

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXII*

Relazione 1° anno

TITOLO:

**INDAGINE SULLA TRASMISSIONE MATERNO-FETALE
DELL'INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS UMANI E DI SV-40
MEDIANTE METODICHE MOLECOLARI.**

Candidato: Allegrini Sara
Tutor: Prof. Boldorini Renzo

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

I Polyomavirus (PVs) appartengono, secondo una recente classificazione, alla famiglia delle *Polyomaviridae*, anche se storicamente venivano classificati come genere appartenente, assieme a quello dei *Papillomavirus*, alla famiglia delle *Papovaviridae* (1). L'infezione virale può avvenire in forma *litica* –con distruzione della cellula bersaglio e liberazione della progenie virale- o *abortiva* – cioè con espressione parziale delle proteine virali, in assenza di distruzione cellulare- con potenzialità di trasformazione oncogenica in vari tipi cellulari (infatti il loro nome deriva dalla fusione di “Poly” e “oma” proprio a sottolineare questa loro caratteristica (2). Attualmente sono noti diversi PVs in grado di infettare su larga scala molte specie tra i mammiferi in modo relativamente specie-specifico tra cui topo, criceto, scimmia e anche l'uomo.

L'uomo è l'ospite naturale di due PVs: il Polyomavirus hominis 1 e 2, , meglio conosciuti con l'acronimo, rispettivamente, di BK virus (BKV) e di JC virus (JCV) derivante dalle iniziali dei pazienti in cui sono stati isolati per la prima volta nel 1971. BKV è stato isolato per la prima volta nelle urine di un paziente con trapianto renale che aveva sviluppato nel periodo post-operatorio una stenosi ureterale (3). Mentre JCV è stato isolato partendo da oligodendrociti (cellule del sistema nervoso centrale produttrici di mielina) di un paziente con morbo di Hodgkin in terapia immunosoppressiva, che aveva sviluppato Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML) (4), una patologia fatale del sistema nervoso centrale caratterizzata da demielinizzazione sottocorticale, multifocale della sostanza bianca talora estesa alla sostanza grigia cerebrale, che si manifesta in un contesto di immunodeficienza (5).

Il Simian virus 40 (SV-40) è uno dei virus più studiati, di cui si conosce sia l'intero genoma, sia il suo modo di interagire con la cellula ospite; sebbene il suo ospite naturale sia rappresentato dalle scimmie, SV-40 può infettare anche l'uomo. Sembra sia stato introdotto accidentalmente nell'uomo tramite la somministrazione di vaccini antipoliomielite contaminati tra il 1955 e il 1963 (il vaccino veniva allestito in colture di cellule renali di scimmia in cui il virus era presente come contaminante) e una volta nell'uomo sia stato poi in grado di infettare nuovi individui (6).

Mentre per BKV e JCV è stato ormai accertato il loro ruolo in diverse patologie umane, per quanto riguarda SV-40 sono ancora in corso studi; osservazioni epidemiologiche su popolazioni accidentalmente infettate da vaccini antipoliomielite non hanno evidenziato apparenti legami tra la presenza del virus e l'insorgere di specifiche patologie. Recenti osservazioni hanno ipotizzato che

esso possa prendere parte al processo di cancerogenesi umana specie per ciò che riguarda l'insorgenza di mesoteliomi maligni (7,8).

Strutturalmente i PVs (vedi **figura 1**) presentano un capsidico a simmetria icosaedrica delle dimensioni di 40-45 nm, privo di envelope, formato da 3 tipi di proteine: viral protein 1 (VP1), viral protein 2 (VP2) e viral protein 3 (VP3). VP1 rappresenta la proteina capsidica maggiore in quanto da sola costituisce circa l'80% dell'intero capsidico; essa si associa in 72 pentameri che costituiscono l'intera superficie esterna del capsidico, e pertanto è la diretta responsabile dell'interazione con le molecole di superficie della cellula bersaglio. VP2 e VP3 invece costituiscono insieme il restante 20% del capsidico associandosi tra loro in complessi che ne formano la superficie interna (9).

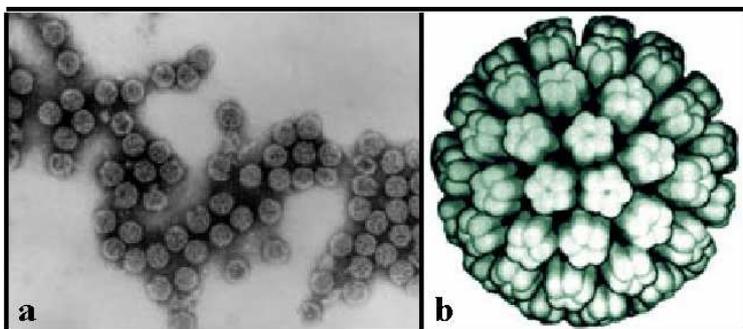


Figura 1: a) fotografia al microscopio elettronico del PV di scimmia SV-40 (Ingrandimento 10000); b) rappresentazione grafica 3D della struttura esterna dei PV rappresentata dall'envolope formato nello strato esterno solo dalla VP1.

Il genoma virale dei PVs consiste in una singola molecola di DNA, a doppio filamento, delle dimensioni di circa 5300 paia di basi (bp), che si trova all'interno del capsidico associata con quattro istoni (H2A, H2B, H3 e H4) provenienti dalla cellula eucariotica infettata; il DNA e gli istoni sono complessati sotto forma di cromatina a costituire quello che spesso viene definito un minicromosoma virale. Il genoma dei tre PVs precedentemente citati (BKV, JCV ed SV40) presenta una elevata omologia di sequenza (i PVs umani hanno una omologia del 75%, mentre se li confrontiamo con SV40 scende al 70%) ad indicare una comune origine nell'evoluzione (8, 9).

Funzionalmente il genoma dei PVs (vedi **figura 2**) viene suddiviso in tre regioni:

- La **regione precoce** (Early region, nota anche come regione LT) di 2400bp, che codifica due proteine non strutturali: una fosfoproteina nucleare definita "**large tumor (T) antigen**" (**TAg**) e una proteina ricca in cisterne, citoplasmatica, definita "**small tumor (t) antigen**" (**tAg**). Tali proteine sono le prime ad essere espresse durante l'ingresso del virus nella cellula e sono perciò indicative della presenza virale. TAg riveste un ruolo critico nel ciclo replicativo del virus in quanto contribuisce attivamente alla sua regolazione; infatti promuove la progressione nel ciclo cellulare della cellula ospite inducendo l'entrata in fase S,

contribuisce al reclutamento del macchinario replicativo di cui il virus è sprovvisto, prende parte attivamente alla replicazione del DNA come fattore di iniziazione del processo di sintesi e come elicasi. TAg svolge inoltre un importante ruolo nello sviluppo di neoplasie in animali da laboratorio, attraverso l'interazione con svariate proteine cellulari che ricoprono il ruolo di importanti oncosoppressori o regolatori del ciclo cellulare, tra cui la proteina 53 (p53) e la proteina associata al retinoblastoma (pRb). Il ruolo di tag invece è poco noto, sembra svolgere un'attività di supporto nei confronti di TAg (9).

- La **regione tardiva** (Late region) di 2300 bp, che viene espressa efficacemente solo durante la replicazione virale, codifica per le proteine capsidiche del virus **VP1**, **VP2** e **VP3** e per la proteina a funzione ignota, definita appunto, **agnoproteina** (tale proteina sembra svolgere un ruolo nell'assemblaggio del virione prima del suo rilascio all'esterno della cellula) (2,8). Queste due regioni genomiche, codificanti, sono, dal punto di vista genomico stabili, ovvero le mutazioni nella sequenza di basi nucleotidiche che le compongono sono rare e generalmente coinvolgono singole basi (9). E' possibile identificare diversi sottotipi di JCV e BKV basandosi sulle variazioni della regione codificante per la VP1 (la relativa variabilità di questa porzione della regione tardiva è da imputare al ruolo di VP1 nel riconoscere le diverse cellule bersaglio tramite interazioni con recettore di membrana) (8). Attualmente JCV viene suddiviso in 8 genotipi (definiti **tipo 1**, **tipo 2**, **tipo 3**, **tipo 4**, **tipo 5**, **tipo 6**, **tipo 7**, **tipo 8**) che a loro volta vengono suddivisi in numerosi sottotipi (10). Analogamente anche BKV è stato diviso in quattro genotipi denominati **gruppo I**, **gruppo II**, **gruppo III** e **gruppo IV** (11); i genotipi così identificati di BKV corrispondono ai sierotipi identificabili nelle diverse popolazioni (il concetto

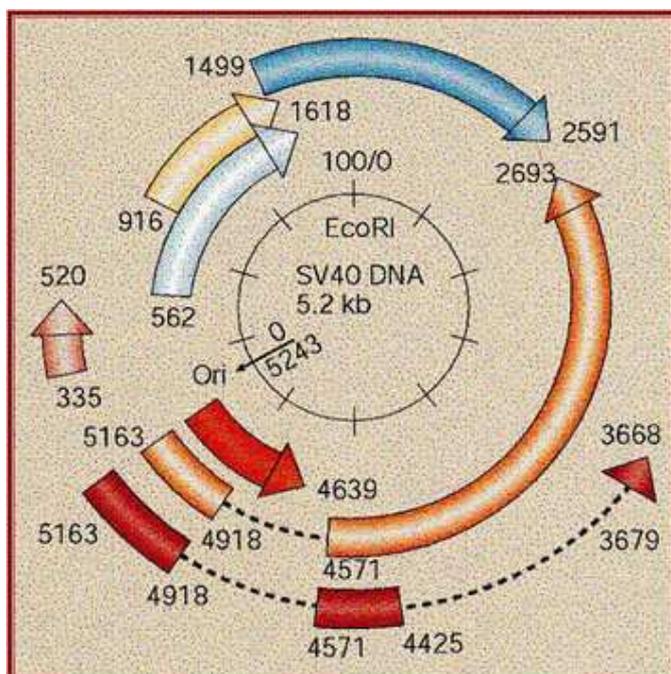


Figura 2: Struttura del genoma del PV SV-40. Come si può notare dall'immagine partendo dall'origine (ORI) i geni del virus si dividono in due gruppi: quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso orario sono i geni della regione tardiva; mentre quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso antiorario sono i geni della regione precoce.

	VP1		Large T Ag
	VP2		Small t Ag
	VP3		Agnoprotein
	17 kT		

di sierotipo riflette la risposta immune specifica dell'ospite verso epitopi antigenici di differenti strutture), mentre per quanto riguarda JCV questa sovrapposizione di classificazione non è possibile in quanto JCV DNA non mostra una variazione di sequenza sufficiente a generare epitopi antigenici sierologicamente distinguibili (12).

- La **regione di controllo trascrizionale** (TCR region) di circa 400 bp, non codificante, è posta tra la regione precoce e quella tardiva, e svolge un importante ruolo nel controllo della regolazione della sintesi e della replicazione virale. Contiene le **origini di replicazione (ORI)** e gli elementi di **promoter/enhancer** di entrambe le regioni codificanti, permettendo la trascrizione dei geni precoci su uno dei filamenti in una direzione, e quella dei geni tardivi sul filamento complementare in direzione opposta (13). All'interno di questa regione sono anche presenti siti di legame per diversi fattori trascrizionali, tra i quali i più importanti sono: **Sp1** proteina endogena dell'ospite coinvolta nel differenziamento cellulare, il cui ruolo principale sembra essere quello di mantenere libere da metilazione le isole CpG mantenendo così attiva la trascrizione; **Nuclear factor 1 (NF1)** proteina dell'ospite che media le reazioni infiammatorie ed immunologiche in risposta a vari stimoli, mutazioni a questo livello sembrano interferire con la trascrizione dei geni tardivi; **TAg** proteina di origine virale che agisce attraverso un meccanismo di controllo negativo, infatti inibisce l'attività del promotore precoce; **Purα** proteina che controlla la replicazione e la trascrizione del DNA, in particolare promuove la trascrizione dei geni precoci e viene inibita da TAg (14). La regione TCR, a differenza di quelle precedenti, è caratterizzata da una ipervariabilità mutazionale dovuta a inserzioni di singoli o molteplici nucleotidi, duplicazioni o delezioni. In contrasto con quanto appena detto sono state trovate un limitato numero di sequenze di TCR altamente conservate definite **archetipi**; queste sequenze rappresentano i genotipi dei PVs realmente circolanti nella popolazione umana e derivano dalla co-evoluzione con l'ospite (prova di ciò ne è il fatto che è possibile usare JCV come marker per ricostruire le migrazioni umane). L'ipotesi è che dalle sequenze archetipo presenti in un individuo si originano le sequenze ricombinanti a causa ipervariabilità della regione, allo scopo di adattarsi alle condizioni presenti nell'ospite modificando il tropismo cellulare, il potere infettivo, l'aggressività e l'abilità replicativa virale (15). Infatti la regione regolatoria sembra controllare la trascrizione cellulo-specifica del DNA virale come è stato osservato negli studi di Sock et al. (16) dove è emerso che la TCR di JCV aumenta notevolmente la trascrizione nelle cellule gliali in coltura in confronto alle cellule non gliali; inoltre, in altri studi è stato osservato che le sequenze riarrangiate mostrano un'attività differente da quelle archetipo, che può essere sia più alta sia più bassa (17). Allo scopo di

classificare più agevolmente i genotipi di JCV, *Ault* e *Stoner* (18) divisero arbitrariamente la sequenza archetipo individuata da *Yogo et al.*(19), definita Mad1, in cinque blocchi definiti **A**(25bp), **B**(23bp), **C**(55bp), **D**(66bp), **E** (18bp) e **F**(69bp) in base alle sequenze che mancavano o duplicavano se confrontate con altri archetipi .

Analogamente anche la regione TCR di BKV fu divisa in cinque blocchi di sequenza definiti da *Yoshiike e Takemoto* (20) **O**(124bp), **P**(68bp), **Q**(39bp), **R**(63bp) ed **S**(63bp), basandosi su una sequenza archetipo (BKV-WW) .

I PVs umani sono virus ubiquitari; infatti circa il 60-80% degli adulti possiede anticorpi della classe IgG diretti contro BKV e JCV (21). Si ritiene che l'infezione primaria avvenga durante l'infanzia e decorra in forma asintomatica od oligosintomatica (blande infezioni a livello respiratorio con disturbi per lo più simil-influenzali), autolimitante. Successivamente il virus rimane latente riattivandosi in seguito a immunodepressione, soprattutto se dovuta ad un deficit di linfociti T.

La patogenesi dell'infezione da PVs non è stata ancora definitivamente chiarita. L'ipotesi più probabile prevede una trasmissione per via aerea (22), la successiva moltiplicazione a livello dell'apparato respiratorio con conseguente viremia transitoria. Per via ematogena, veicolato dai linfociti T, il virus raggiunge vari siti di latenza attualmente identificati in oligodendrociti del sistema nervoso centrale, cellule tubulari renali, urotelio (21), tessuto stromale tonsillare , linfociti B e loro precursori (22).

I virus aderiscono alla membrana citoplasmatica della cellula ospite tramite la proteina capsidica VP1 (23), vengono internalizzati mediante vescicole endocitotiche e quindi trasportati al nucleo dove, previa fusione delle vescicole alla membrana nucleare, sono liberati nelle cisterne perinucleari (vedi **figura 3**). La sintesi del DNA virale necessita dei prodotti trascritti nella fase precoce, in particolare del TAg, che funziona da attivatore trascrizionale ed è richiesto per il completamento del ciclo replicativo del virus e per iniziare la trascrizione dei geni tardivi. In particolare, una volta privato di rivestimento capsidico, il virus inizia la trascrizione degli RNA messaggeri della regione precoce ad opera della RNA polimerasi dell'ospite; i trascritti vengono tradotti nel citoplasma. La trascrizione della regione tardiva consente la produzione delle proteine che entreranno a far parte del capsido ed assumeranno pertanto il ruolo di determinanti antigenici. Le particelle virali, una volta assemblate nel nucleo, liseranno la cellula ospite acquisendo la capacità di iniziare un nuovo ciclo infettivo.

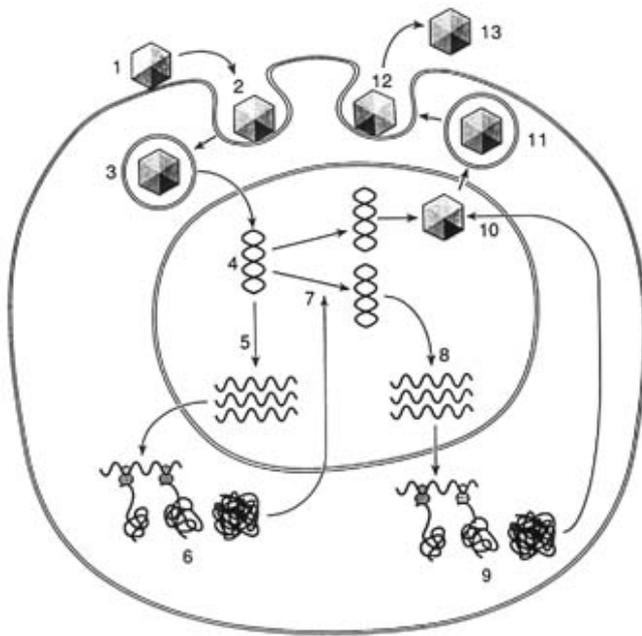


Figura 3: ciclo replicativo dei PVs. FASE 1 Il virus interagisce con i recettori di membrana della cellula ospite; FASE 2 in seguito all'interazione tra il virus e il recettore di membrana inizia il processo endocitico con cui il virus penetra nella cellula ospite; FASE 3 il virus ormai all'interno della cellula si dirige verso il nucleo; FASE 4 il virus interagisce con i fattori trascrizionali endogeni per poter iniziare la fase di trascrizione genica; FASE 5 l'mRNA virale prodotto migra nel citosol; FASE 6 le proteine virali generate nel citosol tornano nel nucleo della cellula ospite; FASE 7 nel nucleo le proteine virali possono o far partire un nuova fase replicativa del genoma virale (FASE 8 e 9) oppure riassemblarsi intorno alla molecola di dsDNA virale per generare nuovi virioni (FASE 10), che attraverso la via esocitica vengono liberati nell'ambiente esterno (FASE 11,12 e 13).

L'infezione della cellula può essere di due tipi:

- Infezione **produttiva o litica** nelle cellule permissive, con formazione di particelle virali complete a cui consegue la morte cellulare e la liberazione di particelle virali infettanti.
- Infezione **abortiva o non produttiva** nelle cellule non permissive: si suppone che Tag si leghi a proteine cellulari, come quelle prodotte dai geni onco-soppressori quali p53 e pRB (24) che vengono inattivate. Solitamente questo effetto si manifesta per pochi giorni, dopodichè il genoma virale viene rilasciato dalla cellula che ritorna a possedere le caratteristiche normali.

A volte il genoma virale può integrarsi in modo casuale nel DNA della cellula ospite che assume caratteri trasformati. Tale processo sembra essere coinvolto nell'insorgenza delle neoplasie. L'integrazione del genoma virale potrebbe inoltre provocare la comparsa sulla superficie cellulare di antigeni virali, riconosciuti dal sistema immunitario con conseguente danno cellulare immunomediato (per reazione crociata) ed essere quindi causa di malattie autoimmunitarie (sclerosi multipla, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide).

Come già accennato l'infezione primaria può decorrere in forma asintomatica o esordire con lieve sintomatologia delle prime vie aeree. Generalmente negli individui immunocompetenti BKV e JCV non causano quadri clinici di significato patologico ed una riattivazione virale si può

occasionalmente riscontrare, mediante citologia urinaria, durante la gravidanza, negli anziani, nei pazienti affetti da neoplasie e trattati con chemioterapia, nei diabetici, nei soggetti dializzati (25).

Le manifestazioni cliniche da PVs si riscontrano prevalentemente nei pazienti affetti da deficit dell'immunità cellulo-mediata, in particolare a carico dei linfociti T, come avviene in corso di AIDS (26,27), di trapianto allogenico di midollo osseo (28) e di trapianto renale (29).

Allo stato attuale delle conoscenze possiamo affermare che JCV sia sicuramente l'agente eziologico della PML (30), mentre BKV è attualmente riconosciuto come agente eziologico delle cistiti emorragiche in pazienti riceventi trapianto di midollo osseo eterologo (31) e della cosiddetta nefropatia da PVs che colpisce una piccola percentuale di pazienti portatori di trapianto renale.

Nonostante il largo numero di studi effettuati, specie recentemente, sussistono ancora alcuni dubbi su vari aspetti della storia naturale dell'infezione virale, sulle modalità di trasmissione dell'infezione e infine su siti di latenza virale –oltre a quelli già noti del sistema nervoso centrale e dell'apparato uropoietico.

Per quanto riguarda le possibili vie di trasmissione sono state fatte varie ipotesi:

- **Trasmissione per via aerea:** dato che l'infezione primaria dei PVs sembra avvenire a livello delle vie respiratorie superiori, si ipotizza che individui infettati in forma asintomatica possano rilasciare nell'ambiente le particelle virali tramite fini gocce di aerosol, oppure tramite gocce di saliva. A conferma di questa ipotesi sono stati riportati casi in cui sono stati isolati i virus partendo da lavaggi e spazzolati provenienti della gola di individui immunocompromessi (32), e soprattutto nel tessuto tonsillare di bambini con ricorrenti patologie respiratorie (33). Si deve però aggiungere che, nonostante sia stato individuato il DNA virale, non è stato possibile dimostrare l'infettività dei virus isolati transfettandoli in linee cellulari suscettibili.
- **Trasmissione urinaria:** è noto da studi effettuati su campioni autoptici e chirurgici che rene e vie escrettrici urinarie rappresentano importanti siti di latenza di JCV e BKV e alcuni studi rilevano un aumento della viruria di BKV e JCV in condizioni di deficit immunologici transitori o persistenti (34,35). E' stato perciò ipotizzato che una delle vie con cui le particelle virali vengano propagate e trasmesse da individuo ad individuo sia tramite la loro escrezione nelle urine (36).
- **Trasmissione oro-fecale:** alcuni studi hanno messo in evidenza la possibilità che i PVs possano utilizzare come sito d'entrata il tratto gastrointestinale tramite l'ingestione di cibi e acqua contaminati. Questa ipotesi viene supportata dal ritrovamento dei genomi virali in tessuti provenienti dall'apparato gastrointestinale (32). Inoltre è stato recentemente riportato che è stato

possibile individuare DNA di BKV analizzando il materiale proveniente dai rifiuti urbani in concentrazioni relativamente elevate (10^1 - 10^3 particelle virali per 4 ml di rifiuti)(37).

- **Trasmissione tramite organo trapiantato:** costituisce una possibile via di trasmissione nell'eventualità in cui si trapianti un organo di latenza per i PVs, come per esempio il rene, da un individuo sieropositivo ad uno sieronegativo (38).
- **Trasmissione trans-placentale.** Questa modalità di trasmissione è stata proposta da alcuni autori, sia sulla base di osservazioni epidemiologiche che evidenziavano presenza di IgG anti JCV e BKV nel sangue di soggetti in età pediatrica e nel sangue di cordone ombelicale in neonati sani (39), sia sulla base di studi sperimentali effettuati sulla possibilità di trasmissione trans-placentale di un analogo Polyomavirus nel topo (*Murine Polyoma virus* (MuPyV) (40) dimostranti il passaggio di virioni attraverso il cordone ombelicale durante l'infezione virale acuta. Tale ipotesi è inoltre supportata dall'osservazione che durante la gravidanza, verosimilmente in seguito a mutate condizioni immunologiche ed ormonali, si evidenzia con discreta frequenza una riattivazione dell'infezione da PVs (41). Ciò è dimostrato dalla escrezione urinaria delle cosiddette decoy cells, cellule uroteliali con tipiche inclusioni intranucleari, espressione morfologica di proliferazione virale. Altri autori tuttavia, basandosi sull'utilizzo di metodiche molecolari, non sono riusciti a dimostrare con certezza la possibilità di una significativa trasmissione trans-placentale dell'infezione (42,43), pertanto tale modalità di trasmissione è tuttora controversa.

SCOPO DEL LAVORO

Al fine di valutare la possibile trasmissione materno-fetale dell'infezione da Polyomavirus umani e di SV40 abbiamo condotto uno studio su campioni di sangue e di urine in una popolazione non selezionata di donne gravide, tutte con gravidanza fisiologica, e dei loro neonati, utilizzando metodiche di diagnostica molecolare (nested-PCR) per la ricerca di genoma virale.

Gli isolati virali inoltre sono stati sottoposti ad analisi di sequenza della regione di controllo trascrizionale allo scopo di valutare eventuali riarrangiamenti genomici ed il loro significato in relazione alla trasmissione materno-fetale dell'infezione.

MATERIALI E METODI

Raccolta campioni

Lo studio è stato condotto su 300 donne gravide, non selezionate, di età compresa tra 17 e 44 anni (età media 31.77 anni, mediana 32 anni), afferenti alla I Divisione di Ginecologia e Ostetricia dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara, consecutivamente arruolate tra Febbraio e

Settembre 2005. In tutti i casi sono stati raccolti i campioni di urina e di sangue periferico durante i controlli clinici e di laboratorio di *routine* alla 37° settimana di gestazione.

Per quanto riguarda il gruppo dei relativi neonati, sono stati analizzati i campioni di sangue provenienti dal cordone ombelicale, raccolti durante il parto e conservati presso il Servizio Trasfusionale dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara.

Campioni di urina

I campioni di urina sono stati centrifugati a 2500 giri per minuto (rpm) per 10 minuti in modo da poter concentrare le cellule presenti nel campione, che altrimenti risulterebbero troppo diluite per la ricerca dei PVs, senza che vadano incontro a rottura; parte del sedimento cellulare è stato raccolto in una provetta da 1,5 mL e conservato a -80°C per la ricerca di genoma virale tramite saggio PCR, mentre la restante parte del sedimento è stata utilizzata per l'analisi citologica. Il sedimento cellulare, da sottoporre ad analisi citologica, è stato ulteriormente centrifugato a 1,800 giri per minuto per 10 minuti mediante Cytospin, fino a formare due pozzetti su di un vetrino. Successivamente il vetrino è stato fissato con cytospray e colorato con metodica di Papanicolau. I campioni di urina così preparati sono stati sottoposti ad analisi citologica allo scopo di identificare la presenza di decoy cells, indicative di replicazione attiva dei PVs. Brevemente, si tratta di cellule epiteliali con nuclei ingranditi, a profilo tondeggianti, con inclusioni intranucleari, che all'indagine ultrastrutturale risultano costituite da numerosissime particelle virali complete (44).

Campioni di sangue

I campioni di sangue (sia provenienti dalle gravide, sia dai neonati) sono stati raccolti e conservati a -80°C . Da essi è stato estratto DNA a partire da 300 μl di sangue intero trattato con EDTA utilizzando il kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Italia) e risospeso in volume finale di 100 μl . Tutti i campioni di DNA sono stati sottoposti ad analisi spettrofotometrica utilizzando lo strumento DU®530 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) e diluiti ad una concentrazione di [10 ng/ μL] prima di essere testati in nested-PCR (nPCR) multiplex, questo per ridurre al minimo la formazione di prodotti aspecifici durante la reazione di PCR, essendo questo un problema frequente quando si lavora partendo da DNA estratto da sangue intero.

Saggi in PCR

Su DNA estratto dal sangue periferico delle gravide e dal cordone ombelicale dei neonati e direttamente sui campioni di urina (senza previa estrazione di DNA come proposto da Agostini et al. (45)), è stata eseguita una nPCR multiplex, allo scopo di amplificare la regione LT di PVs utilizzando i seguenti primers:

- PM1+ e PM1- primers esterni che amplificano un frammento di DNA *comune* a tutti i PVs (lunghezza del frammento amplificato: 550 bp).
- PM2- primer interno comune a tutti i PVs seguito da: a) JC+ amplifica un frammento di 189 bp specifico per JCV; b) BK+ amplifica un frammento di 353 bp, specifico per BKV e c) e SV40+ amplifica un frammento di 135 bp specifico per SV40; tutti aggiunti contemporaneamente nella stessa reazione. (46)

L'amplificazione è stata condotta in un volume totale di 25 μ L contenenti 2U Biotaq DNA polimerase (Bioline, London, U.K.), in presenza di tampone NH_4 Bioline 1x, MgCl_2 2mM (1mM nella reazione interna), 0,2 mM di dNTPs, [5pmol/ μ L] di ciascun primer (Roche Diagnostics, Milano, Italia). La quantità di campione aggiunto alla miscela di reazione varia a seconda della tipologia di materiale da testare: nel caso delle urine vengono aggiunti 2,5 μ L, mentre nel caso dei campioni di sangue vengono eseguite due reazioni a concentrazioni differenti (10 μ L e 7,5 μ L) tenendo conto che il DNA virale contenuto può essere a bassa carica. Nella reazione interna, invece, viene aggiunto 1 μ L di amplificato proveniente dalla miscela di reazione esterna.

I campioni sono stati amplificati utilizzando un termociclatore Progene Techno PCR system attraverso il seguente programma:

- Denaturazione a 95°C per 5 min;
- 40 cicli (35 nell'interna) costituiti da: $\left\{ \begin{array}{l} \text{denaturazione a } 95^\circ\text{C per } 40\text{s;} \\ \text{annealing a } 61^\circ\text{C (} 55^\circ\text{C per l'interna) per } 40\text{s;} \\ \text{estensione a } 72^\circ\text{C per } 40\text{s;} \end{array} \right.$
- Estensione finale a 72°C per 5 min.

Come controllo negativo è stata utilizzata dell'acqua DEPC-treated e RNAsi-free (Biotacx Labs, Houston, USA), mentre come controlli positivi sono stati usati campioni di DNA estratti da tessuto cerebrale di soggetto affetto PML, istologicamente dimostrata (per JCV), da tessuto renale di un soggetto con nefropatia da BKV istologicamente dimostrata (per BKV) e

linee cellulari infettate con SV-40 (per SV-40). Data, però, l'esigua quantità di DNA utilizzato nelle condizioni di PCR adottate nel nostro lavoro è stato necessario realizzare una curva di sensibilità per saggiare i limiti del protocollo appena descritto. Per realizzare tale curva sono state testate diluizioni a scalare di un campione di DNA estratto da sangue intero, positivo per JC virus, la cui concentrazione di partenza è di [128 ng/μL]. Le diluizioni sono state testate in doppio, è stato possibile amplificare il campione fino alla soglia di [0.5 ng/μL].

Sui campioni risultati positivi con nPCR multiplex per la regione LT, è stata eseguita reazione di amplificazione mediante nPCR per la regione TCR dei PVs. Sui campioni positivi per la regione LT di BKV, sono stati utilizzati come primers esterni BKTT1 e BKTT2, e come primers interni BRP1 e BRP2 (amplificano un frammento di 356 bp nell'archetipo). L'amplificazione avviene in un volume totale di 25 μL contenente: tampone NH₄ Bioline 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, [10 pmol/μL] di ciascun primer, 2U Biotaq DNA polimerase. Per la reazione esterna vengono aggiunti alla miscela di reazione 5μL di urina o di DNA estratto da sangue, mentre per la reazione interna vengono aggiunti 2,5μL di template.

I campioni sono stati amplificati utilizzando un termociclatore Progene Techno PCR system attraverso il seguente programma:

- denaturazione a 95°C per 5 min;
- 35 cicli costituiti da: $\left\{ \begin{array}{l} \text{denaturazione a } 95^{\circ}\text{C per } 40\text{s;} \\ \text{annealing a } 55^{\circ}\text{C (} 50^{\circ}\text{C per l'interna) per } 40\text{s;} \\ \text{estensione a } 72^{\circ}\text{C per } 40\text{s;} \end{array} \right.$
- estensione finale a 72°C per 5 min.

Sui campioni positivi per la regione LT di JCV, sono stati utilizzati come primer esterni JRE1 e LP2, e come interni RFOR e RREV (amplificano un frammento di 358 bp nell'archetipo). L'amplificazione avviene in un volume totale di 25 μL contenente: buffer NH₄ Bioline 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, [10 pmol/μL] di ciascun primer, 2U Biotaq DNA polimerase. Per la reazione esterna vengono aggiunti alla miscela di reazione 5μL di urina o di DNA estratto da sangue, mentre per la reazione interna vengono aggiunti 2,5μL di template.

I campioni sono stati amplificati utilizzando un termociclatore Progene Techno PCR system attraverso il seguente programma:

- denaturazione a 95°C per 5 min;
- 35 cicli costituiti da:
 - denaturazione a 95°C per 40s;
 - annealing a 55°C (50°C per l'interna) per 40s;
 - estensione a 72°C per 40s;
- estensione finale a 72°C per 5 min.

Tutti i prodotti di amplificazione sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 2% e visualizzati tramite bromuro di etidio.

Sequenziamento diretto del DNA

I frammenti di DNA di tutti i campioni positivi alla TCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 3%; 1-3 frammenti per ogni campione (con dimensione compresa tra 300 e 400 bp) sono state prelevati dal gel, estratti e purificati utilizzando il kit commerciale NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germania).

La reazione PCR di sequenziamento ciclico viene allestita utilizzando il Big Dye Version 2.0 Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystem, Monza, Italia), a cui si aggiungono, in un volume totale di 20 µL, 8 µL di campione e 1 µL di uno dei primers della reazione interna per l'amplificazione della TCR, utilizzato però alla concentrazione di [3,2 pmol/µL]. Per sequenziare BKV viene aggiunto nella reazione il primer BRP1 (forward), mentre per sequenziare JCV viene utilizzato RFOR (forward). Per la reazione di sequenza viene utilizzato un termociclatore Progene Techno PCR system e le seguenti condizioni:

- 25 cicli costituiti da:
 - 10s a 96°C;
 - 5s a 50°C;
 - 4s a 60°C;
- terminazione a 4°C.

I prodotti di sequenziamento sono stati purificati utilizzando le Centri-sep Spin Columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA), e il DNA è stato sequenziato utilizzando un sequenziatore automatico a 16 capillari (ABI-Prism 3100, Applied Biosystem, Monza, Italia).

Le sequenze così ottenute sono state analizzate tramite il programma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) presente sul sito web del National Centre for Biotechnology Information of the United States (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se nella sequenza vengono rilevate variazioni nucleotidiche rispetto alle sequenze archetipo, vengono confermate utilizzando i rispettivi primer reverse BRP2 per BKV e RREV per JCV.

RISULTATI

ESAME CITOLOGICO DELLE URINE

Nonostante un'attenta ricerca, solo in un campione di urina (1/300) è stato possibile identificare rare ed isolate decoy cells. Tali cellule presentavano tipico nucleo rotondeggiante, con aspetto "a vetro smerigliato"(44) in assenza di flogosi (vedi **figura 4**).

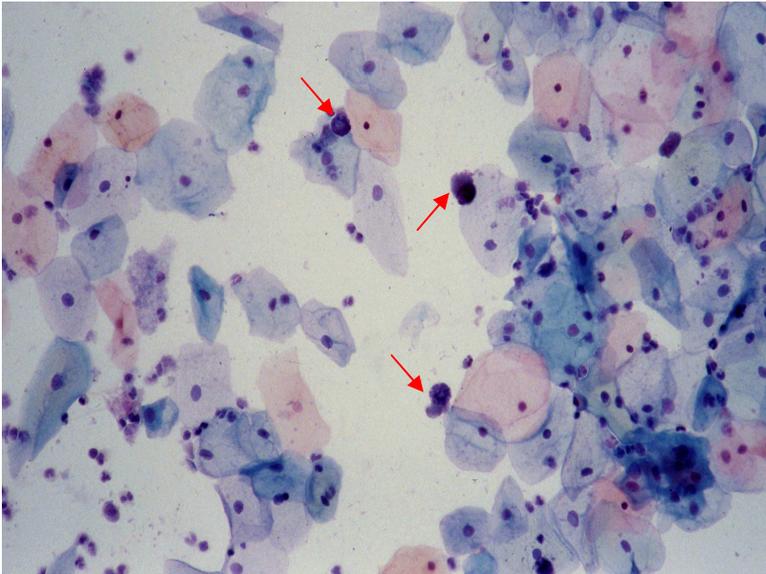


Figura 4: Esame citologico delle urine: si evidenziano (frecce) rarissime decoy cells identificabili dalla presenza di nuclei perfettamente rotondi, con cromatina "a vetro smerigliato", frammiste a numerose cellule vaginali contaminanti. Colorazione di Papanicolau, ingrandimento originale 250X

BIOLOGIA MOLECOLARE

AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE LT

La regione LT dei PVs è stata amplificata in 80 campioni di urina (80/300; 26%) e in 17 campioni di sangue (17/300; 5.5%) provenienti dalle madri. In particolare, nei campioni di urina sono stati identificati: 49 JCV (61.3%), 28 BKV (35%) e 3 co-infezioni JCV-BKV (3.7%), mentre nei campioni di sangue sono stati identificati: 7 JCV (41.2%) e 10 BKV (58.8%) (vedi **tabella 1**). Solo in 3 casi (2 JCV e 1 BKV) DNA virale è stato identificato in campioni di urina e sangue appartenenti allo stesso soggetto (vedi **tabella 1**). Il campione di urina in cui erano presenti decoy cells, è risultato positivo per DNA di BKV.

Nessuno dei campioni di sangue provenienti dai cordoni ombelicali dei neonati è risultato positivo per DNA dei PVs.

In nessun caso è stato identificato genoma virale di SV40.

	BKV	JCV	BKV/JCV	totale campioni positivi
campioni positivi nell'urina	28	49	3	80
campioni positivi nel sangue	10	7	0	17
totale dei campioni positivi	38	56	3	97
Campioni positivi nelle urine e nel sangue dello stesso paziente	1	2	0	3

Tabella 1: Campioni risultati positivi per la ricerca del genoma dei PVs e relativa genotipizzazione tramite nPCR multiplex. In tabella sono mostrati i numeri di campioni positivi solo per BKV (colonna +BKV), positivi solo per JCV (colonna +JCV), campioni co-infetti per BKV e JCV (colonna+BKV/JCV) relativi ai campioni urinari, ai campioni di sangue intero. Nell'ultima riga invece è stato riportato il numero di campioni che sono risultati positivi, per i diversi genotipi, sia nelle urine che nel sangue appartenenti allo stesso individuo.

AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE TCR

La regione TCR dei PVs è stata amplificata in tutti i campioni positivi per la regione LT, sia nei campioni di urina (80/80) sia nei campioni di sangue (17/17), e tutti i frammenti di DNA isolati in un range di 300-400 bp sono stati sottoposti ad analisi di sequenza.

ANALISI DI SEQUENZA DELLA REGIONE TCR

Le sequenze nucleotidiche identificate sono state valutate comparando la regione TCR di ciascun genotipo di BKV e JCV con le sequenze "consenso" o archetipo, proposte rispettivamente da Yoshiike e Takemoto (20), e Yogo et al (19), che prevedono una suddivisione schematica nei seguenti blocchi di sequenze: per BKV **O**(124bp), **P**(68bp), **Q**(39bp), **R**(63bp) ed **S**(63bp); mentre per JCV i blocchi sono: **A**(25bp), **B**(23bp), **C**(55bp), **D**(66bp), **E** (18bp) e **F**(69bp).

Campioni di urina

L'analisi di sequenza ha consentito di identificare 4 genotipi diversi di **BKV** (numero totale 28): BKV-WW (14 campioni), BKV-WWT (9 campioni), BKV-AS (3 campioni) e BKV-128 (2 campioni) (47). Tutti i genotipi identificati di BKV-WWT e BKV-AS, e 5 di 14 BKV-WW mostravano sequenza archetipa. Al contrario nei 2 casi di BKV-128 sono state osservate

sostituzioni di singoli nucleotidi (SNPs) G→T nel blocco S e in 9 di 14 casi di BKV-WW si è identificata costantemente sostituzione C→T nel blocco P.

Per quanto riguarda **JCV**, tutti i casi isolati appartengono al genotipo CY (49/49); 37 casi sono risultati archetipi, mentre in 11 casi si sono evidenziate sostituzioni di singoli nucleotidi, delezioni o inserzioni. Solo in un caso abbiamo riscontrato un riarrangiamento della sequenza archetipa (ripetizione di 13 bp nel blocco D)(vedi **figura 5 e 6**).

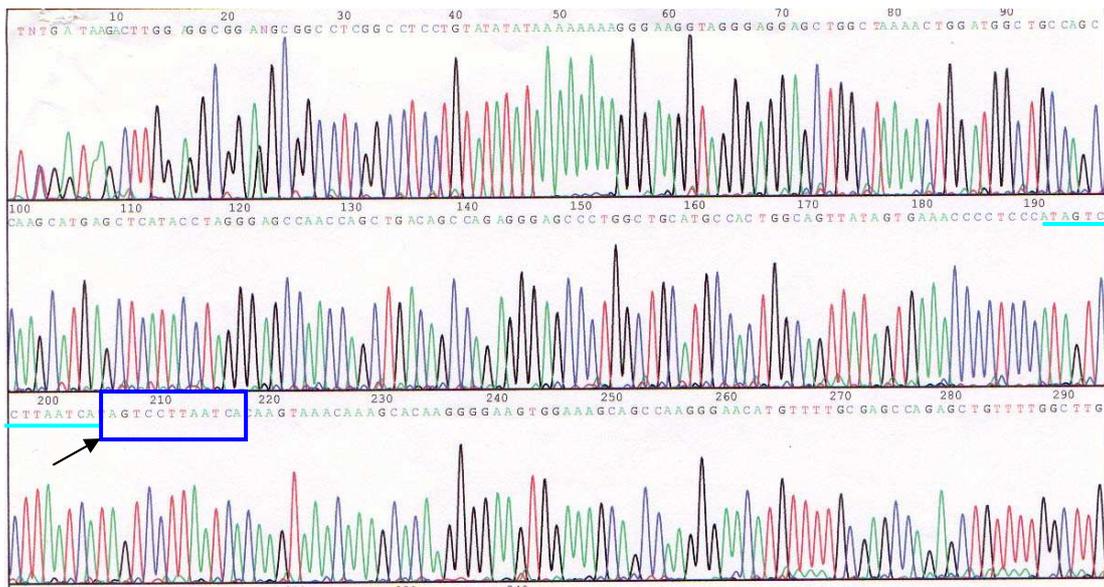


Figura 5: Elettroferogramma della regione regolatoria del ceppo JCV CY riarrangiato isolato partendo da un campione urinario. In azzurro sono state sottolineati i nucleotidi presenti nell’archetipo, in blu sono stati evidenziati il blocco ripetuto. Sull’asse delle ascisse si trova il tempo espresso in minuti, mentre su quello delle ordinate l’intensità di fluorescenza espressa in nanometri (nm). I residui di: adenina (A) sono mostrati in verde, citosina (C) in blu, guanina (G) in nero e timina (T) in rosso.

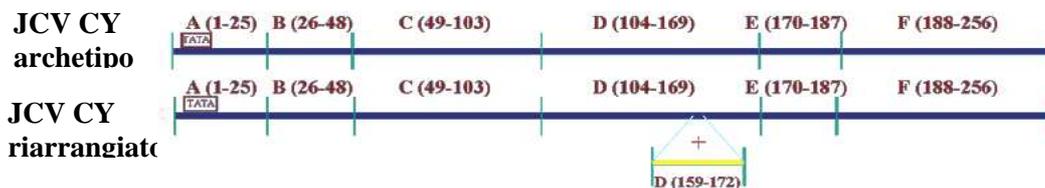


Figura 3: Confronto tra lo schema dell’anatomia a blocchi dell’archetipo JCV CY e il frammento riarrangiato isolato partendo da DNA estratto da sangue intero.

L’analisi di sequenza dei 3 casi co-infetti ha permesso di identificare JCV-CY (3casi), BKV-WW (2 casi) e BKV-WWT (1 caso). Nei frammenti isolati sono state identificate solo mutazioni di singoli nucleotidi.

Campioni di sangue

L'analisi di sequenza della regione TCR nei campioni di sangue è stata possibile in 14 di 17 casi, mentre, nonostante numerosi tentativi, è fallita in 3 campioni (2 BKV e 1 JCV) probabilmente a causa di bassi livelli di viremia (48).

L'analisi di sequenza della TCR di BKV ha rivelato, in tutti i casi (8), un'inserzione di 20 bp di genoma virale, corrispondenti al blocco P₍₄₂₋₆₁₎, 5 casi nel cromosoma umano 20 (BLAST: Human DNA sequence from clone RP11-112L6 on chromosome 20 of Homo Sapiens), tra i geni CEBPB (20q13.1) e Kua-UEV (20q13.2) e 3 casi nel cromosoma 14 (BLAST: Human DNA sequence BAC R-182E21 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo Sapiens) all'interno del gene DPF3 (14q24.3-q31.1) nell'introne tra gli esoni 5 e 6 (vedi **figura 7**)

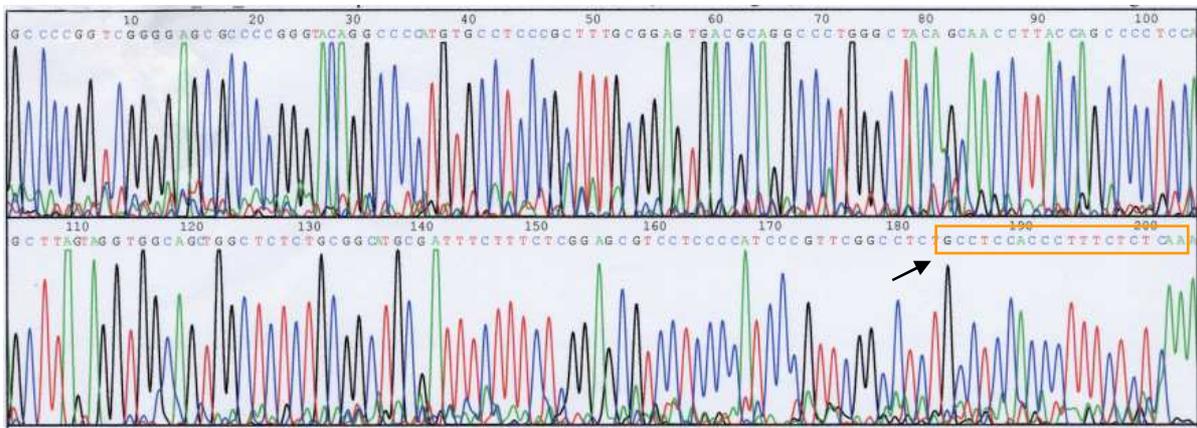


Figura7: Elettroferogramma riguardante l'inserzione di 20bp della regione di controllo di BKV (nel riquadro arancione), all'interno del cromosoma umano 20, in particolare nella regione q13-q14, osservata nei campioni di sangue intero. Sull'asse delle ascisse si trova il tempo espresso in minuti, mentre su quello delle ordinate l'intensità di fluorescenza espressa in nanometri (nm). Sull'asse delle ascisse si trova il tempo espresso in minuti, mentre su quello delle ordinate l'intensità di fluorescenza espressa in nanometri (nm). I residui di: adenina (A) sono mostrati in verde, citosina (C) in blu, guanina (G) in nero e timina (T) in rosso.

Tutti i JCV isolati partendo dai campioni di sangue appartengono al genotipo CY, 4 sono archetipi, mentre i restanti 2 casi mostrano sostituzioni, inserzioni e delezioni di singoli nucleotidi in differenti blocchi di sequenza.

DISCUSSIONE

L'identificazione e la corretta classificazione dei Polyomavirus (PVs) umani JCV e BKV costituisce un evento relativamente recente: nel 1971 Gardner et al. (3) ed Padgett et al.(4) identificarono, in modo del tutto indipendente, la presenza di particelle virali di BK virus e JC virus, rispettivamente, nelle urine e nel tessuto cerebrale di due soggetti immunodepressi; l'uno a seguito di trapianto renale con lo sviluppo nel periodo post-operatorio di una stenosi ureterale; l'altro con

una insolita malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale (Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML)) insorta in seguito a terapie immunosoppressive per il morbo di Hodgkin. Da allora il ruolo di questi due virus nella patologia umana è stato estensivamente investigato e i principali aspetti patogenetici, epidemiologici, anatomopatologici e clinici delle due principali patologie ad essi correlate – nefropatia da BK Virus e Leucoencefalopatia Progressiva Multifocale – sono stati adeguatamente chiariti.

Ciò nonostante rimangono oscuri o non sufficientemente dimostrabili altri aspetti in relazione alla storia naturale dell'infezione, ai siti di latenza e soprattutto ai meccanismi più frequenti di trasmissione virale interumana.

Per quanto riguarda questi ultimi, non è ancora chiara la principale modalità di trasmissione virale, anche se l'estrema diffusione dell'infezione farebbe propendere per una trasmissione aerea o, in alternativa, oro-fecale. Studi epidemiologici indicano che circa l'80% della popolazione adulta, sana è stata infettata da JCV e/o BK Virus, come dimostrato dalla presenza di IgG anti-JCV e/o BKV; questa percentuale di sierconversione è più bassa quando si analizza una popolazione infantile o adolescenziale. Studi epidemiologici effettuati su neonati hanno mostrato la presenza di IgG anti-JCV e/o BKV, stando ad indicare che l'infezione può essere molto precoce o, ipoteticamente intrauterina; alcuni autori hanno esaminato quest'ultima possibilità, ovvero, come per altri virus quali CMV, HSV, la possibilità di un passaggio trans-placentale di genoma virale, con risultati ampiamente discordanti (12).

In questo studio abbiamo valutato la possibilità di una trasmissione verticale dell'infezione da PVs umani e di SV-40 in una popolazione non selezionata di gravide, con gravidanza fisiologica, analizzando mediante tecniche molecolari la presenza di genoma virale nelle urine, nel sangue materno, in quello fetale corrispondente prelevato dal cordone ombelicale dopo il parto. Inoltre le urine materne sono state analizzate citologicamente per la identificazione delle decoy cells, espressione morfologica di attività replicativa virale intranucleare.

Questo studio rappresenta la prima investigazione sistematica della infezione da PVs eseguito durante la gravidanza; la limitazione di questo studio -di carattere osservazionale- è consistita nella possibilità di valutare solo la fase terminale della gravidanza, periodo nel quale le partorienti effettuano controlli di routine, mentre le fasi precedenti non sono state investigabili sistematicamente.

I risultati del nostro studio indicano la presenza di genoma virale di PVs del 26% dei campioni urinari e nel 5.5% dei campioni di sangue materno, mentre in nessun caso è stato identificato nei campioni di sangue fetale; inoltre decoy cells sono state identificate in un unico

campione di urine. L'analisi di questi dati indica che nella popolazione da noi studiata non si è avuta evidenza di una trasmissione materno-fetale della infezione.

Come già precedentemente espresso, poiché non esistono in letteratura altri studi pubblicati utilizzando metodiche di indagine di biologia molecolare ma solo di tecniche di carattere immunologico, i nostri risultati non sono facilmente comparabili con quelli di altri autori. Lo studio di Taguchi et al.(39), eseguito su 80 gravide, mostrò la presenza di IgM anti-BKV nel sangue materno in 6 casi, e in 3 campioni di sangue di cordone ombelicale dei loro neonati. Rziha et al. (49) esaminarono 846 campioni di sangue di altrettanti neonati sani mediante immunofluorescenza indiretta per la ricerca di IgM anti-BKV, identificando 77 campioni positivi (7%), suggerendo l'ipotesi di una discreta frequenza di infezione trans-placentale di BKV. Tali risultati sono stati successivamente contestati da Shah et al.(50) come largamente non specifici. Gibson et al.(41) esaminando 430 donne gravide identificarono presenza di decoy cells in 40 casi, 10 dei quali mostravano IgM anti-BKV o JCV, ma in nessun caso anticorpi specifici furono identificati nei campioni di sangue di cordone ombelicale dei loro neonati.

Più recentemente Pietropaolo et al (51) hanno effettuato uno studio con tecniche molecolari di identificazione di genoma virale su tessuti placentari e su organi fetali prelevati da materiali abortivi. In questo studio, eseguito su 15 aborti, gli autori hanno osservato genoma di BKV nell'80% dei casi di tessuto placentare e nell'80 e 60% rispettivamente di tessuto cerebrale e renale dei corrispondenti feti abortiti. Questa indagine è stata eseguita tramite estrazione di DNA da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina seguita da amplificazione mediante nested-PCR, è perciò possibile che i risultati possano essere stati inficiati da una contaminazione tra i tessuti ed il sangue materno, potenzialmente contenente genoma virale. In questo studio peraltro non sono riportati i dati sulla presenza o assenza di genoma virale nei campioni di sangue periferico delle madri.

Recentemente Zhang et al. (40) in uno studio condotto su femmine gravide di topi sperimentalmente infettati nella cavità peritoneale durante la fase terminale della gravidanza con PVs murino (*Murine Polyoma virus*- MuPyV) hanno dimostrato la presenza di genoma virale nel sangue del cordone ombelicale nell'86% dei topi nati da madri infette. I risultati di questo studio indicano quindi la capacità dell'analogo murino dei Polyomavirus umani di attraversare la barriera placentare, e tuttavia non sono comparabili con quelli esposti nel nostro lavoro sia per le differenze anatomiche tra la placenta umana e quella murina, sia perché nel lavoro di Zhang et al. (40) concentrazioni plasmatiche virali, risultanti dalla somministrazione di elevati titoli virali, sono verosimilmente raggiungibili solo in condizioni di infezione virale acuta. Nel nostro studio non sono state eseguite valutazioni quantitative di viremia e di viruria; tuttavia l'osservazione di decoy cells in un unico campione urinario nonché la presenza di frammenti di TCR integrati in cromosomi

umani in tutti i casi di BKV isolato da campioni di sangue materno, suggerisce che in tutti i casi da noi esaminati i PVs erano presenti in forma latente. Pertanto dalla valutazione dei nostri risultati non è possibile escludere un analogo probabilità di trasmissione materno-fetale in particolari condizioni patologiche o con determinate cariche virali.

Nel nostro studio l'evidenza citologica di escrezione urinaria da PVs è stata osservata in un solo caso di 300 campioni osservati. Questo risultato è in contrasto con quanto riportato da Coleman et al.(43) che hanno evidenziato la presenza di decoy cells in 40 di 1000 campioni urinari raccolti in altrettante gravide (4 %). Tale discrepanza è verosimilmente interpretabile con le differenti modalità di raccolta dei campioni urinari: mentre nel nostro caso tali campioni sono stati raccolti al termine della gravidanza (37° settimana) Coleman et al. (43) hanno eseguito la raccolta di campioni urinari in differenti periodi di gestazione, suggerendo così che la riattivazione e la escrezione dei PVs nelle vie urinarie avvenga in modo intermittente, coincidendo con differenti livelli di immunosoppressione che si possono verificare nel corso di una gravidanza.

L'analisi di sequenza della regione regolatoria di BKV e di JCV isolati sia da sangue periferico sia da urine ha mostrato principalmente forme archetipe, più raramente sostituzioni o delezioni di singole basi nucleotidiche e in solo 2 casi (isolati da campioni urinari) riarrangiamenti significativi. Il significato biologico e soprattutto patogenetico di tali riarrangiamenti non è tuttora noto (19), anche se ipoteticamente duplicazioni di regioni contenenti siti di controllo trascrizionale potrebbero incrementare l'attività replicativa virale e conseguentemente la sua patogenicità. Nella casistica da noi studiata tuttavia non abbiamo rilevato che né sostituzioni di singole basi nucleotidiche né riarrangiamenti abbiano determinato incremento dell'attività replicativa e della infettività: è inoltre da sottolineare che i campioni di sangue di cordone ombelicale provenienti da neonati le cui madri mostravano riarrangiamenti di TCR nei campioni urinari sono risultati negativi alla ricerca di DNA virale.

CONCLUSIONE

Pur nella relativa limitatezza del campione esaminato e soprattutto in relazione alla possibilità di poter condurre tale indagine solo in una fase specifica della gravidanza, i risultati del nostro studio -il primo condotto con nPCR su campioni biologici materno- fetali- indicano che la possibilità di trasmissione materno-fetale di BKV JCV e SV-40 non rappresenta un evento significativamente frequente.

Inoltre la replicazione virale dei PVs umani durante la fase terminale della gravidanza è un evento molto raro ed infine i riarrangiamenti della regione di controllo virale sembrano non incrementare il rischio di trasmissione verticale dell'infezione.

Idealmente a completamento della nostra indagine riteniamo sarebbe opportuno effettuare valutazioni su campioni biologici materni durante varie fasi della gravidanza in modo da osservare, nell'eventualità di una prima infezione o di una riattivazione di una infezione latente da PVs umani, la possibilità che elevate cariche virali plasmatiche possano associarsi ad una reale possibilità di trasmissione verticale.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Regenmortel, M.H.V., Fouquet, C.M. e Bishop, D.H.L. (2000). *Virus Taxonomy: The classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virus Taxonomy, VIIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego
2. Hirsh, H. (2005). *Clinical infectious disease* **41**, 354-360
3. Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., e Hulme, B. (1971). *Lancet*, 1253-1257
4. Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., e Dessel, B.H. (1971). *Lancet*, 1257-1260
5. Richardson E. (1961). *N Engl J Med* **265**, 815-823
6. Ferber, D.(2002). *Science* **296**:1012-1014
7. Bocchetta, M., Di Resta, I., Powers, A., Fresco, R., Tosolini, A., Testa, J.R., Pass, H.I., Rizzo, P., e Carbone, M. (2000). *Proc Natl Acad Sci* **97**:10214-10219
8. Cole, N.C., e Conzen S.D. (2001). In: *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2141-2174
9. Imperiale, M.J. (2000). In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective*. 1st Ed., Wiley-Liss, 53-72
10. Jobes, D.V., Chima S.C., Ryschkewitsch C.F., e Stoner G.L. (1998). *J Gen Virol* **79**: 2491-2498
11. Jin, L., Gibson, P.E., Knowles, W.A., e Clewley J.P. (1993). *J Med Virol* **39**: 50-56
12. Agostini, H.T., Jobes, D.V. e Stoner G.L. (2000) In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective*. 1st Ed., Wiley-Liss, 491-526
13. Major, E.O. (2001) In: *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2175-2196
14. Kim, H.S., Henson J.K., e Frisque R.J. (2000) In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective*. 1st Ed., Wiley-Liss, 73-126
15. Yogo Y, e Sugimoto C. (2000). In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective*. 1st Ed., Wiley-Liss, 128-148.

16. Sock, E., Renner, K., Feist, D., Leger, H., e Wegner, M. (1996). *J Virol* **70**:1512-1520
17. Ault, G.S. (1997). *J Gen Virol* **78**:163-169
18. Ault, G.S., e Stoner, G.L.(1993) *J Gen Virol* **74**:1499-1507
19. Yogo, Y, Kitamura, T, Sugimoto, C, Ueki, T, Aso, Y, Hara K, e Taguchi F. (1990). *J Virol* **64**:3139-3143.
20. Yoshiike K., e Takemoto, K.K. (1986) In: Salzman NP *The Papovaviridae, vol.1, The Polyomaviruses* Plenum Press: NY, 295-326
21. Shah, K.V. (2000). *Nephrol Dial Transplant* **15**: 754-755
22. Monaco, M.C., Atwood, W.J., e Gravel, M. (1996). *J Virol* **70**: 7004-7012
23. Breau, W.C., Atwood, W.J., e Norkin, L.C. (1992). *J Virol* **66**: 2037-2045
- 24 Gordon, J., Krynska B., e Otte, J. (1998) *Dev Biol Stan* **94**:93-101
25. Roploeg, M.D., Storch G.A., e Clifford, D.B. (2001) *Clin Infect Dis* **33**: 191-202
26. Nebuloni, M., Tosoni, A., e Boldorini, R. (1999) *Arch Patol Lab Med* **123**: 807-811
27. Boldorini R, Omodeo-Zorini E, Viganò P. et al.(2000). *Acta Cytol* **44**: 205-210
28. Chan, P.K., Iq, K.W., e Shiu, S.Y. (1994).. *J Infect* **29**:139-146
29. Randhawa, P.S., Filkelstein, V., e Scantlebury, V. (1999) *Transplantation* **67**:103-109
- 30.Greenle, J.E. (1998) *New Eng J Med* **338**: 1378-1380
- 31.Vianelli, N., Renga, N., e Azzi, A. (2000) *Bone marrow transplantation* **25**:319-320
32. Posatti, L., e Bartolotta, E. (1981) *Acta Virol* **25**:254-255
33. Goudsmit, J., Wertheim-Van Dillen, P., e Van Strien, A. (1982). *J Med Virol* **10**: 91-99
34. Boldorini, R., Brustia, M., Veggiani, C., Barco, C., Andorno, S., e Monga G. (2005).*Acta Cytol* **49**: 235-243
35. Arthur, R.R., e Shah, K.V. (1989) *Prog Med Virol* **36**:42-61

36. Brown, P., Tsai, T., e Gajdusek, D.C. (1975). *Am J Epidemiol* **102**:331-340
37. Bofill-Mas, S., Pina, S., e Girones, R. (2000). *Appl Environ Microbiol* **66**:238-245
38. Shah, K.V. (2000) *Nephrol Dial Transplant* **15**:754-755
39. Taguchi, F., Nagaki, D., Saito, M., Haruyama, C., Iwasaki, K., e Suzuki, T. (1975). *Jpn J Microbiol* **19**:395-398
40. Zhang, S., McNees, L., e Butel, J.S. (2005). *J Gen Virol* **86**:2721-2729.
41. Gibson, P.E., Field, A.M., Gardner, S.D., e Coleman, D.V. (1981). *J Clin Pathol* **34**:674-679.
42. Chang, D., Wang, M., Ou, W.C., Lee, M.S., Ho, H.N., e Tsai, R.T. (1996b). *J med Virol* **48**: 95-101
43. Coleman, D.V., Wolfendale, M.R., Daniel, R.A., Dhanjal, N.K., Gardener, S.D., Gibson, P.E., e Field, A.M. (1980). *J Infect Dis* **142**:1-8
44. Koss, L. (1979). 3rd ed. Philadelphia,PA: Lippincott JB, 711-48.
45. Agostini, H.T., Brubaker, G.R., Shao, J., Levin, A., Ryschkewitsch, C.F., Blattner, W.A., e Stoner, G.L. (1995). *Arch. Virol* **140**:1919-1934.
46. Fedele, C.G., Ciardi, M., Delia, S., Echevarria, J.M., e Tenorio, A. (1999) *J Virol Meth* **82**:137-44.
47. Negrini, M., Sabbioni, S., Arthur, R.R., Castagnoli, A., e Barbanti-Brodano, G. (1991). *J Virol* **65**:5092-5.
48. Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sebille, V., Andre-Garnier, E., e Imbert-Marcille, M.(2005). *Am J Transplant* **5**:1926-33.
49. Rziha, H-J., Bornkamm, G.W., e Zur Hausen, H. (1978) BK virus
Med Microbiol Immunol **165**:73-81
50. Shah, K., Daniel, R., Madden, D., e Stagno, S. (1980). *Infect Immun* **30**:29-35.
51. Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A.M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchini, A., Melis, M., e Orsi, N. (1998). *J Med Virol* **56**:372-6.

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

- Corso di statistica medica
- Corso di inglese

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

Seminari:

- SILENZIAMENTO GENICO MEDIANTE ESPRESSIONE DI SHRNA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 10/01/2007
- AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC SCLEROSIS: FROM CLINICAL SUBSET TO PATHOGENETIC, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 12/01/2007
- DETECTION DI MRNA MEDIANTE ANALISI STATISTICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 17/01/2007
- GENETICA E PREVENZIONE DEI TUMORI EREDO-FAMILIARI DI MAMMELLA E OVAIO, Ospedale Maggiore della Carità, Novara, 19/01/2007
- IMAGING MASS SPECTROMETRY, Ospedale Maggiore della Carità, Novara, 24/01/2007
- GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 01/02/2007
- VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 09/02/2007
- THE LONG HAN OF THE SMALL RNAs REACHES INTO SEVERAL LEVELS OF GENE REGULATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 15/02/2007
- PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED SENSITIVITY, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 14/03/2007
- MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI BIOMARCATORI TUMORALI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/03/2007
- DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/03/2007
- RELAZIONE TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ANALISI DEL PROTEIN DATA BASE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 12/04/2007
- PATHOGENIC VIRUSES: SMART MANIPULATORS OF THE INTERFERON SYSTEM, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 19/04/2007
- DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/05/2007
- THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALLING, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 25/05/2007
- TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR SHWACHMAN DIAMOND SYNDROME, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 28/05/2007
- TUMORI GLIALI, Università di Torino, Torino, 01/06/2007

- SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 04/06/2007
- LA GENESI DEI GLIOMI E I SUOI RISVOLTI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 14/06/2007
- BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRS AND FOR THE PRODUCTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 21/06/2007

Congressi:

- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF CANCER, University of Birmingham, Department of Pathology, Division of Cancer Studies, Birmingham (UK), 19/02/2007 – 23/02/2007
- DIAGNOSTICA CITOLOGICA E MOLECOLARE NEL PERCORSO CLINICO DEI PAZIENTI CON CARCINOMA UROTELIALE, Università di Ferrara, Ferrara (IT), 10/05/2007
- PRIMO CONGRESSO INTERNAZIONALE SULLA RICERCA TRASLAZIONALE IN MEDICINA, Villa Contarini, Fondazione Ghirardi, Padova (IT), 10/06/2007 – 12/06/2007
- IV INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYOMAVIRUSES AND HUMAN DISEASES, Bercellona 30/09/2007-03/10/2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) *Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

- Allegrini S., Veggiani C., Amoruso E., Miglio U., Paganotti A., Ribaldone E R, Boldorini R. HUMAN POLYOMAVIRUS INFECTION AND PREGNANCY: INVESTIGATION ON POSSIBLE VERTICAL TRANSMISSION. IV international conference on Polyomaviruses and human diseaseS, Bercellona, 01/10/2007

B) *Altre comunicazioni*

- Boldorini R., Veggiani C., Paganotti A., Allegrini S. Miglio U. SEQUENCE VARIATION IN THE REGULATORY REGION OF BK VIRUS ISOLATED FROM KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENT. Primo congresso internazionale sulla ricerca internazionale. Padova (IT), 12/06/2007
- Miglio U., Allegrini S., Veggiani C., Paganotti A., Boldorini R. SEQUENCE VARIATION IN THE REGULATORY REGION OF HUMAN POLYOMAVIRUSES ISOLATED FROM KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENT. IV international conference on Polyomaviruses and human diseaseS, Bercellona, 02/10/2007
- Boldorini R., Allegrini S., Miglio U., Paganotti A., Veggiani C. FREQUENCY OF POLYOMAVIRUS DETECTION IN SURGICAL SAMPLES OF UNSELECTED HUMAN TUMOURS. IV international conference on Polyomaviruses and human diseaseS, Bercellona, 03/10/2007

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

“*Latent Human Polyomavirus Infection In Pregnancy: Investigation Of Possible Transplacental Transmission*”, Amoruso E., Ribaldone R., Boldorini R., Veggiani C., Allegrini S., Miglio U., Surico N., Monga G. **Pathology**, in stampa.