

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXV

Relazione 1° anno

TITOLO:

**INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS UMANI E CANCEROGENESI
DELLE VIE ESCRETTRICI URINARIE**

Candidato: Ilenia Nestasio

***Tutor:* Prof. Renzo Boldorini**

SEZIONE 1

INTRODUZIONE

I Polyomavirus (PVs) sono virus altamente diffusi nella popolazione mondiale, come dimostra l'elevata percentuale (60-80%) degli adulti che possiedono anticorpi della classe IgG diretti contro i PVs¹. Le modalità attraverso cui i PVs infettano e si trasmettono non sono ancora interamente note: la via di trasmissione principale sembra essere quella respiratoria^{2,3}, anche se sono possibili altre modalità quale quella oro-fecale⁴, urinaria⁵ e trans-placentare^{6,7}. L'infezione primaria avviene prevalentemente durante l'età infantile, dove si sviluppa in forma asintomatica od oligosintomatica (blande infezioni a livello respiratorio con disturbi simil-influenzali). Tuttavia, essi ricoprono un ruolo fondamentale nella patogenesi di alcune importanti patologie che coinvolgono prevalentemente pazienti immunocompromessi²; ciò è dovuto al fatto che il virus rimane in latenza e si riattiva in seguito ad un calo della risposta immunitaria, in particolare se si è in presenza di un rilevante deficit di linfociti T.

Sono noti diversi PVs in grado di infettare su larga scala molte specie tra i mammiferi in modo relativamente specie-specifico tra cui il topo, il criceto, la scimmia e anche l'uomo. Ad oggi sono stati identificati cinque PVs in grado di infettare l'uomo:

- JC virus (JCV), agente eziologico della leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML);
- BK virus (BKV), agente eziologico della nefropatia polyomavirus associata (BKVN);
- KI (Karolinsk Institute) e WU (Washington University), di recente scoperta strettamente collegati tra loro, isolati da escrezioni respiratorie⁸;
- Merkel cell polyomavirus (MCV), isolato un anno fa e descritto come probabile agente eziologico del carcinoma a cellule di Merkel (MCC)⁸.

I 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*⁹.

Tra i PVs che infettano l'uomo, i più studiati sono il Polyomavirus hominis 1 e 2, meglio conosciuti con l'acronimo, rispettivamente, di BKV e JCV, derivante dalle iniziali dei pazienti in cui sono stati isolati per la prima volta nel 1971. BKV fu isolato in un campione di urine di un paziente trapiantato di rene con stenosi ureterale da causa ignota e dove indagini ultrastrutturali rilevarono la presenza di particelle virali icosaedriche, prive di envelope di diametro di 45 nm¹⁰. JCV venne invece isolato partendo da oligodendrociti (cellule del sistema nervoso centrale produttrici di mielina) di un paziente affetto di morbo da Hodgkin in terapia immunosoppressiva

che aveva sviluppato PML¹¹, una grave patologia 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 immunodeficienza¹².

Esiste infine un altro PVs, definito Simian virus 40 (SV40), il cui ospite naturale è la scimmia, in grado di infettare l'uomo. SV40 è uno dei virus più studiati di cui si conosce sia l'intero genoma, sia il suo modo di interagire con la cellula ospite e sembra essere 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 si suppone che, una volta inoculato nell'uomo, sia stato poi in grado di infettare nuovi individui¹³. Recenti osservazioni hanno ipotizzato che esso possa prendere parte al processo di cancerogenesi umana soprattutto per ciò che riguarda l'insorgenza di mesoteliomi maligni^{14,15} e tumori cerebrali.

Strutturalmente i PVs presentano un capside 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) (Fig. 1). VP1 rappresenta la proteina capsidica maggiore in quanto da sola costituisce circa l'80% dell'intero capside; essa si associa in 72 pentameri che costituiscono l'intera superficie esterna del capside, ed è pertanto la diretta responsabile dell'interazione con le molecole di superficie della cellula bersaglio. VP2 e VP3 invece costituiscono insieme il restante 20% del capside associandosi tra loro in complessi che ne formano la superficie interna¹⁶.

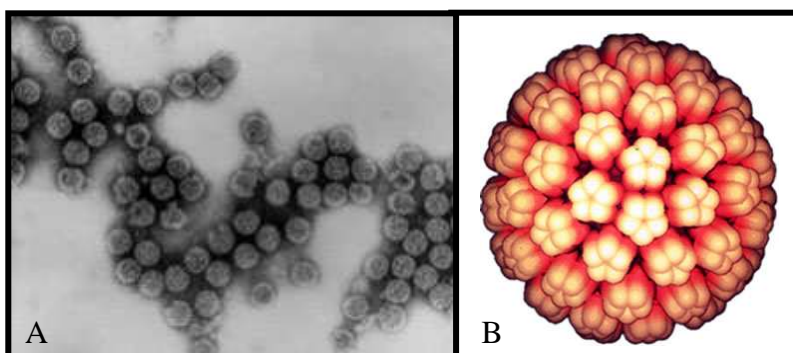


Figura 1:

A) Fotografia al microscopio elettronico di SV40 (ingrandimento 10000).

B) Rappresentazione grafica 3D della struttura esterna del Polyomavirus rappresentata dall' envelope formato nello strato esterno solo dalla VP.

All'interno del genoma dei PVs si distinguono tre regioni (Fig. 2):

- **Regione precoce** (Early region, nota anche come regione LT) di 2400 base pair (bp), che codifica due proteine non strutturali: una fosfoproteina nucleare definita *Large Tumor antigen (TAg)* e una proteina citoplasmatica, ricca in cisteine, definita *Small tumor antigen (tAg)*; tali proteine sono le prime ad essere espresse durante l'ingresso del virus nella cellula e perciò sono

indicative della presenza virale. TAg assume un ruolo critico nel ciclo replicativo del virus, in quanto contribuisce attivamente alla sua regolazione; essa, infatti, promuove la progressione nel ciclo cellulare della cellula ospite inducendo l'ingresso nella fase S, contribuisce al reclutamento del macchinario per la replicazione di cui il virus è sprovvisto, partecipa attivamente alla replicazione del DNA come fattore di iniziazione del processo di sintesi e come elicasi. Inoltre TAg interagisce con molte proteine cellulari che rivestono il ruolo di oncosoppressori o regolatori del ciclo cellulare, tra cui la proteina *p53* e la proteina associata al retinoblastoma (*pRb*), formando legami inibenti che promuovono la divisione della cellula ospite al fine di reclutare i fattori per la replicazione del DNA virale, contribuendo, così, allo sviluppo di neoplasie in animali da laboratorio. Diversamente il ruolo di tAg non è ancora ben noto, ma sembra svolgere un'attività di supporto alla proteina TAg¹⁷.

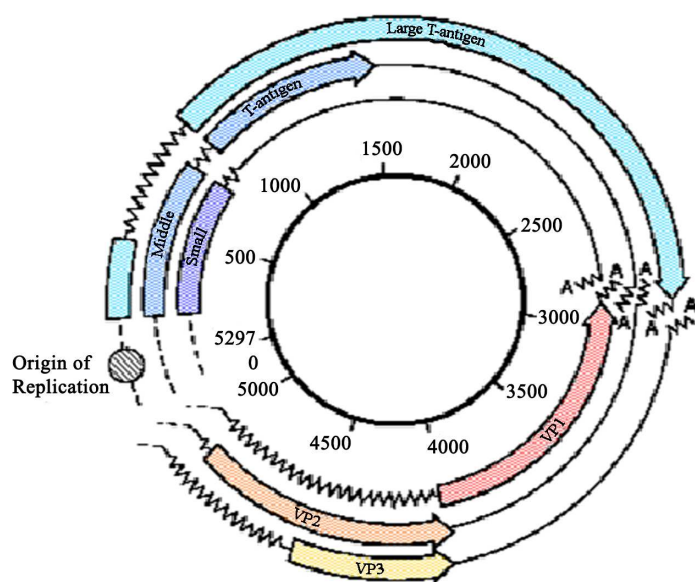


Figura 2:
Rappresentazione schematica del genoma dei Polyomavirus umani. La regione TCR è posizionata tra la regione early (Large T, Small t), che codifica in un verso, e la regione late (VP1, VP2, VP3), che codifica in senso opposto.

- **Regione tardiva** (Late region) di 2300 bp viene espressa solo durante la replicazione virale e codifica per le proteine capsidiche *VP1*, *VP2*, *VP3* e per la proteina *agnoproteina*, la cui funzione è poco nota e sembra riguardare l'assemblaggio delle proteine capsidiche del virione prima del suo rilascio all'esterno della cellula¹⁶. Queste due regioni genomiche, entrambe codificanti, sono dal punto di vista genomico stabili ed altamente conservate, caratterizzate da rare mutazioni puntiformi all'interno della sequenza di basi nucleotidiche che le compongono¹⁷. Sulla base delle variazioni nucleotidiche, della regione codificante per *VP1*, si possono identificare diversi sottotipi di JCV e di BKV. Ciò è dovuto al fatto che *VP1* è deputata al riconoscimento delle diverse cellule bersaglio tramite interazioni con i recettori di membrana e

quindi più soggetta a variabilità¹⁶. VP1, infatti, media l'aggancio alle cellule bersaglio tramite una regione proteica specifica, denominata BC-loop, che interagisce con l'acido sialico delle glicoproteine presenti sulla superficie delle cellule bersaglio; singoli cambiamenti amminoacidici a livello del loop possono influire sull'infettività e la stabilità delle particelle virali¹⁷. Attualmente JCV viene suddiviso in 8 genotipi (definiti tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, tipo 5, tipo 6, tipo 7, tipo 8)¹⁸, che a loro sono suddivisi in ulteriori sottotipi.

BKV è invece suddiviso in quattro genotipi definiti gruppo I, gruppo II, gruppo III e gruppo IV, suddivisi in altrettanti sottotipi¹⁹; i genotipi così identificati di BKV corrispondono ai sierotipi identificati nelle diverse popolazioni, dove il sierotipo riflette la risposta immune specifica dell'ospite verso epitopi antigenici di differenti strutture²⁰.

- **Regione di controllo trascrizionale** (TCR region) di circa 400 bp, non codificante, posizionata tra la regione precoce e la regione tardiva del genoma virale, dove svolge il ruolo di regolazione della sintesi e della replicazione virale. Contiene, infatti, l'origine di replicazione ORI, che divide la regione codificante in due regioni di espressione genica, precoce e tardiva, e tutti gli elementi che funzionano come promoter ed enhancer di tali regioni codificanti. In questo modo consente, quindi, la trascrizione dei geni precoci, posti vicino a ORI, a partire da un filamento seguendo una direzione e dei geni tardivi, trascritti solo in seguito all'inizio della replicazione, dal filamento complementare e seguendo una direzione opposta²¹. All'interno della regione di controllo trascrizionale sono presenti anche i siti di legame per diversi fattori di trascrizione, aventi il ruolo di attivatori o repressori. I più importanti sono: *Sp1*, proteina endogena dell'ospite, il cui ruolo sembra essere quello di mantenere libere dalla metilazione le isole CpG permettendo quindi la trascrizione dei geni; *Nuclear factor 1 (NF1)*, proteina dell'ospite che media reazioni infiammatorie ed immunologiche in risposta a vari stimoli, mutazioni a questo livello sembrano interferire con la trascrizione dei geni tardivi; *TAg*, proteina virale che agisce come controllore negativo legando i siti del promotore precoce e inibendone la sua attività; *Pura*, proteina implicata nel controllo della replicazione e della trascrizione del DNA, che agisce promuovendo la trascrizione dei geni precoci e viene inibita da TAg²². Sebbene la regione TCR sia caratterizzata da un'elevata ipervariabilità mutazionale, è stato dimostrato che vi sono un numero limitato di sequenze TCR altamente conservate caratterizzate solo da occasionali mutazioni puntiformi (quali delezioni, inserzioni o sostituzioni di singole basi nucleotidiche); tali sequenze sono state definite da Yogo et al.²³ *archetipi*. Gli archetipi rappresentano i genotipi dei PVs presenti nella popolazione umana derivanti dalla co-evoluzione con l'ospite; l'ipotesi più accreditata è quella che spiega come dalle sequenze archetipo, presenti

in un individuo, si originano per fenomeni di riarrangiamento genico, le sequenze ricombinanti, a causa dell'ipervariabilità della regione, allo scopo di adattarsi alle condizioni presenti nell'ospite, modificando per esempio il tropismo cellulare, l'infettività, l'aggressività e l'abilità replicativa virale²⁴. È stato infatti dimostrato come la regione regolatoria sia in grado di controllare la trascrizione cellulo-specifica del DNA virale osservando, per esempio, come la TCR di JCV aumenta notevolmente la trascrizione nelle cellule gliali in coltura rispetto alle cellule non gliali; ciò anche grazie alla presenza in tali cellule di fattori di trascrizione più specifici per le sequenze regolatrici^{22,25}. Inoltre, in altri studi è stato osservato come le sequenze riarrangiate presentino un'attività differente, maggiore o minore, rispetto quelle archetipo, evidenziando come significative mutazioni possano modificare la capacità replicativa, l'infettività e anche gli effetti patogeni del virus²⁶. Allo scopo di classificare i genotipi di JCV, Ault e Stoner²⁷ divisero la sequenza archetipo, definita Mad1, in sei blocchi definiti **A**(25bp), **B**(23bp), **C**(55bp), **D**(66bp), **E**(18bp) ed **F**(69bp) in base alle sequenze che mancavano o duplicavano se confrontate con altri archetipi. In questo modo identificarono quattordici genotipi differenti di JCV, tra cui i più ricorrenti²⁴: CY, Mad1, e Tokyo-1.

Analogamente fu divisa anche la regione TCR di BKV in cinque blocchi di sequenze definite da Yoshiite e Takemoto **O**(124bp), **P**(68bp), **Q**(39bp), **R**(63bp) ed **S**(63bp), basandosi su una sequenza archetipo (BKV-WW), cioè non mutata²⁸. BKV venne, infatti, classificato in relazione alla sequenza della regione TCR, che mostrava dei siti polimorfici caratteristici e conservati tra i vari genotipi²⁹. I genotipi più rappresentati sono: WW, WWT, AS e 128-I.

I PVs umani sono virus ubiquitari; sebbene l'infezione avvenga durante l'infanzia, essi, in seguito all'infezione primaria, rimangono in forma latente principalmente nei reni, nelle vie escretrici urinarie e nei linfociti B¹. La patogenesi dell'infezione da PVs non è del tutto chiarita; l'ipotesi più accreditata, anche in relazione all'estrema diffusione dei virus nella popolazione generale, è quella di una trasmissione per via aerea, con successiva moltiplicazione a livello dell'apparato respiratorio e conseguente viremia transitoria. Per via ematogena, veicolato dai linfociti T, il virus raggiunge vari siti di latenza attualmente identificati negli oligodendrociti del sistema nervoso centrale, cellule tubulari renali e uroteliali delle vie di transizione, tessuto stromale tonsillare, linfociti B e loro precursori³⁰. In tali sedi, e, verosimilmente, anche in altre non ancora identificate, il virus rimane quiescente per un tempo indefinito, e il suo genoma è identificabile mediante estrazione di DNA ed amplificazione mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) in tali distretti, come dimostrato da vari Autori^{31,32}.

In relazione al tipo cellulare infettato, l'infezione da PVs può essere:

- *produttiva o litica* nelle cellule permissive, con trascrizione di tutte le proteine virali, liberazione finale di progenie virale e conseguente morte cellulare;
- *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 pRB³³ che vengono inattivate. Solitamente questo effetto si manifesta per pochi giorni, dopo di che 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 e porterebbe quindi a presupporre un ruolo causativo di PVs con lo sviluppo di tumori, come ad esempio accade nel carcinoma a cellule di Merkel. Studi effettuati su MCV, hanno mostrato come il virus sia in grado di integrarsi, a vari livelli, nel genoma umano secondo un modello clonale, indicando come l'infezione delle cellule si possa verificare prima della loro espansione clonale. Un'evidenza aggiuntiva deriva dal fatto che sono state osservate mutazioni troncanti il prodotto dell'antigene TAg nel genoma virale dei tumori MCC, che interromperebbero la replicazione virale. La proteina TAg, infatti, rilevabile nei tumori MCC virus-positivi, e le mutazioni del genoma non sembrano influenzare il legame della proteina Rb con TAg. È stata descritta inoltre una mutazione nel gene VP1, in possibile relazione con l'integrazione incompleta del virus nell'MCC. Tali mutazioni non sono state osservate nei genomi virali delle cellule non tumorali, a conferma dell'ipotesi che nella tumorigenesi dell'MCC potrebbero essere coinvolte un'alterata replicazione o integrazione dell'MCV³⁴.

Parallelamente alcuni studi hanno messo in luce come anche JCV, BKV e SV40 abbiano capacità trasformante cellule umane in coltura e, se inoculati sperimentalmente sottocute o nei ventricoli cerebrali, di indurre tumori maligni in animali da laboratorio^{33,35,36}. Come accennato in precedenza l'attività trasformante è mediata dall'espressione dell'antigene LT, il quale stabilisce legami inattivanti con i prodotti proteici di geni oncosoppressori che esercitano funzione inibitoria del ciclo cellulare, quali p53 e pRB e con beta catenina, che, traslocata nel nucleo della cellula infettata, amplifica l'espressione di oncogeni deregolatori il ciclo cellulare, come c-myc e ciclina D1. Studi recenti hanno inoltre sottolineato che un'altra proteina virale, l'agnoproteina, può esercitare attività trasformante, in parte con meccanismi simili ad LT, in parte condizionando una meno efficace risposta enzimatica della cellula alla riparazione dei danni del DNA indotti da agenti esogeni³⁷.

Alcuni lavori hanno associato SV40 con l'insorgenza di medulloblastomi e meningiomi e ipotizzato un ruolo causativo di JCV e BKV nell'insorgenza di glomi maligni^{38,39}, mentre altri autori hanno negato tali evidenze⁴⁰; al contrario, solo pochi lavori hanno investigato un possibile nesso causale o concausale tra infezione da PVs, carcinoma transizionale e carcinoma del rene. Un recente lavoro ha identificato alti livelli di espressione dell'antigene LT di BKV in tumori primitivi e metastatici dell'urotelio, suggerendo come BKV possa essere un agente eziologico nello sviluppo di questo tumore⁴¹.

L'insorgenza di tumori da parte dei PVs non solo viene attribuita all'inibizione di geni oncosoppressori o alterazione dei meccanismi di danno del DNA della cellula; recentemente infatti altri autori hanno associato la capacità dei PVs di indurre l'insorgenza di neoplasia alla caratteristica, in particolare di BKV e JCV, di causare instabilità cromosomica. L'induzione di questo fenomeno, caratterizzato da rotture cromosomiche, cromosomi dicentrici e aumento della ploidia, fu osservato in alcuni studi sperimentali su cellule in coltura infettate da alcuni genotipi di JCV⁴².

Occasionalmente il virus si riattiva in individui immunocompetenti in varie condizioni fisiologiche, quali la gravidanza o nei soggetti anziani, e in condizioni di immunocompromissione di grado variabile, per esempio nei pazienti affetti da neoplasie trattati con chemioterapici, nei diabetici, nei soggetti dializzati, dove possono causare cistiti od ureteriti emorragiche⁴³. Diversamente accade, invece, in tutti i pazienti con un'immunità cellulo-mediata gravemente compromessa, dove la riattivazione di PVs porta a manifestazioni cliniche rilevanti. Ciò accade soprattutto se si è in presenza di un deficit di linfociti T, come in pazienti affetti da AIDS la cui riattivazione può portare all'insorgenza di PML⁴⁴, o in pazienti trapiantati renali nei quali si può sviluppare la Nefropatia Associata a Polyomavirus (BKVN)⁴⁵ o in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di midollo osseo nei quali può provocare una cistite emorragica⁴⁶.

Studi condotti fino ad oggi affermano con certezza che JCV sia l'agente eziologico responsabile della PML⁴⁷. La PML, leucoencefalopatia multifocale progressiva, è una patologia demielinizzante, così chiamata perché la guaina mielinica, che avvolge gli assoni delle cellule nervose, viene gradualmente distrutta, con il conseguente danneggiamento della trasmissione nervosa. È una patologia che insorge quasi esclusivamente nei pazienti che soffrono di grave immunodeficienza, come in pazienti trapiantati in trattamento con immunosoppressori o in pazienti affetti da AIDS. La PML è caratterizzata dalla demielinizzazione della sostanza bianca cerebrale provocata da un'infezione litica degli oligodendrociti da parte di JCV. La distruzione di oligodendrociti, con produzione di inclusioni nucleari, è associata inoltre ad un'ulteriore infezione degli astrociti, nei

quali il virus sviluppa le tipiche caratteristiche morfologiche indicative di neoplasia, come l'aspetto mitotico e la forma multinucleata⁴⁷.

Parallelamente con altri studi emerge come BKV possa essere considerato l'agente eziologico di cistiti emorragiche insorte in pazienti riceventi trapianto di midollo osseo eterologo⁴⁸, e soprattutto della cosiddetta nefropatia da PVs che colpisce una piccola parte di pazienti che hanno subito un trapianto renale⁴⁵. La nefropatia da PVs (BKVN) consiste in un'infezione litica di cellule epiteliali dei tubuli renali o delle cellule epiteliali della capsula di Bowman che riveste i glomeruli renali, con conseguente nefrite tubulo-interstiziale⁴⁹. Tale patologia, causata da una riattivazione di BKV, è tipica dei pazienti immunocompromessi che hanno subito un trapianto di rene e può essere causata, sia da una riattivazione del virus latente nel soggetto ricevente l'organo trapianto, sia da una nuova infezione veicolata dal rene trapiantato. In entrambi i casi, la riattivazione di BKV (che rappresenta un evento molto frequente, nell'ordine del 70% dei pazienti), dovuta molto probabilmente alle terapie farmacologiche anti-rigetto alle quali i pazienti sono sottoposti⁵⁰, può portare ad una prematura perdita dell'organo neo-trapiantato (dal 10 all'80% dei casi). Per tale motivo la BKVN è considerata la maggior causa di disfunzione e/o fallimento del trapianto renale⁵¹. Recentemente è stato riportato, inoltre, il possibile coinvolgimento di JCV nell'infezione-riattivazione causa di danno renale⁵².

L'immunocompetenza è considerata un'importante difesa contro l'induzione e progressione del carcinoma uroteliale; nei pazienti immunocompetenti, la trasformazione maligna indotta da BKV può essere controllata da meccanismi di sorveglianza immunologica. Il potere trasformante di BKV può quindi essere maggiore nei pazienti immunocompromessi nei quali si verifica riattivazione dell'infezione da BKV. Poiché il carcinoma uroteliale è stato identificato come una delle neoplasie maligne che insorgono de novo nei pazienti trapiantati renali, il trapianto renale e la concomitante immunosoppressione sembrano portare ad una condizione favorevole al comportamento aggressivo del tumore. È dimostrato infatti come questi tipi di carcinoma alla vescica, insorgendo nei trapiantati renali, comportino una rapida progressione, precoce disseminazione e una bassa risposta alla chemioterapia⁴¹.

La diagnosi di BKVN si basa su elementi clinici, di laboratorio e su indagini cito-istologiche effettuate su urine e biopsia renale. Un importante elemento diagnostico è rappresentato dalla escrezione urinaria di cosiddette "*decoy cells*", identificabili con esame citologico urinario sotto forma di cellule con nucleo ipercromico, con inclusioni intranucleari a vetro smerigliato, espressione morfologica di replicazione virale⁵³ (figura 3). Tale reperto, è costantemente presente nei soggetti con BKVN, ma è scarsamente specifico, in quanto riscontrabile anche in soggetti in cui la

riattivazione virale avviene nelle vie escrettrici (ad es. nelle cistiti od ureteriti emorragiche) e deve essere associato ad una valutazione molecolare sulla presenza di viremia. Le attuali linee guida sulla diagnostica della BKVN prevedono poi che in caso di positività citologica alle *decoy cells* e molecolare su sangue debba essere eseguita una biopsia renale che attualmente rappresenta il *gold standard* diagnostico per questa patologia.

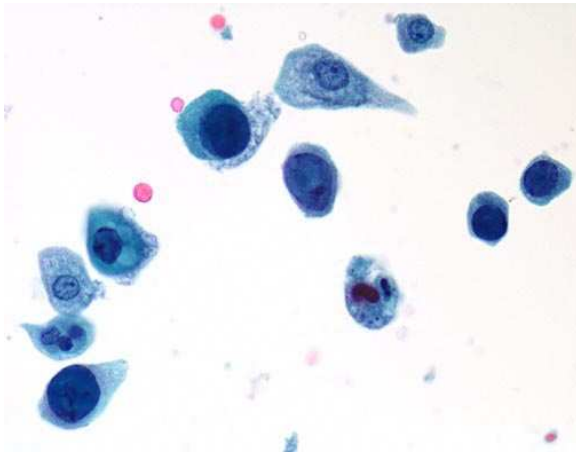


Figura 3:

Decoy cells causate da infezione da PVs, caratterizzate da nuclei perfettamente rotondi e con cromatina a "vetro smerigliato". Identificate con esame citologico delle urine . Colorazione di Papanicolau, ingrandimento 400x.

Sebbene l'analisi citologica sia uno strumento prezioso per valutare se cellule infettate da PVs siano presenti nel campione di urina, è noto come BKV infettando le cellule, possa mimare l'alto grado di malignità nei campioni di urina sottoposti a valutazione per il Carcinoma Uroteliale (UC)⁵⁴.

I carcinomi uroteliali sono le neoplasie più frequenti dell'apparato urinario, principalmente si sviluppano nella vescica, ma si possono riscontrare anche a livello pelvico, caliciale, ureterale ed uretrale. L'esame citologico del sedimento urinario riveste un ruolo importante nella diagnosi, nello screening e nel follow-up di questa neoplasia. Questo tipo di analisi che presenta un'elevata specificità, poiché permette di identificare le cellule neoplastiche di sfaldamento, è tuttavia caratterizzato da una variabile sensibilità, soprattutto nel rilevamento di neoplasie di basso grado che sono poco esfolianti e con caratteristiche cellulari troppo simili alle cellule normali. Numerosi progressi nella tecnica di Fluorescence In Situ Hybridizations (FISH), hanno permesso la ricerca di alterazioni citogenetiche che possono verificarsi nel carcinoma uroteliale. Recenti studi hanno messo in evidenza come la progressione del carcinoma uroteliale sia accompagnata da un aumento dell'instabilità cromosomica e aneuploidia. Studi citogenetici rivelano frequenti alterazioni di una serie di cromosomi, tra cui i cromosomi 3, 9, 17, 7, 11 e 1, evidenziando come l'analisi FISH possa essere utilizzata per rilevare le cellule con alterazioni cromosomiche garantendo una maggiore sensibilità (80%) se paragonata alla citologia tradizionale (figura 4). In particolare viene utilizzato

un pool di sonde dirette verso i centromeri dei cromosomi 3 (CEP3), 7 (CEP7), e 17 (CEP17) e della sonda per il gene p16 (LSI 9p21)^{55,56}.

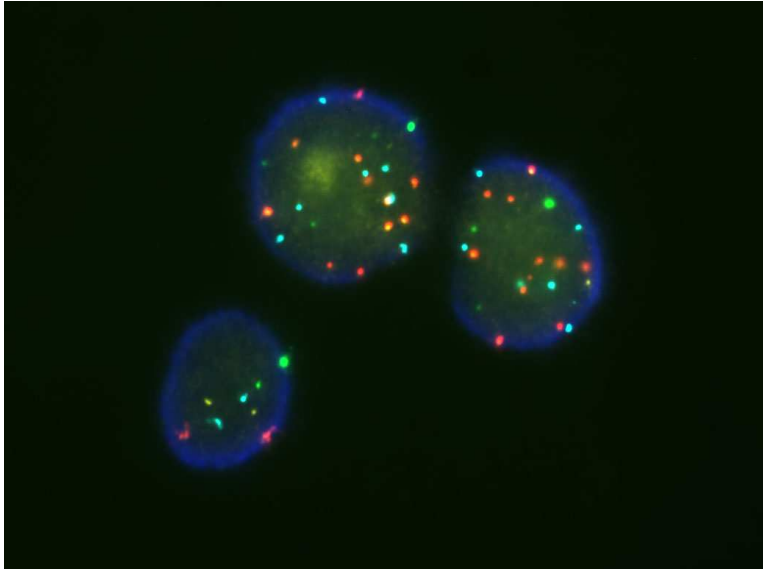


Figura 4:
Esempio di analisi FISH positiva. Cellule di carcinoma uroteliale in cui sono visibili alterazioni cromosomiche. Cellule in interfase: nuclei colorati con DAPI e marcati con tre sonde centromeriche e una sonda locus-specifica.

Studi precedenti hanno dimostrato, con FISH o Digital Image Analysis (DIA), che BKV può causare aneuploidia e alterazioni cromosomiche in campioni di urina di pazienti non affetti da carcinoma uroteliale o altre neoplasie. In particolare, una ricerca attuale mostra come una riattivazione virale di BKV, in campioni di urina di pazienti trapiantati renali, possa indurre polisomia, trisomia del cromosoma 7 e delezione in omozigosi di 9p21, suggerendo così come l'infezione possa causare risultati *falsi-positivi* se metodiche, come DIA o FISH, vengono utilizzate per valutare presenza di carcinoma uroteliale⁵⁷.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del lavoro consiste nel valutare se l'infezione da PVs possa causare alterazioni cromosomiche nelle cellule uroteliali rilevabili mediante analisi FISH, su urine di pazienti sottoposti a trapianto renale. Nell'ipotesi che si osservi instabilità cromosomica lo studio proseguirà valutando se tale fenomeno possa interferire nella diagnosi del carcinoma uroteliale generando risultati falsi positivi, indicando la necessità di porre maggiore attenzione al momento della diagnosi. Infine potrà essere condotto un monitoraggio dei pazienti, risultati positivi all'analisi FISH, per osservare se i soggetti svilupperanno tumore durante il follow-up clinico.

Lo studio viene condotto su campioni di urina di soggetti trapiantati, in cui era evidente la riattivazione virale, indicata dalla presenza delle cosiddette *decoy cells*. Al fine di confermare la presenza di genoma virale e indicare la presenza di JCV o BKV o entrambi, sui campioni di urina e sangue dei pazienti viene condotta dapprima l'indagine molecolare (PCR multiplex), seguita dall'analisi UroVysion FISH su urine per la ricerca di aneusomia cromosomica. I ceppi virali isolati verranno poi sottoposti ad analisi di sequenza delle regioni genomiche TCR e VP, per la ricerca di mutazioni di possibile significato oncologico.

MATERIALI E METODI

RACCOLTA E SELEZIONE DEI CAMPIONI

Nel presente studio sono state analizzate urine e sieri di pazienti trapiantati renali, provenienti nel reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara, per i controlli *routinari* in seguito a trapianto di rene.

A partire da aprile 2009 ad oggi sono stati raccolti 790 sieri e urine di pazienti trapiantati renali. Le urine dei campioni sono state valutate tramite indagine citologica identificando 100 campioni positivi per i PVs, sui quali è stata successivamente condotta l'indagine molecolare su siero e urina con metodica PCR multiplex. I campioni di urina positivi alla presenza di PVs sono stati selezionati tramite pretrattamento e processazione con metodica *Urovysion* per valutare la presenza di un numero adeguato di *decoy cells*, ottenendo 35 campioni idonei per l'analisi FISH.

Poiché alcuni dei campioni appartenevano allo stesso paziente, in tabella 1 vengono riportati i casi (pazienti) e per ciascun caso i campioni di siero e urina raccolti.

N° casi	Età	Sesso	N° campioni	Data prelievi siero e urina
1	58	M	1	Aprile 2009
2	55	F	2	Aprile 2009
3	54	F	3 A	Aprile 2009
			3 B	Dicembre 2009
4	62	M	4 A	Aprile 2009
			4 B	Novembre 2009
			4 C	Dicembre 2009
			4 D	Gennaio 2010
			4 E	Marzo 2010
			4 F	Aprile 2010
5	63	M	5	Maggio 2009
6	42	M	6 A	Maggio 2009
			6 B	Marzo 2010
			6 C	Luglio 2010
7	70	M	7 A	Giugno 2009
			7 B	Novembre 2009
8	68	M	8 A	Giugno 2009
			8 B	Luglio 2010
9	55	F	9	Novembre 2009
10	56	M	10 A	Novembre 2009
			10 B	Aprile 2010
			10 C	Luglio 2010
11	52	M	11	Dicembre 2009
12	56	M	12	Dicembre 2009

13	55	M	13 A	Dicembre 2009
			13 B	Marzo 2010
14	78	F	14	Gennaio 2010
15	63	M	15	Gennaio 2010
16	63	M	16	Febbraio 2010
17	56	F	17	Aprile 2010
18	59	M	18	Aprile 2010
19	51	F	19	Maggio 2010
20	52	M	20	Luglio 2010
21	29	M	21	Luglio 2010
22	39	M	22	Agosto 2010

Tabella 1: Dati relativi ai campioni utilizzati per lo studio. Vengono mostrati il numero dei casi corrispondenti ai pazienti, l'età e il sesso dei pazienti, i relativi campioni raccolti e la data dei prelievi di siero e urina.

Campioni di sangue periferico

I campioni di sangue periferico sono stati centrifugati a 2500 rpm per 10 min per evitare la lisi cellulare. Il siero così ottenuto è stato aliquotato in provette da 1,5 mL e stoccato a -20°C. Per effettuare l'indagine molecolare il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale (Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® Machery-Nagel, Germania) che prevede la lisi cellulare mediante buffer di lisi, seguita dal legame del DNA alla membrana di silice. Dopo aver lavato il DNA con buffer contenente etanolo, viene eluito dalla membrana con buffer di eluizione in un volume finale di 70 µL e conservato a -20°C.

Campioni di urine

Del campione di urina giunto in reparto circa 50 mL di urina sono stati inizialmente centrifugati a 2500 rpm per 10 min. Dal sedimento ottenuto sono stati ricavati: una provetta da 1,5 mL per indagini molecolari, conservata a -20°C; mediante ulteriore cito-centrifugazione a 1800 rpm per 10 min è stato ottenuto un vetrino per valutazione citologica in microscopia ottica. Il vetrino è stato fissato mediante citospray, contenente una soluzione alcolica. I preparati citologici ottenuti sono stati colorati con metodica Papanicolau e quindi esaminati citologicamente, in particolare per identificare la presenza di *decoy cells*, ritenute espressione morfologica della proliferazione virale intranucleare.

Le *decoy cells* sono state valutate semiquantitativamente come segue:

- carica bassa (+): da 1 a 5 cellule in 5 campi microscopici ad alto ingrandimento (HPF, dove HPF corrisponde ad un ingrandimento di 400x)

- carica intermedia (++) , da 6 a 10 cellule in 5 HPF
- alta carica (+++), più di 10 cellule in 5 HPF .

La rimanente urina, circa 10 ml, ottenuta dopo l'iniziale centrifugazione viene posta rapidamente in soluzione conservante *Carbowax* (PEG al 2% in alcool 50%) e stoccata a -4°C; in queste condizioni il campione rimane stabile per una settimana in attesa della processazione per l'analisi FISH.

LT MULTIPLEX PCR

Al fine di amplificare la regione del large-T (LT), è stata eseguita una multiplex/nested PCR (nPCR) sulle urine e sul DNA estratto da siero.

La reazione avviene utilizzando PM1+ e PM1- primers esterni, che amplificano un frammento di DNA (550 bp) comune a tutti i PVs; mentre come primers interni PM2- primer comune a tutti i PVs a cui vengono aggiunti nella stessa reazione: JC+ specifico per JCV (189 bp), BK+ specifico per BKV (353 bp), e SV40+ specifico per SV40 (135 bp). La reazione avviene in un volume totale di 25 µL contenenti 0.05U/µL Biotaq DNA polimerase (Bioline, London,U.K.), in presenza di tampone NH₄ Bioline 1x, MgCl₂ 4mM (2mM nella reazione interna), 0,2 mM di dNTPs, 0.2 pmol/µL di ciascun primer (Roche Diagnostics, Milano, Italia) ai quali vengono aggiunti 10 µL e 5 µL di DNA estratto da siero e 2.5 µL di urina. La reazione è stata eseguita su Mastercycler Gradient (Eppendorf, Amburgo, Germania) con il seguente programma:

→ denaturazione a 95°C per 5 min;

→ 40 cicli (35 nell'interna) costituiti da:

- denaturazione a 95°C per 40s;
- annealing a 61°C (55°C per l'interna) per 40s;
- estensione a 72°C per 40s;

→ estensione finale a 72°C per 5 min.

Come controllo negativo è stata usata acqua DEPC-Treated RNase free (Bioline, London, U.K.), e come controllo positivo un campione di urina presentante confezione da JCV, BKV e SV40.

I prodotti di amplificazione, sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 2% e visualizzati tramite colorazione con SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA).

ANALISI FISH

Processazione dei campioni

I campioni di urina, conservati in *Carbowax* (PEG al 2% in alcool 50%) vengono centrifugati a 2000 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente. Rimosso il surnatante, il pellet di circa 5ml viene risospeso in 15 ml di una soluzione ipotonica (0.075 M KCl) e lasciato riposare per 10 minuti.

Successivamente il campione viene centrifugato a 2000 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente e viene eliminato il surnatante. Il pellet di circa 2 ml viene poi risospeso in 10 ml di soluzione fissativa (3:1, metanolo:acido acetico) e centrifugato a 1000 rpm per 8 minuti. Il pellet viene quindi risospeso in 0.5 ml del surnatante rimasto e trasferito in una provetta da 2 ml.

Preparazione dei vetrini

Per ogni campione vengono allestiti quattro vetrini trasferendo su di ognuno ~ 150 µL della soluzione ottenuta precedentemente. I vetrini vengono fatti asciugare all'aria e un vetrino viene colorato con blu di toluidina (0,1% in acqua) per un minuto; si osserva il vetrino per controllare la densità cellulare e valutare la presenza di un numero adeguato di *decoy cells*. Per l'esecuzione della metodica FISH da noi condotta, è richiesto un numero di *decoy cells* non inferiore a 3 per campione; se la densità cellulare risulta inferiore di quella richiesta, viene aggiunto ai restanti vetrini una quantità idonea della soluzione del campione per ottenere la densità necessaria e si controlla nuovamente la cellularità ottenuta. Diversamente, qualora il numero di *decoy cells* non fosse sufficiente, nonostante l'aggiunta di campione, quest'ultimo viene escluso dalla casistica.

I vetrini, così preparati, possono essere stoccati a -20°C.

Analisi Fish

Tale metodica viene eseguita utilizzando il kit Vysis® *UroVysion* (Abbott Molecular Inc.), applicato nella diagnosi dei tumori della vescica, che prevede l'utilizzo di un pool di sonde e un programma di ibridazione di 73°C per 2 min seguito da 39°C o/n, come descritto da Halling et al.. Il pool consiste in tre sonde centromeriche per i cromosomi 3(CEP3), 7(CEP7), 17(CEP17), utilizzate per l'individuazione di aneuploidie cromosomiche ed una locus specifica per il gene p16 (9p21), che rileva delezioni di tale locus. Ogni sonda è marcata "direttamente" con un fluorocromo differente (tabella 2, figura 5).

SONDA	FLUOROCROMO	FILTRO	λ Assorbimento	λ Emissione
CEP3	RODAMINA	SpectrumRed	590nm	620 nm
CEP7	FITC	SpectrumGreen	488 nm	530 nm
CEP17	AQUA	SpectrumAqua	433 nm	480 nm
LSI9p21	GOLD	SpectrumGold	530 nm	555 nm
	DAPI	DAPI	325 nm	470 nm

Tabella 2: Schema delle sonde usate per l'analisi in FISH.

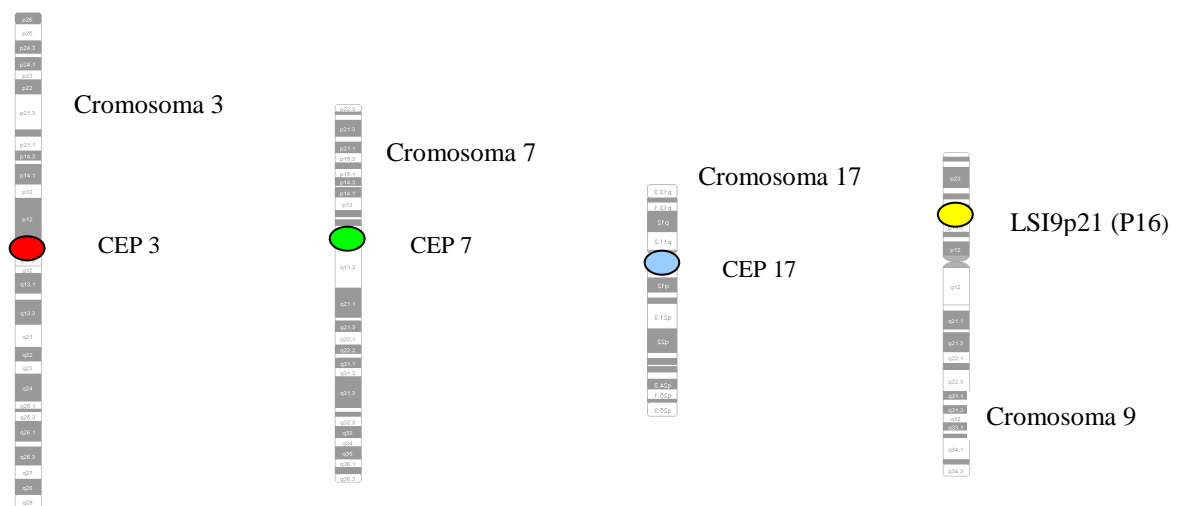


Figura 5: Rappresentazione dei cromosomi e delle sonde utilizzate per l'analisi in FISH.

Durante l'analisi in FISH il vetrino viene posto dapprima in SSC 2X (Sodio Citrato Standard) a 37°C per 10 min e successivamente in pepsina 0.005% a 37°C per 15 min per ottenere la digestione cellulare. Il vetrino viene poi lavato in 1X PBS (Buffer Fosfato Salino) per 5 min a temperatura ambiente e fissato con 1% di formalina (12,5ml di formalina 10% + 500µl di MgCl₂ 2M + 37ml PBS 1%) per 5 min a temperatura ambiente. Il vetrino così fissato viene lavato nuovamente in 1X PBS e disidratato con scala alcolica (70-85-100%). Una volta asciutto, al vetrino viene aggiunta circa 3 µl della soluzione contenente il mix di sonde (diluita 1:2) e coperto con vetrino coprioggetto da 12mm. Il vetrino viene quindi posizionato in camera umida HYBrite (Vysis) dove sarà sottoposto al programma di ibridazione. Terminata la fase di ibridazione il vetrino, rimosso il coprioggetto, viene lavato dapprima in SSC 2X/0.1% NP40 a 73°C per 2 min e successivamente in SSC 2X/0.1% NP40 a temperatura ambiente per 2 min. Una volta asciutto, al vetrino vengono applicati circa 8µl di DAPI (4'6'-diammino-2-fenilindolo diidrocloreto) e il coprioggetto. Dopo la lettura i vetrini vengono conservati a -20° C al buio.

Criteri di valutazione

L'analisi del vetrini, che avviene tramite microscopio a fluorescenza, prevede un primo screening ad ingrandimento 400X per l'identificazione delle cellule con morfologia sospetta e un'analisi approfondita dei nuclei, ad un ingrandimento di 1000X. La valutazione prevede l'individuazione delle *decoy cells*; vengono considerate almeno 3 *decoy cells* per vetrino.

Acquisizione delle immagini

Il programma da noi utilizzato (*AxionVision 4*) funziona tramite l'utilizzo di una telecamera digitale posizionata sul microscopio a fluorescenza che acquisisce le immagini generate dalle sonde in B/N; in seguito il programma elabora i dati e li trasforma in immagini digitali: permette di identificare ogni fluorocromo con un colore diverso, rendendo immediata l'osservazione dell'analisi FISH. E' possibile visualizzare le cellule con un'unica fluorescenza oppure sommare tutte le immagini generate singolarmente e visualizzare la presenza di tutte le sonde contemporaneamente.

Grazie alla trasformazione digitale delle immagini è possibile operare aggiustamenti su queste per ottimizzarne la risoluzione, il contrasto e la luminosità, rendendo meglio visibili le sonde e le cellule stesse.

Amplificazione e sequenziamento delle regioni genomiche VP e TCR.

In un secondo tempo, i ceppi virali isolati verranno sottoposti ad analisi di sequenza delle regioni genomiche TCR e VP, per la ricerca di mutazioni di possibile significato oncologico.

RISULTATI

Dati clinici

I 35 campioni selezionati per lo studio appartenevano a 22 pazienti trapiantati renali. I pazienti erano suddivisi in sei femmine (27.3%) e 16 maschi (72.7%), con età media di 56 anni (range 29-78; mediana 56). Sette dei 22 trapiantati renali (31.8%) presentavano due o più prelievi effettuati a distanza di mesi (il periodo di tempo con cui i controlli venivano fatti variava da un mese fino a 10 mesi) (tabella 1).

Analisi citologica

L'esame citologico effettuato sui 790 campioni urinari giunti in laboratorio di Anatomia Patologica da aprile 2009 ad agosto 2010, ha evidenziato presenza di *decoy cells* in 100 campioni di urina di pazienti trapiantati (12.65%). Dai 100 campioni positivi all'analisi citologica ne sono stati selezionati 35 idonei per l'analisi in FISH (35%). Dei 35 campioni selezionati, 11 (31.4%) presentavano numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs (+++); 10 (28.6%) mostravano carica intermedia (++) e 14 (40%) erano caratterizzati da rare cellule infettate da PVs (+) (tabella 3).

Indagine molecolare: LT multiplex PCR

La regione LT dei PVs è stata amplificata in 7 campioni di siero (7/35; 20%) e in 33 campioni di urina (33/35; 94.3%) di pazienti sottoposti a trapianto renale. In particolare, nei campioni di siero sono stati identificati: 5 BKV (71.4%) e 2 co-infezioni BKV-JCV (28.6%); mentre nei campioni di urina sono stati identificati: 15 BKV (45.45%), 6 JCV (18.2%) e 12 co-infezioni BKV-JCV (36.35%). Negli 8 campioni (casi n°1, 3, 7, 9, 13 e 18), in cui è stata amplificata la regione LT sia nei sieri che nelle urine, 7 mostravano l'infezione dello stesso virus nei due campioni (5 BKV e 2 co-infezione BKV-JCV), mentre uno solo (caso n°7) evidenziava un'infezione da BKV nel siero e co-infezione BKV-JCV nell'urina. Dei 35 campioni presi in esame due campioni (caso n°5 e 13) risultavano negativi (5.7%), sia nel campione di siero che di urina, per l'amplificazione della regione LT dei PVS (tabella 3).

Valutazione cellularità con blu di toluidina

L'analisi FISH dei campioni di urina è stata preceduta in tutti i casi da una valutazione dell'adeguatezza mediante colorazione delle cellule con blu di toluidina, allo scopo di identificare la cellularità e la presenza di un numero congruo di *decoy cells*.

N° casi	N° campioni	Diagnosi citologica	LT-multiplex siero	LT-multiplex urina
1	1	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	BKV	BKV
2	2	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV
3	3 A	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	BKV-JCV	BKV-JCV
	3 B	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	BKV	BKV
4	4 A	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	neg	BKV
	4 B	Numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs. (+++)	neg	BKV
	4 C	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	neg	BKV
	4 D	Numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs. (+++)	neg	BKV
	4 E	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV
	4 F	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	neg	BKV
5	5	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	neg
6	6 A	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV-JCV
	6 B	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV-JCV
	6 C	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	JCV
7	7 A	Numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs. (+++)	neg	BKV-JCV
	7 B	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	BKV	BKV-JCV
8	8 A	Numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs. (+++)	neg	BKV-JCV
	8 B	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV-JCV
9	9	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV-JCV
10	10 A	Numerose cellule epiteliali con inclusi da PVs. (+++)	BKV-JCV	BKV-JCV
	10 B	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	BKV	BKV
	10 C	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV
11	11	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV-JCV
12	12	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV-JCV
13	13 A	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	neg
	13 B	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	BKV	BKV
14	14	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	JCV
15	15	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	JCV
16	16	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	JCV
17	17	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV
18	18	Tappeto di cellule epiteliali con inclusi da PVS (+++).	BKV	BKV
19	19	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	BKV-JCV
20	20	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	JCV
21	21	Rare cellule epiteliali con inclusi da PVs (+).	neg	JCV
22	22	Presenza di cellule epiteliali con inclusi da PVs (++)	neg	BKV

Tabella 3: Risultati ottenuti dall'analisi citologica sui prelievi di urina e dall'analisi mediante PCR-multiplex sui campioni di siero e urina.

FISH analisi

Ad oggi sono state effettuati 9 saggi FISH dei 35 campioni raccolti durante il primo anno di studio. Dei 9 campioni, 4 (campioni n°3A, 3B, 4B e 7A) non mostravano alterazioni cromosomiche (44.4%), mentre gli altri 5 vetrini analizzati (campioni n°1, 4C, 8A, 9 e 10A), mostravano aneusomia cromosomica. Tali alterazioni cromosomiche erano differenti all'interno delle cellule dello stesso vetrino (tabella 4).

Nel caso 1 sono state osservate 13 cellule con alterazioni cromosomiche, di queste 7 presentavano più di una alterazione mentre 6 cellule ne presentavano solo una. Nei casi 4 e 8 sono state osservate 3 cellule una sola delle quali mostrava più aberrazioni cromosomiche. Nel caso 9 sono state individuate 8 cellule mutate metà delle quali erano caratterizzate da più alterazioni, mentre nel caso 10, delle quattro cellule osservate, una sola mostrava una sola alterazione cromosomica. Il caso n°1 mostrava 2 cellule con polisomia di 2 cromosomi, mentre i casi n°4 C, 8A, 10A, erano caratterizzati da una sola cellula con polisomia in 2 cromosomi (figura 6).

Si è inoltre osservata in una discreta proporzione di *decoy cells* (dato non mostrato in tabella) delezione di 9p21, sia in omozigosi (76.2%) sia in eterozigosi (23.8%).

Casi e n°cell. mutate	Polisomia crom.7	Delezione crom. 7	Polisomia crom. 3	Delezione crom. 3	Delezione 9p21	Polisomia crom. 17	Delezione crom. 17	N° cell con più alterazioni	N° cell con una alterazioni
1 13 cell.	xxxx	x	xxxxx		xxxx xxxx	x	xx	7	6
4 C 3 cell			x		xx	x	x	1	2
8 A 3 cell.			x	x	x	x		1	2
9 8 cell.	xxx	x		x	xxxx xxx			4	4
10 A 4 cell.	x		xx		xxx	xx	x	3	1

Tabella 4: Dati relativi ai campioni risultati positivi all'analisi in FISH. Vengono rappresentate il numero di cellule esaminate per ogni campione e le alterazioni cromosomiche che le caratterizzano (polisomia e delezione dei cromosomi 7, 3 e 17 e delezione del locus 9p21).

“X” indica la presenza dell'alterazione cromosomica in ogni cellula. Le cellule analizzate vengono distinte in cellule aventi una sola alterazione e cellule aventi più di un'alterazione cromosomica.

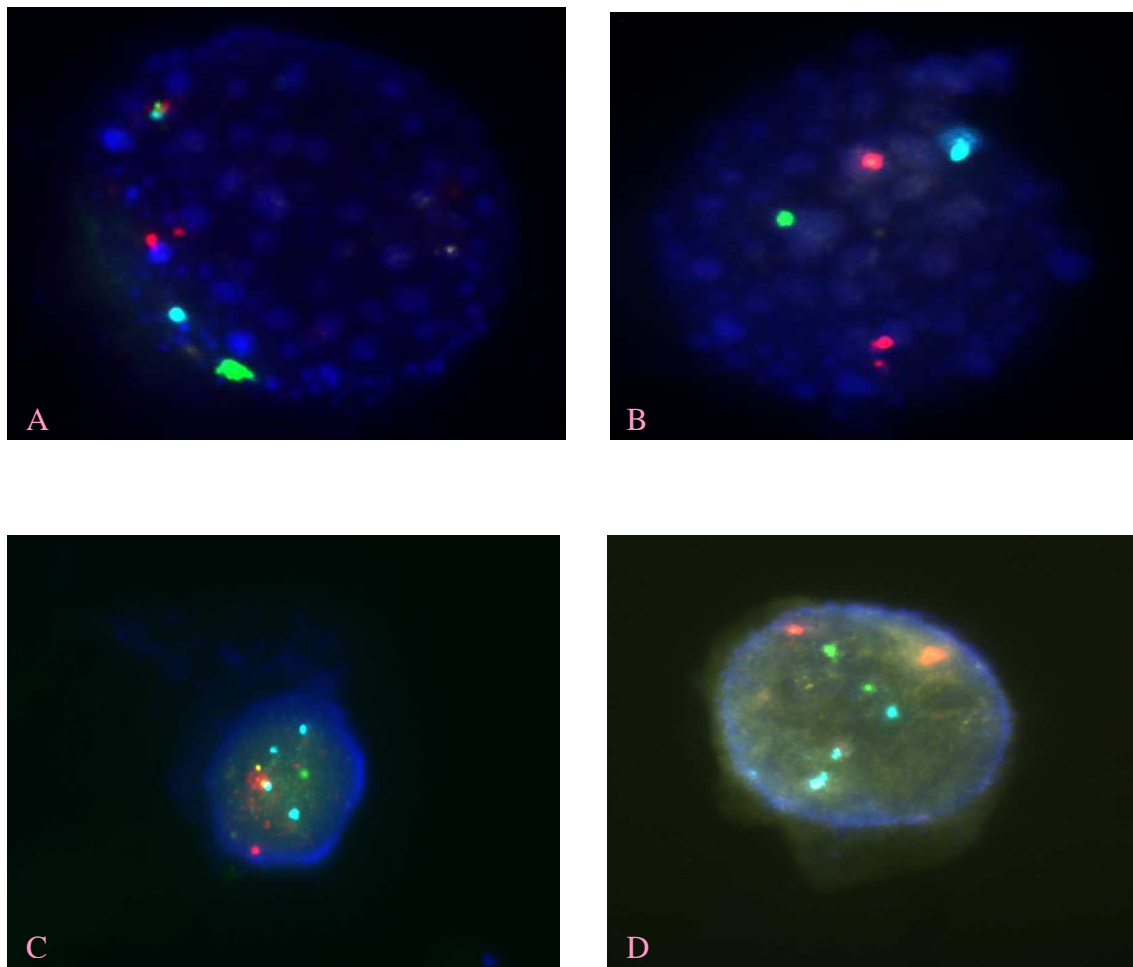


Figura 6: Rappresentazione di decoy cells analizzate con metodica FISH mediante tre sonde centromeriche per i cromosomi 3(CEP3), 7(CEP7), 17(CEP17), utilizzate per l'individuazione di aneuploidie cromosomiche ed una locus specifica per il gene p16 (9p21). In ogni cellula è presente alterazione del numero dei cromosomi. In particolare: A) e B) presentano delezione dei cromosomi 7, 17 e 9p21; C) presenta delezione del cromosoma 7 e polisomia del cromosoma 17; D) presenta delezione di 9p21 e polisomia del cromosoma 17.

DISCUSSIONE

Numerosi autori hanno investigato il possibile coinvolgimento dei polyomavirus umani JCV e BKV nell'insorgenza di vari tipi di neoplasie umane, in analogia con quanto noto per SV40 che, in animali da laboratorio mostra sicura azione oncogena^{35,58}, e in relazione al recentemente descritto MCV di cui è comprovata l'azione oncogena nel carcinoma a cellule di Merkel insorto in soggetti immunocompromessi. Nelle cellule di MCC, infatti, è stato osservato come il genoma di MCV sia integrato a vari livelli nel genoma della cellula ospite indicando così che l'infezione delle cellule si era verificata prima della loro espansione clonale. Tra i vari studi, che tentano di identificare i meccanismi attraverso i quali i PVs possano condurre all'insorgenza di un tumore, l'ipotesi più accreditata, sembra essere quella descritta nel ciclo di replicazione di tipo abortivo. Il meccanismo d'azione prevede l'inserimento del genoma virale nella cellula ospite con arresto della replicazione virale e continua espressione della proteina TAg. La capacità di TAg di trasformare le cellule è data in particolare da tre domini: dominio J, dominio legante pRB e dominio legante p53. Quest'ultimo dominio è responsabile del legame alla proteina, inattivandola e causando la crescita incontrollata della cellula. Più recentemente è stato ipotizzato il ruolo di un'altra proteina con attività trasformante: l'agnoproteina, che sembra possa condizionare la risposta enzimatica della cellula alla riparazione del danno del DNA indotta da agenti esogeni³⁷.

Oggi, alcuni gruppi di ricerca stanno focalizzando l'attenzione sui possibili meccanismi che inducono, nelle cellule infettate dai PVs, un'instabilità cromosomica. Alcuni autori hanno investigato il possibile nesso tra alcuni genotipi di JCV (Mad-1 e Δ98) e la loro capacità di portare ad un'alterazione cromosomica nelle cellule di carcinoma colon-rettale in coltura⁴²; altri hanno indagato il potere trasformante di JCV, attraverso esperimenti in vitro e in vivo, in cellule del sistema immunitario conosciute come sito di latenza, i linfociti B. Quest'ultimi in particolare hanno osservato come le cellule trasformate, in coltura, mostravano multiple e complesse aberrazioni cromosomiche (come traslocazioni, inserzioni, delezioni), e pertanto venivano definite "*rogue cells*"⁵⁹.

Il meccanismo molecolare dell'effetto clastogenico di TAg non è ancora chiaro, ma tra le ipotesi formulate le più accreditate risultano essere quelle che correlano l'instabilità cromosomica con la capacità di TAg di legare la topoisomerasi 1, o in alternativa l'attività elicastica della proteina virale^{42,60,61}.

Nonostante gli studi effettuati, non è stato ancora osservato con certezza un nesso specifico tra l'infezione da PVs e l'insorgenza di neoplasie nell'uomo ed è ancora da chiarire quali siano i meccanismi molecolari alla base dell'instabilità cromosomica causata da questi virus.

Nell'uomo sono riportate associazioni tra infezioni da JCV e SV40 e neoplasie cerebrali nell'età adulta^{62,63} e in quella pediatrica (glioblastomi, ependimomi, medulloblastomi)⁶⁴, e tra infezione da BKV e neoplasie renali o delle vie escrettrici urinarie^{29,61}. In particolare recenti studi hanno ipotizzato un probabile ruolo di BKV nell'insorgenza del carcinoma uroteliale⁶⁵. La riattivazione di BKV sarebbe supportata da un calo delle difese immunitarie in pazienti immunocompromessi, come i soggetti trapiantati renali, i quali presentano un rischio tre volte maggiore di sviluppare un carcinoma uroteliale⁴¹. Sebbene l'esame citologico del sedimento urinario rappresenti un elemento importante per la diagnosi di questo carcinoma, la bassa sensibilità che caratterizza quest'analisi non permette l'identificazione delle neoplasie a basso grado. Per questo motivo all'analisi citologica è seguita l'analisi in FISH che permette la ricerca di alterazioni citogenetiche che caratterizzano il carcinoma uroteliale. Recenti studi su questa neoplasia hanno infatti messo in evidenza come la progressione del carcinoma uroteliale sia accompagnata da un aumento dell'instabilità cromosomica e aneuploidia. Le alterazioni dei cromosomi 3, 7, 17 e del gene p16 sembrano essere le più frequenti e nella diagnosi, la positività al carcinoma viene indicata dalla presenza di 5 o più cellule che presentano guadagno di 2 o più cromosomi oppure dalla presenza di 12 cellule che presentano perdita in omozigosi del locus 9p21⁵⁶.

Recenti studi hanno indagano un probabile correlazione tra l'infezione da PVs e alterazioni cromosomiche in urine di pazienti trapiantati renali. Un gruppo di ricercatori ha mostrato come in urine di pazienti trapiantati, non affetti da carcinoma uroteliale o da altre neoplasie, BKV, in seguito a riattivazione, sia in grado di indurre alterazioni cromosomiche quali polisomia, trisomia del cromosoma 7 e delezione in omozigosi di 9p21. E' stato ipotizzato in questo modo come l'infezione da PVs possa condurre a risultati *falsi positivi* nella diagnosi al carcinoma uroteliale effettuata tramite FISH⁵⁷.

Sulle base delle conoscenze che abbiamo riguardo la capacità dei PVs di indurre instabilità cromosomica nasce il nostro interesse nell'indagare se, l'infezione dei PVs, in particolare JCV e BKV, possa causare alterazioni cromosomiche nell'analisi in FISH su urine di pazienti trapiantati, e valutare se tale meccanismo possa interferire nella diagnosi di carcinoma uroteliale. Come accennato in precedenza, alcuni autori come Kipp et al. hanno ipotizzato come l'alterazione del numero dei cromosomi da PVs può condurre a risultati falsi positivi nei pazienti trapiantati, ma nessuno fino a oggi ha seguito il follow up clinico di tali pazienti e osservato se l'instabilità cromosomica può contribuire nel tempo allo sviluppo di cancro.

Nel nostro studio iniziale l'analisi ha rilevato un'alterazione del numero dei cromosomi in cinque campioni sui nove esaminati (66.6%), mentre quattro campioni erano caratterizzati cellule prive di

aneusomia cromosomica (44.4%). Dei cinque campioni positivi all'analisi in FISH il numero di cellule esaminate variava da 3 a 13 cellule per caso e di queste alcune erano rappresentate da una sola alterazione altre da più alterazioni per cellula. Le anomalie cromosomiche riscontrate comprendevano: polisomia e delezione del cromosoma 7, polisomia e delezione del cromosoma 3, delezione di 9p21, polisomia e delezione del cromosoma 17. Dato il numero limitato di campioni a cui momentaneamente è stata eseguita l'analisi in FISH non è stato possibile individuare una maggiore corrispondenza tra l'aneusomia cromosomica e l'infezione di BKV o JCV.

Nessuno dei casi esaminati in FISH mostrava positività ai criteri diagnostici utilizzati nel carcinoma uroteliale, che prevedono positività nel caso in cui siano presenti almeno 5 cellule con polisomia di 2 o più cromosomi. Nella nostra analisi condotta fino ad oggi il caso n°1 possedeva 2 cellule con polisomia di 2 cromosomi, mentre i casi n° 4 C, 8 A, 10A, erano caratterizzati da una sola cellula con polisomia in 2 cromosomi.

Alla luce dei risultati ottenuti si può, quindi, presupporre che i PVs, BKV e JCV, possano causare aneuploidia cromosomica, ma sarà necessario ampliare la casistica per confermare tale dato e suggerire nuove ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Shah, K.V. (2000) *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**, 754-755
2. Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., Van Strien, A. and Van der Noordaa, J. (1982) *J. Med. Virol.* **10**, 91-99
3. Monaco, M.C.G., Jensen, P.N., Hou, J., Durham, L.C. and Major, E.O. (1998) *J. Virol.* **72**, 9918-9923
Posatti, L., Bartolotta, E. (1981) *Acta Virol.* **25**, 254-255
4. Brown, P., Tsasi, T., Gajdusek, D.C. (1975) *Am. J. Epidemiol.* **102**, 331-340
5. Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A.M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchini, A., Melis, M. and Orsi, N. (1998) *J. Med. Virol.* **56**, 372-376
6. Rziha, H.J., Bornkamm, G.W. and Zur Hausen, H. (1978) *Med. Microbiol. Immunol.* **165**, 73-81
7. Nebuloni, M., Tosoni, A., Boldorini, R., Monga, G., Carsana, L., Bonetto, S., Abeli, C., Caldarelli, R., Vago, L., e Costanzi, G. (1999) *Arch. Lab. Med.* **123**, 807-811
8. Jiang, M., Abend, J. R., Johnson, S. F., e Imperiale, M. J. (2009) *Virology* **384**, 266-273
9. 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, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego
10. Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., e Hulme, B. (1971) *Lancet*, 1253-1257
11. Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., e Dessel, B.H. (1971) *Lancet*, 1257-1260
12. Richardson E. (1961) *N. Engl. J. Med.* **265**, 815-823
13. Ferber, D. (2002) *Science* **296**, 1012-1014
14. Bocchetta, M., Di Resta, I., Powers, A., Fresco, R., Tosoolini, A., Testa, J.R., Pass, H.I., Rizzo, P., e Carbone, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 10214-10219
15. Cole, C.N., Conzen, S.D. (2001) In: *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2141-2498
16. Imperiale, M.J. (2000) In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspective.* 1st Ed, Wiley-Liss, 53-72
17. Krautkramer, E., Klein, T.M., Sommerer, C., Schnitzler, P., e Zeier, M. (2009) *J. Med. Virol.* **81**, 75-81
18. Jobes, D.V., Chima, S.C., Ryschkewitsch, C.F., e Stoner, G.L. (1998) *J. Gen. Virol* **79**, 2491-2498

19. Jin, L., Gibson, E.P., Booth, J.C., e Clewley, J.P. (1993) *J. Med. Virol.* **41**, 11-17
20. 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
21. Major, E.O. (2001) In: *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2175-2196
22. 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
23. Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K., e Taguchi F. (1990) *J. Virol.* **64**, 3139-3143
24. 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.
25. Sock, E., Renner, K., Feist, D., Leger, H., e Wegner, M. (1995) *J. Virol.* **70**, 1512-1520
26. Ault, G.S. (1997) *J. Gen. Virol.* **78**, 163-169
27. Ault, G.S., e Stoner, G.L. (1993) *J. Gen. Virol.* **74**, 1499-1507
28. Yoshiike K., e Takemoto, K.K. (1986) In: Salzman NP *The Papovaviridae, vol.1, The Polyomaviruses* Plenum Press: NY, 295-326
29. Negrini, M., Sabbioni, S., Arthur, R.R., Castagnoli, A., e Barbanti-Brodano, G. (1991) *J. Virol.* **65**, 5092-5095
30. Monaco, M.C.G., Atwood, W.J., Gravell, M., Tornatore, C.S., e Major, E.O. (1996) *J. Virol.* **70**, 7004-7012
31. Chesters, P.M., Heritage, J., e McCance, D.J. (1983) *J. Infect. Dis.* **147**, 2037-2045
32. Boldorini, R., Veggiani, C., Barco, D., e Monga, G. (2005) *Arch. Pathol. Lab. Med.* **129**, 69-73
33. Gordon, J., Krynska B., e Otte, J. (1998) *Dev. Biol. Stan.* **94**, 93-101
34. Sastre-Garau, X., Peter, M., Avril, M.F., Laude, H., Couturier, J., Rozenberg, F., Almeida, A., Boitier, F., Carlotti, A., Couturaud, B., e Dupin, N. (2009) *J. Pathol.* **218**, 48-56
35. Cheng, J., DeCaprio, J.A., Fluck, M.M., e Schaffhausen, B.S. (2009) *Semin. Cancer Biol.* **19**, 218-228
36. Fioriti, D., Videtta, M., Mischitelli, M., Degener, A.M., Russo, G., Giordano, A., e Pietropaolo, V. (2005) *J. Cell. Physiol.* **204**, 402-406
37. Del Valle, L., e Khalili, K. (2010) *J. Med. Virol.* **82**, 806-811
38. Arrington, A.S., Moore, M.S., e Butel, J.S. (2004) *Oncogene* **23**, 2231-2235
39. White, K.M., Gordon, J., Reiss, K., Del Valle, L., Croul, S., Giordano, A., Darbiyan, A., e Khalili, K. (2005) *Brain Res. Rev.* **50**, 69-85
40. Vashitha, R.K., Pasricha, N., Nath, A., e Sehgal, S. (2009) *Indian J. Pathol. Virol.* **52**, 42-45

41. Geetha, D., Tong, B.C., Racusen, L., Markowitz, J.S., e Westra, W.H. (2002) *Transplantation* **73**, 1933-36
42. Ricciardello, L., Baglioni, M., Giovannini, C., Pariali, M., Cenacchi, G., Ripalti, A., Landini, M.P., Sawa, H., Nagashima, K., Frisque, J.R., Goel, A., Boland, R., Tognon, M., Roda, E., e Bazzoli, F. (2003) *Cancer Res.* **63**, 7256-7262
43. Reploeg, M.D., Storch, G.A., e Clifford D.B. (2001) *Clin. Infect. Dis.* **33**, 191-202
44. Omodeo-Zorini, E., Boldorini, R., Vigano, P., Mena, M., Benigni, E., Adorno, S., e Monga, G. (2003) *Acta. Cytol.* **47**, 985-990
45. Randhwa, P.S., Finkelstain, S., Scantlebury, V., Shapiro, R., Vivas, C., Jordan, m., Picken, M.M., e Demetris, A.J. (1999) *Transplant.* **67**, 103-109
46. Chan, P.K.S., Ip, K.W.Y., Shiu, S.Y.W., Chiu, E.K.W., Wong, M.P., e Yuen, K.Y. (1994) *J. Infect.* **29**, 139-146
47. Greenle, J.E. (1998) *N. Eng. J. Med.* **338**, 1378-1380
48. Vinelli, N., Renga, M., Azzi, A., De Santis, R., Bandini, G., Tosi, P., e Tura, S. (2000) *Bone Marrow Transplant.* **25**, 319-320
49. Hirsch, H.H., e Steiger, J.(2003) *Lancet Infect.* **3**, 611-623
50. Ahuja, M., Cohen, E.P., Dayer, A.M., Kampalath, B., Chang, C.c., Bresnahn, B.A., e Hariharan, S. (2001) *Transplantation* **71**, 896-899
51. Boudreault; A.A., Courtemanche, C.,Latulippe, E., Cotè, Houde, I., e Deschènes, L. (2009) *J. Clin. Virol.* **45**, 318-321
52. Randhawa, P., Baksh, F., Aoki, N., Tschirhart, D., Finkelstein, S. (2001) *Transplantation* **9**, 1300-1303
53. Koss, L. (1979) *Diagnostic Cytology and its histopathologic bases*, 3rd Ed., Lippincott JB, Philadelphia, PA 711-741
54. Seftel, A.D., Matthews, L.A., Smith, M.C., e Willis, J. (1996) *J.Urol.* **156**, 1764
55. Luo, B., Li, W., Deng., C.H., Zheng, F.F., Sun, X.Z., Wang, D.H., e Dai, Y.P. (2009) *Cancer genetics and cytogenetic* **189**, 93-97
56. Halling, K.C., King, W., Sokolova, I.A., Meyer, R.G., Burkhardt, H.M., Halling, A.C., Cheville J.C., Sebo, T.J., Ramakumar, S., Stewart, C.S., Pankratz, S., O'kane, D.J., seeling, S.A., Lieber M.M., e Jenkins, R.B. (2000) *J. Urol* **164**, 1768-1775
57. Kipp, B.R., Sebo, T.J., Griffin, M.D., Ihrke, J.M., e Halling, K.C. (2005) *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 854-861
58. Stewart, A.R., Lednick, J.A., e Butel, S. (1998) *J. Neurovirol.* **4**, 182-193

59. M'kacher, R., Andreoletti, L., Flamant, S., Milliat, F., Girinsky, T., Dossou, J., Violot, D., Assaf, E., Clausse, B., Koscielny, S., Bourhis, J., Bosq, J., Bernheim, A., Parmentier, C., e Carde, P. (2010) *Ann. Oncol.* **21**, 826-832
60. Nosho, K., Shima, K., Kure, S., Irahara, N., Baba, Y., Chen, L., Charles, S.F., e Ogino, S. (2009) *Neoplasia* **11**, 87-95
61. Corallini, A., Tognon, M., Negrini, M., Barbanti-Brodano, G. (2001) In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspective*. 1st Ed, Wiley-Liss, 431-460
62. Delbue, S., Pagani, E., Guerini, F.R., Agliardi, C., Mancuso, R., Borghi, E., Rossi, F., Boldorini, R., Reggiani, C., Car, P.G., e Ferrante, P. (2005) *J. Med. Virol.* **77**, 447-454
63. Croul, S., Otte, J., e Khalili, K. (2003) *J. Neurovirol.* **9**, 173-182
64. Bergsagel, D. Gel., Findgold, M. J., Butel, J.S., Kupsky, W.J., e Garcea, R.L. (1992) *N. Engl. J. Med.* **326**, 988-993
65. Fioriti, D., Pietropaolo, V., Dal forno, S., Laurenti, C., Chiarini, F., e Degener, A.M. (2003) *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **16**, 283-288

SEZIONE 2

CORSI FREQUENTATI:

- lezioni di apertura del ciclo dei seminari di oncologia (prof. Albano)

CONGRESSI FREQUENTATI:

Seminari:

- ANAPLASTIC LINFOMA KINASI: AN ONGOING EVOLVING STORY, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 16/11/2009
- USE OF MAREPIGENETIC REGULATORS FOR THERAPEUTIC EXPRESSION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 30/11/2009
- CONTROLLO DEI LINFOCITI T DA PARTE DELL'ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP) EXTRACELLULARE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 14/12/2009
- CLINICAL SIGNIFICANCE OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN AUTOIMMUNE LIVER DISEASE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 14/01/2010
- LSD1, LYSINE SPECIFIC DEMETHYLASE 1: INSIGHT INTO A NEW EPIGENETIC REGULATOR INVOLVED IN NEURONAL GENE REGULATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 20/01/2010
- DAL DIFETTO GENETICO ALL'INFIAMMAZIONE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 28/01/2010
- R & D MAGNETIC NANOPARTICLES AND CARRIERS FOR DRUGS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 09/02/2010
- COMPUTATIONAL ANALYSIS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 17/02/2010
- BASI GENETICHE DEL DIABETE DI TIPO 1 E DELLA SCLEROSI MULTIPLA: L'ESEMPIO DELLA POPOLAZIONE SARDA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 03/03/2010
- I VIRUS DELL'INFLUENZA ASPETTI PATOGENETICI, EPIDEMIOLOGICI E PREVENTIVI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento DI Medicina Clinica e Sperimentale, Novara, 04/03/2010
- THE WONDERS OF YEAST: YEAST AS A MODEL ORGANISM, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 05/03/2010
- CHROMOSOME 5q DELETIONS IN MDS: GENOTYPE/PHENOTYPE RELATIONSHIPS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 08/03/2010
- DASATINIB: TRANSFORMING AN ADVERSE EVENT INTO A NEW THERAPEUTIC TARGET, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 09/03/2010
- MARCATORI BIOLOGICI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE, Università del Piemonte Orientale, Polo didattico Perrone, Novara, 12/03/2010
- DIAGNOSTICA MOLECOLARE NEI CARCINOMI DEL COLON RETTO, Università del Piemonte Orientale E Ospedale Maggiore della Carità di Novara, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 18/05/2010
- DIAGNOSTICA MOLECOLARE NEI CARCINOMI NON A PICCOLE CELLULE DEL POLMONE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 26/05/2010

- DIAGNOSTICA MOLECOLARE NEI TUMORI STROMALI GASTRO INTESTINALI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 01/06/2010
- FENOTIPO E CELLULE STAMINALI TUMORALI NEI GLIOMI MALIGNI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 14/06/2010
- NUOVE STRATEGIE ANTICANCRO: I MICRORNA COME AGENTI DIFFERENZIAATIVI PER I TUMORI SOLIDI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 15/06/2010
- COMBATING BIOTERRORISM: NEW ANTIDOTES FOR AN OLD POISON, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 17/06/2010
- IDENTIFICAZIONE DI ANTIGENI PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DEL CARCINOMA PANCREATICO MEDIANTE L'ANALISI SIEROLOGICA DEL PROTEOMA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 30/06/2010
- ROLE OF MEMBRANE LIPIDS IN NEURONAL SYNAPSES ORGANIZATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 05/07/2010
- RUOLO DELLE MICROVESCICOLE NELLA COMUNICAZIONE TRA LE CELLULE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 06/09/2010
- PREVENTION AND CURE OF AUTOCHTHONOUS MAMMARY CARCINOMAS IN HER2 TRANSGENIC MICE?, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 17/09/2010
- NEW ASPECTS OF CATHEPSIN E FUNCTIONS IN HOST DEFENSE MECHANISMS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 22/09/2010
- LE CELLULE STAMINALI TUMORALI: DALLA BIOLOGIA ALLA CLINICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 22/09/2010
- PREVENTING PERSISTERS: TARGETING EPIGENETIC CHANGES IN CANCER CHEMOTHERAPY, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento Scienze Mediche, Novara, 23/09/2010

Congressi internazionali:

- *“LXXV Riunione Annuale della Società Svizzera di Patologia”*, presso l'Istituto Cantonale di Patologia di Locarno – Svizzera, dal 05/11/2009 al 07/11/2009.

Congressi nazionali:

- *“Evoluzione della strategia terapeutica del cancro colon-retto”*, presso l'Hotel Paradiso di Lugano – Svizzera, 10/02/2010
- *“Le malattie autoimmuni dal laboratorio al paziente” (Convegno IRCAD)*, presso la Banca Popolare di Novara – Novara, 26/02/2010

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO

- *“BK virus sequences in specimens from aborted fetuses”*, Renzo Boldorini, Sara Allegrini, Umberto Miglio, **Ilenia Nestasio**, Alessia Paganotti, Claudia Veggiani, Guido Monga and Valeria Pietropaolo. *Journal of Medical Virology*, in stampa.