

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Tesi di Dottorato
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXII***

TITOLO:

**INDAGINI SIEROLOGICHE E MOLECOLARI
SULLA TRASMISSIONE MATERNO-FETALE
DELLA INFEZIONE DA JV VIRUS E BK VIRUS E
SIGNIFICATO CLINICO DELLE MUTAZIONI DI
REGIONI GENOMICHE VIRALI**

Candidato: Allegrini Sara

Tutor: Prof. Renzo Boldorini

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 3
• Scopo dello studio	Pag. 17
RISULTATI	Pag. 18
• Pubblicazione 1	Pag. 19
• Pubblicazione 2	Pag. 25
• Pubblicazione 3	Pag. 32
CONCLUSIONI	Pag. 57
BIBLIOGRAFIA	Pag. 59
ALTRE PUBBLICAZIONI	Pag. 65

INTRODUZIONE

INTRODUZIONE

I polyomavirus (PVs) umani sono virus altamente diffusi nella popolazione mondiale sia adulta che infantile¹ e rivestono un ruolo fondamentale nella patogenesi di alcune importanti patologie a carico di pazienti immunocompromessi, come la Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML) in pazienti con AIDS, la Cistite Emorragica in pazienti trapiantati di midollo osseo o la Nefropatia Associata a Polyomavirus (PVAN) in trapiantati renali²⁻⁵.

A tutt'oggi molti aspetti dell'infezione umana da parte di questi virus rimangono da chiarire; uno degli aspetti più controversi risulta essere la modalità di trasmissione con cui i PVs si diffondono nella popolazione umana, in quanto l'infezione primaria ad essa associata non presenta una fase acuta chiaramente riconoscibile⁶.

Approfondire le conoscenze su un aspetto sicuramente importante della storia naturale dei PVs umani, come le loro modalità di trasmissione, risulta critico per poter comprendere al meglio la patogenesi delle importanti patologie umane di cui rappresentano il principale agente etiologico e per poter approntare una efficace terapia e prevenzione.

I Polyomavirus

I polyomavirus (PVs) appartengono alla famiglia delle *Polyomaviridae*, anche se storicamente venivano classificati come genere appartenente, assieme a quello dei *Papillomavirus*, alla famiglia delle *Papovaviridae*⁶. 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 caratteristica⁷. 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 cinque PVs; i primi a essere scoperti e per tanto i più studiati a tutt'oggi risultano essere 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 ureterale⁸. 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)⁹, 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 immunodeficienza¹⁰. Recentemente sono stati scoperti tre nuovi PVs in grado di infettare l'uomo: KI (Karolinsk Institute) e WU (Washington University) isolati in escrezioni respiratorie, e Merkel cell polyomavirus isolato un anno fa e descritto come probabile agente eziologico del carcinoma a cellule di Merkel¹¹.

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 individui¹².

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^{13,14}.

Strutturalmente i PVs (vedi **figura 1**) presentano un capsido 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 capsido; essa si associa in 72 pentameri che costituiscono l'intera superficie esterna del capsido, 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 capsido associandosi tra loro in complessi che ne formano la superficie interna¹⁵.

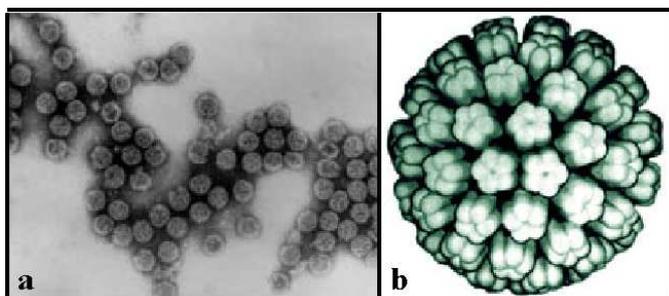


Figura 1: A) Fotografia al microscopio elettronico del PV di scimmia SV-40 (Ingrandimento 10000); B) Rappresentazione grafica 3D della struttura esterna dei PV rappresentata dall'envelope formato nello strato esterno solo dalla VP1.

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 capsid 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^{14,15}.

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 citoplasmatica ricca in cisteine, 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 TAg¹⁵.

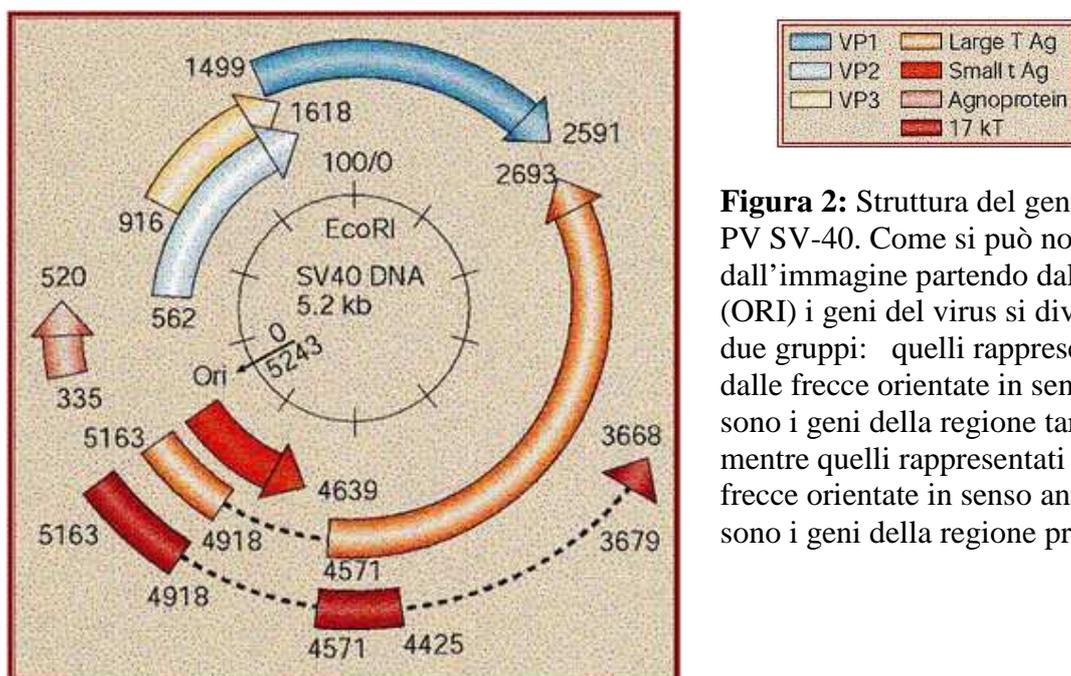


Figura 2: Struttura del genoma del PV SV-40. Come si può notare dall'immagine partendo dall'origine (ORI) i geni del virus si dividono in due gruppi: quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso orario sono i geni della regione tardiva; mentre quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso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

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 una 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)^{7,14}. 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 nucleotidiche¹⁵. La proteina VP1 sembra svolgere un ruolo cruciale nell'influenzare la capacità del virus di infettare con diverso tropismo le cellule bersaglio, in quanto riconosce e lega specificamente molecole bersaglio sulla superficie cellulare, permettendo l'internalizzazione della particella virale¹⁶. Per questo motivo nell'ultimo decennio un certo numero di studi si è proposto di analizzare e di caratterizzare in dettaglio la struttura della proteina VP1, le proteine bersaglio presenti sulla cellula e il sito di legame con tali proteine^{17,18}. La proteina VP1, è costituita da 362 aminoacidi (regione codificante di circa 1086 nucleotidi) e viene suddivisa in 5 loops: BC, DE, EF, GH e HI. La struttura terziaria di ogni monomero forma un "barile" β composto da filamenti β antiparalleli tra i quali si posizionano 3_{10} -eliche e α -eliche. Nella regione C-terminale il loop DE si inserisce in profondità nel monomero VP1 adiacente consentendo il legame con gli altri monomeri, formando infine un pentamero. La struttura capsidica viene completata attraverso l'N-terminale di ogni monomero che si inserisce in un pentamero adiacente, stabilizzando così la struttura del capside virale¹⁹. Successive analisi hanno inoltre evidenziato che VP1 di BKV e JCV è in grado di legare selettivamente oligosaccaridi leganti all'N-terminale una molecola di acido sialico presenti sulla membrana cellulare^{18,20} (**Figura 3 e 4**). JCV e BKV vengono inoltre classificati sulla base di variazioni nucleotidiche della regione codificante per la VP1. In particolare JCV viene suddiviso in 8 genotipi (definiti **tipo 1**, **tipo 2**, **tipo 3**, **tipo 4**, **tipo 5**, **tipo 6**, **tipo 7**, **tipo 8**), loro volta suddivisi in numerosi sottotipi, in base alla sequenza nucleotidica della regione di 164 bp compresa tra il nucleotide 1736 e il 1900²¹. Analogamente anche BKV è stato diviso in quattro genotipi denominati **gruppo I**, **gruppo II**, **gruppo III** e **gruppo IV** in base alla sequenza nucleotidica di 69 bp compresa tra i nucleotidi 1744-1812²²; i genotipi così identificati di BKV corrispondono ai sierotipi identificabili nelle diverse popolazioni (il concetto 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 la regione tardiva del suo genoma non mostra una variazione di sequenza sufficiente a generare epitopi antigenici sierologicamente distinguibili²³.

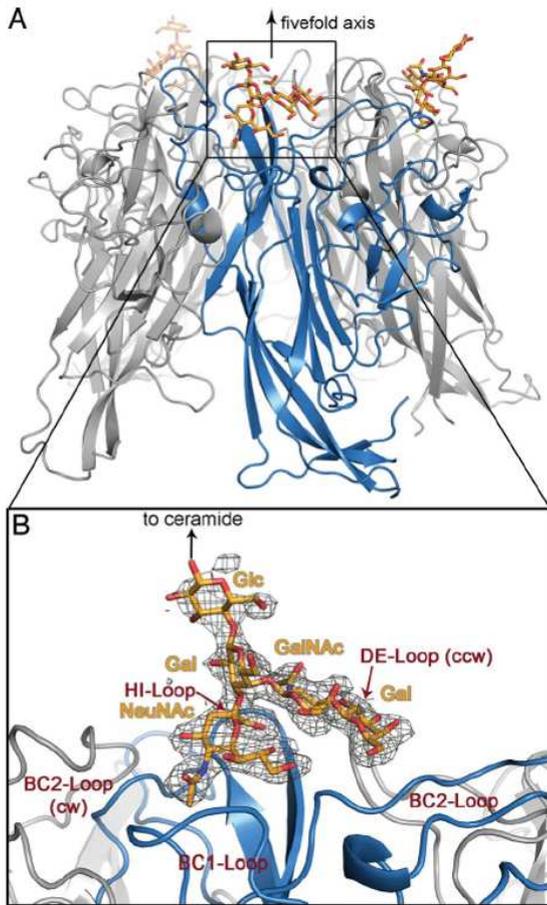


Figura 3: Struttura del complesso VP1 del PV SV-40 e il suo ligando naturale. **A)** Struttura completa; le 5 catene monometriche di VP1 sono rappresentate come nastri con uno dei monomeri evidenziato in blu, gli altri sono in grigio; il ligando è rappresentato come struttura a bastoncino, in arancione sono evidenziati gli atomi di carbonio, in rosso quelli di ossigeno e in blu quelli di azoto. La molecola ligando si lega alla sommità del pentamero di VP1 che corrisponde alla superficie capsidica. **B)** Particolare del legame.

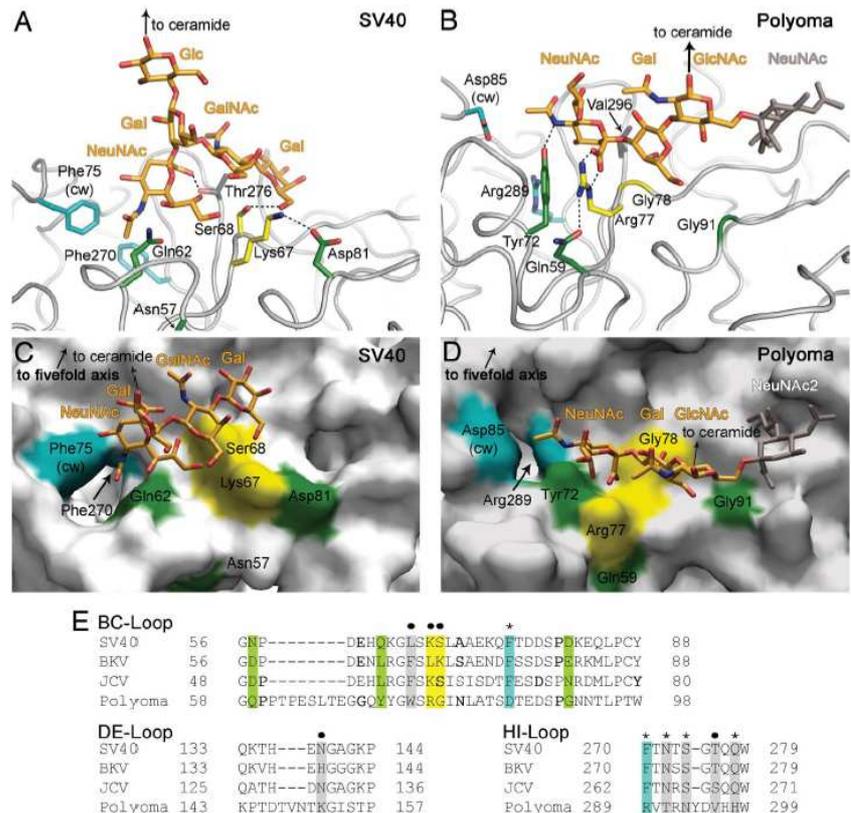


Figura 4: Legame tra SV-40, polyomavirus e il loro ligando naturale in differenti orientamenti e conformazioni. **A e B)** Confronto delle specifiche interazioni tra SV-40 (A) e polyomavirus (B) e il loro ligando. **C e D)** Conformazione dei siti di legame di VP1 in SV-40 (C) e in polyomavirus (D). **E)** Allineamento della sequenza aminoacidica di VP1 di SV-40, BKV e JCV. L'asterisco identifica i residui identici tra SV-40, BKV e JCV; il punto identifica i residui identici in almeno due dei tre polyomavirus.

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 opposta²⁴. 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; **Puro α** proteina che controlla la replicazione e la trascrizione del DNA, in particolare promuove la trascrizione dei geni precoci e viene inibita da TAg²⁵. 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 della 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 virale²⁶. Infatti la regione regolatoria sembra controllare la trascrizione cellulo-specifica del DNA virale come è stato osservato negli studi di Sock et al.²⁷ 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 bassa²⁸. Allo scopo di classificare più agevolmente i genotipi di JCV, *Ault* e *Stoner*²⁹ (vedi **figura 5**) divisero arbitrariamente la sequenza archetipo individuata da *Yogo et al.*³⁰, 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 Takemoto³¹ **O**(124bp), **P**(68bp), **Q**(39bp), **R**(63bp) ed **S**(63bp), basandosi su una sequenza archetipo (BKV-WW).

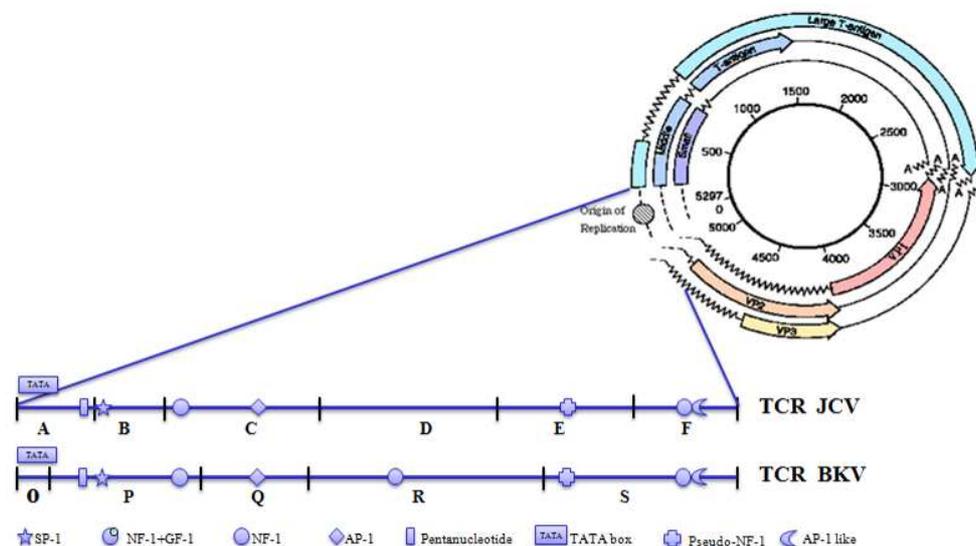


Figura 5: Divisione in blocchi di sequenza della regione regolatoria (TCR) in base al legame di fattori trascrizionale della cellula ospite, rispettivamente di JCV e di BKV.

I PVs umani sono virus ubiquitari; infatti circa il 60-80% degli adulti possiede anticorpi della classe IgG diretti contro BKV e JCV¹. 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 aerea³², 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, urotelio¹, tessuto stromale tonsillare, linfociti B e loro precursori³².

I virus aderiscono alla membrana citoplasmatica della cellula ospite tramite la proteina capsidica VP1³³, 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 6**). 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.

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 pRB³⁴ 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 dializzati³⁵.

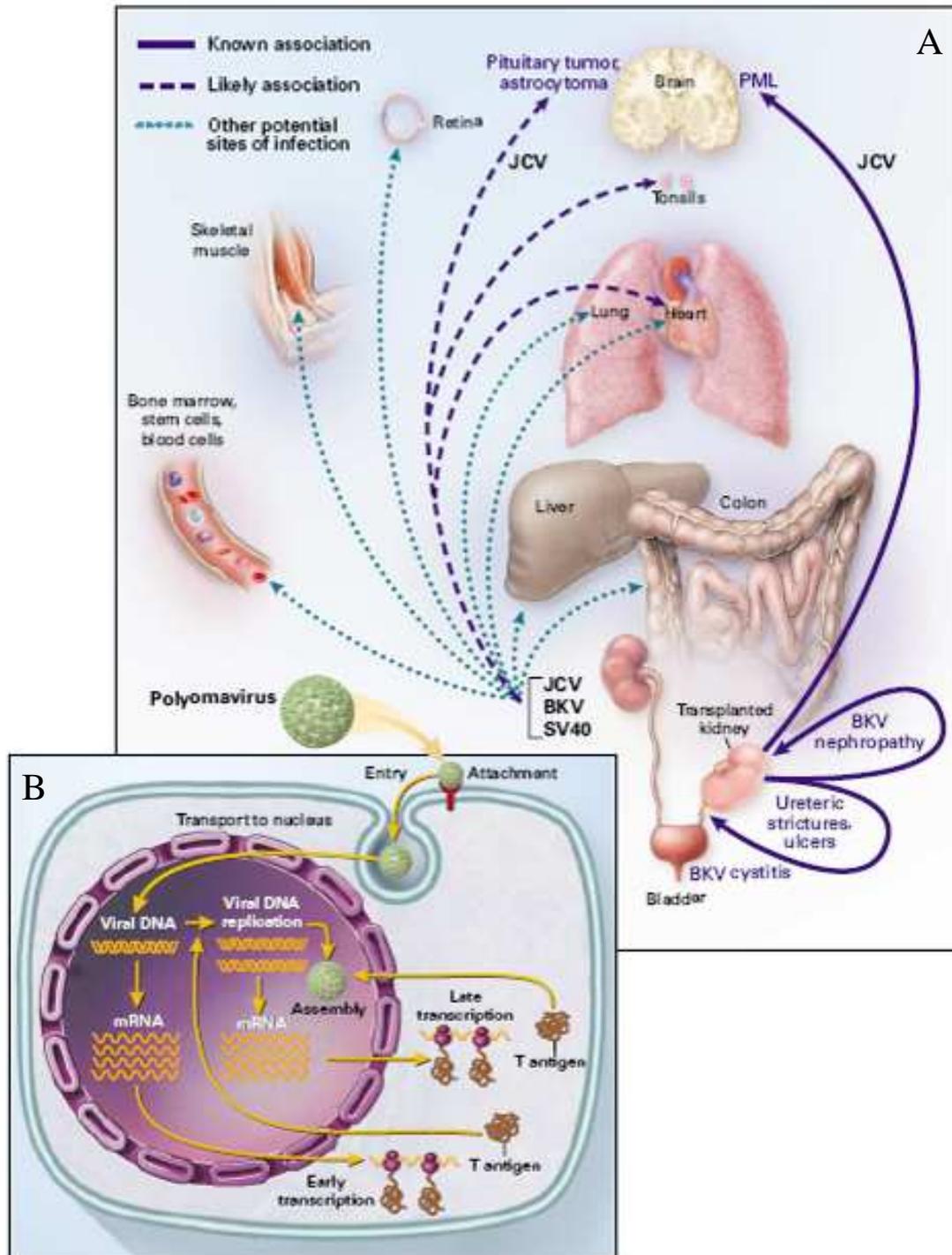


Figura 6: **A)** Principali siti di latenza noti dei PVs umani, JCV e BKV, e di SV-40 all'interno dell'organismo umano. **B)** Ciclo replicativo dei PVs. FASE 1 Il virus interagisce con i recettori di membrana della cellula ospite; FASE 2 in seguito all'interazione tra il virus e il recettore di membrana 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 escitica vengono liberati nell'ambiente esterno (FASE 11,12 e 13).

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^{2,3}, di trapianto allogenico di midollo osseo⁴ e di trapianto renale⁵.

Allo stato attuale delle conoscenze possiamo affermare che JCV sia sicuramente l'agente eziologico della PML³⁶, mentre BKV è attualmente riconosciuto come agente eziologico delle cistiti emorragiche in pazienti riceventi trapianto di midollo osseo eterologo³⁷ 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.

Nefropatia associata a PVs

La nefropatia associata a PVs (PVAN) consiste in una 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-interstiziale³⁸. Tale patologia è causata in prevalenza da infezione-riattivazione di BKV³⁹, anche se di recente è stato riportato un caso di possibile coinvolgimento di JCV⁴⁰. La PVAN, esclusiva dei soggetti immunodepressi in corso di trapianto renale, può essere causata da una riattivazione di virus latente nel soggetto ricevente l'organo trapiantato o, in alternativa, da una nuova infezione veicolata dall'organo trapiantato. Le cause principali della riattivazione sono le terapie farmacologiche anti-rigetto⁴¹ (in particolare mofetil-mycophenolato, ciclosporina A e prednisone), ma ci possono essere altri fattori di rischio come l'età avanzata (le persone anziane rispondono di più all'immunosoppressione), il sesso (i maschi sono più a rischio), il siero-stato (l'80% dei pazienti con PVAN presenta BKV nel siero prima del trapianto)³⁸. La diagnosi di PVAN si basa su elementi clinici, di laboratorio e su indagini cito-istologiche effettuate su urine e biopsia renale.

I sintomi della infezione sono aspecifici e in gran parte simili a quelli che si osservano in corso di rigetto acuto interstiziale mentre gli esami di laboratorio evidenziano generalmente un incremento aspecifico della creatinina sierica. 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 virale⁴². Tale reperto, è costantemente presente nei soggetti con PVAN, 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 PVAN 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.

In caso di PVAN, la biopsia renale evidenzia un quadro di nefrite tubulo-interstiziale (**Figura 7**) (infiltrati mononucleari interstiziali, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale) associata alla presenza delle tipiche inclusioni virali intranucleari, dimostrabili morfologicamente e con metodiche immunostochimiche in cellule epiteliali.

Lo sviluppo della PVAN può essere diviso in stadi³⁸:

- **STADIO A:** coinvolgimento focale midollare della cellule epiteliali del tubulo, inclusioni nucleari limitate;
- **STADIO B:** estensivo coinvolgimento del rene con alterazioni citoplasmatiche diffuse o multifocali, necrosi e primi segni di fibrosi;
- **STADIO C:** fibrosi interstiziale, i tubuli sono atrofici e appiattiti.

Dai dati della letteratura emerge che l'infezione-riattivazione di BKV nei soggetti trapiantati di rene rappresenta un evento molto frequente (nell'ordine del 70% dei pazienti) mentre la malattia conclamata si osserva in una netta minoranza (2-7%)⁴³. Tale discrepanza può dipendere da vari fattori, in parte legati all'ospite (età, sesso, tipo e livello di immunodepressione, fattori geografici) e in parte legati al virus. Tra questi ultimi di particolare rilevanza sembra essere il genotipo virale, quale determinato dalle caratteristiche specifiche della regione regolatoria che, come precedentemente detto, presiede al controllo della replicazione ed infettività virale; più recentemente è emerso il possibile ruolo di JCV come co-fattore coinvolto nel danno renale da polyomavirus.

Le possibili vie di trasmissione dell'infezione da PVs umani

La modalità con cui i PVs si diffondono all'interno della specie ospite rimane, di sicuro, uno degli aspetti più oscuri e di difficile studio della loro storia naturale, non solo per quanto riguarda i PVs umani, ma anche per i PVs infettanti altre specie come il Polyomavirus murino (*Murine Polyoma virus* (MuPyV⁴⁴ o SV-40⁴⁵). Per quanto riguarda le possibili vie di trasmissione dei PVs umani BKV e JCV 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 dalla gola di individui immunocompromessi⁴⁶, e soprattutto nel tessuto tonsillare di bambini con ricorrenti patologie respiratorie⁴⁷. 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^{48,49}. 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 urine⁵⁰.
- **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 gastrointestinale⁴⁶. 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)⁵¹.
- **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 sieronegativo⁵².
- **Trasmissione verticale:** quest'ultima via di trasmissione è stata proposta da alcuni autori sulla base di osservazioni epidemiologiche che evidenziano sia la presenza di IgG anti JCV e BKV nel sangue di soggetti in età pediatrica⁵³, sia la presenza di materiale genomico di SV-40 all'interno di tumori pediatrici⁵⁴. In particolare è stata proposta la **trasmissione per via trans-placentare**, anche se non si esclude la possibilità di trasmissione nel periodo perinatale. L'ipotesi della trasmissione trans-placentare viene supportata sia da studi epidemiologici, che hanno messo in evidenza la presenza di IgG anti JCV e BKV nel sangue di cordone ombelicale in neonati sani⁵⁵, sia da studi sperimentali effettuati sulla possibilità di trasmissione trans-placentare di analoghi Polyomavirus nel topo (*Murine Polyoma virus* (MuPyV))⁴⁴ e nel criceto (SV-40)⁵⁶ dimostranti il passaggio di virioni attraverso il cordone ombelicale durante l'infezione virale acuta. Tale ipotesi viene, 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 PVs⁵⁷. 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 sierologiche, non sono riusciti a dimostrare con certezza la possibilità di una significativa trasmissione trans-placentare dell'infezione^{58,59}, pertanto tale modalità di trasmissione è tuttora controversa.

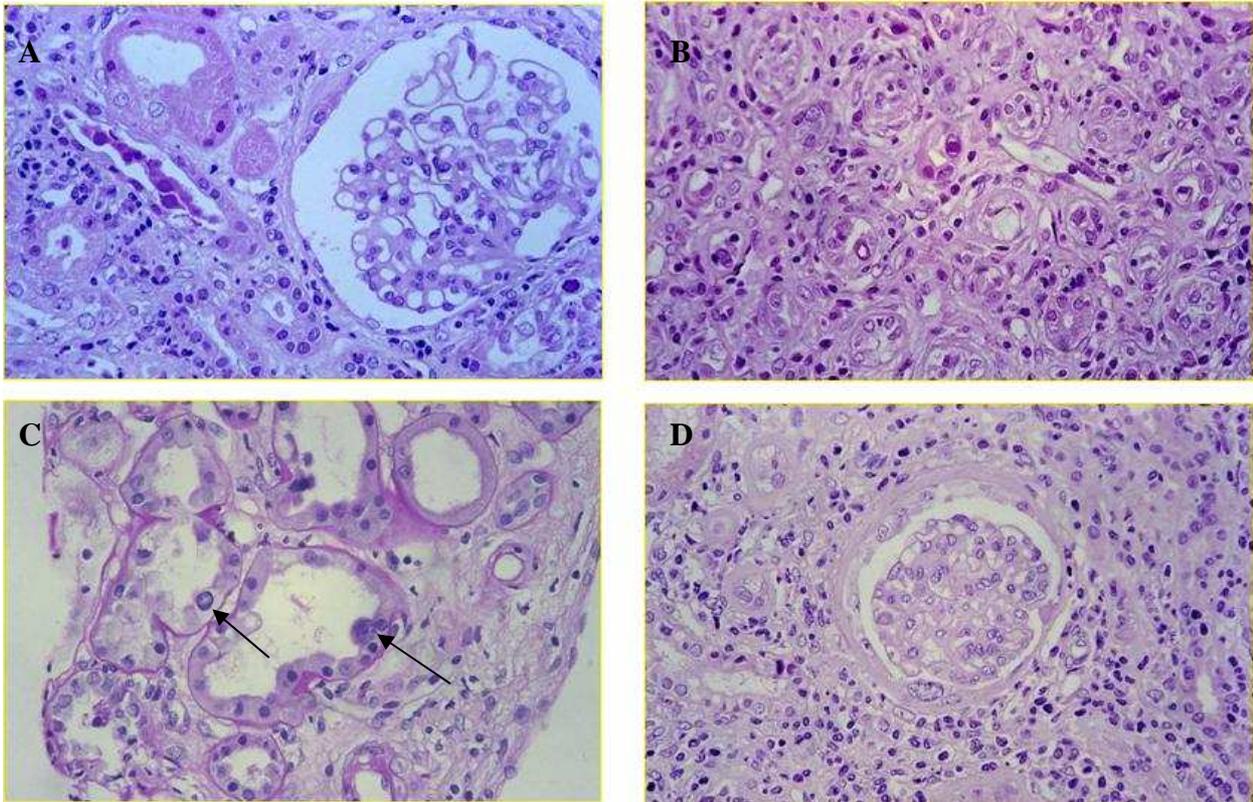


Figura 7: Biopsie renali di soggetti con nefropatia polyomavirus-associata: A,B,C) Varie tipologie di inclusi virali in cellule tubulari renali (freccie) e D) in cellula parietale di capsula di Bowman (freccia).

Ematossilina-Eosina, Ingrandimenti originali: 250x

SCOPO DELLA TESI

Durante il periodo di dottorato la candidata ha seguito due differenti progetti di ricerca, volti entrambi a chiarire alcuni punti oscuri dell'infezione da polyomavirus umani, ma in contesti differenti.

Il primo progetto di ricerca ha riguardato l'analisi di sequenza dell'intera regione codificante la proteina capsidica VP1 di BKV in soggetti trapiantati renali allo scopo di identificare eventuali mutazioni aminoacidiche che possano influire sulla patogenicità virale. Nello specifico è stato condotto uno studio, in collaborazione con il Laboratorio di Patologia e di Ricerca Traslazionale del Ospedale "San Giuseppe" di Milano, su una casistica di pazienti trapiantati renali afferenti al Centro Trapianti di Rene dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" che hanno sviluppato nel corso degli anni PVAN istologicamente dimostrata e, per confronto, su una popolazione di pazienti con infezione da Polyomavirus ma che non hanno sviluppato PVAN (gruppo di controllo).

Il secondo progetto di ricerca, invece, è stato volto a chiarire la possibile trasmissione verticale dei polyomavirus umani BKV e JCV e del polyomavirus di scimmia SV-40. Allo scopo di investigare la trasmissione trans-placentale è stato condotto uno studio di carattere osservazionale su una popolazione non selezionata di donne con gravidanza fisiologica in fase terminale (37° settimana di gestazione), afferenti alla I divisione di Ostetricia e Ginecologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità", e i rispettivi neonati utilizzando metodiche molecolari qualitative per identificare ed eventualmente caratterizzare i PVs presenti. In una fase successiva, allo scopo di valutare la trasmissione verticale (inclusa la via trans-placentare), lo studio è stato esteso a tutti i tre trimestri gestazionali e al primo mese di vita dei bambini. Nello specifico, è stata presa in esame una nuova casistica costituita da una popolazione di donne con gravidanza sia fisiologica che patologica afferenti alla I divisione di Ostetricia e Ginecologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" e i rispettivi bambini afferenti al reparto di Pediatria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità". In questo studio sono state utilizzate metodiche molecolari sia qualitative che quantitative per identificare e caratterizzare i PVs presenti, inoltre in collaborazione con Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Pediatria della "Johns Hopkins" University School of Medicine di Baltimora, sono stati determinati i livelli sierologici di immunoglobuline specifiche contro i BKV e JCV sia nelle donne in corso di gravidanza che nei rispettivi bambini durante il primo mese di vita.