluppa una reazione chemiluminescente**

Hybrid Capture System, Digene, consente la determinazione del gruppo (alto o basso rischio).

# Genotipizzazione dei Papillomavirus

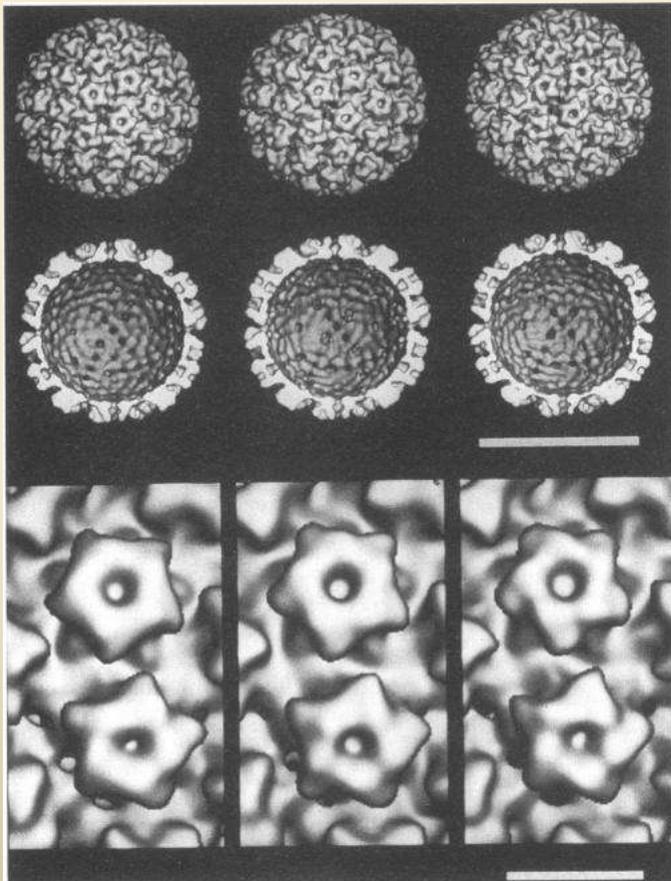
## Sistema INNO-LiPA per HPV

Parte della regione L1 del genoma virale viene amplificata con primers consensus e basi biotinilate e poi denaturata. Gli ampliconi vengono ibridati a sonde immobilizzate sulla striscia, specifiche per i singoli tipi. Dopo lavaggi (stringenti) si aggiunge il sistema rivelatore (streptavidina, fosfatasi, cromogeno).



E' entrato in uso un **vaccino anti-HPV**. Consiste di particelle simil-virali (virus-like particle, VLP), prodotte clonando L1 di HPV6, 11, 16 e 18. Le L1 ricombinanti si autoassemblano in VLPs strutturalmente uguali ai virioni. Non contenendo acidi nucleici, le VLPs non sono infettanti.

Virioni da  
verruche      Psvirioni  
con L1      Psvirioni  
con L1+L2



La morfologia degli pseudovirioni composti solo da L1 e' uguale ai virioni naturali.

Sono disponibili due vaccini: *Gardasil*, tetravalente (HPV6, 11, 16,18), con L1 prodotta in lievito *Cervarix*, bivalente (HPV16, 18), con L1 prodotta tramite baculovirus in cellule di insetto

Il vaccino, contenente VLPs + adiuvante, viene somministrato con 3 iniezioni IM, e protegge per almeno 4 anni (ancora non si sa se sia necessario un richiamo), e stimola una significativa risposta anticorpale.

# VACCINO

In Italia a febbraio 2007, l'Agenzia italiana del farmaco ha autorizzato la commercializzazione del primo vaccino contro il papilloma virus (HPV), responsabile della quasi totalità dei casi di tumore del collo dell'utero (o cervice uterina)

Il vaccino è **offerto gratuitamente dalle strutture pubbliche dal 2008 a tutte le bambine all'età di 12 anni.**

In Italia il tumore del collo dell'utero colpisce circa 3500 donne ogni anno: l'incidenza più elevata si ha attorno ai 45 anni di età, mentre è praticamente assente sotto ai 25 anni.

Il vaccino messo in commercio è diretto contro 4 ceppi del virus: HPV 16, HPV 18, HPV 11, HPV 6.



## **NOTA:**

Il vaccino non ha effetto sulle infezioni già in corso, ma solo nel **prevenire** le nuove infezioni.

Infatti l'infezione da HPV è ristretta alle cellule epiteliali, pertanto la presentazione degli antigeni virali al sistema immunitario è limitata. L'infezione naturale del tratto genitale causa nella maggior parte dei soggetti (ma non in tutti) lo sviluppo di **anticorpi** contro HPV che non hanno alcun effetto sulle infezioni già in atto o latenti.

L'infezione naturale da HPV è eliminata attraverso la risposta **cellulo-mediata** specifica, mediata soprattutto da cellule dendritiche e linfociti T citotossici. Al momento, non ci sono vaccini in grado di stimolare tali risposte.

Anche in donne vaccinate è necessario continuare lo screening di routine, perchè esistono altri tipi oncogeni di HPV (es. 31, 33, ecc.), responsabili del 30% delle neoplasie, contro cui il vaccino non è efficace.

### **1. Papillomavirus umano**

Si contrae per via sessuale ed è il primo responsabile del cancro al collo dell'utero. Il vaccino, già disponibile gratuitamente per le adolescenti italiane, è stato salutato da alcuni con entusiasmo perché libera dal rischio-cancro, da altri con perplessità, perché è molto costoso e protegge da un tumore per il quale esistono sistemi di screening efficacissimi.

**Non è vero che libera dal rischio cancro!!!!  
Ha effetto solo su HPV 16 e 18, non sugli  
altri HPV oncogeni**

L'espresso, 22/11/2007. p 197

**La diminuzione delle infezioni da HPV16 e HPV18 altererà la frequenza degli altri tipi oncogeni, che potranno occupare la “nicchia” lasciata libera?**