

Alma Mater Studiorum-Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE BIOMEDICHE: PROGETTO N°1
BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

Ciclo XXV

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/07

Sigla Settore Concorsuale: 06\A3

TITOLO TESI

**VIRUS ONCOGENI A DNA IN TUMORI UMANI: STUDIO
DELLE INFEZIONI DA PAPPILLOMAVIRUS E
POLIOMAVIRUS IN NEOPLASIE DI DIVERSA ORIGINE**

Presentata da: Dott.ssa Federica Alessandrini

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Correlatore
Dott.ssa Monica Cricca

Esame finale anno 2013

INDICE

Introduzione	8
1. I virus Oncogeni	
1.1. Le tappe storiche dalla loro scoperta	8
1.2. Genetica molecolare del cancro	12
1.3. Oncogenesi virale	16
1.3.1. Virus tumorali ad RNA	16
1.3.2. Virus tumorali a DNA	18
1.3.3. Che cosa è la trasformazione e come si collega alla tumorigenesi?	18
1.3.4. Come si può collegare la tumorigenesi con l'infezione virale?	19
1.3.5. Origine funzionale delle proteine virali trasformanti	23
1.4. Epidemiologia dei tumori associati ad infezioni da virus oncogeni umani	26
2. Polyomavirus	
2.1. Introduzione	30
2.2. Struttura del genoma e ciclo vitale	33
2.3. Genetica della trasformazione: i riprogrammatori della cellula ospite	37
2.3.1. Antigene T grande	37
2.3.2. Antigene t piccolo	38
2.3.3. Agnoproteina	40
2.3.4. Proteine T'	40
2.4. Meccanismo di trasformazione: interazione di TAg con le proteine cellulari pRb e p53	41
2.5. Polyomavirus JC: dalla PML all'associazione con i tumori umani	44
2.6. Polyomavirus SV40: dalla patologia animale all'associazione con i tumori umani	47
3. Papillomavirus umani	
3.1. Classificazione	49
3.2. Organizzazione del genoma	51
3.3. Ciclo di vita dei papillomavirus umani	53
3.4. Trasformazione indotta da HPV	58
3.5. Risposta immunitaria all'infezione da HPV	64
3.6. Trasmissione, patogenesi e manifestazioni cliniche dell'infezione da HPV	65
3.6.1. Infezioni della cute	67

3.6.2.	Infezioni del distretto testa-collo	69
3.6.3.	Infezioni da HPV nel tratto ano-genitale	71
3.7.	Vaccini per HPV	76
3.8.	Associazione di HPV ad altri tipi di cancro nell'uomo	77
4.	Tumori umani	
4.1.	Tumori mesenchimali	
4.1.1.	Tumori ossei	
4.1.1.1.	Osteosarcoma	80
4.1.1.2.	Tumore a Cellule Giganti	83
4.1.1.3.	Condrosarcoma	85
4.2.	Tumori epiteliali	
4.2.1.	Carcinoma mammario	
4.2.1.1.	Ghiandola Mammaria	89
4.2.1.2.	Cenni Epidemiologici	91
4.2.1.3.	Fattori Di Rischio	91
4.2.1.4.	Carcinoma Mammario nell'uomo	93
4.2.1.5.	Malattie Benigne Della Mammella	93
4.2.1.6.	Tumori Maligni Della Mammella	95
4.2.1.7.	Classificazione Molecolare Del Cancro Alla Mammella	96
4.2.1.8.	Diagnosi e Trattamenti	98
4.3.	Tumori del tessuto neuroepiteliale	
4.3.1.	Glioblastoma Multiforme	99
	Lavoro sperimentale	
5.	Scopo della tesi	102
6.	Materiali e metodi	106
6.1.	Tumori ossei e polyomavirus SV40 e JCV	
6.1.1.	Campioni clinici	106
6.1.2.	Estrazione del DNA	107
6.1.3.	PCR Real-time (PCR-RT)	108
6.1.4.	PCR qualitativa e Nested-PCR	110
6.1.5.	Controlli positivi plasmidici per i saggi di PCR	111
6.1.6.	Amplificazione del housekeeping per la β -actina (ACTB)	113

6.2. Carcinoma mammario e HPV	113
6.2.1. Campioni clinici	114
6.2.2. Linee cellulari	115
6.2.3. Citoinclusi di linee cellulari	115
6.2.4. Estrazione del DNA	115
6.2.5. Tecniche di PCR per la ricerca del genoma virale	116
6.2.6. Ibridazione in situ cromogenica (CISH)	125
6.2.7. Controlli positivi per i saggi di PCR	126
6.3. Glioblastoma multiforme e HPV	
6.3.1. Campioni clinici	127
6.3.2. Estrazione del DNA	128
6.3.3. PCR Nested MY-GP	128
6.3.4. Ibridazione in situ cromogenica (CISH)	128
6.3.5. Immunoistochimica (IHC)	129
6.3.6. Analisi statistiche	129
7. Risultati	
7.1. Tumori ossei e polyomavirus SV40 e JCV	
7.1.1. Saggi di PCR	129
7.1.2. Amplificazione del DNA virale mediante tecniche di PCR	131
7.2. Carcinoma mammario e HPV	
7.2.1. Valutazione del sistema di raccolta dei secreti mammari	133
7.2.2. Saggi di PCR	134
7.2.3. CISH	138
7.2.4. Amplificazione del DNA virale mediante tecniche di PCR: prevalenza di HPV e correlazione con i dati clinici	140
7.3. Glioblastoma multiforme e HPV	
7.3.1. Dati clinici ed analisi istologica dei campioni	145
7.3.2. Amplificazione del DNA virale mediante PCR-Nested MY/GP	146
7.3.3. Ricerca del genoma virale mediante CISH	146
7.3.4. Analisi della produttività dell'infezione virale	147
7.3.5. Effetto prognostico dell'infezione virale nel GBM	147
8. Discussione	151
9. Bibliografia	166

*Oh stupendo era sentirsi
Solo eppure non solingo.
Dopo il buio e la paura
Giunger in vista delle patrie mura.*

WALTER DE LA MARE

DNA TUMOR VIRUSES IN HUMAN CANCER: STUDY OF POLYOMAVIRUS AND PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS IN TUMORS OF DIFFERENT ORIGIN.

Tumor viruses induce oncogenesis in their natural host or in experimental animal systems by manipulating an array of different cellular pathways. To date, seven human viruses have been identified to cause or contribute to specific human cancers. Furthermore some viruses such as HPV, JCV and SV40, have been associated with a large number of human cancers in non conventional body sites; but, in spite of many years of research, no viral etiology have been confirmed for these tumors. The aim of this study was to evaluate the presence and significance of both JCV and SV40 in human bone tumors, and HPV in breast carcinoma (BC), galactophorectomy (GF), pathological nipple discharge (ND) and glioblastoma multiforme (GBM). Molecular biology techniques (PCR) and chromogenic in situ hybridization (ISH) were employed to examine specimens of tumor tissue from 70 bone tumors (20 Osteosarcomas[OS], 20 Giant Cell Tumors [TCG], 30 Condrosarcomas [CS]), 168 BCs, 30 GFs, 59 GBMs and 30 specimens of ND. SV40 and JCV genomes were found in 70% of CS + 20% of OS, and in 13% of CS +10% of TCG, respectively. HPV DNA was detected in 30% of BC patients, in 27% of GF specimens and in 13% of NDs. HPV16 was the most common type observed in all these samples, attended by HPV18 and HPV35. In addition, HPV DNA was found in 22% of patients with GBM; in this tumor HPV6 was the most frequent type detected, followed by HPV16. ISH data showed that HPV DNA was located in breast and GBM tumor cells. Our results suggest a possible role of JCV, SV40 and HPV in the induction of these different tumors. However, detection of viruses in human tumors does not prove that they cause those malignancies. Several different criteria need to be met before viral etiology could be established.

VIRUS ONCOGENI A DNA IN TUMORI UMANI: STUDIO DELLE INFEZIONI DA PAPPILLOMAVIRUS E POLIOMAVIRUS IN NEOPLASIE DI DIVERSA ORIGINE.

I virus tumorali inducono oncogenesi nel loro ospite naturale o in sistemi animali sperimentali, manipolando diverse vie cellulari. Ad oggi, sono stati identificati sette virus capaci di causare specifici tumori umani. Inoltre HPV, JCV ed SV40, sono stati associati con un grande numero di tumori umani in sedi corporee non convenzionali, ma, nonostante molti anni di ricerca, nessuna eziologia virale è stata ancora confermata. Lo scopo di questo studio è stato di valutare la presenza ed il significato sia di JCV ed SV40 in tumori ossei umani, e di HPV nel carcinoma della mammella (BC), galattoforectomie (GF), secrezioni mammarie patologiche (ND) e glioblastoma multiforme (GBM). Tecniche di biologia molecolare sono state impiegate per esaminare campioni di tessuto tumorale di 70 tumori ossei (20 osteosarcomi [OS], 20 tumori a cellule giganti [TCG], 30 condrosarcomi [CS]), 168 BCs , 30 GFs, 59 GBM e 30 campioni di ND. Il genoma di SV40 e JCV è stato trovato nel 70% dei CS + 20% degli OS, e nel 13% dei CS +10% dei TCG, rispettivamente. Il DNA di HPV è stato rilevato nel 30% dei pazienti con BC, nel 27% dei campioni GF e nel 13% dei NDs. HPV16 è stato il genotipo maggiormente osservato in tutti questi campioni, seguito da HPV18 e HPV35. Inoltre, il DNA di HPV è stato trovato nel 22% dei pazienti con GBM, in questo tumore HPV6 era il tipo più frequentemente rilevato, seguito da HPV16. L' ISH ha mostrato che il DNA di HPV è situato all'interno di cellule tumorali mammarie e di GBM. I nostri risultati suggeriscono un possibile ruolo di JCV, SV40 e HPV in questi tumori, se non come induttori come promotori del processo neoplastico, tuttavia diversi criteri devono ancora essere soddisfatti prima di chiarirne il ruolo.

INTRODUZIONE

1. I virus Oncogeni

1.1. Le tappe storiche dalla loro scoperta

Gli Oncovirus sono virus che inducono il cancro nei loro ospiti naturali o in sistemi sperimentali animali. Questo termine ha avuto origine dagli studi compiuti tra gli anni 1950-'60 sui retrovirus acutamente trasformanti, spesso definiti virus oncogeni ad RNA. Attualmente, con il termine "Oncovirus" (ormai divenuto sinonimo di "virus tumorale" o "virus cancerogeno") si identifica un piccolo sottogruppo di circa 2000 virus riconosciuti, classificati in virus tumorali a DNA e virus tumorali ad RNA in base alla natura degli acidi nucleici contenuti nel virione. La maggior parte dei virus animali ed umani non provocano tumori, probabilmente a causa del lungo processo co-evolutivo tra il virus ed il suo ospite. Anche molti Oncovirus non causano il cancro nei loro ospiti naturali, ma diventano tumorigenici quando vengono iniettati in alcune specie di laboratorio. Tuttavia, alcuni virus tumorali sono stati strettamente associati all'insorgenza di alcuni tipi di neoplasie umane. I meccanismi con cui i virus tumorali a DNA ed RNA inducono cancro nella specie umana o in animali da laboratorio sono differenti, sebbene siano presenti alcune caratteristiche condivise, il cui studio ha contribuito fortemente alla comprensione degli eventi molecolari che guidano la tumorigenesi.

Risalgono a poco più di un secolo fa le prime scoperte relative ai virus tumorali (Fig.1). La prima dimostrazione che il cancro potesse essere trasmesso attraverso estratti tumorali privi di cellule e che quindi potesse essere causato da un piccolo agente trasmissibile, probabilmente un virus, fu fornita da Francis Peyton Rous nel 1908, attraverso esperimenti di trasmissione virale a partire da sarcoma aviario. Il *virus del sarcoma di Rous (RSV)* fu il primo retrovirus oncogeno identificato come tale, ed era destinato ad avere un ruolo di primo piano nello sviluppo delle attuali conoscenze sul cancro [Rous P. (1911)].

I progressi compiuti nel campo della virologia tumorale furono scarsi fino agli anni trenta, periodo nel quale cominciarono ad essere descritti i primi virus tumorali dei mammiferi come il *papillomavirus del coniglio (CRPV)* e il *virus del tumore*

mammario del topo (MMTV) [Shope, R. E. & Hurst, E. W. (1933). Bittner, J. J. Some (1936)].

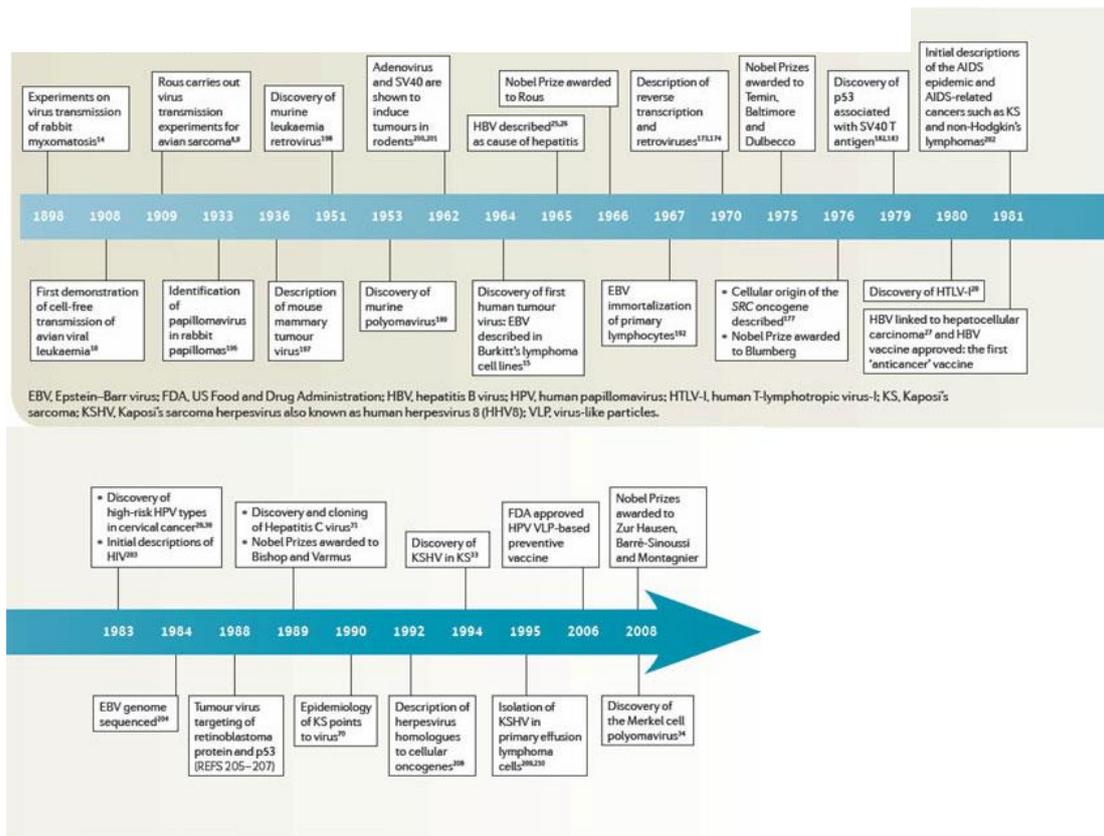


Fig.1: Linea del tempo: scoperte ed avvenimenti di rilievo nel campo della virologia tumorale dell'ultimo secolo.

L'interesse relativo alle cause virali del cancro si raddoppiò negli anni cinquanta in seguito alla scoperta del *virus della leucemia murina (MLV)*, retrovirus oncogeno acutamente trasformante, compiuta da Ludwik Gross [Gross L. (1951)].

Solo nel 1964 fu descritto il primo virus tumorale umano, il *virus di Epstein-Barr (EBV)*, noto anche come herpesvirus umano 4 (HHV4), grazie alle osservazioni di microscopia elettronica compiute da Anthony Epstein, Bert Achong e Yvonne Barr, che permisero di identificare le particelle virali di EBV in linee cellulari di pazienti africani con linfoma di Burkitt [Epstein M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. (1964)]. Oltre ad EBV sono stati scoperti altri sei virus tumorali (Tab. 1) che, ad oggi, sono ampiamente accettati come causa di tumori umani invasivi.

Virus	Genome	Notable cancers	Year first described
Epstein-Barr virus (EBV; also known as human herpesvirus 4 (HHV4))	Double-stranded DNA herpesvirus	Most Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, most lymphoproliferative disorders, some Hodgkin's disease, some non-Hodgkin's lymphoma and some gastrointestinal lymphoma	1964
Hepatitis B virus (HBV)	Single-stranded and double-stranded DNA hepadenovirus	Some hepatocellular carcinoma	1965
Human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I)	Positive-strand, single-stranded RNA retrovirus	Adult T cell leukaemia	1980
High-risk human papillomaviruses (HPV) 16 and HPV 18 (some other α -HPV types are also carcinogens)	Double-stranded DNA papillomavirus	Most cervical cancer and penile cancers and some other anogenital and head and neck cancers	1983-1984
Hepatitis C virus (HCV)	Positive-strand, single-stranded RNA flavivirus	Some hepatocellular carcinoma and some lymphomas	1989
Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV; also known as human herpesvirus 8 (HHV8))	Double-stranded DNA herpesvirus	Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma and some multicentric Castlemans disease	1994
Merkel cell polyomavirus (MCPyV)	Double-stranded DNA polyomavirus	Most Merkel cell carcinoma	2008

Tab.1: Virus tumorali umani.

A questa breve lista si cerca continuamente di aggiungere nuovi candidati, ma molti di loro hanno ancora un ruolo controverso e poco chiaro nei tumori umani. Una sorprendente conclusione che si può trarre da questo (ancora) scarso elenco è che i virus tumorali umani non appartengono ad un' unica classe virale. Infatti, sebbene gran parte del secolo scorso sia stato dedicato alla ricerca di retrovirus semplici (simili al virus del sarcoma di Rous) come possibili responsabili del cancro umano, solo il retrovirus complesso *HTLV-I (virus T-linfotropico umano I)* è stato ascritto alla classe dei retrovirus oncogeni. E' evidente che i virus oncogeni dell'uomo coprono l'intero repertorio virologico e comprendono retrovirus esogeni (*HTLV-I*), virus con genoma ad RNA a singolo filamento positivo (*virus dell'epatite C (HCV)*), virus a DNA con caratteristiche retrovirali (*virus dell'epatite B (HBV)*), ma anche i grandi virus con DNA a doppio filamento (*EBV e l'herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV, noto anche come herpesvirus umano 8 (HHV8))*) ed i piccoli virus con DNA a doppio filamento (come il *papillomavirus umano (HPV)* ed il *poliomavirus a cellule di Merkel (MCPyV)*). Pertanto, non sembra esserci una evidente "regola molecolare" che includa od elimini a priori un agente infettivo dalla lista dei potenziali virus tumorali umani.

Le tecniche virologiche tradizionali hanno avuto scarso successo nella scoperta dei virus tumorali umani. Dopo l'identificazione dei virioni di EBV attraverso tecniche di microscopia elettronica a partire da colture cellulari, solo la scoperta di HTLV-I, compiuta da Poiesz e Gallo nel 1980, ha seguito gli stessi passi [Poiesz, B. J. et al.(1980). Gallo, R. C. (2005).]. Al contrario, HBV, scoperto poco dopo EBV a metà

del 1960 da Blumberg, e solo di recente propagato con successo in coltura, è stato inizialmente collegato all'epatite acuta piuttosto che al cancro attraverso l'utilizzo della sierologia [Blumberg, B. S. et al..(1965)]. Il ruolo di HBV nel carcinoma epatocellulare è stato stabilito solo sedici anni più tardi [Beasley RP, et al.. (1981)].

Gli altri quattro virus oncogeni sono stati scoperti sotto forma di elementi genetici, utilizzando tecniche di biologia molecolare piuttosto che virologiche. Poiché già dal 1800 si sospettava che l'attività sessuale potesse essere un fattore di rischio per il cancro cervicale, Harald zur Hausen aveva pensato che il papillomavirus potesse contribuire allo sviluppo di questo tumore a causa del ruolo, già accertato, nella trasmissione sessuale delle verruche genitale [zur Hausen, H..(1976)]. Nei primi anni '80, lui ed i suoi colleghi cross-ibidizzarono il DNA di un papillomavirus conosciuto con il DNA proveniente da un cancro del collo dell'utero, scoprendo due genotipi di papillomavirus ad alto rischio (HPV-16 e HPV-18) che, successivamente, furono ritrovati nella maggior parte dei tumori cervicali [zur Hausen H.. (1983). Boshart, M. et al..(1984)]. Come HBV, anche HPV si propaga male in coltura nella maggior parte dei tipi cellulari, ma viene mantenuto come virus integrato e non produttivo in cellule Caski, Hela e SiHa.

A metà degli anni settanta, lo statunitense Harvey J. Alter dimostrò come la maggior parte dei casi di epatite post-trasfusionale non fossero causati dal virus dell'epatite A o B. Solo nel 1989, utilizzando tecniche di panning anticorpale su librerie di cDNA costruite a partire da sieri di scimpanzé sperimentalmente infettati, venne isolato e clonato un antigene ricombinante associato a un virus inizialmente chiamato epatite nonA-nonB (NANBH), trasmesso per via parenterale e denominato poi virus dell'epatite C o HCV [Choo, Q. L. et al.. (1989)]. L'isolamento di frammenti genomici del flavivirus HCV, venne utilizzata, subito dopo, per dimostrare che questo nuovo virus, come il virus dell'epatite B, è associato al carcinoma epatocellulare. HCV è stato solo recentemente propagato in linee cellulari [Wakita, T. et al.. (2005)]. Negli anni '90, le ricerche delle cause virali del Sarcoma di Kaposi e del carcinoma a cellule di Merkel (MCC), portarono alla scoperta di KSHV nel 1994 e MCPyV nel 2008, da parte di un team di scienziati coordinato da Yuan Chang e Patrick Moore [Chang, Y. et al.. (1994). Feng, H. et al.. (2008)]. Queste scoperte si sono entrambe basate su metodiche molecolari e bioinformatiche di nuovo sviluppo, particolarmente sull'uso delle tecnologie di sottrazione degli acidi nucleici, sebbene l'approccio sperimentale effettivo avutosi nelle due scoperte sia stato diverso. Infatti, KSHV è

stato identificato mediante sottrazione fisica del DNA (analisi delle differenze di rappresentatività (RDA)) a partire da DNA estratto da Sarcoma di Kaposi e da quello proveniente dal tessuto sano dello stesso paziente [Lisitsyn, N. et al.. (1993)]. Invece, sequenze di MCPyV sono state identificate attraverso una tecnica denominata sottrazione digitale del trascrittoma (DTS) e l'uso del sequenziamento high throughput di librerie di cDNA costruite a partire da 4 tumori MCC. Applicando la tecnica DTS agli MCC, vennero trovate sequenze virali appartenenti a questo nuovo poliomavirus umano, denominato poliomavirus a cellule di Merkel, che causa una rara neoplasia delle cellule neuroendocrine cutanee e che venne identificato nell'80% dei casi di MCC.

Per comprendere il ruolo che i virus giocano nei tumori umani, i virologi hanno affrontato (e devono affrontare) molte difficoltà nel trovare un approccio metodologico alternativo a quello tradizionale (basato sulla coltura virale e la microscopia elettronica) che spesso non fornisce risultati adeguati negli studi relativi alla virologia del tumore. A questo va aggiunta la lenta presa di coscienza che l'infezione virale, da sola, non è sufficiente ad indurre il processo di tumorigenesi. Solo in alcuni casi specifici, come per KSHV nel sarcoma di Kaposi e HPV nel cancro della cervice uterina, tali virus possono essere considerati necessari, in quanto universalmente presenti in questi tumori. Pertanto, il concetto che un virus possa essere necessario e sufficiente per lo sviluppo di una neoplasia, è troppo semplicistico per poter essere utilizzato nella moderna ricerca sul cancro. Poiché la tumorigenesi è un complesso processo composto da più fasi, è ormai evidente che molti eventi molecolari cooperano alla creazione di un fenotipo cellulare trasformato e, tra questi, anche l'infezione virale.

1.2.Genetica molecolare del cancro

Un tumore (dal latino tumor, «rigonfiamento») o neoplasia (dal greco néos, «nuovo», e plásis, «formazione») può verificarsi in quasi tutti i diversi tipi di tessuto presenti nei metazoi superiori, ed anche all'interno dello stesso tessuto può presentare spesso varie forme con proprietà e comportamento clinico peculiare. Alcune proprietà dei tumori chiaramente riflettono quelle del tessuto da cui hanno avuto origine e, probabilmente, il particolare tipo cellulare all'interno del tessuto, mentre altre sono

conseguenza di eventi genetici ed epigenetici che si sono verificati negli stadi iniziali del tumore o durante la sua progressione.

Studi epidemiologici e molecolari suggeriscono che la tumorigenesi è un processo che avviene in presenza di eventi anomali multipli, e differenti linee di ricerca indicano che la *mutazione genetica* è l'evento di maggior importanza per l'insorgenza del tumore e la sua progressione. La maggior parte dei tumori non ha origine da un singolo evento dannoso a carico di un gene, ma è necessaria più di una mutazione per dare avvio al processo carcinogenico (Fig. 2). Non tutte le mutazioni sono direttamente associate all'induzione di una forma tumorale e la maggior parte di esse probabilmente si localizza in geni non direttamente associati allo sviluppo di una neoplasia. Infatti, di solito è necessaria una serie di mutazioni in determinate classi di geni prima che una cellula normale si trasformi in una cellula tumorale [Fearon ER. et al.. (1990)]. Solo quelle mutazioni che si verificano in geni che giocano un ruolo vitale nella divisione cellulare, nell'apoptosi e nei meccanismi di riparo del DNA causano la perdita di controllo della cellula e la sua proliferazione incontrollata. Molti sforzi attualmente si concentrano sull'identificazione di mutazioni critiche per la tumorigenesi e sulla comprensione del ruolo giocato in questo processo dai prodotti dei geni che ne sono affetti. In generale, si può affermare che i prodotti genici più frequentemente mutati nei tumori sono i proto-oncogeni, i soppressori tumorali, e quei prodotti genici che influenzano la fedeltà della replicazione del DNA, la sua riparazione, o la segregazione cromosomica e la citocinesi. I *proto-oncogeni*, la versione wild-type dei geni da cui derivano gli oncogeni, sono generalmente elementi di trasduzione del segnale che regolano la proliferazione cellulare o l'arresto, la sopravvivenza cellulare o la morte, o altri meccanismi cellulari ancora poco conosciuti. Cambiamenti genetici che trasformano un proto-oncogene in oncogene provocano l'espressione di una proteina alterata che può risultare bloccata in uno stato costitutivamente attivato e/o refrattaria alla regolamentazione da parte dei segnali a monte della via di trasduzione del segnale. Al contrario, i *soppressori tumorali* codificano proteine che normalmente servono a bloccare la proliferazione cellulare e/o ad indurre la morte. Nei tumori, le mutazioni che interessano i geni soppressori tumorali generalmente portano ad una perdita di funzione della proteina, e talvolta alla completa delezione del gene. Pertanto, qualora si verifichi una mutazione a carico di un proto-oncogene o di un soppressore tumorale, questo predispone la cellula alla tumorigenesi e all'insorgenza di una vera e propria neoplasia nel caso in cui si

verifichino alterazioni addizionali [Croce CM.. (2008)]. Una volta che, in una singola cellula si sia verificata la corretta combinazione di mutazioni genetiche, la cellula perde la sua normale crescita limitata, ed inizia a proliferare in maniera incontrollata. Allo stato attuale delle cose, è difficile capire quale di queste mutazioni contribuisca direttamente alla tumorigenesi e quali siano solo delle mere conseguenze dello stato tumorigenico. L'immagine che emerge da diversi studi molecolari suggerisce che le mutazioni genetiche contribuiscono alla tumorigenesi alterando specifiche vie di trasduzione del segnale, e poiché queste vie sono regolate a diversi livelli, l'anomalia può colpire qualunque proteina coinvolta nella cascata del segnale. Un esempio di questo principio è illustrato dalle vie che coinvolgono i soppressori tumorali del retinoblastoma (Rb) e p53. Una funzione critica delle proteine della famiglia Rb è quella di regolare l'espressione di geni necessari ad entrare e progredire nel ciclo cellulare. Molti di questi geni richiedono fattori di trascrizione E2F per la loro espressione. Nelle cellule che si trovano in fase di crescita arrestata, la trascrizione dipendente da E2F è inibita da una o più proteine soppressori tumorali della famiglia Rb, come pRb, p107, p130. A monte, diversi segnali attivano o inibiscono delle chinasi ciclina-dipendenti (cdk4 o 6) che fosforilano le proteine Rb bloccando la loro capacità di reprimere la trascrizione E2F-dipendente. Si pensa che la via di regolazione che coinvolge Rb sia alterata in quasi tutti i tumori, ma che, nei diversi tipi di cancro, questa alterazione possa avvenire a differenti livelli della via di trasduzione del segnale: in alcuni casi si verifica la delezione del gene Rb, in altri casi l'attivazione costitutiva delle chinasi che inattivano Rb, ed altri in cui si verificano delezioni dei regolatori negativi delle chinasi stesse. Allo stesso modo, la maggior parte dei tumori presentano mutazioni che inattivano la via del soppressore tumorale p53. Alcune di esse riguardano direttamente il gene p53, mentre altre alterano proteine che modulano l'attività di p53.

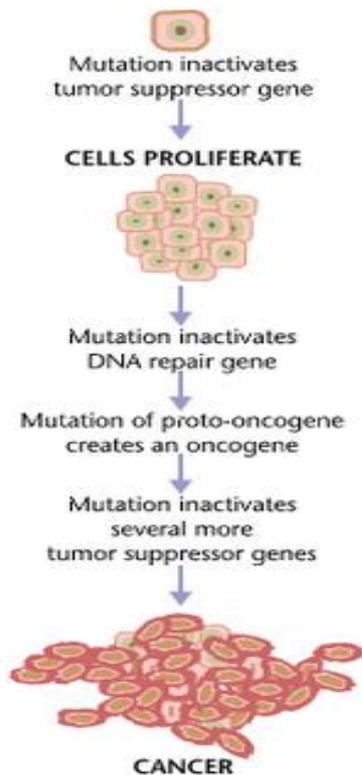


Fig. 2:
I tumori sono causati da una serie di mutazioni. Ogni mutazione altera in qualche modo il comportamento della cellula.

Si crede che la strada che conduce una cellula normale ad un tumore solido invasivo passi attraverso la progressione in diversi stadi istopatologici. In un caso idealizzato questi potrebbero includere: iperplasia, cioè un incremento anomalo della densità cellulare; displasia, indicata dall'architettura disorganizzata del tessuto; tumore benigno, cioè una massa di tessuto neoplastico non invasivo; tumore invasivo, dove il tumore penetra i tessuti adiacenti; metastasi, dove le cellule tumorali stabiliscono colonie in tessuti lontani dal sito del tumore primario (Fig. 3).

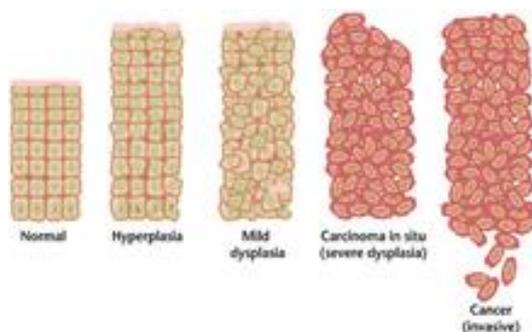


Fig. 3:
Possibili tipologie di organizzazione dei tessuti.

Si ritiene che la spinta alla progressione da uno di questi stadi al successivo sia dovuto a mutazioni che colpiscono geni diversi, presumibilmente, coinvolti in diverse vie di trasmissione del segnale [Knudson AG.. (2001)]. Tra le attuali sfide della ricerca

contro i tumori, una è rivolta alla comprensione di come l'alterazione di ogni specifica via di trasmissione del segnale possa alterare il comportamento della cellula e quindi contribuire alla progressione tumorale; d'altro canto si cerca di capire anche come l'alterazione combinata di diverse vie di trasmissione del segnale si correli a specifiche proprietà tumorali come invasività e metastasi.

1.3.Oncogenesi virale

Dove si posizionano i virus oncogeni in questo quadro e come possono influire sulla tumorigenesi?

1.3.1. Virus tumorali ad RNA

Membri specifici di diverse famiglie di virus inducono tumori in animali da esperimento, mentre alcuni di essi sono associati a forme tumorali nell'uomo (HCV, HTLV-I). I meccanismi molecolari attraverso cui essi contribuiscono all'insorgenza del tumore non sono ancora stati del tutto chiariti. In generale si può dire che i virus tumorali ad RNA inducono mutazione neoplastica attraverso il meccanismo *di mutagenesi inserzionale* (virus lentamente trasformanti) o attraverso l'acquisizione di un oncogene cellulare all'interno del genoma virale (virus acutamente trasformanti). I virus oncogeni a RNA sono distinti in virus trasformanti acuti e virus lenti (Fig. 4). I *virus acutamente trasformanti* hanno uno spiccato potere oncogeno, determinando precoce comparsa di tumori in un'alta percentuale di animali infettati, ed una elevata efficienza di trasformazione di cellule in coltura.

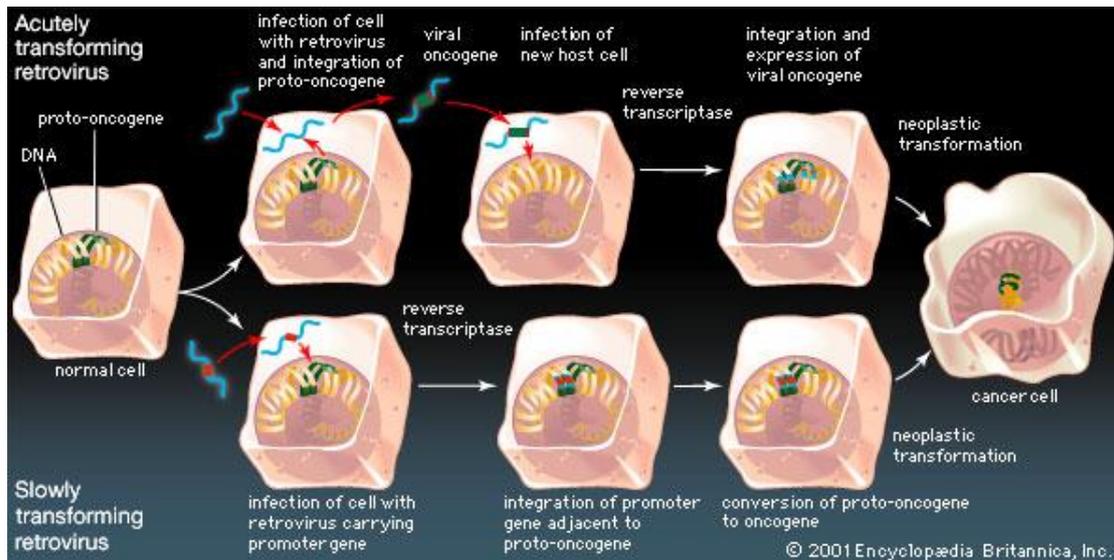


Fig. 4: Meccanismi con cui i Retrovirus causano l'insorgenza di forme tumorali.

L'alto potere oncogeno dei virus acuti è attribuita a prodotti genici di un oncogene iperattivo chiamato oncogene virale (v-onc). E' stato dimostrato che le sequenze degli oncogeni cellulari o proto-oncogeni (geni c-onc) sono omologhe a quelle dei v-onc, ma differiscono strutturalmente solo perchè le prime contengono sequenze non codificanti (introni) intercalate tra sequenze codificanti (esoni), com'è appunto generalmente proprio dei geni cellulari nei vertebrati. Si ritiene pertanto che i v-onc siano in realtà derivati dai c-onc per acquisizione delle sequenze codificanti di questi ultimi in corso di infezione (la cosiddetta "pirateria molecolare" di geni delle cellule ospiti acquisiti nel corso dell'evoluzione). Quando un retrovirus acutamente trasformante infetta una cellula, il suo genoma viene retrotrascritto, si integra in quello cellulare (l'integrazione è un passo obbligato nel ciclo di infezione produttiva dei Retrovirus) ed esprime immediatamente l'oncogene virale.

Al contrario, i *virus lentamente trasformanti* non inseriscono un oncogene virale nella cellula ospite, ma portano nel loro genoma un promotore che viene integrato nel DNA cellulare accanto o all'interno di un proto-oncogene, consentendone la sovra-espressione (e quindi la conversione in oncogene), con conseguente alterazione della proliferazione cellulare. L'effetto oncogeno dei retrovirus lenti è legato, quindi, alla capacità dei rispettivi provirus di attivare uno o più c-onc in prossimità dei quali sia avvenuta la loro integrazione nel genoma cellulare. Alcuni eventi di integrazione possono verificarsi anche entro geni cellulari con conseguente perdita dell'espressione genica o della funzione della proteina codificata. Ad esempio, l'integrazione

all'interno di un gene che codifica per un soppressore tumorale può contribuire alla tumorigenesi attraverso l'inattivazione della sua funzione. Poiché l'inserimento del genoma virale avviene in una posizione casuale del cromosoma ospite, la possibilità di inserimento vicino ad un proto-oncogene o all'interno di un soppressore tumorale è bassa, motivo per cui i virus lentamente trasformanti hanno una lunga latenza rispetto alla formazione di un tumore rispetto ai virus acutamente trasformanti, che portano già l'oncogene virale.

1.3.2. Virus tumorali a DNA

Diversi studi compiuti sui virus oncogeni a DNA hanno mostrato che essi codificano per uno o più *prodotti genici con capacità trasformante*, cioè proteine che contribuiscono alla trasformazione interagendo direttamente con i targets cellulari ed alterandone l'attività. In generale, l'azione di queste proteine virali si esplica attivando specifici oncogeni o inibendo dei soppressori tumorali. Non a caso, infatti, i soppressori tumorali p53 e pRb sono stati scoperti grazie alla loro interazione con proteine virali trasformanti.

1.3.3. Che cosa è la trasformazione e come si collega alla tumorigenesi?

Una cellula risulta trasformata quando acquisisce stabilmente la capacità di proliferare e sopravvivere in un ambiente che normalmente porterebbe all'arresto della crescita o alla morte cellulare. Al contrario, le *cellule primarie* possono crescere e dividersi quando sono messe in coltura, ma la loro capacità proliferativa è limitata ed esse alla fine entrano in fase di senescenza. Le *cellule immortalizzate*, invece, hanno una vita più lunga rispetto alle cellule primarie, ma non crescono indefinitamente in coltura; l'immortalizzazione può avvenire attraverso un meccanismo telomerasi-dipendente, nel quale si verifica una implementazione dell'attività telomerasica, ma può avvenire anche attraverso la via ALT telomerasi-indipendente. Le *cellule trasformate*, invece, possono crescere indefinitamente in coltura ed acquisiscono una serie di proprietà tra cui la perdita dell'inibizione da contatto, la perdita di controllo del ciclo cellulare, la capacità di crescere in presenza di ridotte quantità di siero, instabilità cariotipica, capacità di formare tumori se inoculate in topi nudi o con immunodeficienza combinata grave (SCID), formazione di ATP tramite digestione anaerobica del

glucosio anche in presenza degli enzimi necessari per la respirazione aerobia (effetto di Warburg). Queste proprietà sono proprie solo delle cellule trasformate, e non sono condivise con le cellule primarie o immortalizzate.

1.3.4. Come si può collegare la tumorigenesi con l'infezione virale?

Per comprendere come i virus tumorali contribuiscono allo sviluppo del cancro, è fondamentale avere una conoscenza approfondita del ciclo produttivo virale e dei vari modi con cui i differenti tipi di cellule rispondono all'infezione. Ci sono essenzialmente tre tipi di infezione virale: permissiva, semipermissiva e non permissiva. L'infezione permissiva è quella cui il virus può infettare la cellula e produrre una progenie virale. In questo caso le cellule infettate sono permissive per il virus e generalmente vengono lisate per permettere la fuoriuscita della progenie virale. L'infezione semipermissiva è quella in cui l'efficienza della replicazione virale è minore e si verifica pertanto una scarsa produzione di progenie virale. Nell'infezione non permissiva, il virus o non riesce ad entrare nella cellula ospite per mancanza di recettori specifici, oppure, qualora riesca ad entrare, non riesce a replicare in seguito alla mancanza dei fattori specifici dell'ospite. Pertanto, nel caso di infezione non permissiva la progenie virale non viene prodotta. Dopo l'infezione, il virus può entrare in diverse fasi del suo ciclo vitale. L'infezione può essere litica, persistente, latente, cronica o trasformante. In una infezione litica il virus può replicare il suo genoma e produrre più progenie virali. Nella maggior parte dei casi la cellula muore o per apoptosi (morte cellulare programmata) o per necrosi, un processo nel quale viene persa l'integrità della membrana ed il contenuto citoplasmatico si riversa al di fuori della cellula. Queste alterazioni indotte dal virus vengono comunemente indicate come effetto citopatico (CPE). Si chiamano persistenti le infezioni virali nelle quali il virus infettante non scompare dall'organismo, dopo un periodo più o meno lungo, ma continua ad essere presente producendo una infezione latente o cronica. Nell'infezione latente il virus non è rilevabile come virus infettante poiché la sua replicazione viene soppressa da una proteina virale della fase latente; esso, pertanto, non uccide la cellula, ma rimane associato ad essa sotto forma di acido nucleico integrato od episomico, la sua replicazione avviene in concomitanza con quella del genoma cellulare ad opera degli enzimi dell'ospite e con l'espressione di un limitato numero di geni senza produzione di progenie virale; in particolari condizioni il virus può riprendere

l'attività replicativa che può concludersi con una nuova fase di latenza.. L'infezione cronica, invece, rappresenta tipicamente una condizione dinamica, caratterizzata dalla costante presenza di virioni infettanti che vengono prodotti, in genere, a livelli più bassi e compatibili per lungo tempo con la sopravvivenza dell'ospite. Infine, un'altro possibile risultato dell'infezione virale è la trasformazione virale della cellula. Questa forma di infezione riguarda tutti i virus tumorali. Il virus infetta la cellula, ma invece di causarne la lisi con conseguente rilascio di virioni, esso ne modifica le proprietà di crescita portandola, infine, verso la proliferazione incontrollata.

I virus tumorali possono agire in maniera diretta o indiretta sulla cancerogenesi. Un virus oncogeno che agisce come agente della cancerogenesi diretta esplica la propria azione o attraverso l'inserimento e l'espressione di oncogeni virali (v-*onc*) nella cellula ospite, o aumentando l'espressione dei proto-oncogeni cellulari (c-*onc*), o esprimendo le proteine trasformanti virali; in questo modo il virus promuove la proliferazione cellulare, l'acquisizione di un fenotipo tumorale ed il mantenimento dello stato trasformato, come si verifica con tumori HPV-, MCPyV-, EBV e KSHV-correlati. Poiché in questi tumori i virus, esprimono almeno un antigene virale in ogni cellula trasformata, gli individui immunocompromessi come i soggetti con AIDS od i trapiantati hanno un rischio più alto di sviluppare questo tipo di neoplasie. Molti virus tumorali a DNA codificano oncoproteine virali in grado di trasformare le cellule in maniera diretta. I piccoli virus tumorali a DNA come Polyomavirus e Papillomavirus risultano carcinogenici quando si integrano nel genoma della cellula ospite, come parte di un incidente biologico e codificano proteine trasformanti che interagiscono con le vie di regolazione del ciclo cellulare per permettere la replicazione virale attraverso la polimerasi cellulare dell'ospite. I virus tumorali a DNA di maggiori dimensioni, come EBV e KSHV, sono tumorigenici quando infettano una cellula e persistono come episomi o plasmidi, replicandosi separatamente dal DNA della cellula ospite poiché possiedono una loro DNA polimerasi virale e non hanno bisogno di far entrare la cellula infettata nel ciclo cellulare; tuttavia, questi virus esprimono proteine trasformanti che provocano una deregolazione delle vie di trasduzione del segnale e sovvertono la risposta immune dell'ospite in modo da sfuggire al sistema immune. I virus che inducono tumori in maniera indiretta, presumibilmente provocano alterazioni che predispongono alla cancerogenesi semplicemente attraverso il processo di infezione cronica ed infiammazione [zur Hausen, H..(1999)] .Il virus in sé, potrebbe anche non essere più presenti a livello di una neoplasia in stadio avanzato

poiché, grazie all'infiammazione cronica dovuta all'infezione virale, la cellula tumorale ha accumulato sufficienti mutazioni ed acquisito una condizione di crescita iperplastica. Teoricamente, quindi, l'oncogenicità virale indiretta potrebbe virtualmente includere anche dei virus 'hit-and-run' il virus viene perso non appena il tumore inizia la sua fase di accrescimento. Esempi di questo processo non sono stati ancora ben documentati. Tuttavia alcuni agenti infettivi come HBV, HCV e HTLV-I, non sembrano rientrare esattamente né nella categoria dei virus ad azione oncogena indiretta né in quella diretta, dal momento che non è ancora chiaro se specifici prodotti virali contribuiscano a promuovere un fenotipo cellulare precanceroso, o servano a mantenere in fase di accrescimento le cellule tumorali, oppure più semplicemente agiscano sulla cancerogenesi attraverso la prolungata infezione e l'infiammazione cronica [Tsai, W. L. & Chung, R. T.. (2010). Jeang, K. T. et al..(2004)].

Una caratteristica comune dei virus tumorali umani è che essi, a livello dei tessuti tumorali, instaurano infezioni latenti persistenti o pseudo-latenti dove, generalmente, non replicano per formare particelle virali infettive. Tutti i virus oncogeni hanno la capacità di formare virioni e diventare trasmissibili ad un certo punto del loro naturale ciclo di vita, ma all'interno dei tumori queste infezioni sono generalmente latenti, così che la replicazione virale produttiva o è ridotta oppure è del tutto assente [Zur Hausen, H.. (2009)]. Il virus persiste come acido nucleico nudo, spesso in *forma plasmidica o episomiale*, che usa la cellula ospite per replicarsi quando la cellula si divide. Infatti, la scoperta di EBV nel linfoma di Burkitt, tramite osservazioni al microscopio elettronico, fu casuale poiché la maggior parte delle cellule tumorali portano il DNA di EBV in forma episomiale; egualmente avvenne per KSHV nel sarcoma di Kaposi, visto che la stragrande maggioranza dei tumori KSHV-correlati contengono KSHV sotto forma di genoma latente [Zhong, W. et al.. (1996)]. Contrariamente agli herpesvirus che generalmente non si integrano nel genoma dell'ospite, ed hanno un ben conosciuto meccanismo di controllo virale dell'infezione litica e della latenza, per i virus oncogeni ad RNA e per i piccoli virus tumorali a DNA il meccanismo non è ancora stato compreso pienamente. HTLV-I si trova integrato sotto forma di provirus a DNA all'interno delle cellule tumorali della leucemia a cellule T ed esprime le oncoproteine TAX, che promuove l'accrescimento e la sopravvivenza della cellula precancerosa, e HBZ che sembra avere un ruolo nel mantenimento dello stato trasformato della cellula [Matsuoka, M. & Green, P. L.. (2009)]. Tra i piccoli virus

tumorali a DNA, la frammentazione del DNA virale e la sua *integrazione* nella cellula tumorale porta all'incapacità di replicare per formare virioni, uno stato chiamato 'pseudo-latenza'. Nello scenario neoplastico, l'integrazione clonale del virus all'interno del tumore, come riscontrato in alcuni tumori maligni HPV-, MCPyV-, HBV e HTLV-I correlati, costituisce la prova principale del nesso causale con l'insorgenza della neoplasia, ponendo il virus sospetto sulla 'scena del crimine'. La latenza virale senza dubbio funge da strategia di evasione immune consentendo al virus di sfuggire al sistema immunitario disattivando inutili proteine virali che potrebbero essere riconosciute dall'immunità cellulo-mediata. Pertanto, una spiegazione per collegare la latenza del virus alla tumorigenesi è che virus che replicano produttivamente possono provocare l'attivazione della risposta immunitaria aspecifica innata a seguito dell'effetto citopatico indotto dall'infezione e dalla necrosi cellulare.

Tuttavia, già nel 1970 i ricercatori riconobbero per i virus tumorali una relazione inversa tra la permissività della replicazione virale e la trasformazione cellulare. SV40, per esempio, è stato trovato capace di trasformare cellule umane in modo efficiente quando vengono introdotte mutazioni nella sua origine di replicazione per prevenirne la replicazione virale [Small, M. B. et al.. (1982)]; allo stesso modo il poliomavirus murino, reso specificamente incapace di replicarsi a seguito di una parziale delezione genica, ha dimostrato un forte incremento del suo potenziale di immortalizzazione e delle sue proprietà trasformanti [Roberge, C., Bastin, M.. (1988)]; a questo si aggiunge la recente dimostrazione dell'incapacità di replicazione del poliomavirus MCPyV nei carcinomi a cellule di Merkel a seguito dell'espressione di un antigene T tronco [Shuda, M. et al.. (2008)]. Si crede, pertanto, che la tumorigenesi possa avere inizio in cellule in cui l'infezione virale è incompleta, dal momento che, nei loro ospiti naturali, i virus prendono contatto con molti tipi diversi di cellule, solo alcune delle quali sono suscettibili ad un ciclo completo di infezione. Quindi, la tumorigenesi virale potrebbe essere considerata un raro evento che avviene nel momento in cui il virus non riesce ad instaurare una infezione produttiva e le cellule che sopravvivono si trovano ad esprimere in maniera continuativa solo un sottogruppo di geni virali. In generale, quindi, si può dire che l'infezione non permissiva o semi-permissiva possa essere un fattore predisponente alla trasformazione della cellula. A rafforzare questa ipotesi sono subentrati i numerosi studi compiuti su diverse famiglie di virus patogeni per l'uomo (ad esempio, poliomavirus JC e BK, EBV, adenovirus) che causano

tumori negli animali in sistemi sperimentali. In tali sistemi lo sviluppo del tumore è di solito il risultato di una infezione non produttiva. Le cellule dell'animale ospite sono di solito non permissive per i virus umani, ma rimangono, tuttavia, suscettibili di infezioni e permettono l'espressione di antigeni virali precoci, come si è potuto osservare nelle cellule dei tumori che ne derivano. Bisogna sottolineare, tuttavia, che la trasmissione di virus umani a specie animali in condizioni naturali è stata poco studiata. Sulla base di queste osservazioni, nell'ultimo decennio alcuni scienziati hanno ipotizzato l'esistenza di un intero gruppo di patogeni trasmissibili da animali che potrebbero essere in grado di infettare, ma incapaci di replicare, nelle cellule umane e, tra questi, virus che potrebbero esprimere proteine trasformanti nelle cellule umane, nonostante la severa restrizione replicativa all'interno di questo ospite eterologo. Alcuni ricercatori hanno descritto la presenza del poliomavirus SV40 della scimmia rhesus in mesoteliomi umani ed in tumori dell'encefalo (questa infezione avvenne a causa della contaminazione dei vaccini anti poliomielite utilizzati tra il 1950 ed il 1960) ma, oltre a questi studi, ci sono ancora poche indagini relative alla potenziale trasmissione e alla effettiva capacità di causare tumori da parte di virus animali che inducono proliferazione in sistemi non permissivi negli esseri umani.

1.3.5. Origine funzionale delle proteine virali trasformanti

I tumori causati da virus – così come quelli non infettivi - sono incidenti biologici. Il tumore non aumenta la trasmissibilità del virus né migliora la sua fitness replicativa. È errato pensare che i virus oncogeni provochino il cancro per aumentare la carica virale e la loro trasmissibilità. Al contrario, per un virus ritrovarsi in un tumore significa aver imboccato un vicolo cieco. Nella maggior parte dei casi, la trasmissione dei virus tumorali umani provoca stati asintomatici o lievemente sintomatici, ma non portano a neoplasia. Solo una piccola percentuale di persone infettate con uno dei virus tumorali umani sviluppa tumori, e queste raramente (se non mai) servono da veicolo per la trasmissione del patogeno.

Se scartiamo l'idea che i virus siano evolutivamente programmati per provocare il cancro, allora perché i virus tumorali codificano oncogeni? Poiché virus diversi (tra cui virus non tumorali) mostrano un notevole accordo nell'indirizzare la loro azione verso le stesse vie di trasmissione del segnale che coinvolgono gli oncosoppressori, è evidente che esiste una forte selezione indirizzata a mantenere i geni virali che

possono favorire la tumorigenesi (Fig. 5). Ad esempio, la maggior parte dei virus tumorali umani codificano oncoproteine che hanno come bersaglio RB1 e p53, anche se ognuna di loro ha un meccanismo d'azione peculiare [Levine, A. J.. (2009)]. Altri obiettivi comuni che hanno un ruolo nella tumorigenesi di virus tumorali includono la trascrittasi inversa telomerica (TERT), la via citoplasmatica PI3K-AKT-mTOR (che regola il controllo della crescita, del metabolismo, dell'apoptosi e della trascrizione) [Buchkovich N. J. et al.. (2008)], e la via dell' interferone (IRF).

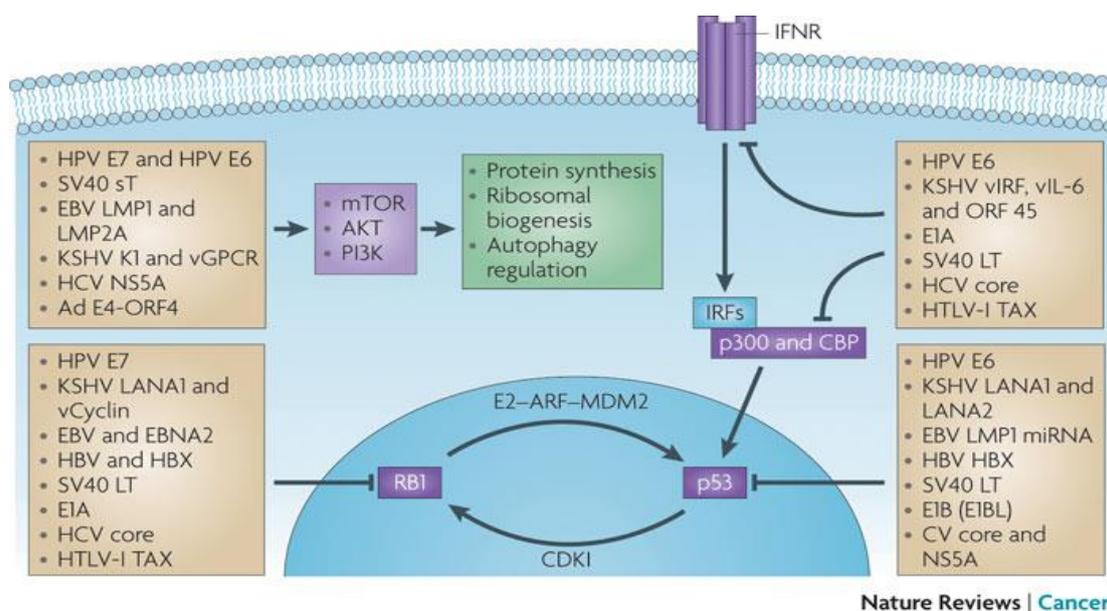


Fig. 5. Bersagli cellulari comuni di oncoproteine appartenenti a virus tumorali. Un elenco di proteine di virus tumorali animali ed umani che colpiscono le vie di trasmissione del segnalazione relative a RB1, p53, interferone e PI3K-mTOR. La maggior parte di queste proteine virali sono evolutivamente distinte tra loro ed hanno meccanismi unici per deregolare i segnali biochimici della cellula ospite.

Esistono due punti di vista largamente diffusi sull'origine funzionale delle proteine virali trasformanti. La prima ipotesi si basa sulla biologia dei piccoli virus tumorali a DNA (come HPV e SV40), e cioè sulla presunta necessità di questi virus di innescare l'ingresso nel ciclo cellulare delle cellule differenziate allo scopo di ottenere le condizioni adatte alla replicazione virale [Levine, A. J.. (2009)]. Infatti, poiché nella fase G0 delle cellule differenziate la capacità replicativa dell'ospite ed i nucleotidi sono limitati, questi virus potrebbero forzare l'ingresso non programmato in fase S

per generare le risorse cellulari necessarie per la replicazione del genoma virale. L'alterazione della regolazione del ciclo cellulare, però, attiva anche le vie biochimiche coinvolte nella morte cellulare, quali p53, e così il segnale apoptotico deve essere inibito per permettere un'efficiente produzione e diffusione del virus prima della morte cellulare. Un esempio di questo meccanismo si ha nel ciclo di vita di HPV, che infetta le cellule epiteliali basali le quali, a loro volta, si differenziano in epitelio squamoso in fase di crescita arrestata. Riguardo alla modalità con cui HPV agisce sulle vie degli oncosoppressori, si pensa che l'oncoproteina E7 di HPV inattivi RB1 quando il cheratinocita infetto si differenzia, in modo tale da guidare la cellula verso lo stato proliferativo e consentire la replicazione del genoma virale [Munger, K. et al.. (1989)]. Contemporaneamente, la proteina oncogenica E6 di HPV induce la degradazione di p53 mediata dall'ubiquitina, impedendo l'apoptosi che altrimenti limiterebbe l'efficienza della produzione virale [Scheffner M. et al.. (1990)]. In circostanze normali, queste cellule alterate dal virus vengono perse per esfoliazione naturale insieme ai virioni infettanti. Tuttavia, rare mutazioni che destabilizzano questo ciclo di vita (ad esempio, un evento di integrazione di HPV che provoca la perdita della regolazione dei geni virali precoci) possono preparare il terreno per convertire questo parassitismo molecolare a trasformazione in cellula cancerosa. Agendo a livello dei punti di controllo del ciclo cellulare e del meccanismo anti-apoptotico, che sono coinvolti nelle attività di riparazione del genoma, gli oncogeni virali inducono anche instabilità genomica della cellula e aneuploidia, che a loro volta contribuiscono alla carcinogenesi [Duensing, S. et al.. (2000). Hein, J. et al.. (2009)]. In sintesi, la versione più accreditata della funzione degli oncogeni virali è che questi colpiscono le vie dei soppressori tumorali per promuovere la replicazione virale produttiva e contribuiscono al cancro solo quando mutazioni casuali disturbano questo equilibrio. Tuttavia, studi compiuti sui virus tumorali con DNA di maggiori dimensioni (come EBV e KSHV) suggeriscono un'interazione più complessa tra gli oncogeni virali e la cellula ospite che sembra essere più mirata ad eludere la risposta immunità durante la fase di latenza piuttosto che a garantire la replicazione del genoma virale [Moore, P. S. & Chang, Y. et al.. (2003). Liang, C. et al.. (2008)].

E' chiaro, quindi, che c'è ancora molto da capire sui meccanismi comuni e sulle strategie uniche che ogni virus utilizza per modificare il comportamento delle cellule. La tumorigenesi non offre alcun evidente vantaggio selettivo ai virus oncogeni ma appare essere la conseguenza indiretta di strategie virali volte sia a reindirizzare

specifici componenti cellulari verso la produzione di virus, sia a sfuggire alla difesa antivirale innata ed adattativa. I virus oncogeni non creano nuove vie di trasmissione del segnale, ma reindirizzano quelle già esistenti al miglioramento della produzione e della diffusione virale, attuando una serie di meccanismi di trasformazione, tra cui: l'attivazione degli oncogeni, l'inattivazione dei soppressori tumorali, la stimolazione paracrina della sopravvivenza e della proliferazione cellulare, l'evasione dal sistema immunitario. E' improbabile che un virus tumorale sia sufficiente a convertire una cellula normale in una cellula tumorale, ma è piuttosto probabile che la combinazione dell'azione di proteine virali e mutazioni geniche possa fornire impulso alla tumorigenesi. Il problema chiave è capire come l'infezione virale si inserisce nel quadro più ampio della tumorigenesi. La comprensione della sinergia tra meccanismi virali e genetici nel fenomeno tumorigenico, porterà all'identificazione di nuovi bersagli per l'intervento terapeutico e a nuove strategie terapeutiche.

1.4.Epidemiologia dei tumori associati ad infezioni da virus oncogeni umani

Generalmente, i virus tumorali, in seguito all'infezione del loro ospite, causano lievi stati di malattia o non ne causano affatto, oppure causano patologie non neoplastiche come l'epatite acuta da HBV o la mononucleosi da EBV. Questa condizione naturale è solo una delle ragioni per cui è stato così difficile identificare gli agenti virali come fattori causali per i tumori umani. e diverse altre motivazioni potrebbero essere addotte per fornire una spiegazione di questo:

1. Nessun tumore umano origina come conseguenza di una infezione virale acuta. I periodi di latenza tra infezione primaria e sviluppo del cancro sono spesso compresi in un intervallo di 15-40 anni.
2. Tranne rare eccezioni, nelle cellule tumorali non si verifica una infezione produttiva.
3. La maggior parte delle infezioni correlate ai tumori umani sono comuni nella popolazione umana e sono sempre esistite durante l'evoluzione umana. Tuttavia, solo una piccola parte degli individui infetti sviluppa la forma tumorale correlata ad una di queste infezioni.
4. Mutazioni nei geni della cellula ospite o all'interno del genoma virale sono obbligatorie per la conversione maligna.

5. Agenti cancerogeni chimici e fisici agiscono di solito come mutageni. Essi consentono la selezione di mutazioni specifiche e spesso agiscono in sinergia con la capacità degli oncovirus di promuovere la tumorigenesi.

6. Alcuni agenti infettivi agiscono come agenti cancerogeni indiretti, senza persistenza dei loro geni all'interno delle rispettive cellule tumorali (HCV e HBV).

Tra tutti questi fattori, le ragioni principali che hanno reso difficoltosa la comprensione del ruolo degli oncovirus nella tumorigenesi sono i lunghi periodi di tempo richiesti per la trasformazione maligna e la diffusione nella popolazione della maggior parte di queste infezioni. Il fatto che solo una minoranza di persone vada incontro allo sviluppo del cancro dopo l'infezione, ha reso difficile la comprensione del ruolo dei virus tumorali nell'insorgenza e/o nel mantenimento della neoplasia. In effetti, i postulati di Koch del XIX° secolo (formulati per provare una relazione causale tra l'infezione di un microrganismo ed una malattia) non sono applicabili alle patologie virali. Relman and Fredericks hanno descritto le difficoltà che si incontrano nell'applicare i postulati di Koch ai tumori indotti da virus.[Fredericks DN, Relman DA.. (1996)]. Pertanto, i criteri proposti dall'epidemiologo inglese Sir Bradford. Hill nel 1965, altrimenti conosciuti come i cinque criteri di causalità, risultano essere più rilevanti per lo studio della virologia del cancro, sebbene presentino parecchi limiti.

Questi criteri vengono utilizzati per stabilire una differenza tra associazione e nesso di causalità quando si associa un agente eziologico ad una patologia tumorale umana. Questi criteri includono (1) forza dell'associazione tra agente infettivo e malattia (calcolo del rapporto di probabilità o stima del rischio relativo), (2) coerenza dei risultati tra i vari studi, (3) specificità della malattia, (4) associazione temporale tra l'induzione del tumore e l'infezione, (5) associazione tra carica virale e gravità della malattia, (6) plausibilità biologica dedotta da modelli molecolari ed animali, (7) coerenza biologica, (8) evidenze sperimentali che sostengono un ruolo dell'infezione virale in specifici tumori, (9) analogia con malattie simili indotte da virus [Hill AB.. (1965)]. Tali criteri, sono attualmente accettati nella comunità scientifica.

I virus sono gli agenti infettivi più comunemente responsabili dello sviluppo di tumori, (soprattutto in animali come gli uccelli, e molto più raramente nell'uomo) ma anche batteri e parassiti possono esserne la causa. L'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro stima che il 20% dei tumori umani in tutto il mondo abbia una eziologia infettiva. Questa percentuale varia nelle diverse regioni del mondo, da un massimo del 25% in Africa a meno del 10% in tutto il mondo sviluppato. [Anand P. et al.. (2008)].

Inoltre si stima che l'80% dei tumori ad eziologia infettiva siano associati ad infezioni da virus oncogeni; in altre parole si ritiene che il 10-15% dei tumori umani possa essere attribuito ad infezioni da parte di oncovirus. [Parkin, DM.. (2006). Bouvard V, et al.. (2009). Carrillo-Infante C. et al.. (2007)].

HBV e HCV infettano, rispettivamente, oltre 300 milioni e 170 milioni di persone in tutto il mondo, soprattutto in Asia e in Africa. L'infezione cronica di questi virus costituisce, nel loro complesso complesso, circa il 25% di tutti i tumori ad eziologia infettiva, ed è correlata a circa l'80% di tutti i carcinomi epatocellulari [IARC. Hepatitis viruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum (1994). Parkin D.M. et al.. (2002)]. Inoltre, esistono prove sufficienti per affermare che l'infezione cronica da HCV può causare anche linfoma non-Hodgkin, specialmente il linfoma a cellule B.

L'infezione da **EBV** costituisce circa il 10% di tutti i tumori ad eziologia infettiva, è comune in tutta la popolazione mondiale ed è associata a diversi tipi di cancro, tra cui il carcinoma nasofaringeo, uno dei tumori più comuni nel sud-est asiatico, il linfoma di Burkitt nei bambini africani, il linfoma non-Hodgkin AIDS-associato [Rickinson A, et al. (2006)]. Inoltre, ci sono prove che attestano il ruolo di EBV nel 5-10% dei carcinomi gastrici in tutto il mondo [Zur Hausen H. (2006)]. Tuttavia, poiché il carcinoma gastrico EBV-positivo si sviluppa in età precoce e mostra un diverso quadro istopatologico rispetto a quello EBV-negativo, esso potrebbe costituire una entità clinica separata. In questo sottogruppo di tumori gastrici, la presenza del genoma virale in forma monoclonale e l'espressione delle proteine trasformanti di EBV costituiscono prove significative per il coinvolgimento di EBV in questo tipo di neoplasia [Hino R, (2008)].

Dati provenienti da 22 studi di coorte e 80 studi caso-controllo mostrano un associazione tra **KSHV** e sarcoma di Kaposi, con rischio relativo superiore a 10. La maggior parte degli studi sono stati condotti su trapiantati e soggetti HIV-1 positivi. Sia nei soggetti HIV-1 infetti, sia in quelli non infetti, il rischio di sarcoma di Kaposi aumenta in maniera proporzionale all'aumento del titolo di anticorpi diretti contro KSHV, indicatori della carica virale. Esiste evidenza sufficiente a dimostrare che KSHV causa il linfoma ad effusione primaria, un raro sottogruppo di linfoma non-Hodgkin a cellule B, comunemente diagnosticato in pazienti affetti da AIDS [Mesri EA. (2010)]. KSHV è anche associato alla Malattia di Castleman (MC) multicentrica, definita da un'ipertrofia dei linfonodi in presenza di un'iperplasia linfatica angiofollicolare. La forma multicentrica colpisce più linfonodi, mentre la forma

localizzata si limitata a un solo linfonodo. La prevalenza della MC non è nota, ma è calcolata in meno di 1/100.000. La forma multicentrica, più rara, può associarsi all'infezione da HIV. KSHV si osserva nel 60-100% dei pazienti colpiti da MC associata ad HIV, ma anche nel 20-40% dei pazienti HIV-negativi.

L'infezione da **HPV** è correlata all'insorgenza di circa il 5% di tutti i tumori umani a livello mondiale [Parkin D.M. et al.(2006)] e a circa il 28% di tutti i tumori umani ad eziologia infettiva [zur Hausen H. (2009)]. E' l' infezione sessualmente trasmessa più comune nella popolazione mondiale ed è associata a tumori dell'epitelio anogenitale, orofaringeo e cutaneo. Tra questi il cancro della cervice uterina è quello con maggiore prevalenza (4,5%) e costituisce la seconda causa di morte per cancro nel mondo [Moody CA. et al.(2010)]. E' ormai ampiamente accertato che l'infezione da genotipi di HPV mucosali ad alto rischio sia responsabile del 99% dei carcinomi della cervice uterina [Walboomers JM. et al. (1999)] e che giochi un ruolo nell'eziologia di circa il 25% dei tumori della cavità orale e della faringe.

HTLV-1 infetta circa 15-20 milioni di persone in tutto il mondo, in aree endemiche del Giappone, Caraibi ed Africa, ed in gruppi a rischio di contrarre l'infezione (abuso di droghe per via intravenosa) [Watanabe T. (2011)]. Il virus si diffonde attraverso il contatto con i fluidi corporei contenenti cellule infette, e quindi attraverso rapporti sessuali, dalla madre al bambino attraverso il latte materno, tramite trasfusione di sangue o condivisione di siringhe. Dopo lunghi periodi di latenza, circa il 3-5% degli individui infetti svilupperà la leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATLL) o la paraparesi spastica tropicale, di cui HTLV-1 è l'agente eziologico. HTLV-1 viene rilevato in forma monoclonale integrata in più del 90% dei casi di ATLL e, per tale motivo, il riscontro di infezione da HTLV-1 fa parte dei criteri diagnostici di ATLL. Diversi studi di coorte hanno confermato la relazione causale tra l' infezione di HTLV-1 e l'incidenza di ATLL.

MCPyV è un poliomavirus recentemente scoperto nell'80% dei casi di un raro cancro della pelle, il carcinoma umano a cellule di Merkel (MCC). MCPyV viene comunemente rilevato nella pelle della maggior parte degli individui adulti; l'infezione viene acquisita nei primi anni di vita ed è asintomatica. La modalità di trasmissione, il tropismo cellulare e le caratteristiche del suo stato di latenza restano ancora da chiarire. Il ruolo eziologico di MCV nella MCC è supportato da alcuni studi caso-controllo e diverse case-series; per questo motivo MCV è stato classificato come

" probabilmente cancerogeno per l'uomo ". dall' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) .

A seguito dei dati esposti, una considerazione degna di nota sta nel fatto che alcuni tumori eziologicamente correlati agli oncovirus umani si potrebbero facilmente prevenire attraverso la vaccinazione (per esempio, programmi di vaccinazione contro i due oncovirus umani HPV e HBV), potrebbero essere diagnosticati con semplici test di laboratorio oppure trattati con farmaci antivirali poco tossici [Anand P. et al. (2008)].

2. Polyomavirus

2.1.Introduzione

I polyomavirus (PyVs) sono piccoli virus a DNA, icosaedrici e privi di envelope, che infettano un gran numero di vertebrati [Imperiale, M.J., and Major, E. O. (2007)]. Le infezioni dovute ai PyVs furono scoperte casualmente negli anni '50 mentre si stava cercando di caratterizzare un agente trasmissibile capace di indurre diversi tipi di tumori nei roditori. Infatti, il lavoro congiunto di Gross [Gross, L.. (1953)] e di Stewart [Stewart S.E.. (1958)], portò alla dimostrazione dell'esistenza del polyomavirus murino (MPyV), ubiquitario nel topo, ma capace di indurre tumori in topi appena nati o immunosoppressi. Il polyomavirus simian virus 40 (SV40) fu descritto per la prima volta nel 1960 in colture di cellule renali di scimmia, utilizzate per ottenere il vaccino della poliomielite, somministrato a livello mondiale negli anni '50 [Sweet B.H..(1960)]. In maniera simile ad MPyV, anche SV40 fu dimostrato essere capace di indurre tumori nei topi e nei roditori, facendo sorgere un preoccupante interrogativo sulla possibilità che SV40 potesse causare tumori nell'uomo in seguito alla distribuzione di vaccini antipolio contaminati dal virus a quasi 100 milioni di persone. Da allora i PyVs sono stati ritrovati in numerosi ospiti vertebrati, tra cui uccelli, roditori, gatti e nell'essere umano [John R. et al. (2011)]. I primi due polyomavirus umani (HPyVs) JC (JCV) e BK (BKV), il cui nome deriva dalle iniziali dei soggetti in cui vennero ritrovati, furono identificati nel 1971, il primo nel cervello di un paziente con linfoma di Hodgkin e leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) [Padgett B.L et al.. (1971)], ed il secondo nelle urine di un

trapiantato renale [Gardner S. D. et al., (1971)]. Di recente sono stati isolati, in aspirati nasofaringei di bambini con infezioni del tratto respiratorio, il KI polyomavirus (KIPyV) [Allander T.. (2007)] e WU polyomavirus (WUPyV) [Gaynor AM. et al. (2007)], mentre il polyomavirus a cellule di Merkel (MCPyV) fu ritrovato in pazienti affetti da carcinoma a cellule di Merkel [Feng H, et al. 2008]. Allo stesso modo, il polyomavirus TS (TSPyV), è stato chiamato in accordo con la sua identificazione avvenuta in un soggetto affetto da tricodispasia spinulosa, una rara malattia della pelle [van der Meijden E. et al..(2010)]. HPyV6 e HPyV7, sono stati identificati nella cute, HPyV9 è stato ritrovato nel siero e nella cute, mentre MWPyV è stato trovato nella feci e nella cute [Schowalter R.M. (2010). Scuda N. et al. (2011). Siebrasse E.A. et al.. (2012). Buck C.B. et al.. (2012). Yu G. et al..(2012)]. A causa del sostanziale incremento nel numero di HPyVs scoperti negli ultimi 5 anni, l'interesse relativo al loro ruolo nell'induzione di forme patologiche e tumorali ha subito una forte impennata.

Pur avendo un' organizzazione strutturale ben conservata, i PyVs hanno uno spettro d'ospite ristretto ed una certa specificità cellulare; questi limiti sembrano essere dovuti, a livello extracellulare, dalla presenza o meno di recettori sulla superficie della cellula ospite e, a livello intracellulare, dalla presenza o meno di fattori cellulari dell'ospite che permettano l'espressione dei geni virali ed il completamento del ciclo vitale del virus [Atkin S.J. et al.. (2009). Cheng J.. et al.. (2009)]. Sperimentalmente, la ristrettezza d'ospite e la specificità cellulare possono essere superate, e quindi il rischio di trasformazione oncogena aumenta, tipicamente a spese della replicazione litica. La trasformazione oncogena è mediata dalle proteine precoci dei PyVs, chiamate antigeni T (Tumore), attraverso cui riescono ad aggirare i controlli del ciclo cellulare al fine di replicare in modo efficiente. La trasformazione dei PyVs si basa sul disallineamento genetico o funzionale tra l'espressione dell'antigene T e le fasi successive del ciclo di vita virale caratterizzato dalla replicazione del DNA virale, espressione del gene tardivo, assemblaggio del virione ed eventualmente la lisi cellulare dell'ospite. In seguito a questo, le cellule lasciano che gli antigeni T sovvertano il controllo del ciclo cellulare inattivando le vie di trasduzione del segnale dei soppressori tumorali pRb e p53, avviandosi sulla strada della trasformazione neoplastica. Questi concetti sono emersi dalla ricerca paradigmatica compiuta su MPyV e SV40 come virus tumorali a DNA [Cheng J. et al.. (2009)]. I PyVs condividono diverse caratteristiche con i papillomavirus tra cui il potenziale oncogeno,

ma non sono più classificati insieme ad essi nel genere Papova, ma separatamente nel genere Poliomavirus, della famiglia Polyomaviridae [Hirsch H.H. (2010)].

Gli HPyVs instaurano un' infezioni primaria clinicamente non evidente, tipicamente latente, che tende ad associarsi ad un quadro clinico sintomatico solo in determinate condizioni (generalmente in caso di immunosoppressione). BKV, ad esempio, è collegato all'insorgenza della cistite emorragica (HC) a seguito di trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, ed alla nefropatia associata a PyV dopo trapianto renale. JCV è associato alla leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) in soggetti HIV-AIDS, a disordini ematologici e ad alcune malattie autoimmuni. In seguito all'infezione, BKV e JCV sono noti persistere in forma latente all'interno delle cellule epiteliali dei tubuli renali riattivandosi specialmente in caso di deficit del sistema immunitario; tuttavia sono state osservate riattivazioni asintomatiche ed occasionali anche in soggetti sani, con diffusione del virus attraverso l'urina. [Chesters P.M. (1983)]. TSPyV è stato individuato nella tricodisplasia spinulosa, una rara malattia della pelle che presenta sia caratteristiche litiche indotte dal virus, sia caratteri proliferativi simil-tumorali, osservata in pazienti trapiantati immunosoppressi. Gli altri HPyVs ritrovati a livello cutaneo, non sono stati collegati a nessun tipo di manifestazione patologica; solo MCPyV è l'unico HPyVs strettamente associato all'insorgenza di una forma tumorale, il MCC, rara malattia della pelle che può avere origine in soggetti anziani e cronicamente immunodepressi. La capacità dei PyVs di promuovere la proliferazione cellulare e stabilire infezioni persistenti nei loro ospiti, li ha visti spesso implicati in tumori maligni degli animali e dell'uomo.

Ancora oggi la modalità di trasmissione degli HPyVs non è stata chiarita, dato che le infezioni primarie, che sembrano avvenire nella prima infanzia, sono presumibilmente subcliniche, ma si pensa possa avvenire attraverso il contatto di secrezioni e fluidi contaminati con superfici mucose; tuttavia sono state suggerite altre fonti di infezione, come cibo o acqua contaminate. [Bofill-Mas S. et al. (2001). Bofill-Mas S. et al. (2000)]. Studi sierologici suggeriscono che gli HPyVs infettino in maniera subclinica la popolazione globale con tassi che oscillano tra il 50% ed il 90% nella popolazione adulta. Test sierologici sono stati utilizzati anche per determinare la presenza dell'infezione da SV40 nell'uomo. La sua presenza sembra essere sporadica nell'essere umano ma al tempo stesso variabile, a seconda della regione geografia o del tipo di popolazione esaminata; infatti, le stime di prevalenza per SV40 hanno fornito risultati generalmente compresi tra il 2% ed il 10%, ma con picchi che talvolta

superano il 20% in alcuni gruppi di popolazione. Poiché SV40 è stato riscontrato anche in soggetti a cui non venne somministrato il vaccino antipolio, questo fa ipotizzare che la propagazione sia potuta avvenire non solo tramite l'immunizzazione, ma che avvenga anche per via verticale e/o orizzontale [Shah KV et al.. (1972)]. Tuttavia, la modalità di trasmissione di SV40 non è ancora chiara.

2.2.Struttura del genoma e ciclo vitale

I PyVs sono virus di piccole dimensioni, privi di envelope, dotati di un capsidico icosaedrico. Il capsidico contiene una molecola di DNA a doppio filamento circolare di circa 5 kbs organizzata intorno ad istoni cellulari che, così composta, prende il nome di minicromosoma. La struttura dei virioni di SV40 e MPyV sono conosciute, poiché questi virus sono serviti da strumenti per studiare la biochimica e la biologia molecolare della cellula di mammifero [Acheson, N.H.. (2007)]. Ognuno dei 72 capsomeri che compongono il capsidico è composto da un pentamero di VP1 (proteina capsidica maggiore) ciascuno dei quali ha al centro una proteina VP2/3 (proteine capsidiche minori) che prende contatto con il mini-cromosoma condensato.

Il genoma virale (Fig. 6) contiene due unità trascrizionalmente divergenti. Una codifica un insieme sovrapposto di proteine regolatorie multifunzionali espresse nella fase precoce dell'infezione. L'altra codifica, nelle cellule permissive, le tre proteine capsidiche espresse durante la fase tardiva dell'infezione (VP1, VP2, VP3) e, in alcuni PyVs, una agnoproteina che facilita l'assemblaggio del virione. La regione regolatoria (RR) che si trova tra l'unità trascrizionale precoce e quella tardiva, contiene un enhancer bidirezionale, i promotori per la regione precoce e tardiva, l'origine della replicazione del DNA virale, ed il segnale per l'assemblaggio del virione (*ses*), cioè delle ripetizioni in tandem di sei siti di legame per un fattore di trascrizione dell'ospite [Gordon-Shaag A. et al.. (2002)]. La sequenza dell'enhancer può differire tra i vari PyVs; in particolare, il genoma più frequentemente isolato corrisponde a quello di un virus definito *archetipo* caratterizzato da una regione regolatoria contenente una singola copia della sequenza enhancer; virus definiti *riarrangiati*, invece, possiedono due identiche ripetizioni in tandem lunghe, ad esempio, 98 paia di basi per JCV e 72 bps per SV40 [Ricciardiello et al., 2001].

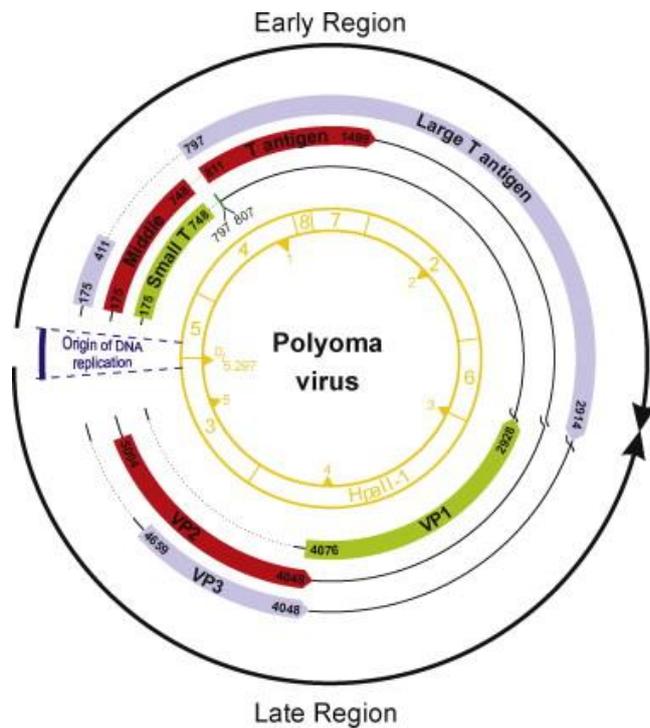


Fig. 6 :
Organizzazione generale del
genoma di un Polyomavirus

La regione precoce codifica per diverse proteine regolatorie multifunzionali, gli antigeni tumorali [T/t], che hanno la sofisticata capacità di riprogrammare la cellula ospite per consentire la replicazione virale. Analisi genetiche e biochimiche degli antigeni T di SV40 e MPyV hanno rivelato che l'antigene T grande (TAg) è essenziale per guidare le cellule infette in fase quiescenti verso la fase S del ciclo cellulare, per dare inizio e portare a termine la replicazione del DNA virale e per promuovere l'assemblaggio del virione [Ahuja D et al.. (2005)]. Il TAg è necessario e, talvolta, sufficiente ad indurre la trasformazione cellulare, ma altre proteine virali della fase precoce, tra cui l'antigene t piccolo (tAg), l'antigene t medio, la proteina 17kT (in SV40) e proteine T' quali T'165, T'136 e T'135 (in JCV) contribuiscono alla fase precoce dell'infezione e sono di vitale importanza per la trasformazione cellulare (Fig. 7) [Chen Y. et al.. (2007)].

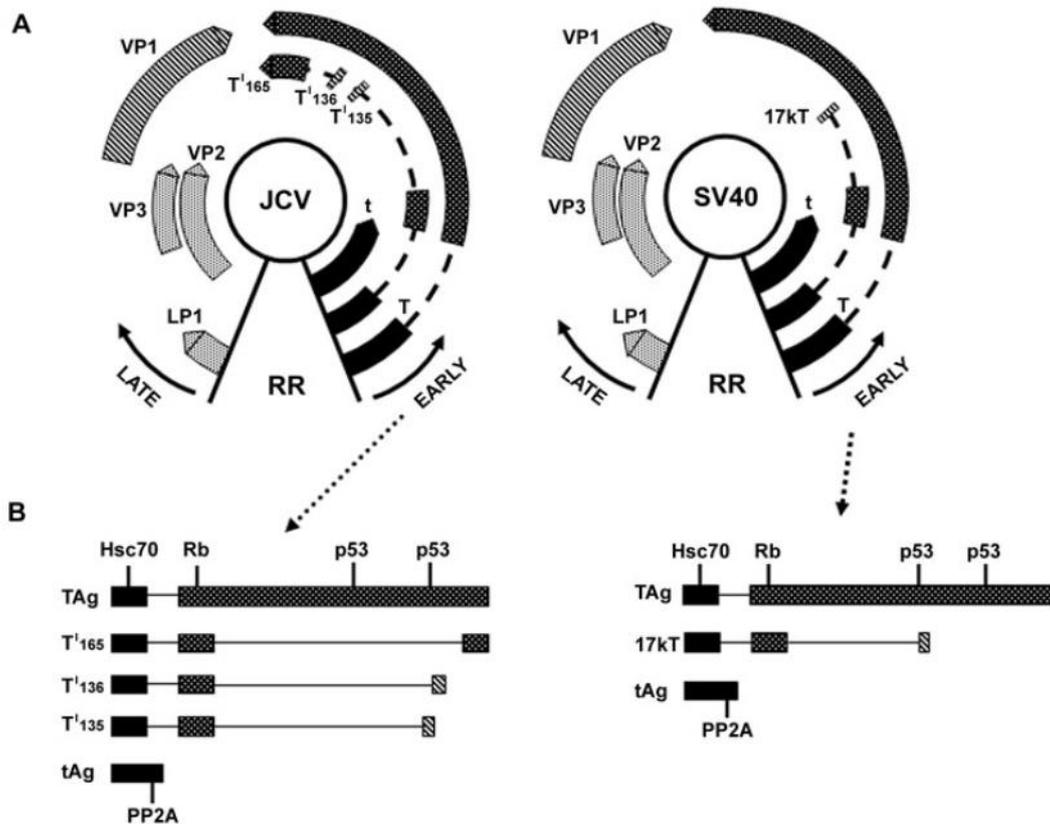


Fig. 7 : Confronto tra i genomi di JCV e di SV40.

Il ciclo di infezione inizia con il legame del virione, attraverso VP1, ai gangliosidi superficiali della cellula ospite o a glicoproteine contenenti acido sialico; ad esempio SV40 lega il ganglioside GM1 e le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (IHM) [Dugan AS. et al.. (2006)]. Comunque, altri PyVs riconoscono altre classi di recettori; ad esempio JCV lega un recettore serotonergico sulle cellule gliali umane (Fig. 8) [Elphick GF. et al.. (2004)]. I PyVs generalmente entrano nella cellula ospite attraverso strutture della membrana plasmatica chiamate caveole [Parton RG and Simons K..(2007)]. Le caveole sono microdomini di membrana a forma di fiasca, ricchi di colesterolo e sfingolipidi. Al contrario della maggior parte dei PYVs, JCV entra nella cellula ospite attraverso un meccanismo di endocitosi clatrina dipendente [Querbes W. et al.. (2006)]. Una volta che il virus è stato internalizzato nel citoplasma cellulare, esso viene convogliato al reticolo endoplasmatico (RE) attraverso endosomi o caveosomi [Tagawa A. et al.. (2005)]. Nel RE sembra aver luogo l'uncoating, seguito dalla traslocazione nel nucleo mediata

principalmente dalle proteine VP2 e VP3 e dai domini NLS (Nuclear Localization Signal) presenti su di esse (Shishido-Hara Y, et al., 2000).

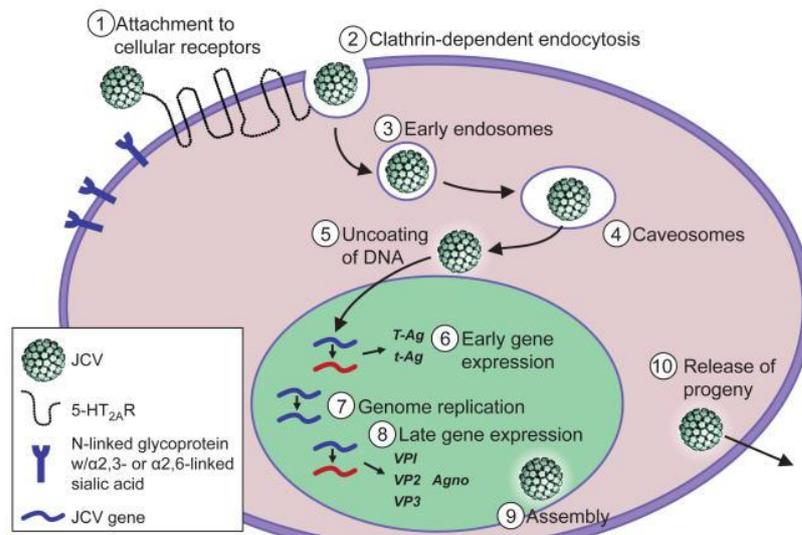


Fig. 8 : Rappresentazione del ciclo di vita del PyV JCV in una cellula ospite permissiva.

Una volta nel nucleo, inizia la trascrizione virale dei geni precoci ad opera dell'apparato trascrizionale della cellula ospite: il trascritto primario della regione precoce subisce splicing alternativo, determinando la formazione delle diverse proteine regolatorie multifunzionali. La sintesi delle proteine precoci consente l'avvio della replicazione del DNA virale grazie al legame della proteina monomeric T-Ag alla RR e al successivo legame di altre proteine T-Ag al complesso, con conseguente formazione di due esameri situati agli estremi dell' origine della replicazione (*ori*), il tutto stimolato dall'ATP. Tale legame è anche facilitato da proteine cellulari con attività elicastica che consentono uno svolgimento bidirezionale dell'*ori*, determinando la formazione di una bolla di replicazione sull'*ori*. Il complesso T-Ag/proteine cellulari recluta la polimerasi- α primasi, una polimerasi cellulare, in modo da formare il complesso di preinizio (o primosoma). Una volta reclutato il primosoma, ha inizio la sintesi del DNA in direzione della regione precoce, utilizzando come stampo i filamenti di mRNA precoci. Il complesso enzimatico estende tali primers formando dei complessi RNA/DNA di 35 nt che verranno ulteriormente estesi dalla polimerasi- δ , una DNA polimerasi cellulare, fino a circa 200 nucleotidi, che presentano una regione

a singolo filamento esposta. Questa regione consente alla polimerasi- α primasi di sintetizzare DNA nella direzione opposta, verso la regione tardiva, determinando la formazione di una seconda forca di replicazione che si sposta in direzione contraria. La replicazione termina quando le due forche di replicazione si troveranno a circa 180° dall'origine di replicazione. Una volta sintetizzato, il DNA virale forma un complesso con alcune proteine istoniche cellulari, formando una struttura denominata mini-cromosoma virale; quest'ultimo viene localizzato in specifici domini nucleari, in cui può permanere in forma latente fino al processo di assemblaggio del virione e al suo rilascio. L'assemblaggio dei virioni ha luogo nel nucleoplasma. Le proteine VP1, VP2 e VP3 vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e da esso migrano al nucleo dove interagiscono tra loro formando il capside icosaedrico (Shishido-Hara Y, et al 2000); in particolare, 360 molecole di VP1 si strutturano in 72 pentameri, al centro di ciascuno dei quali si lega una delle 2 proteine VP2 o VP3; su queste ultime è presente inoltre un sito di legame per il genoma virale, che permette di veicolarlo all'interno del virione. La liberazione dei virioni avviene in genere tramite citolisi. Tuttavia, studi effettuati al microscopio elettronico hanno evidenziato la presenza di vescicole esocitiche veicolanti il virus al di fuori delle cellule infette, suggerendo che alla via di liberazione classica se ne accompagni una alternativa, esocitosi-dipendente [Imperiale MJ. et al., (2001)].

Non sempre, però, un PyV può andare incontro alla liberazione della sua progenie virale. Infatti, un PyV può instaurare due diversi tipi di infezione: (1) un'infezione produttiva, in cui l'ospite permette la replicazione virale con produzione della progenie e successiva lisi cellulare, e (2) un'infezione non permissiva in un ospite che non consente la replica del DNA e quindi porta ad una infezione abortiva che può causare la trasformazione della cellula attraverso l'espressione continuativa di antigeni T (piccolo, grande, medio e forme tronche).

2.3.Genetica della trasformazione: i riprogrammatori della cellula ospite

2.3.1. Antigene T grande

La capacità del TAg di agire a livello di molti processi biologici differenti può essere spiegata dalla presenza, sulla proteina, di domini strutturali multipli che possiedono distinte attività biochimiche. Il TAg è una proteina multifunzionale di circa 700 aa, la

cui attività è coinvolta in numerosi processi durante il ciclo replicativo del virus tra cui, (i) l'interazione diretta con una serie di fattori cellulari coinvolti nella regolazione del ciclo e della sopravvivenza della cellula, (ii) e la capacità di alterare la regolazione sia dei promotori cellulari che virali per agire sull'espressione genica. In modo particolare, l'importanza di tale proteina è legata al fatto che, senza di essa, non potrebbe avvenire la replicazione del DNA virale [Nesper J. et al.. (1997)]. Usando il TAg di SV40 come esempio (la maggior parte delle conoscenze relative alla regolazione della replicazione da parte del TAg vengono da studi condotti su SV40), si può dire che la fosfoproteina TAg può essere divisa in tre domini funzionali maggiori: all'estremità N-terminale un dominio che lega la proteina del retinoblastoma (pRb) affiancato dal dominio J, centralmente un dominio che lega l'origine della replicazione virale e consente la replicazione, ed un dominio al C-terminale che ha attività elicastica ed interagisce con p53 (Fig. 9). Il TAg induce trasformazione attraverso il dominio J, il dominio che lega pRb, ed il dominio che lega p53 [Chen J. et al.. (1992). Peden KW et al.. (1998)]. Il dominio di legame con pRb contiene una sequenza amminoacidica conservata, LXCXE che, insieme alla sequenza HPDKGG contenuta nel dominio J, permette l'interazione con pRb ed i membri della sua famiglia [Sullivan CS. and Pipas JM..(2002)]. La porzione C-terminale della proteina, invece, esplica varie funzioni, tra cui l'interazione con p53 e l'attività elicastica e di legame all'ATP che si esplicano durante la formazione delle forche replicative.

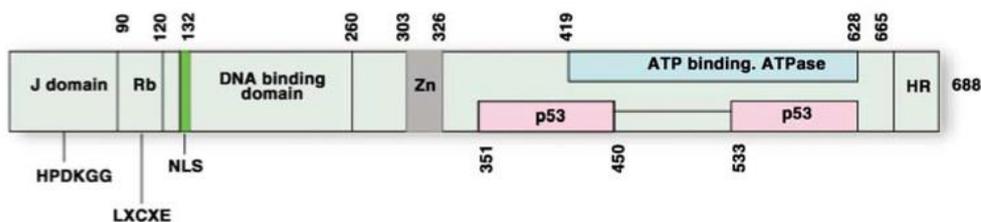


Fig. 9: Struttura lineare della proteina Large T.

2.3.2. Antigene t piccolo

La proteina Small t Antigen (t-Ag) di circa 170 aminoacidi, è una proteina regolatoria, ricca di cisteina, codificata dalla regione genomica virale precoce ed ha un ruolo non solo nel ciclo vitale virale, ma anche nei fenomeni di induzione della trasformazione

cellulare. La prima evidenza dell'esistenza di tale proteina, si è avuta nel 1977 quando venne tradotto in vitro l'mRNA del virus SV40 [Prives C. et al.. (1977)].

Il tAg condivide la sua sequenza ammino-terminale, incluso il dominio J, con TAg (Fig. 10). Esso coopera con TAg alla stimolazione dei promotori virali e cellulari, ed induce trasformazione sia nelle cellule di topo che in quelle umane [Rundell K. et al..(1998)]. Viene ritrovata sia nel nucleo che nel citoplasma della cellula [Zhu J. et al.. (1992)]. Il dominio che contiene la sequenza ripetuta LXCXE nel TAg, non è presente in tAg. L'estremità C-terminale non è in comune con il TAg, e lega la protein fosfatasi 2A (PP2A), inibendone la funzionalità; attraverso questo legame, il tAg normalmente influenza la trasduzione del segnale, l'apoptosi e la regolazione del ciclo cellulare [Janssens V. and Goris J.. (2001)]. Mutazioni nel C-terminale del tAg di SV40 ha permesso di identificare i residui amminoacidici 97-103 come cruciali per l'interazione con PP2A [Yu J. et al.. (2001)]. L'interazione tra tAg e PP2A è indispensabile per la trasformazione delle cellule umane da parte del TAg [Hahn WC. et al.. (2002)]. Cellule umane che esprimono solo il TAg mostrano caratteristiche proprie di cellule normali, mentre le cellule che esprimono sia il TAg che il tAg mostrano cambiamenti morfologici simili alle linee cellulari di derivazione tumorale [de Ronde A.. (1989)]. Inoltre, alcune cellule umane che esprimono sia TAg che tAg, mostrano una crescita ancoraggio indipendente [Yu J. et al.. (2001)].

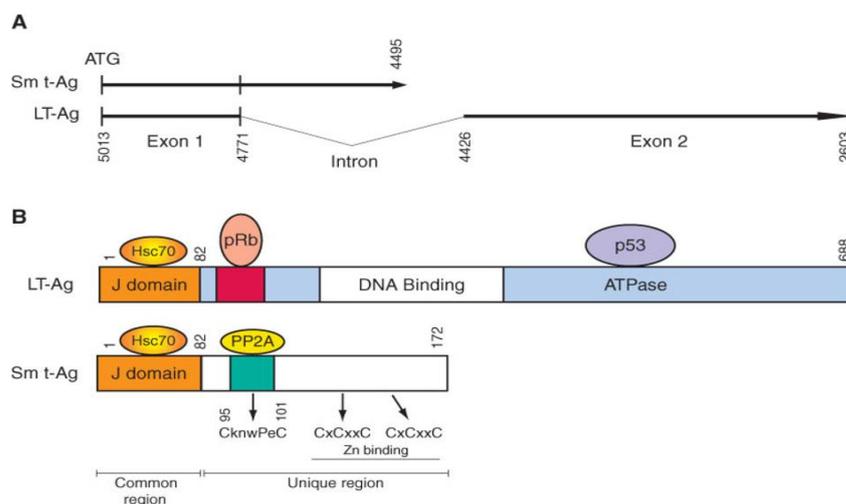


Fig. 10: Rappresentazione schematica della proteina Small t.

2.3.3. Agnoproteina

Nel 1970 venne sequenziato per la prima volta un intero genoma, quello di SV40 [Reddy VB. et al.. 1978]. L'analisi di tale genoma portò all'identificazione di una piccola open reading frame (ORF) nella regione prossimale tardiva che venne denominata "agnogene", poichè la sua funzione non era ancora nota [Dhar R. et al.. (1977)]. Successivamente venne identificata come regione codificante una proteina di 62 aminoacidi, sintetizzata tardivamente nell'infezione virale. L'analisi strutturale dell'agnoproteina dei tre polyomavirus SV40, JCV e BKV ha evidenziato la presenza di una regione ad alta omologia compresa tra l'N-terminale e i domini centrali, portando all'ipotesi che questa regione sia importante per l'attività specifica del virus nella cellula ospite. Un'attività fondamentale dell'agnoproteina è quella di interazione con il meccanismo di riparazione del DNA cellulare. La cellula, infatti, è dotata di vari meccanismi di riparazione del DNA che fanno sì che, una volta subito un danno al genoma, la replicazione si blocchi, non si abbia il passaggio della cellula da una fase del ciclo cellulare a quella successiva e la cellula rimanga quiescente fino a che il danno non viene riparato. Nel caso in cui la cellula non sia in grado di riparare il danno, viene attivata la sintesi di proteine coinvolte nel processo di apoptosi. L'agnoproteina sconvolge questo equilibrio, rendendo le cellule che la esprimono più sensibili agli effetti citotossici del cisplatino (agente chemioterapico antineoplastico in grado di interferire con tutte le fasi del ciclo cellulare) e più soggette ad aumento della frammentazione cromosomica e della formazione di micronuclei (Darbinyan A, et al., 2004). L'agnoproteina, infatti, lega il fattore di riparazione del DNA Ku70, coinvolto nella via NHEJ (Non-Homologous End Joining) che si attiva in seguito al danno del DNA cellulare [Darbinyan A. et al.. (2004)]. Pertanto, l'agnoproteina è coinvolta, nell'instabilità genomica, nel mancato arresto del ciclo cellulare in seguito a danno del DNA e quindi nella progressione delle cellule verso un fenotipo maligno [White MK. and Khalili K.. (2004)].

2.3.4. Proteine T'

Le proteine T'135, T'136 e T'165 vengono prodotte durante l'infezione litica di JCV nella cellula ospite [Trowbridge PW and Frisque RJ.. (1995)] e risultano dal taglio di due introni a partire dall'mRNA precoce immaturo. Uno di tali introni è lo stesso che

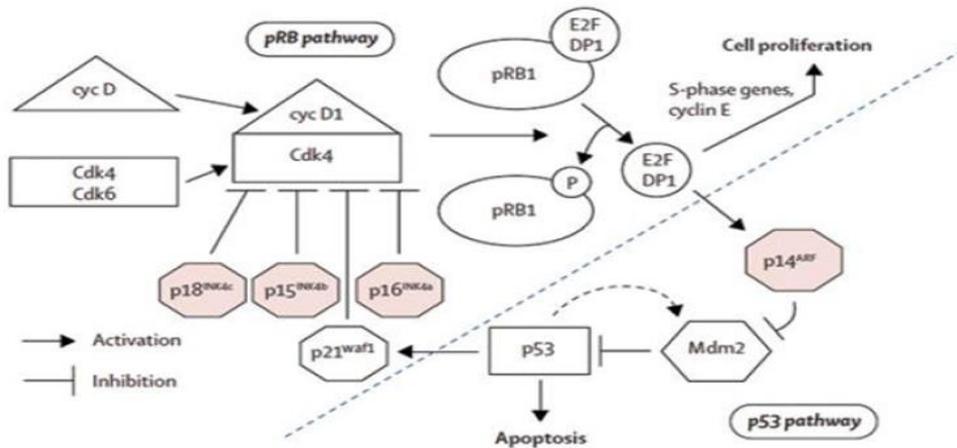
viene rimosso dall'mRNA del T-Ag, mentre nella seconda reazione di splicing, viene utilizzato lo stesso sito donatore di splicing al 5' ma un differente sito accettore di splicing al 3' per ogni messaggero. In tal modo, queste tre proteine condividono i primi 132 aminoacidi all'N-terminale, dove si trovano domini funzionali importanti che influenzano la capacità di JCV di replicare il proprio genoma e di esibire attività oncogena. In particolare, sono mantenuti i domini J e LXCXE. Al contrario, il C-terminale è unico per ogni proteina ed ognuno di essi è in grado di legare la proteina pRb con affinità differenti [Bollag B. et al.. (2000)]. Tale capacità sembra aumentare l'efficienza della trasformazione cellulare da parte del T-Ag, stimolando l'ingresso della cellula in fase S.

2.4. Meccanismo di trasformazione: interazione di TAg con le proteine cellulari pRb e p53

L' interazione tra il TAg e le proteine della famiglia pRb portano all'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia E2F, che inducono espressione dei geni cellulari essenziali per l'ingresso in fase S e la sintesi del DNA. TAg può anche inattivare il soppressore tumorale p53 per promuovere la transizione della cellula dalla fase G1 alla fase S e per prevenire il fenomeno apoptotico (Fig. 11). In un ospite permissivo questo porta alla produzione della progenie virale, seguita dalla lisi e dalla morte della cellula. In un ospite non permissivo o nel caso in cui vi siano riarrangiamenti nel genoma virale che interferiscono con la replicazione, questo può portare all'oncogenesi, dal momento che gli antigeni T sono espressi in maniera continua senza che il ciclo di vita del virus possa arrivare a completamento. Un terzo potenziale meccanismo dell'oncogenesi mediata da TAg è l'induzione del danno cromosomico, ma il meccanismo preciso di con cui i PyVs avviano questo evento non è ancora stato compreso [Trabanelli C. et al.. (1998). Lazutka JR. et al.. (1996)].

RB1, inizialmente identificato come gene soppressore tumorale in cui mutazioni omozigoti nulle (cioè che portano alla sua mancata trascrizione o traduzione in una proteina funzionale) causano tumori della retina nell'essere umano, gioca un ruolo di primo piano nel controllo del ciclo cellulare e nella progressione tumorale [Genovese C. et al.. (2006)]. Il suo prodotto proteico, **pRb**, controlla lo step G1/S del ciclo cellulare, inibendo l'ingresso della cellula nella fase S attraverso l'interazione con il dominio trans-attivante di E2F (Fig. 12). La famiglia dei fattori di trascrizione E2F

regola i geni coinvolti nella sintesi del DNA e nella progressione del ciclo cellulare tra cui le cicline A ed E, la DNA polimerasi alfa e la timidin kinasi [DeGregori J. and Johnson DG.. (2006)]. Quindi, le proteine appartenenti alla famiglia pRb, sono fondamentali nella regolazione del passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. All'interno di questa famiglia sono presenti 3 proteine quali pRb, p107 e p130, conosciute come "pocket proteins" poiché le loro strutture cristalline mostrano la presenza di una "tasca" contenente il sito di legame per alcune oncoproteine virali appartenenti a virus di diverso tipo, le quali, a loro volta, contengono tutte la sequenza consenso LXCXE [Felsani A. et al.. (2006)]. E' da notare, comunque, che sia il dominio LXCXE che il dominio J presenti sull'antigene TAg agiscono in sinergia nel meccanismo di rottura del complesso pRb/E2F per portare all'attivazione di E2F. Inoltre, l'espressione di prodotti di splicing alternativi del TAg (17kT in SV40 o T'135-136 e 165 in JCV), contenenti il dominio J ed il sito di legame specifico per pRb, pur legando pRb con differente affinità, hanno la capacità di riattivare il meccanismo di trasformazione in caso di mutazione nel dominio J del TAg [Boyapati A. et al.. (2003). Bollag B. et al.. (2000)]. TAg può legare pRb, rendendola incapace di legare ed inibire l'azione di E2F, che quindi può liberamente attivare il ciclo cellulare inducendo la sintesi del DNA in cellule quiescenti. Lo stato di fosforilazione della proteina pRb viene regolato durante il ciclo cellulare in modo tale che quando E2F è legato alla forma ipofosforilata di pRb (forma attiva, capace di legare E2F ed inibire la progressione del ciclo cellulare) esso funziona come repressore trascrizionale, mentre quando pRb si trova in forma fosforilata (forma inattiva, incapace di legare E2F e di inibire la progressione del ciclo cellulare) il complesso pRb-E2F si dissocia ed E2F è libero di agire come un attivatore trascrizionale. Un modello proposto per descrivere l' interazione TAg-pRb ipotizza che la proteina TAg interagisca, mediante il dominio LXCXE, con il complesso pRb-E2F. Una volta instaurata l'interazione, il dominio J recluterebbe uno chaperone, Hsc70, che utilizza ATP per dissociare E2F da pRb, permettendo ad E2F di trans-attivare i suoi geni target. [Sullivan CS. et al.. (2000). Garimella R. et al.. (2006)].



Source: Neurosurg Focus © 2011 American Association of Neurological Surgeons

Fig. 11: Meccanismo d'azione dei soppressori tumorali pRb e p53

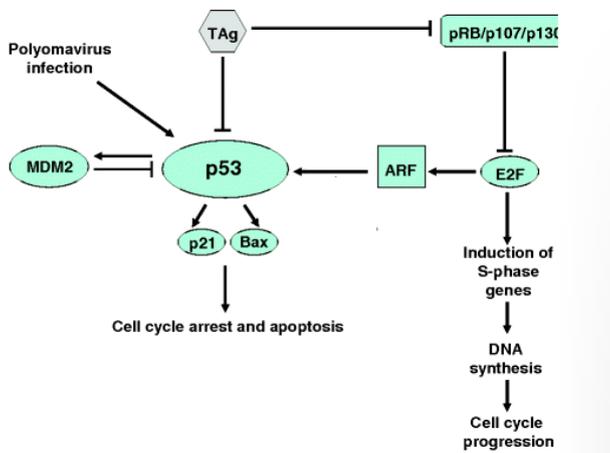


Fig. 12:

L'associazione del TAg con p53 porta all'inattivazione di p53 ed alla inibizione di p21; questo, infine, influenza anche lo stato della fosforilazione di pRb attraverso l'azione della chinasi ciclina dipendente con il conseguente il rilascio di E2F; quest'ultima è anche promossa dall'interazione del TAg con pRb. Le frecce indicano attivazione mentre le linee a forma di T indicano inibizione.

L'attivazione della p53 avviene in risposta a danno del DNA, ipossia o radiazione, e questo porta all'induzione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi (Fig. 12) [Coutts AS. and La Thangue NB.. (2007)]. Per consentire la

riparazione del danno del DNA, p53 causa l'arresto della crescita attraverso la regolazione dell'espressione di p21 (inibitore della kinasi ciclina dipendente). Inoltre, p53 promuove l'apoptosi attraverso l'induzione dell'espressione di geni codificanti Apaf1 e Bax. I livelli di p53 nella cellula sono regolati principalmente dall'oncoproteina murina double minute denominata Mdm2 (Murine Double Minute 2), una ubiquitin-ligasi che abbassa i livelli di p53 mediandone la degradazione [Coutts AS. and La Thangue NB.. (2007)]. Infatti p53 inizia la sua stessa degradazione attivando l'espressione di Mdm2 [Van Dyke T.. (2007)].

L'attivazione di p53 indotta da TAg è controllata dal soppressore tumorale p14^{ARF} [Sherr CJ.. (2006)]. Esso fa aumentare l'espressione di p53 per contrastare i segnali dello stress oncogeno. L'espressione di p14^{ARF} è regolata da E2F. Quindi, p14^{ARF} è un soppressore tumorale critico che connette la via di trasduzione del segnale di p53 a quella di pRb. Questo potrebbe portare all'apoptosi o all'arresto del ciclo cellulare in maniera p53-dipendente, ma la p53 viene a sua volta inattivata dal TAg. L'interazione tra p53 e TAg impedisce a p53 di interagire con il DNA poiché il TAg si lega a p53 proprio a livelli del suo dominio di legame per il DNA, e quindi inibisce le sue funzioni trans-attivanti. E' interessante notare che, mentre oncoproteine virali come E6 di HPV colpiscono p53 degradandola, TAg porta all'accumulo di p53, stabilizzandola sotto forma di complesso p53-TAg [Tiemann F. and Deppert W..(1994)].

2.5.Polyomavirus JC: dalla PML all'associazione con i tumori umani

Il JCV infetta circa l' 80% della popolazione umana; evidenze sierologiche indicano che l'infezione primaria avviene nella tarda infanzia [Knight RS. et al.. (1988)]. Si ipotizza che, all'infezione primaria da JCV segua una viremia con conseguente disseminazione a livello renale, dove JCV stabilisce un' infezione persistente. La presenza di JCV nelle urine di soggetti sani ed immunocompetenti suggerisce che il rene sia il sito primario di latenza del virus [Kitamura T. et al.. (1990)]. La via di trasmissione di JCV rimane controversa; la trasmissione orizzontale, mediante respirazione o ingestione di acqua o cibi contaminati, è probabilmente la via primaria di diffusione. La replicazione di JCV viene tenuta sotto controllo dall'immunità cellulo-mediata; la riattivazione di JCV dallo stato di latenza è associata ad uno stato di deterioramento della risposta dei linfociti T-helper-1[Weber F. et al.. (2001)]. Più

recentemente sono stati rilevati linfociti T citotossici in individui immunocompetenti suggerendo un ulteriore ruolo dell'immunità cellulo-mediata nella protezione contro la riattivazione del virus [Du Pasquier RA. et al.. (2004)].

JCV è l'agente eziologico della PML, malattia fatale demielinizzante del sistema nervoso centrale, che colpisce soggetti immunodepressi, in particolare gli affetti da HIV/AIDS, che costituiscono l'80% dei casi di PML (circa il 5% dei pazienti con AIDS sviluppa questa patologia). JCV è in grado di infettare attivamente e di distruggere gli oligodendrociti, cellule produttrici di mielina, portando alla formazione di foci multipli di demielinizzazione nel SNC. In vitro, JCV può essere coltivato solamente in cellule primarie gliali fetali umane, cellule nelle quali può essere riscontrato anche nei soggetti affetti da PML. Non è ancora chiaro come JCV possa giungere in questa sede anatomica, dal momento che la persistenza del virus si attesta a livello delle cellule del tratto reno-urinario. Alcuni ricercatori ipotizzano che il midollo osseo possa costituire un sito di latenza e che le cellule derivate da esso (in particolare i linfociti B per i quali il JCV ha tropismo) possano veicolare il virus a livello encefalico attraverso il torrente circolatorio [Major EO.. (2010)]; altri, invece, pensano che siano le stesse cellule gliali ad ospitare la latenza di JCV e che esso possa riattivarsi a seguito del sopraggiungere dello stato immunosoppressivo [Bayliss J. et al.. (2012)].

JCV è stato associato con una ampia varietà di tumori maligni in animali da laboratorio (Tab. 2). L'inoculazione intracerebrale di JCV in criceti siriani causa tumori di origine neuronale o gliale [Walker DL. et al.. (1973)], mentre ratti infettati sviluppano tumori neuroectodermici primitivi [Ohsumi S. et al.. (1986)]. Alcuni primati (scimmia scoiattolo e scimmia gufo) sviluppano neoplasie gliali se infettati in età adulta con JCV [Miller NR. et al.. (1984). London WT. et al.. (1983)], rimanendo il solo virus umano capace di indurre la formazione di tumori solidi in primati non umani [Khalili K. et al.. (2003)]. Topi transgenici che esprimono il TAg di JCV sviluppano neuroblastomi e tumori neuroectodermici primitivi [Krynska B. et al.. (1999)].

Animal	Tumor Type	Reference
Hamster	Medulloblastoma	Padgett et al. 1977 and Zu Rhein et al. 1979
	Glioma	Walker et al. 1973
	Neuroblastoma	Varakis et al. 1978
	Pineocytoma	Padgett et al. 1977
Rat	Neuroectodermal	Ohsumi et al. 1986
Owl Monkey	Astrocytoma	London et al. 1978
	Glial/Neural Origin	
	Glioblastoma	Major et al. 1987
Squirrel Monkey	Astrocytoma	Houff et al. 1983 and London et al. 1983

Tab. 2: Tumorigenesi di JCV in modelli animali.

JCV è stato associato anche ad alcuni tumori maligni dell'uomo, come dimostra la presenza di sequenze del suo DNA e l'espressione di proteine virali in numerosi campioni clinici tumorali. Il DNA di JCV è stato rilevato in molti tumori umani maligni e non maligni che originano dalle cellule del sistema nervoso centrale [Khalili K. et al.. (2003)]. Sequenze di DNA di JCV ed immunoreattività al TAg sono stati rilevati in una varietà di tumori umani dell'encefalo, compresi tumori di origine gliale e medulloblastomi [Del Valle L. et al.. (2002)]. In un report circa il 77% dei medulloblastomi conteneva il DNA di JCV ed il 36% era positivo al TAg in immunohistochimica (IHC) [Khalili K. et al.. (2003)]. Anche l'agnoproteina di JCV è stata rilevata in campioni tumorali [Del Valle L. et al.. (2002)]. Il DNA di JCV è stato anche trovato a livello del tratto gastrointestinale umano sia superiore che inferiore [Ricciardiello L. et al.. (2001). Ricciardiello L. et al.. (2000)], inclusi oltre l' 80% di adenocarcinomi del colon [Laghi L. et al.. (1999)].

Tumor Type/Cancer	References
Glioblastomas	Del Valle et al. 2000, Del Valle et al. 2001, Boldorini et al. 2003, and Pina-Oviedo et al. 2006
Medulloblastoma	Krynska et al. 1999, Del Valle et al. 2000, Delbue et al. 2005, and Shiramizu et al. 2007
Astrocytoma	Del Valle et al. 2001 and Boldorini et al. 2003
Oligoastrocytoma	Rencic et al. 1996, Caldarelli-Stephano et al. 2000, and Del Valle et al. 2001
Oligodendroglioma	Caldarelli-Stephano et al. 2000, Del Valle et al. 2001, Del Valle et al. 2002, and Boldorini et al. 2003
Ependymoma	Caldarelli-Stephano et al. 2000 and Del Valle et al. 2001
Colorectal cancer	Laghi et al. 1999, Ricciardiello et al. 2001, Enam et al. 2002, Lin et al. 2008, and Jung et al. 2008
Esophageal cancer	Del Valle et al. 2005
Gastric cancer	Shin et al. 2006 and Murai et al. 2007
Lung cancer	Zheng et al. 2007

Tab. 3: Associazioni riportate tra JCV e tumori umani.

Pertanto, test biologici compiuti su animali e studi su culture cellulari mostrano che JCV esplica in maniera diretta il suo potenziale oncogeno e trasformante, attraverso le oncoproteine dell' antigene-T espresse in maniera costante [White MK. et al.. (2004)]. Anche se i modelli animali spesso non possono tradursi all'uomo per compiere una valutazione pato-biologica, è comunque probabile che le strategie biologiche dei PyVs abbiano delle similarità nonostante la differenza di ospite. E' importante sottolineare che, basandosi sull' "inadeguata evidenza " nell'uomo e sulle "sufficienti evidenze in animali sperimentali, un gruppo di lavoro monografico dell' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha recentemente classificato JCV come "possibile cancerogeno per l'uomo" (Gruppo 2B) [Bouvard V. et al.. (2012)]. In ogni modo, l'associazione tra JCV e tumori umani rimane argomento discusso e controverso.

2.6.Polyomavirus SV40: dalla patologia animale all'associazione con i tumori umani

SV40 è stato isolato per la prima volta nel 1960 in cellule di rene di scimmia resus usate per produrre il vaccino antipolio. Nei macachi asiatici il virus si trasmette attraverso l'urina e per via respiratoria, orale e subcutanea. SV40 è stato isolato dal cervello e dai reni delle scimmie macaco, e causa la PML in scimmie resus infettate da SIV [Horvath CJ. et al.. (1992)]. SV40 trasforma cellule di specie animali che non sono permissive per la replicazione virale, compresi ratti, topi, criceti e maiali della guinea [Vilchez RA. et al.. (2003)]. Iniezioni sottocutanee di SV40 in criceti porta alla formazione di tumori solidi [EDDY BE. et al.. (1962)], mentre inoculazioni intravenose inducono linfomi, leucemia ed osteosarcoma [Diamandopoulos GT..(1972)]. Criceti a cui viene iniettato SV40 per via intracranica sviluppano tumori del plesso corioideo ed ependimomi [KIRSCHSTEIN RL. and GERBER P. (1962)], mentre criceti a cui in virus viene somministrato in maniera intrapleurica sviluppano mesoteliomi [Cicala C. et al.. (1993)]. Topi transgenici che esprimono la regione precoce di SV40 sotto il controllo del promotore di SV40 per la regione precoce, sviluppano tumori del plesso corioideo [Palmiter RD. et al.. (1985)]. La somministrazione accidentale di vaccini antipolio contaminati da SV40 a milioni di persone tra il 1955 ed il 1963, ha stimolato l'interesse per la determinazione delle potenzialità di questo virus a causare malattia nella popolazione umana.

Nove studi di coorte indipendenti hanno seguito popolazioni che ricevettero i vaccini potenzialmente contaminati da SV40; questi studi epidemiologici, spesso sono risultati viziati in varia misura e non hanno permesso di trovare un' associazione chiara ed inequivocabile tra la somministrazione del vaccino ed il cancro, sebbene la maggior parte di questi non abbia riportato un aumento di rischio per il cancro collegato a questa esposizione [Stratton K. and Almario DA. (2002)]. Sequenze di DNA simili a quelle di SV40 sono state rilevate in una ampia varietà di tumori umani. Sequenze di SV40 sono state inizialmente trovate mediante PCR in tumori del plesso coroideo ed ependimomi [Bergsagel DJ. et al.. (1992)]. Particelle infettive di SV40 sono state successivamente isolate da un tumore del plesso coroideo [Lednicky JA. et al.. (1995)]. Oltre a tumori del plesso coroideo, sequenze di DNA di SV40 sono state rilevate mediante PCR in medulloblastomi, con concomitante immunostochimica dell' antigene TAg [Huang H. et al.. (1999)]. Sequenze simili a quelle di SV40 sono state osservate in più del 30% di alcuni tumori dell'osso [Carbone M. et al.. (1996)] e nel 43% dei linfomi non-Hodgkins [Shivapurkar N. et al.. (2002)], sebbene alcuni abbiano riportato anche un' associazione non altrettanto chiara tra SV40 e linfomi [Hernández-Losa J, et al.. (2005)]. Sequenze di DNA di SV40 sono state trovate in 40-50% dei mesoteliomi, seppure in maniera variabile in relazione alle aree geografiche [Emri S. et al.. (2000)]. Il mesotelioma è una malattia complessa e l'esposizione all'amianto è un noto fattore di rischio per il suo sviluppo. Linee cellulari umane di mesotelioma sono semi-permissive per l'infezione da SV40 e subiscono trasformazione cellulare in risposta all'infezione L'esposizione delle cellule all'amianto ha un effetto sinergico sulla trasformazione [Bocchetta M. et al.. (2000)]. Alla luce di questi dati e dei numerosi studi che hanno descritto l'associazione di SV40 al mesotelioma, si ipotizza che l'infezione da SV40 possa essere un cofattore nello sviluppo di questa neoplasia. Tuttavia, sebbene numerosi studi abbiano riportato una associazione tra infezione da SV40 e questa patologia, altri ricercatori non sono riusciti ad osservare sequenze virali di SV40 in campioni di mesotelioma provenienti da aree geografiche in cui non venne somministrato il vaccino antipolio contaminato [Hirvonen A. et al.. (1999)].

I risultati di questi numerosi studi sollevano preoccupazioni, perché le tipologie di tumori umani in cui SV40 è stato maggiormente ritrovato (tumore della pleura, dell'osso e del cervello) sono le stesse neoplasie maligne osservate nei modelli sperimentali animali. L'ipotesi che SV40 possa causare il cancro negli esseri umani è

un campo di ricerca particolarmente discusso. Vari metodi sono stati usati per rilevare SV40 in una varietà di tumori umani, ma rimane ancora da scoprire se la presenza di SV40 contribuisca significativamente alla trasformazione maligna o se certe neoplasie umane forniscano un microambiente favorevole alla replicazione virale negli esseri umani con infezione latente da SV40.

3. Papillomavirus umani

3.1. Classificazione

I Papillomavirus sono virus largamente diffusi tra i mammiferi e sono stati identificati, oltre che nel genere umano, anche nei cavalli, nei conigli, nei cani, nelle pecore, nelle scimmie e nei topi. I Papillomavirus sono virus specie, sito e tessuto-specifici.

I papillomavirus umani (HPV) appartengono al genere Papillomavirus della famiglia Papillomaviridae. Nella specie umana sono stati descritti, fino ad oggi, oltre 120 diversi genotipi di HPV che sono stati suddivisi in due gruppi in base al sito di infezione [de Villiers EM. et al.. (2004)]; gli HPV mucosotropi infettano gli epiteli mucosi del tratto anogenitale ed orofaringeo, mentre gli HPV epiteliotropi colpiscono prevalentemente la cute. Circa un terzo dei genotipi di HPV infetta le cellule epiteliali del tratto genitale e sono ulteriormente suddivisi in “alto rischio” e “basso rischio”, a seconda del loro potenziale oncogeno [de Villiers EM. et al.. (2004)]. I genotipi a basso rischio, come HPV 6 e HPV 11, inducono proliferazione benigna delle cellule epiteliali, spesso con conseguente sviluppo di verruche genitali (condilomi acuminati). Al contrario, i genotipi ad alto rischio sono gli agenti eziologici del cancro del collo dell'utero; il 99% dei carcinomi a cellule squamose della cervice uterina contiene genotipi di HPV che appartengono ad alcune specie "ad alto rischio" filogeneticamente correlate (alfa-5, 6, 7, 9, 11), appartenenti al genere alfa a tropismo mucoso. [Walboomers JM. et al.. (1999)]. I genotipi trovati più frequentemente nel tumore della cervice uterina (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) ed quattro ritrovati più raramente (HPV-39, 51, 56, 59) sono tutti classificati dallo IARC come “cancerogeni per l'uomo” e, per questo, inseriti nel Gruppo 1 di rischio. Sempre lo IARC ha valutato che il rischio di cancro sia di un ordine di grandezza superiore per

infezione da HPV-16 rispetto agli altri tipi di HPV ad alto rischio. Gli altri genotipi di HPV tra le specie alfa ad alto rischio sono stati classificati come "possibili cancerogeni per l'uomo" (Gruppo 2B), mentre HPV-6 e HPV-11, che appartengono alla specie alfa-10, sono risultati "non classificabili in relazione alla loro cancerogenicità nell'uomo" (Gruppo 3) sulla base di inadeguata evidenze epidemiologiche ed assenza di potenziale cancerogeno in studi meccanicistici [Bouvard V, et al.. 2009]. I genotipi di HPV cutanei dei generi beta e gamma, ampiamente diffusi nella popolazione, sono stati classificati nel gruppo 3 sulla base di prove inconcludenti sulla loro capacità di provocare il cancro della pelle negli esseri umani e sulla base di limitati dati meccanicistici. Eccezioni sono da considerarsi i genotipi HPV-5 e HPV-8, che sono stati valutati come "possibili cancerogeni" in soggetti con epidermodisplasia verruciforme (Gruppo 2B).

HPV 16 è stato dimostrato nel 60% delle displasie intraepiteliali cervicali di alto grado, nel 50% dei carcinomi del tratto ano-genitale e in rari casi di carcinoma orale, faringeo e polmonare; l'HPV 18 è associato agli adenocarcinomi; i genotipi 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82 e 89 sono genotipi meno comuni, ma associati a displasie e carcinomi invasivi del tratto ano-genitale. Fra i genotipi a basso rischio oncogeno i principali sono l'HPV 6, 11, 42, 43, 44, 53, 54, 57, 66 e 84, regolarmente riscontrati in verruche genitali piane ed esofitiche ed in alcune displasie di basso grado. A questi genotipi si aggiungono alcuni HPV non bene caratterizzati dal punto di vista del potenziale oncogeno, tra cui gli HPV 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 81, CP6108 e IS39.

La classificazione in genotipi degli HPV è basata sul confronto di sequenze nucleotidiche di regioni specifiche del genoma. Secondo i criteri adottati dal Comitato di Nomenclatura dei Papillomavirus, i diversi genotipi di HPV vengono distinti in base al grado di omologia esistente tra le sequenze nucleotidiche delle regione L1 del genoma virale. Un Papillomavirus è considerato un nuovo genotipo quando l'omologia esistente tra le sequenze del suo DNA e quelle dei genotipi già classificati non supera il 90%. I virus con un'omologia superiore al 90% ma inferiore al 98% sono definiti sottotipi e quelli con una omologia compresa tra il 98% e il 100% sono definite varianti (esistono molte varianti del genotipo 16, la E è quella europea).

3.2. Organizzazione del genoma

La struttura e l'organizzazione genomica degli HPV è altamente conservata tra i differenti genotipi. Tutti gli HPV sono piccoli virus a DNA a doppio filamento circolare, racchiuso in un capsidico icosaedrico, sprovvisto di peploni, di diametro compreso tra 52 e 55 nm, composto da 72 capsomeri.

Il genoma virale è lungo circa 8000 paia di basi e contiene otto open reading frames (ORF). Uno schema dell'organizzazione genomica di HPV è mostrata in Fig 12. Il genoma virale appare organizzato in tre regioni principali: una regione codificante per le proteine virali precoci (E: early), una codificante per le proteine virali tardive (L: late) ed una regione non codificante regolatoria (LCR: long control region). La regione LCR, denominata anche URR (upstream regulatory region), è un segmento di DNA di circa 1Kb che comprende l'origine della replicazione virale e siti di legame per i fattori trascrizionali.

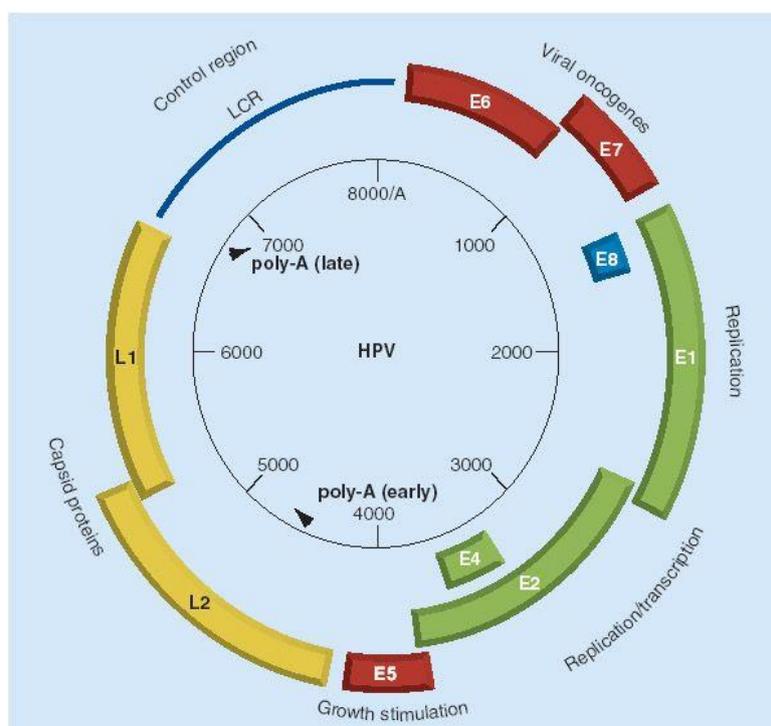
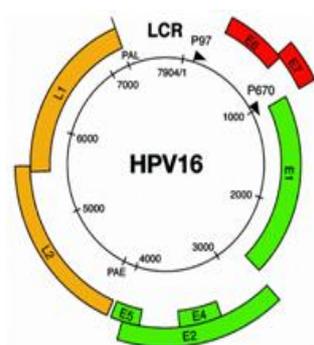


Fig. 12: Organizzazione del genoma di un HPV

Gli HPV ad alto rischio iniziano la trascrizione a partire da due promotori maggiori (precoce e tardivo) che vengono attivati in differenti fasi del ciclo vitale. La

trascrizione da parte di entrambi i promotori avviene a partire da un solo filamento del genoma virale e porta alla produzione di messaggeri policistronici che vanno incontro a splicing alternativo. Il promotore precoce si trova subito a monte della ORF di E6 ed è attivo nella fase iniziale dell'infezione, prima che avvenga la replicazione produttiva. Per HPV 31 ed HPV 16 questo promotore è stato chiamato p97, mentre per HPV 18 è il p105 [Hummel M. et al.. (1992)]. Nelle cellule indifferenziate, i trascritti policistronici che codificano le proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7, sono espresse a partire dal promotore precoce (Tab. 4). La ORF E4 codifica per una proteina che sembra intervenire nella maturazione del virus e durante l'assemblaggio del virione; si trova associata alle membrane cellulari e si accumula nel citoplasma. Nei cheratinociti umani sembra intaccare l'integrità del citoscheletro cellulare, determinando la coilocitosi, alterazione cellulare tipica dell'infezione da HPV, e favorendo la fuoriuscita delle particelle virali neoformate. La ORF E5 codifica per una oncoproteina che interagisce con recettori cellulari di membrana atti a stimolare la proliferazione cellulare. Sia E4 che E5 vengono espresse nei trascritti precoci, ma poiché costituiscono la terza e la quarta ORF esse probabilmente non sono tradotte in maniera efficiente.



PROTEIN	FUNCTIONS
E6	Destruction of p53 tumor suppressor protein (Accumulation of mutation and Apoptosis inhibition)
E7	Inactivation of pRb tumor suppressor protein (Cell cycle progression and accumulation of p16INK4a)
E1	Viral DNA replication
E2	Viral DNA replication; repression of E6/E7 genes
E4	Assembly and release of the viral particle
E5	Interaction with the Epidermal Growth factor (EGF)
L1	Major capsid protein in the viral particle
L2	Minor capsid protein in the viral particle

Tab. 4: Tabella schematica delle proteine di HPV e loro funzioni.

Le ORF E1 ed E2 codificano per proteine essenziali per la replicazione virale. E1 è una fosfoproteina con attività ATP-asi ed elicasi [Hughes FJ. et al.. (1993)]. E2 forma un complesso con E1 e la dirige verso l'origine della replicazione virale dove si lega con alta efficienza [Mohr IJ. et al.. (1990)]. Oltre al suo ruolo nella replicazione virale, E2 è anche un regolatore trascrizionale virale, che può modulare positivamente o negativamente l'espressione dei geni precoci [Cripe TP. et al.. (1987)]. Le ORF E6 ed E7 dei genotipi ad alto rischio codificano per oncoproteine necessarie alla

trasformazione della cellula ospite; esse infatti interagiscono e degradano i soppressori tumorali p53 e pRb, rispettivamente, innescando una proliferazione cellulare incontrollata e favorendo la carcinogenesi [Chellappan S. et al.. (1992)]. La fase produttiva del ciclo di vita virale viene attivata quando le cellule infette sono indotte a differenziarsi. I trascritti che derivano dal promotore tardivo, posto nella ORF di E7, cominciano ad aumentare notevolmente ; essi sono E1, E4, E5 e le proteine capsidiche L1 ed L2 [M Hummel JB. et al. 1992]. L1 ed L2 sono espresse molto tardi nel ciclo di vita e vanno a costituire il capside virale (Fig. 13). L1 è la proteina capsidica maggiore, ha un peso molecolare di circa 55 kDa, e rappresenta l'80% delle proteine virali; la proteina L2 è la proteina capsidica minore, ha un peso molecolare di circa 70 kDa, e rappresenta il 20% delle proteine virali.

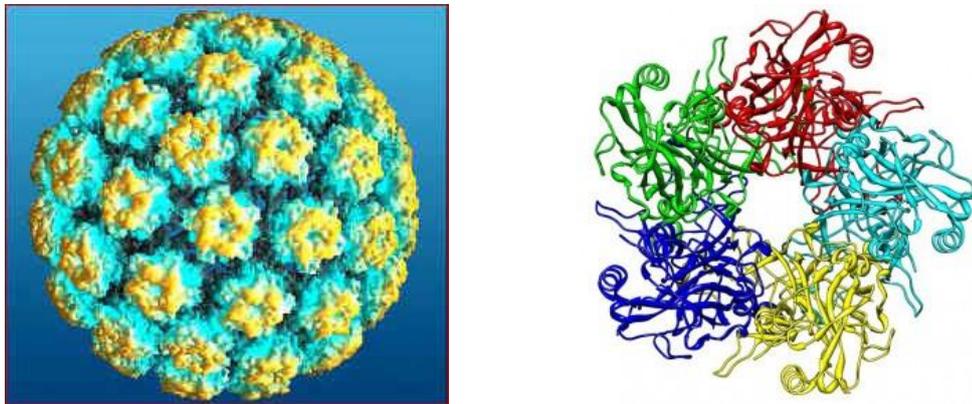


Fig. 13:Modello del virione di HPV (a sinistra) e della forma pentamerica della proteina capsidica L1 (a destra)

3.3.Ciclo di vita dei papillomavirus umani

Il ciclo di vita degli HPV è strettamente dipendente dallo stato di differenziazione della sua cellula ospite , il cheratinocita, ed è regolato da un certo numero di proteine cellulari [Stubenrauch F, Laimins LA. 1999]. Il tropismo degli HPV per i cheratinociti non sembra, infatti, dipendere dalla presenza di specifici recettori presenti sulla superficie della cellula ospite, ma piuttosto dalla presenza di promotori specifici localizzati nella regione LCR del genoma virale, soggetti a fattori di regolazione trascrizionale virali e cellulari. L'infezione avviene nelle cellule staminali dello strato basale attraverso microlesioni. Una volta penetrato nella cellula ospite, il virus si stabilisce nel nucleo come elemento extracromosomico. Il promotore precoce viene

attivato e vengono prodotte le proteine E1 ed E2 che, rapidamente, consentono la replicazione del genoma virale fino a 50-100 copie episomali per cellula. Il numero di copie genomiche, dopo questa fase iniziale costitutiva, viene mantenuto costante e la replicazione avviene in sincronia con quella della cellula ospite. Quando la cellula infettata si divide, una delle due cellule figlie esce dallo strato basale ed intraprende il suo programma di differenziamento, mentre l'altra cellula figlia rimane nello strato basale e costituisce un reservoir di cellule indifferenziate in cui il DNA virale si mantiene in forma latente. Durante la differenziazione della cellula infetta, il promotore tardivo viene attivato e quindi inizia la fase produttiva del ciclo di vita, con massiccia replicazione dei genomi virali fino a migliaia di copie, espressione dei geni tardivi ed assemblaggio del virione. Paradossalmente, questi eventi si verificano nelle cellule che normalmente escono dal ciclo cellulare e non sono più in fase di proliferazione. HPV altera il ciclo cellulare soprattutto attraverso l'azione delle proteine E6 ed E7, riuscendo così a mantenere in fase attiva del ciclo cellulare un gruppo di cellule infette e ad assicurarsi l'espressione di quei fattori cellulari necessari per la replicazione del DNA virale [Garner-Hamrick PA. et al. 2004].

A causa della difficoltà incontrata nella produzione di grandi quantità di virus sia in sistemi in vivo che in vitro, è stato difficile studiare i meccanismi attraverso cui gli HPV entrano nelle cellule e stabiliscono un'infezione produttiva. L'interazione tra HPV e superficie cellulare è stata pertanto indagata utilizzando degli pseudo-virioni formati da proteine L1 ed L2 auto assemblatesi in sistemi eterologhi di espressione (VLP: virus-like particles) ed un plasmide reporter al posto del genoma. I papillomavirus possono legarsi a cellule di vari tessuti e di varie specie, indicando che il recettore di legame iniziale è ampiamente diffuso [M Müller L. et al. 1995]. Diversi recettori sono stati proposti come possibili bersagli di legame del virus, e tra questi i proteoglicani eparan solfato [Shafti-Keramat S. et al. 2003] e l'integrina $\alpha 6$ [McMillan NA. et al. 1999]. Si ipotizza che il legame iniziale di L1 possa essere necessario ad indurre un cambiamento conformazionale nel capsido, permettendo ad L2 di interagire con un recettore secondario, e portando all'internalizzazione [Yang R. et al. 2003]. La maggior parte dei papillomavirus sembra entrare nella cellula attraverso un meccanismo clatrina dipendente che richiede l'acidificazione degli endosomi [Day PM. et al. 2003], all'interno dei quali avviene lo scapsidamento virale e la liberazione del genoma. La proteina capsidica L2 gioca un ruolo cruciale nella fuoriuscita del genoma virale dall'endosoma e quindi per il suo rilascio nel citoplasma

cellulare; L2, infatti, non solo destabilizza la membrana endosomiale [Kämper N. et al. 2006], ma facilita il trasferimento del genoma virale a specifici domini nucleari per stabilirvi l'infezione [Day PM. et al. 2004].

Una volta entrato nel nucleo, il genoma virale vi si instaura sotto forma di episomi multicopia che rimangono numericamente stabili fino alla successiva divisione cellulare (Fig. 14). Queste fasi iniziali del ciclo di vita virale richiedono l'espressione dei trascritti derivanti dal promotore precoce, che codificano per le oncoproteine E6 ed E7, così come per le proteine della replicazione E1 ed E2. La trascrizione a partire dal promotore precoce è controllata dal legame di fattori di trascrizione cellulari a sequenze di riconoscimento specifiche che si trovano nella LCR. E' proprio il legame differenziale tra questi fattori cellulari e le sequenze virali enhancer che contribuisce alla restrizione dell'infezione da HPV alle cellule di origine epiteliale [Chong T. et al. 1991]. L'espressione dei geni virali precoci, inclusi quelli per i fattori della replicazione virale, contribuisce al controllo del numero di copie virali nelle cellule indifferenziate. Il mediatore principale di questa attività è la proteina E2 che funziona come regolatore trascrizionale virale oltre ad avere un ruolo aggiuntivo nella replicazione [Stubenrauch F. et al. 1998]. E2 si lega sotto forma di dimero alle sequenze palindromiche ACCN₆GGT che, nel loro insieme, formano l'E2-binding site (E2BS). Alcuni E2BS sono presenti non solo nella LCR, ma anche a monte del sito di inizio della trascrizione di E6 e circa 500 nucleotidi più a valle. La replicazione del DNA virale è mediata da E1 ed E2 che agiscono in sincronia con le proteine della replicazione del DNA cellulare. La proteina E1 è altamente conservata tra i vari papillomavirus e possiede varie attività tra cui quella di legame al DNA in maniera sito specifica, ATPasica DNA-dipendente ed elicastica [F J Hughes and M A Romanos. 1993. Raj K. et al. 1995]. L'origine della replicazione virale si trova in una zona ricca di A/T nella LCR, adiacente al sito di inizio del promotore tardivo, ed è costituito da siti di legame per E1 ed E2 [A M Del Vecchio et al. , 1992]. E1 può legare l'origine della replicazione virale, ma lo fa con bassa affinità. Invece, attraverso una complessa interazione, E1 ed E2 cooperano a legare l'origine con alta affinità [J Sedman and A Stenlund, 1995]. I genomi virali vengono replicati in sincronia con il DNA cellulare durante la fase S e vengono ripartiti equamente nelle cellule figlie durante la mitosi.

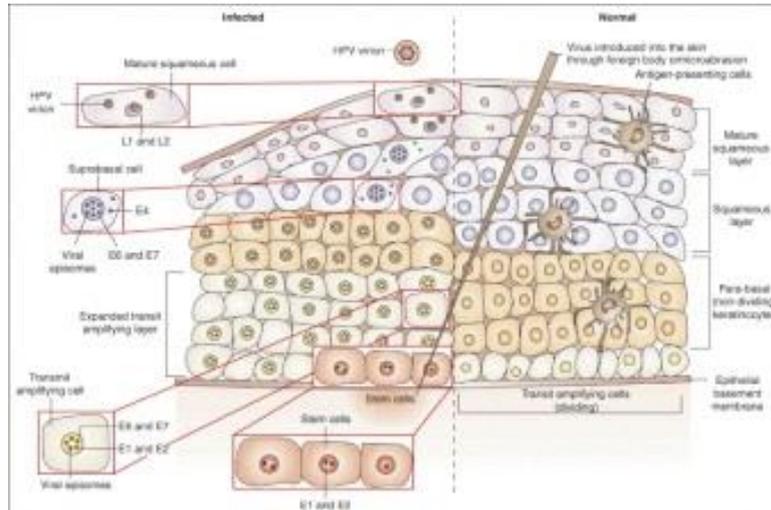


Fig. 14: Ciclo replicativo di HPV nel contesto dell'epitelio squamoso stratificato.

Le proteine E1 ed E2 non sono le uniche proteine virali necessarie a mantenere stabili gli episomi nelle cellule indifferenziate. E' necessaria anche l'espressione di E6 ed E7 per mantenere stabili gli elementi extra cromosomici [Thomas JT. et al., 1999]. Entrambe le proteine E6 ed E7 dei genotipi ad alto rischio sono oncoproteine virali multifunzionali che interagiscono con molte proteine cellulari. E' interessante notare che il ruolo di queste proteine nella gestione degli episomi virali si esplica anche nei genotipi di HPV a basso rischio [Jennifer T. Thomas et al., 2001]. La proteina E7 degli HPV ad alto e basso rischio è una oncoproteina nucleare di circa 100 amminoacidi, divisa in tre regioni conservate: un dominio amino-terminale (CR1), un dominio centrale che contiene il sito di legame LXCXE per pRb (CR2), ed un dominio carbossi-terminale che contiene due motivi a dita di zinco (CR3) [Gage JR. et al., 1990]. La capacità di E7 di legare e degradare i membri della famiglia Rb è una importante funzione dei genotipi ad alto rischio. Anche la proteina E7 dei genotipi a basso rischio lega Rb, ma con ridotta affinità [Münger K. et al., 1989]. I membri della famiglia Rb (pRb, p107 e p130) sono necessari al controllo del ciclo cellulare che avviene in gran parte attraverso la regolamentazione della famiglia di fattori di trascrizione E2F [Dyson N., 1998]. Il legame di E7 ad Rb ipofosforilato porta al rilascio del fattore E2F necessario per la trascrizione dei geni coinvolti nella proliferazione e progressione del ciclo cellulare. La proteina E6, invece, ha la capacità di legare e promuovere la degradazione di p53 [Scheffner M. et al., 1990]. In questo modo, risulta compromessa la capacità della cellula ospite di controllare il ciclo cellulare e la risposta apoptotica. Non è chiaro se i genotipi di HPV a basso rischio

legghino p53, ma è chiaro che essi non ne mediano la degradazione [X Li and P Coffino, 1996]. Comunque, la proteina E6 dei genotipi ad alto e basso rischio ha in, entrambi i casi, la potenzialità di perturbare il potenziale transattivante di p53. L'alterazione dell'attività trascrizionale di p53 viene ottenuta interferendo con il legame di p53 ai suoi siti di legame sul DNA [MS. Lechner and LA. Laimins. 1994] oppure, come avviene per la proteina E6 dei genotipi ad alto rischio, attraverso l'interazione con i coattivatori trascrizionali p300/CBP [Patel D. et al., 1999].

La fase produttiva del ciclo di vita virale avviene negli strati terminali dell'epidermide composti da cellule differenziate, dove le particelle virali vengono assemblate e rilasciate. La differenziazione delle cellule infette induce un drammatico incremento nell'espressione dei geni tardivi, portando all'amplificazione del genoma ed alla sintesi dei virioni [Stubenrauch F. et al., 1999]. I trascritti espressi a partire dal promotore precoce rimangono invariati durante il processo di differenziamento, e questo porta ad una espressione continua, seppur a bassi livelli, delle oncoproteine E6 ed E7 attraverso tutti gli strati dell'epitelio. A seguito dell'inizio del processo di differenziamento cellulare, ha inizio anche la trascrizione tardiva dei geni virali a partire dal promotore tardivo (p742 in HPV31 e p670 in HPV16) localizzato all'estremità 3' dell'ORF di E7 [K Grassmann et al., 1996]. I trascritti tardivi terminano o alla fine del gene E5 o del gene L1, grazie l'azione di sequenze di poliadenilazione che sono conservate tra i papillomavirus. I messaggeri tardivi codificano per E4, E5, L1 ed L2. L'esatto meccanismo con cui il differenziamento cellulare controlla le fasi produttive del ciclo di vita virale è ancora argomento di studio. In seguito al differenziamento, la produzione di E1 ed E2 passa dal controllo del promotore precoce, strettamente regolato da E2, sotto il controllo del promotore tardivo la cui funzione è indipendente da E2 [G Steger and S Corbach, 1997]. Questo cambiamento nell'uso del promotore porta ad un incremento dell'espressione di E1 ed E2, con successiva amplificazione dei genomi virali fino a migliaia di copie per cellula. L'espressione della proteina E7 durante le fasi di differenziamento cellulare, ha la funzione di creare un ambiente cellulare favorevole alla fase produttiva del ciclo di vita virale. E7 mantiene in fase attiva del ciclo cellulare le cellule che si stanno differenziando, e lo fa attraverso il legame con pRb /p130/ p107 di cui media anche la degradazione [A Felsani, et al., 2006]. Questo facilita il rientro della cellula in fase S e permette alla replicazione virale produttiva di avvenire anche nelle cellule differenziate dello strato soprabasale. Sebbene la proteina E7 dei genotipi ad alto

rischio legghi i membri della famiglia Rb con una affinità più elevata di quella dei basso rischio, anche questi ultimi possono indurre la sintesi del DNA nelle cellule in fase di differenziamento [Cheng S. et al., 1995].

L'attivazione della fase produttiva del ciclo di vita di HPV coincide anche con l'espressione ad alti livelli della proteina E4 [Doorbar J. et al. 1997], che si accumula nel citoplasma delle cellule più superficiali dell'epitelio pluristratificato. Sebbene il contributo della proteina E4 al ciclo di vita virale non sia ancora completamente chiaro, sembra che essa abbia un ruolo nell'indurre il collasso delle citocheratine di membrana e quindi favorisca il rilascio dei virioni neoformati mediante l'alterazione dell'integrità cellulare [Wang Q et al. 2004].

Un'altra proteina di HPV che viene espressa nelle cellule in fase di differenziamento è E5. Nel papillomavirus bovino (BPV), la proteina E5 è responsabile della maggiore attività trasformante del virus ma, nell'uomo, i meccanismi con cui essa media i suoi effetti sono ancora in fase di studio. Diversi studi in vitro hanno suggerito una relazione tra E5 ed il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), un recettore transmembrana presente su tutte le cellule epiteliali e potente fattore di crescita per fibroblasti e cheratinociti [Straight SW. et al. 1993].

La sintesi della progenie virale avviene negli strati terminali maggiormente differenziati dell'epitelio. Le proteine capsidiche L1 ed L2 vengono espresse in questi livelli solo dopo l'avvenuta amplificazione dei genomi virali che restano associati ad istoni cellulari formando complessi simil cromatinici. Il genomi virali vengono quindi inseriti in capsidi icosaedrici, ciascuno dei quali è costituito da 360 copie della proteina capsidica maggiore L1 e circa 12 copie della proteina capsidica minore L2 [Modis Y. et al. 2002]. Sebbene le particelle neoformate del virus riescano ad assemblarsi anche in assenza di L2, si crede che la sua presenza influenzi l'efficienza dell'impacchettamento e sia essenziale per la successiva infettività dei virioni [Okun MM. et al., 2001]. Una volta mature, i virioni fuoriescono dalla superficie dell'epitelio, ma il meccanismo ben preciso con cui questo avviene non è chiaro.

3.4. Trasformazione indotta da HPV

In cellule poste in coltura ed in topi transgenici, la capacità trasformante dei genotipi di HPV ad alto rischio è stata dimostrata in numerosi esperimenti. Il DNA di HPV ad alto rischio può immortalizzare fibroblasti umani e cheratinociti [Dürst M. et al. 1987].

Pirisi L. et al., 1987], e la co-espressione dei geni E6 ed E7 è sufficiente per l'induzione della trasformazione. Le oncoproteine E6 ed E7 dei genotipi ad alto rischio sono capaci di immortalizzare le cellule normali in maniera indipendente l'una dall'altra, ma con minore efficienza [Band V. et al. 1991].

Numerosi studi indicano come nelle lesioni umane benigne da HPV (condilomi, verruche, papillomi) il DNA virale sia presente allo stato episomale, mentre nei carcinomi è spesso integrato nel genoma cellulare [Schneider-Maunoury S. et al. 1987]. Questo ha suggerito che l'integrazione del DNA virale in quello cellulare rappresenti un evento importante nel processo di trasformazione neoplastica correlato all'infezione da HPV. Il sito d'integrazione del DNA di HPV nel genoma cellulare è casuale (sebbene talvolta avvenga in prossimità di oncogeni cellulari come c-myc ed N-myc), tuttavia si è notato che nei carcinomi e nelle lesioni di alto grado l'integrazione coinvolge spesso le ORF E1 ed E2 del DNA virale. L'interruzione della regione E1/E2 determina la trascrizione incontrollata dei geni E6 ed E7, i cui prodotti, in particolare nel caso dei genotipi ad alto rischio oncogeno, provocano una proliferazione cellulare incontrollata. I prodotti dei geni E6 ed E7, infatti, si associano a proteine che regolano il ciclo cellulare bloccando la loro azione biochimica naturale. Inoltre, poiché gli HPV terminano il loro ciclo replicativo nelle cellule differenziate dell'epitelio, essi devono non solo stimolare la replicazione del DNA in questo tipo di cellule, ma anche inibirne lo stimolo apoptotico che deriva dalla inappropriata replicazione del DNA cellulare indotta dal virus.

La proteina **E6** è formata da circa 150 aminoacidi e contiene 4 motivi altamente conservati, Cys-X-X-Cys, che formano due dita di zinco ad entrambe le estremità della proteina. [Mantovani F. et al., 2001].

E6 si lega a p53, soppressore tumorale che gioca un ruolo essenziale nel dirigere la risposta cellulare a stress genotossici e citotossici che minacciano la stabilità genomica, e che attiva normalmente la trascrizione di p21, un inibitore delle chinasi che, a loro volta, promuovono la mitosi (Fig. 15). La p53 regola negativamente il ciclo cellulare arrestando la cellula in fase G1 per permettere il controllo dell'integrità genomica; nel caso in cui il genoma sia mutato, la cellula viene indirizzata all'apoptosi, in caso contrario essa entra in fase S per la replicazione del DNA. La proteina p53 sopprime la crescita cellulare attivando trascrizionalmente p21, che a sua volta inibisce le chinasi del ciclo cellulare critiche per la progressione della fase G1 e la crescita cellulare. La proteina E6 blocca l'attività della p53 ed interferisce con la

funzione regolatrice negativa di p53 sul ciclo cellulare. Il legame di E6 alla p53 è mediato da una ubiquitin ligasi cellulare detta proteina E3 E6-associata (E6AP E3) che lega stabilmente la proteina E6 di HPV ad alto rischio oncogeno anche in assenza di p53. In particolare, mentre il legame della proteina E6 degli HPV a basso rischio oncogeno non ha effetto sulla stabilità di p53 in vitro, il legame della proteina E6 degli HPV ad alto rischio alla p53, accelera la degradazione di quest'ultima attraverso proteolisi ubiquitina-dipendente mediata dalla formazione del complesso E6-E6AP E3 [Scheffner M. et al., 1993].

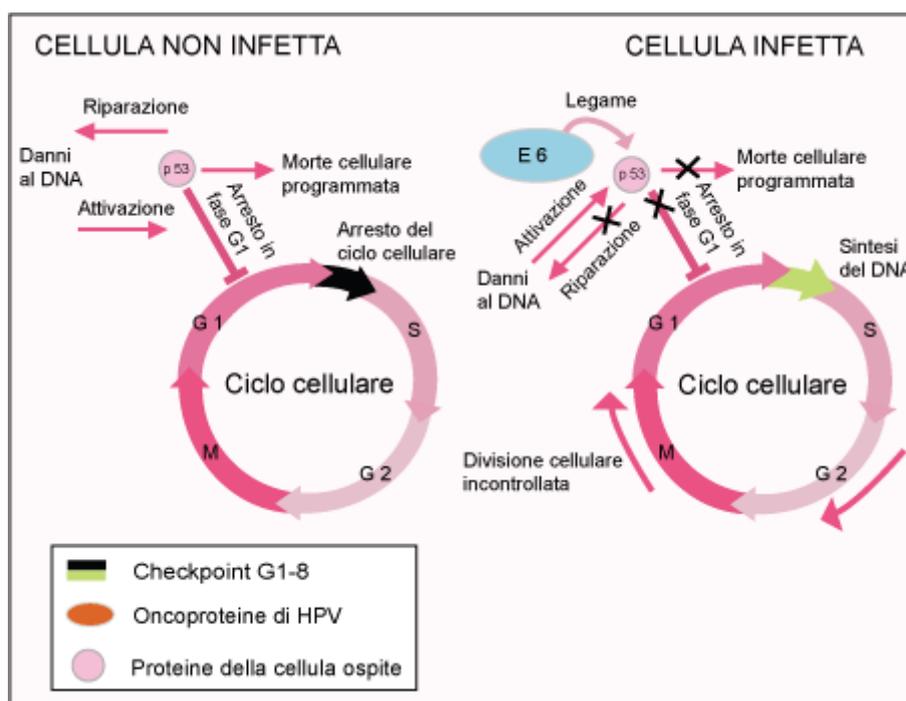


Fig. 15: Effetti della proteina E6 di HPV sul ciclo cellulare.

L'interazione tra E6 ed altre proteine cellulari, quindi, serve a rafforzare l'interazione con p53.

Inoltre, la proteina E6 dei genotipi ad alto rischio può anche legarsi direttamente ai co-attivatori trascrizionali dell'espressione genica mediata da p53, come CBP e p300, ed inibire l'attività trascrizionale indotta da p53 in maniera indipendente dalla degradazione di p53 [Patel S. et al., 1999].

L'interazione tra E6 e p53 dipende anche da polimorfismi di sequenza che interessano la p53. Infatti la proteina p53 "wild type" presenta un polimorfismo di sequenza in posizione 72, potendo codificare sia un residuo di prolina (p53Pro) sia uno di arginina (p53Arg). Il polimorfismo giace in una regione necessaria a p53 per l'induzione

dell'apoptosi. La p53Arg è più suscettibile della p53Pro alla degradazione indotta in vivo dalla proteina E6 dell'HPV-16 e dell'HPV-18. Inoltre la proteina E6 dell'HPV-11 è in grado di indurre la degradazione di p53Arg ma non di p53Pro. L'interazione E6-p53 può anche essere modulata dal virus stesso grazie a fenomeni di splicing alternativo che generano varianti di E6 dette proteine E6*, cioè una serie di proteine E6 tronche (E6*I-IV). Gli splicing coinvolgono un sito detto "splice-donor", altamente conservato in tutti gli HPV ad alto rischio, e un sito detto "splice acceptor". E' stato dimostrato che le proteine E6*IV dell'HPV16 e E6*I dell'HPV18 possono inibire la degradazione di p53 mediata da E6. HPV 18 E6*I può legare in vitro E6 full length e E3 E6AP ma non p53. Questa interazione blocca la formazione del complesso E3 E6AP/E6.

E6 stimola anche la degradazione di c-Myc e di Bak attraverso l'interazione con E3 E6AP, e quindi è in grado di inibire l'apoptosi anche con un'altra via indipendente da p53. C-Myc è un oncogene cellulare la cui sovraespressione può causare l'apoptosi probabilmente attraverso l'attivazione di p14ARF. Questa proteina lega mdm2 e impedisce a questa di ubiquitinare p53, aumentandone l'emivita e probabilmente inducendo l'apoptosi. L'alterazione della regolazione da parte di c-myc induce anche la differenziazione cellulare. Bak è un membro proapoptotico della famiglia Bcl-2 ed è altamente espresso negli strati superficiali dell'epitelio. La degradazione di Bak può impedire l'induzione dell'apoptosi nell'epitelio in differenziazione. E6 può anche attivare le telomerasi indipendentemente da p53, portando alla immortalizzazione della cellula infetta. Vi sono anche prove che E6 possa indurre anomalie nella duplicazione del centrosoma causando instabilità genomica ed aneuploidia. Infine, alcuni recenti lavori ha mostrato come l'oncoproteina E6 di HPV possa attivare la via del segnale di mTOR a diversi livelli: in primo luogo legando TSC2 e mediandone la degradazione attraverso un meccanismo ubiquitina dipendente [Lu Z. et al. 2004], e, secondariamente, attivando PDK1 e Akt a monte di TSC1/TSC2 [Spangle JM. et al. 2010].

La proteina **E7** (Fig. 16) è una oncoproteina nucleare di circa 100 aminoacidi, che contiene 3 regioni conservate: CR1, CR2 e CR3. CR1 si trova all'estremità N-terminale, CR2 contiene il motivo LXCXE necessario per legare i membri della famiglia dei soppressori tumorali Rb, mentre CR3 contiene 2 motivi a dita di zinco Cys-X-X-Cys. Le sequenze che compongono le regioni CR1 e CR2 sono altamente conservate anche nella proteina E1A degli adenovirus e nell'antigene T grande di

SV40, mentre l'estremità C-terminale con i suoi domini che legano metalli gioca un ruolo nella dimerizzazione di E7 [Münger K. et al., 2001]. La capacità trasformante di E7 è dovuta all'interazione tra il suo dominio LXCXE ed i membri della famiglia dei soppressori tumorali pRb (p105, p130, p107). La proteina E7 dei genotipi ad alto rischio lega Rb con più alta affinità rispetto alla E7 dei basso rischio [Gage JR. et al., 1990 Feb;64(2):723-30.]. La proteina E7 degli alto rischio stimola la degradazione di p105 e p107, attraverso una via dipendente dal proteasoma [Berezutskaya E. et al., 1997 Dec;8(12):1277-86.], mentre sia E7 degli alto rischio che dei basso rischio sono capaci di destabilizzare p130 [Zhang Z. et al., 2006]. L'efficienza del legame e della degradazione di p105 si correla con la capacità trasformante di E7. L'inattivazione della funzione di Rb attraverso E7, richiede non solo il legame con Rb, ma anche la sua degradazione [Gonzalez SL. et al., 2001]. In un normale ciclo cellulare la proteina pRB si trova ipofosforilata in fase G0 e G1 ed in questa forma agisce da regolatore negativo del ciclo cellulare legando ed inattivando il fattore trascrizionale cellulare E2F. Al termine della fase G1, la proteina pRB viene fosforilata e rilascia il fattore E2F, rendendolo disponibile per l'attivazione di geni che codificano per proteine implicate nella sintesi del DNA, quali la timidinchinasi, la diidrofollato-reduttasi, la DNA polimerasi alfa. In presenza della proteina E7, la proteina pRB perde completamente la sua funzione di regolazione del ciclo cellulare, in quanto E7 sequestra la forma non fosforilata di pRB rendendo permanentemente libero E2F. Il risultato finale è l'espressione incontrollata di geni che svolgono una funzione critica nel controllo della proliferazione cellulare, tra cui p14ARF e c-myc. Pertanto, la proteina E7 di HPV può legare pRb, rendendola a sua volta incapace di legare e regolare E2F, che quindi può liberamente attivare il ciclo cellulare portando ad una progressione incontrollata. La proteina E7 da sola è sufficiente a trasformare cellule stabilizzate di roditori, ma per un'efficiente immortalizzazione di fibroblasti primari umani o cheratinociti è necessaria anche la proteina E6.

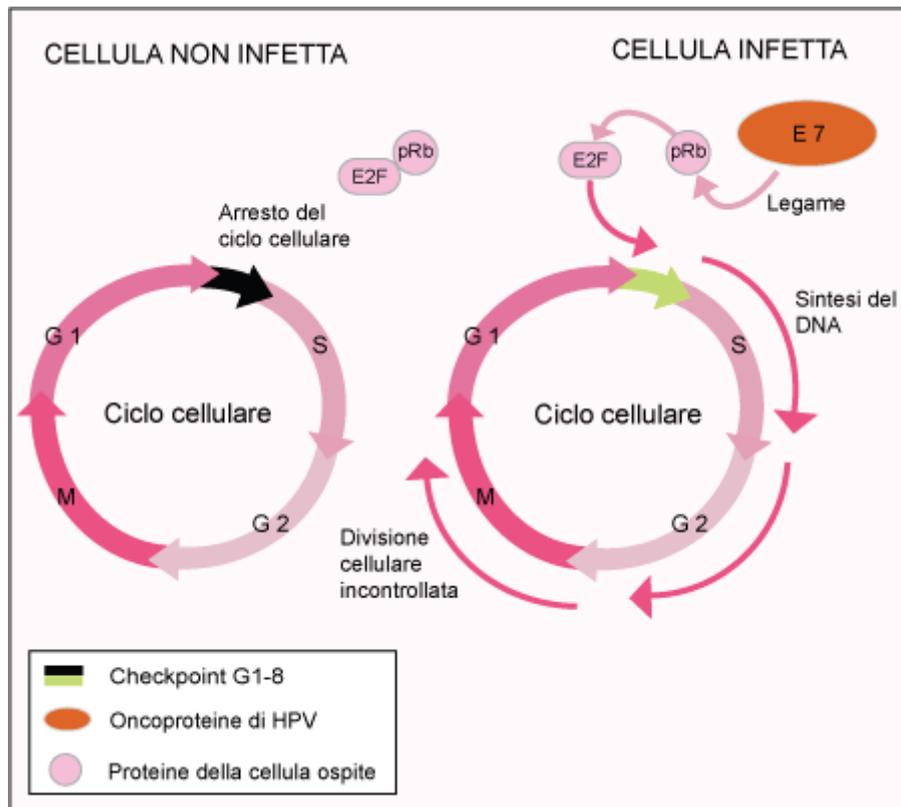


Fig. 16: Effetti della proteina E7 di HPV sul ciclo cellulare

La proteina p16INK4a è un oncosoppressore cellulare che svolge la sua azione mediante controllo negativo sulle chinasi ciclina dipendenti che fosforilano la pRb inattivandola. Nella forma ipofosforilata la pRb è attiva e forma un complesso con E2F, che sotto forma di complesso non è in grado di far procedere il ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Quando si presentano le condizioni di integrità genomica tali da permettere l'avanzamento del ciclo cellulare alla fase S, le chinasi ciclina dipendenti fosforilano la pRb che rilascia il fattore trascrizionale E2F. La pRb, oltre a controllare l'attivazione e inattivazione di questo fattore trascrizionale, opera un controllo a feedback negativo sulla proteina p16INK4a, mantenendone una espressione a livelli non evidenziabili con metodiche di immunistoichimica. In molte neoplasie maligne l'espressione della p16INK4a è ridotta o assente a causa di mutazioni, delezioni o ipermetilazioni del suo promoter.

In presenza di infezione da HPV ad alto rischio oncogeno e di integrazione del genoma virale nel genoma cellulare, si ha una sovraespressione delle oncoproteine virali E6 ed E7 che portano ad una inattivazione di p53 e pRb rispettivamente. In particolare, E7 lega la pRb inattivandola funzionalmente e, attraverso questo meccanismo, non solo media il rilascio incontrollato di E2F, ma elimina anche il

controllo a feedback negativo sull'espressione di p16INK4a, che viene così sovraespressa. L'espressione della p16INK4a rappresenta quindi un potenziale marker di trasformazione neoplastica associata all'azione dell'oncoproteina virale E7.

3.5. Risposta immunitaria all'infezione da HPV

Lo stato immune dell'ospite ha un impatto significativo sul decorso della malattia indotta dall'infezione da HPV e sulla risposta al trattamento.

I primi studi che documentano la comparsa di una risposta anticorpale nei confronti di HPV sono comparsi alla fine degli anni '80 e, da quel momento, sono stati utilizzati diversi metodi per studiare la presenza di anticorpi anti-HPV in sieri umani. Le metodiche di ricerca di anticorpi in siero utilizzano antigeni virali espressi in sistemi eucariotici e procariotici con i metodi del DNA ricombinante. Molti laboratori hanno standardizzato i loro saggi utilizzando test ELISA che si avvalgono dell'impiego delle *virus like particles* (VLPs) generate per autoassemblaggio della proteina L1. I saggi sierologici hanno concorso a delucidare alcuni aspetti dell'infezione da HPV, come ad esempio l'assenza di correlazione tra guarigione della lesione e presenza di anticorpi specifici nel siero, oppure la presenza di anticorpi in pazienti le cui lesioni sono evolute verso la malignità. Attualmente i saggi sierologici vengono utilizzati a scopi epidemiologici e per monitorare l'induzione di anticorpi specifici nell'utilizzo di vaccini.

Il fatto che l'infezione da HPV tenda alla cronicizzazione anche in individui immunocompetenti porta alla considerazione che i Papillomavirus si siano adattati al sistema immunitario dell'ospite durante l'evoluzione. La scarsa immunogenicità dell'infezione da HPV può essere spiegata col fatto che l'infezione stessa non induce citolisi, non prevede una fase viremica e non induce una risposta infiammatoria. A conferma di ciò, la risposta all'infezione primaria compare piuttosto lentamente, mentre gli antigeni virali, se adeguatamente presentati come avviene nei processi di immunizzazione passiva, sono altamente immunogenici. La risposta anticorpale nei confronti degli HPV è diretta sia verso le proteine precoci sia verso le proteine tardive, ma tali anticorpi non sembrano essere protettivi [Kim K et al., 2007].

A differenza della risposta umorale, quella cellulo-mediata gioca un ruolo importante nell'impedire la progressione dell'infezione e l'insorgenza delle lesioni associate. Fino ad oggi le ricerche sono state volte allo studio della risposta cellulo-mediata nei

confronti delle oncoproteine virali E6 ed E7 di HPV16. Ora gli sforzi sono diretti nel valutare la risposta verso altri antigeni virali (E2) prodotti nella fase precoce dell'infezione. Oltre alla risposta cellulo-mediata sistemica, si sta valutando l'importanza anche di quella mucosale. Una buona risposta immunitaria è rappresentata dalla produzione di linfociti T citotossici in grado di riconoscere e distruggere le cellule infette, come dimostrato dalla presenza di infiltrati di cellule T in lesioni in via di regressione. L'importante ruolo della risposta immunitaria cellulo-mediata nel controllare l'infezione da HPV è dimostrato dalla predisposizione di soggetti con rare malattie ereditarie che interessano questo compartimento del sistema immune (ad esempio l'epidermodisplasia verruciforme) a sviluppare carcinomi cutanei, oppure l'elevato rischio di soggetti con determinati alplotipi di MHC a sviluppare carcinomi cutanei e della cervice uterina. Inoltre, in pazienti immunocompromessi, come gli HIV-positivi, le donne in gravidanza, i trapiantati e i pazienti sottoposti a chemioterapia, si è riscontrata un'elevata prevalenza dell'infezione da HPV, con una maggiore probabilità di persistenza della stessa e di evoluzione delle lesioni. Probabilmente la scarsa risposta immunitaria cellulo-mediata dipende anche dalla inefficace presentazione degli antigeni virali, MHC I ristretta, ai linfociti T citotossici. Il virus HPV utilizza molteplici meccanismi di evasione per perturbare la corretta processazione e presentazione dell'antigene al sistema immunitario; la proteina E6 ha la capacità di inibire l'interazione tra cellula epiteliale e cellule dendritiche, probabilmente attraverso la deplezione di queste ultime; la proteina E5 inibisce la processazione di antigeni peptidici con un meccanismo pH-dipendente. Infine i prodotti dei geni E6 ed E7 bloccano la produzione e la risposta delle cellule infette agli interferoni di tipo 1 (IFNs).

3.6. Trasmissione, patogenesi e manifestazioni cliniche dell'infezione da HPV

Le modalità di trasmissione dell'infezione da HPV sono differenti a seconda della regione anatomica interessata [Lowy and Howley, Field VIROLOGY, 2001]. Le infezioni che interessano la cute sono trasmesse mediante contatto diretto o con oggetti contaminati, mentre le infezioni che interessano la regione ano-genitale sono trasmesse sessualmente. Inoltre è frequente la trasmissione dell'infezione, da una regione all'altra di uno stesso ospite, tramite auto-inoculazione [La Placa, Principi di Microbiologia Medica, 2010]. È stata documentata anche la possibilità di una

infezione iatrogena (ad esempio mediante laser-vaporizzazione). Recenti osservazioni indicano che l'infezione da HPV del tratto aereo-digestivo, responsabile di papillomi laringei nei bambini, può essere dalla madre infetta al neonato sia per via perinatale che intrauterina (attraverso il liquido amniotico).

HPV ha la capacità di instaurare latenza nell'organismo ospite, associata a bassi livelli di replicazione virale e caratterizzata da un ciclo virale incompleto. Ciò è stato evidenziato dalla presenza di DNA virale nella laringe di soggetti guariti da papillomatosi in tale distretto, in tessuti normali contigui a regioni precedentemente caratterizzate da lesioni [Abramson et al., 2004], nella cervice uterina di donne durante la gravidanza e in soggetti compromessi [Theiler et al., 2010]. In tutti questi casi, la presenza del genoma di HPV risulta più probabilmente essere dovuta ad una riattivazione dell'infezione sino a quel momento latente, piuttosto che ad un'esposizione secondaria al virus. L'infezione da HPV inoltre, può essere completamente asintomatica e non apparente, come dimostra la presenza di DNA virale in tessuti di cute e mucose assolutamente normali dal punto di vista clinico, evidenza dimostrata grazie all'avvento di tecniche molecolari altamente sensibili come la PCR. Anche nel caso di trasmissione perinatale o intrauterina di HPV dalla madre infetta al neonato, quest'ultimo è asintomatico nel periodo immediatamente successivo al parto, ma intorno all'anno di età può presentare papillomatosi respiratoria ricorrente [Goon et al., 2008].

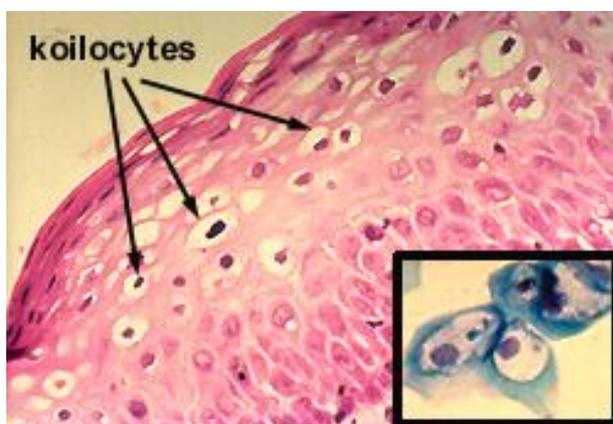


Fig. 17: Cambiamenti coilocitici in cellule epiteliali infettate da HPV.

I Papillomavirus sono associati a lesioni proliferative benigne e maligne degli epiteli di cute e mucose. Le infezioni da HPV sono caratterizzate da un'intensa proliferazione delle cellule basali e da un ispessimento dello strato spinoso

dell'epitelio (acantosi), mentre a livello dello strato granuloso si osservano cellule con citoplasma occupato da un grosso vacuolo che circonda la cromatina nucleare addensata. Tale alterazione citologica, patognomica dell'infezione da HPV, è denominata coilocitosi (Fig. 17). L'ispessimento localizzato del tessuto epiteliale determinato dall'infezione da HPV si manifesta clinicamente in modo diverso a seconda del tipo di epitelio coinvolto e della sede anatomica. La sede dell'infezione dipende dal genotipo di HPV poiché alcuni genotipi presentano un tropismo selettivo per la cute, altri per le mucose. I Papillomavirus umani vengono infatti raggruppati in tipi cutanei o mucosi a seconda che il loro ritrovamento avvenga più frequentemente in lesioni dell'uno o dell'altro tipo.

A livello della cute gli HPV possono causare sia affezioni benigne, quali le verruche comuni, piane, plantari o palmari e lesioni polimorfiche disseminate che si riscontrano in pazienti con Epidermodisplasia Verruciforme, sia affezioni maligne, quali i carcinomi cutanei.

Le infezioni a livello delle mucose riguardano prevalentemente la regione anogenitale. Possono, tuttavia, manifestarsi anche a livello della mucosa delle vie respiratorie, della cavità orale e della congiuntiva. Anche a livello mucoso si possono ritrovare lesioni benigne, come i papillomi del tratto aero-digestivo o i condilomi acuminati e piani a livello dei genitali, o lesioni maligne, quali carcinomi del tratto respiratorio o della regione ano-genitale.

3.6.1. Infezioni della cute

Verruche cutanee

Le verruche comuni sono affezioni di tipo benigno, in genere asintomatiche e solo talvolta dolorose. Possono localizzarsi in ogni parte del corpo anche se le parti scoperte sono quelle maggiormente interessate. Possono avere aspetti morfologici diversi, a seconda della sede di ritrovamento. Generalmente vengono trasmesse attraverso un diretto contatto con i tessuti infetti o per contatto con oggetti contaminati. È frequente l'autoinoculazione. Normalmente le verruche sono di piccola taglia e singole tuttavia un numero maggiore di verruche è riscontrabile in individui immunodeficienti. La maggior parte delle verruche regredisce spontaneamente entro 2 anni; la regressione è il risultato di una risposta immune cellulo-mediata. Le verruche si presentano con maggiore frequenza nei giovani. Sport o lavori dove la pelle viene a

contatto con superfici umide o è sottoposta a microtraumi aumentano il rischio di infezione da HPV. La correlazione tra la morfologia delle verruche e il genotipo di HPV non è assoluta, tuttavia esiste una associazione più forte per esempio tra HPV 1 e le verruche plantari, HPV 2 e le verruche comuni, HPV 3 e 10 e le verruche piane e HPV 7 e le verruche dei macellai [Lowy and Howley, Field VIROLOGY, 2001].

Epidermodisplasia verruciforme

L'epidermodisplasia verruciforme è una malattia rara, a lungo decorso, in cui il paziente non è in grado di risolvere le lesioni verrucose per cui alcune di queste possono nel tempo progredire a forma maligna. Vi sono fattori genetici coinvolti nell'eziologia di tale patologia: sembra infatti correlata ad una rara malattia autosomica recessiva che rende l'individuo incapace di risolvere l'infezione da HPV. Generalmente tale malattia ha origine nell'infanzia con lesioni verrucose multiple, polimorfiche e disseminate sulla faccia, sul tronco e alle estremità che tendono a confluire. Due tipi di verruche vengono riscontrate in tali pazienti: verruche piane (HPV 3 e 10) e placche rosso-brune a cui sono associati tipi di HPV non riscontrati normalmente nelle verruche comuni (HPV 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20 e 25).

In circa un terzo dei casi, dopo un certo numero di anni dall'inizio della malattia, foci multipli di trasformazione maligna si instaurano a livello delle placche rosso-brune (prevalentemente in associazione con l'infezione da HPV 5 o 8), soprattutto in zone della pelle esposte al sole. Istologicamente le lesioni possono essere "in situ" o portare a carcinoma invasivo, comunque in genere non metastatizzano e hanno crescita lenta. I carcinomi cutanei in pazienti con EV sono un ottimo esempio del contributo dell'infezione virale, dei fattori d'ospite (fattori genetici) e di fattori ambientali esterni (luce solare) nella genesi della degenerazione neoplastica maligna. Non è chiaro comunque come individui con EV si infettino con tipi di HPV che non si riscontrano nella popolazione normale; probabilmente questi genotipi sono asintomatici nella popolazione normale [Lowy and Howley, Field VIROLOGY, 2001].

Carcinomi cutanei

I carcinomi cutanei rappresentano la neoplasia maligna più frequente nella popolazione caucasica. L'esposizione solare sembra essere il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo del tumore. Molti studi hanno evidenziato un coinvolgimento dell'infezione da HPV nello sviluppo di questi tumori in pazienti immunodepressi (in

particolare nei trapiantati renali). Negli ultimi anni sono emersi interessanti dati che riguardano anche i soggetti immunocompetenti: infatti il DNA di HPV è stato riscontrato in percentuali rilevanti in campioni di carcinomi a cellule squamose e a cellule basali. La possibilità degli HPV di agire come co-carcinogeni a livello cutaneo è confermata anche dalla storia naturale dell'epidermodisplasia verruciforme, anche se ulteriori studi sono necessari per determinare in che modo e in che misura gli HPV possano partecipare al processo di cancerogenesi cutanea in soggetti non immunodepressi [Lowy and Howley, Field VIROLOGY, 2001].

3.6.2. Infezioni del distretto testa-collo

A livello di questo distretto anatomico coesistono due tipi di epitelio: l'epitelio squamoso stratificato e l'epitelio respiratorio ciliato. In alcuni siti del tratto respiratorio, la presenza di una giunzione tra questi due epiteli sembra essere il requisito fondamentale per il verificarsi di una certa varietà di lesioni, benigne o maligne, e morfologicamente alquanto diverse. I genotipi più comunemente riscontrati nelle lesioni sono HPV 6, 11, 16. Tuttavia, il coinvolgimento di HPV in queste patologie non è ancora del tutto chiarito; le ricerche, infatti, danno spesso risultati controversi, soprattutto a causa della non omogeneità delle metodiche di indagine e della loro diversa sensibilità e specificità.

Papillomatosi Respiratoria Ricorrente

L'infezione da HPV meglio caratterizzata tra quelle del distretto testa-collo è la Papillomatosi Respiratoria Ricorrente (RRP), causata da HPV 6 e 11. E' una patologia rara che interessa soprattutto la laringe (corde vocali) ma può colpire anche la trachea, il naso e la cavità orale. La localizzazione dei papillomi a livello della laringe e della trachea può causare ostruzione delle vie aeree e difficoltà respiratorie. Qualora vengano rimossi chirurgicamente tendono a riformarsi rapidamente e a diffondersi in altre parti del tratto respiratorio. I papillomi respiratori possono insorgere a qualsiasi età, tuttavia i bambini sotto i 5 anni di età hanno un rischio maggiore di sviluppare la malattia. Nel caso di RRP giovanile, la trasmissione avviene probabilmente durante il passaggio nel canale del parto (si ipotizza in certi casi anche una trasmissione in utero attraverso l'ingestione del liquido amniotico). Il genoma di HPV viene spesso riscontrato anche nell'epitelio normale adiacente alla lesione e questo spiega come i

papillomi tendano a riformarsi facilmente dopo la rimozione. I papillomi respiratori possono talvolta portare a displasie e, in seguito, a carcinomi “in situ” che raramente progrediscono a carcinoma invasivo. Per quanto riguarda la forma adulta di RRP, un fattore di rischio è rappresentato dalla pratica del sesso orale.

Papillomi Nasali

I Papillomi Nasali possono insorgere a qualsiasi età, da soli o assieme ad altri papillomi del tratto respiratorio. Sono spesso associati ai genotipi 6 e 11. Solo raramente progrediscono a carcinoma.

Iperplasia Focale Epiteliale

L’Iperplasia Focale Epiteliale (FEH) è caratterizzata clinicamente da noduli multipli a livello della mucosa orale. Le lesioni sono autolimitanti e possono persistere per anni senza disseminazione e senza mostrare degenerazione maligna. Può manifestarsi sia nei bambini che negli adulti e talvolta si manifesta in diversi membri della stessa famiglia. La FEH è prevalentemente associata a HPV 13 e 32.

Papillomi della cavità orale

Lesioni papillomatose sono state riscontrate a livello delle gengive, delle membrane mucose buccali, sul palato, sulle tonsille e sono generalmente asintomatiche. Le infezioni da HPV in tale distretto possono essere anche caratterizzate da lesioni multiple, e sono dovute ai genotipi 6, 11 e 16.

Papillomi congiuntivali

I papillomi congiuntivali sono rari, insorgono a qualsiasi età e sono generalmente associati, soprattutto in età giovanile, a HPV 6 e 11 [Lowy and Howley, *Field VIROLOGY*, 2001].

Carcinomi del distretto testa-collo.

La presenza del genoma di HPV può essere riscontrata in forme di cancro, che si sviluppano a partire dai papillomi presenti nel tratto respiratorio ed anche nei carcinomi orofaringei e tonsillari. Genotipi ad alto rischio sono rilevati nel 25% dei carcinomi orofaringei e nel 10-35% dei carcinomi esofagei [Parkin DM. et al., 2006],

ma la maggior parte dei carcinomi riscontrati a livello della faringe, delle tonsille e della fossa tonsillare, sono dovuti ad HPV-16. Si riscontrano evidenze sempre maggiori sulla correlazione tra infezione da genotipi mucosi di HPV ad alto rischio oncogeno e lo sviluppo di carcinomi del cavo orale [Lowy and Howley, *Field VIROLOGY*, 2001].

Alcuni lavori indicano di considerare le neoplasie HPV-correlate addirittura come una distinta entità biologica all'interno dell'eterogenea famiglia delle neoplasie di testa e collo, date le peculiari caratteristiche di prognosi e di risposta alla terapia.

3.6.3. Infezioni da HPV nel tratto ano-genitale

La rilevanza clinica degli HPV è legata soprattutto alle infezioni del tratto anogenitale della donna e dell'uomo, che hanno una notevole importanza nella patologia umana. Gli HPV rappresentano gli agenti più comuni di infezione a trasmissione sessuale: il 50% della popolazione sessualmente attiva è venuta a contatto almeno una volta con HPV.

La prevalenza delle infezioni da HPV genitali varia in funzione dell'età, dello stato immunitario, delle abitudini di vita e dei comportamenti sessuali della popolazione.

Le infezioni da HPV del tratto anogenitale sono le infezioni a trasmissione sessuale maggiormente diffuse. Elevati picchi di infezione si riscontrano in una età compresa tra i 16 e i 25 anni (25-35%, ma in alcune casistiche si arriva fino all'80% dei casi analizzati), indicando la precoce acquisizione dell'infezione all'esordio dell'attività sessuale. Un recente studio della IARC ha però evidenziato in alcune nazioni (Costarica, Messico, Colombia), ma non in tutte, un secondo picco di prevalenza dell'infezione da HPV dopo i 55 anni. Non è ancora noto se tale secondo picco sia dovuto ad una riattivazione del virus, rimasto latente, ad un effetto di coorte o ad altro. L'immunosoppressione risulta strettamente legata ad un aumento delle infezioni da HPV e delle anomalie HPV-associate: si riscontra infatti un aumento di tali infezioni in pazienti HIV sieropositivi, in donne in gravidanza e in pazienti trapiantati.

Le infezioni genitali da HPV nell'uomo sono state molto meno studiate che nella donna in parte per la maggiore difficoltà nella raccolta dei campioni, in parte in quanto le conseguenze dell'infezione sono meno gravi nell'uomo che nella donna.

Le infezioni che interessano il tratto anogenitale possono presentare andamenti diversi:

1. Completa risoluzione dell'infezione con eradicazione del virus;

2. Persistenza del virus con lieve o nessuna anormalità citologica;
3. Anormalità citologiche transitorie;
4. Anormalità citologiche persistenti;
5. Anormalità citologiche che possono progredire a carcinoma in situ o a carcinoma invasivo.

Le infezioni del tratto ano-genitale sono piuttosto comuni e presentano una vasta gamma di manifestazioni cliniche che possono andare dall'infezione asintomatica, alla comparsa di verruche o condilomi, fino ad arrivare al carcinoma.

Condilomi ano-genitali

I condilomi sono lesioni che si presentano con maggiore incidenza nei giovani adulti sessualmente attivi, sia maschi che femmine. Nell'uomo i condilomi si ritrovano a livello del pene, in regione perianale e solo raramente a livello dello scroto; nella donna interessano la vagina, la vulva, la regione perianale e naturalmente la cervice uterina. Spesso si ritrovano in più di un distretto nello stesso individuo. I maggiori responsabili delle lesioni condilomatose sono gli HPV 6 e 11. I condilomi si manifestano dopo un periodo medio di incubazione di 3 mesi, in circa i 2/3 dei soggetti che entrano in contatto con partner che portano già questo tipo di lesioni. Generalmente tali lesioni sono autolimitanti e regrediscono spontaneamente o dopo intervento medico locale. I condilomi si presentano con più alta frequenza nei soggetti immunodepressi o nelle donne gravide.

Carcinomi vulvari

Circa il 90% dei cancri della vulva sono carcinomi a cellule squamose (SCC). Ci sono due tipi di SCC vulvari ciascuno associata a specifiche lesione preneoplastiche. Il primo tipo è comune nelle donne anziane che spesso hanno un background di neoplasia intraepiteliale vulvare (VIN) non associato ad HPV; questo tipo comprende i carcinomi. Il secondo tipo consiste in carcinomi non cheratinizzati basocellulari, comuni nelle donne giovani ed infezione da HPV ad alto rischio, in particolare HPV 16 e 18.

Il termine neoplasia intraepiteliale vulvare (VIN) è una condizione premaligna della vulva e una sua classificazione fu introdotto nel 1986 dall'International Society for

the Study of Vulvar Disease (ISSVD). Esso comprende le VIN classiche (c-VIN I-III) e le VIN differenziate (d-VIN).

Le prime sono suddivise in tre gradi sulla base dello spessore dell'epitelio interessato da atipia cellulare; esse sono eziologicamente associate all'HPV, in particolare a quelli ad alto rischio (70-90% dei casi ad HPV 16). Si riscontrano nelle giovani donne in età riproduttiva.

Le VIN differenziate (d-VIN), in cui l'HPV non è coinvolto nella cancerogenesi vulvare; si comportano come un carcinoma "in situ" e tendono a progredire verso carcinoma invasivo ben differenziato, cheratinizzato e HPV negativo. Queste lesioni sono tipiche delle donne in post-menopausa.

Nel 2004 questa classificazione fatta nel 1986 è stata modificata dalla WHO, includendo un'ulteriore divisione in 4 sottotipi di carcinomi squamosi vulvari: cheratinizzati (differenziati) e basoloidi, verrucosi e misti (classici).

Il più comune è quello cheratinizzato e associato alle VIN differenziate: tipico delle donne anziane non HPV correlato; quello meno comune è il basaloide riscontrato nelle donne giovani e HPV correlato.

Nei carcinomi vulvari correlati all'HPV i genotipi che si riscontrano con maggior frequenza sono quelli ad alto rischio: nella maggior parte dei casi il 16 seguito dal 33 e meno frequente è il 18. Gli HPV a basso rischio sono rari in questo tipo di lesioni, si trovano da soli o talvolta in combinazione con quelli ad alto rischio nei carcinomi squamosi vulvari invasivi.

Carcinoma anale

Lesioni squamose intraepiteliali e carcinomi anali associati ad infezione da HPV si manifestano prevalentemente nelle donne, negli immunodepressi e frequentemente tra i maschi omosessuali (soprattutto HIV-positivi). Il cancro del margine e del canale anale presenta molte analogie con il cancro della cervice uterina; è infatti una malattia a trasmissione sessuale dovuta alla presenza del DNA di HPV ad alto rischio oncogeno; genotipi ad alto rischio sono infatti rilevati nel 70% dei carcinomi anali [Parkin DM. et al., 2006], in particolare HPV-16 e -18. Il carcinoma anale rappresenta circa il 2% di tutti i tumori del colon-retto e le forme più comuni in cui si manifesta sono quelle epiteliali, in particolare il carcinoma squamoso, l'adenocarcinoma ed il melanoma anale.

Carcinoma della cervice uterina

L'associazione tra HPV e cancro della cervice uterina è stata dimostrata da studi clinici ed epidemiologici, studi patogenetici e studi sulle basi molecolari della trasformazione cellulare da parte degli HPV [Burd et al., 2003]. Genotipi diversi di HPV hanno una diversa distribuzione geografica a livello mondiale. Il cancro cervicale interessa principalmente le cellule squamose (80-85% dei casi), in alcuni casi coinvolge le cellule ghiandolari (10-15% casi) e raramente coinvolge le cellule neuroendocrine originando piccoli tumori (circa il 5%).

Lesioni cervicali squamose

Gli HPV ad alto rischio (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59 e 68) causano il 99% dei carcinomi squamosi della cervice uterina. Quattro di questi sono presenti in oltre il 70% dei tumori del collo dell'utero, con HPV 16 che rappresenta circa la metà dei casi, mentre i genotipi 18, 31 e 45 rappresentano un ulteriore 25-30% [Clifford G. et al., 2006] [Parkin DM. et al., 2006]. Oltre 15 altri genotipi di HPV ad alto rischio sono associati ai restanti tumori.

Gli HPV inducono le più comuni malattie sessualmente trasmesse. Entro due anni dall'inizio dell'attività sessuale più del 50% delle donne acquisisce infezioni del tratto genitale [Koutsky L. et al., 1997]. Sebbene nella vita si corra un rischio superiore all'80% di contrarre un'infezione genitale da HPV, solo una minoranza di infezioni con genotipi ad alto rischio progredisce verso il carcinoma [Baseman JG. et al., 2005]. Infatti, la maggior parte delle infezioni da HPV ad alto rischio sono transitorie e la maggior parte di esse regredisce spontaneamente nel giro di 12-36 mesi. Questa regressione è probabilmente dovuta all'attivazione della risposta immunitaria [Ho GY. et al., 1998. Holowaty P. et al., 1999]. Solo una piccola percentuale di donne non riesce ad eliminare le infezioni da HPV e quindi si trova a rischio di sviluppare il carcinoma cervicale. L'infezione persistente da HPV ad alto rischio è considerata il maggior fattore di rischio nella progressione del tumore del collo dell'utero. È ormai dimostrato che il carcinoma squamoso della cervice uterina si sviluppa attraverso ben definite lesioni precancerose (lesioni intraepiteliali squamose: SIL) e che una parte delle lesioni progredisce a carcinoma invasivo se non viene trattata adeguatamente. Nel 60% dei casi anche le LSIL (lesioni intraepiteliali squamose di basso grado) regrediscono spontaneamente, mentre nel 40% dei casi le lesioni persistono e progrediscono a lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (HSIL) e carcinoma in situ. Studi prospettici condotti su donne inizialmente negative alla citologia, hanno

definitivamente dimostrato che l'infezione da HPV precede lo sviluppo delle lesioni e che le infezioni persistenti da parte di HPV ad alto rischio oncogeno aumentano le probabilità di una progressione neoplastica delle SIL.

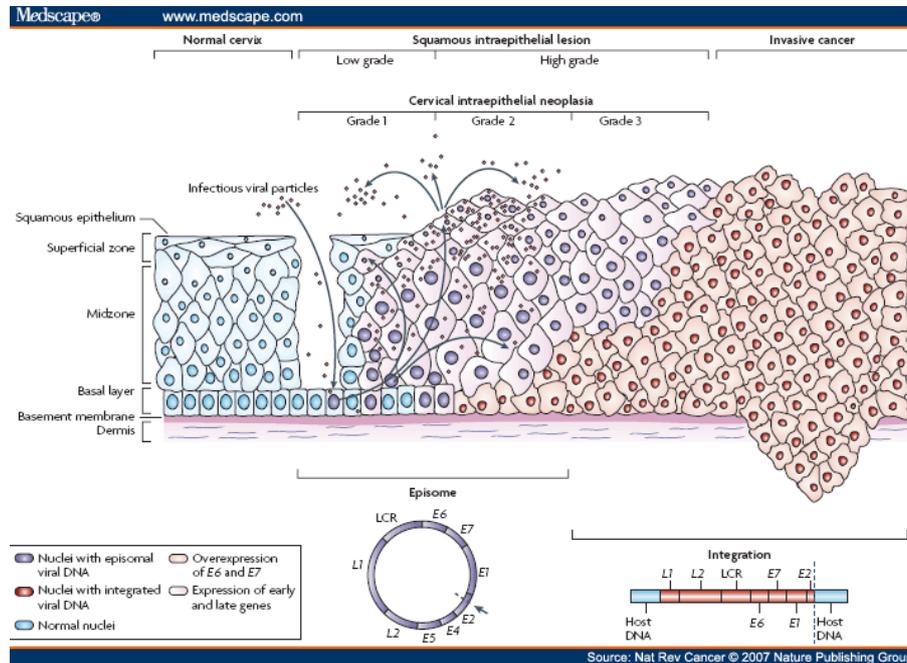


Fig. 17: Evoluzione dell'infezione da HPV e grado di lesione epiteliale.

Quindi, il carcinoma della cervice si sviluppa da lesioni pre-neoplastiche non invasive e progredisce gradualmente da lieve neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN 1) verso gradi più severi di displasia (CIN 2 e CIN 3), che alla fine possono indurre carcinoma maligno invasivo (Fig. 17). Lo sviluppo del tumore del collo dell'utero si verifica in genere diversi decenni dopo l'infezione iniziale [Zielinski GD. et al. 2001]. Lesioni intraepiteliale squamose di basso grado sono altamente prevalenti nei soggetti più giovani, a dimostrare che, mentre l'infezione da HPV è necessaria per lo sviluppo della CIN, ulteriori cambiamenti cellulari sono necessari per la progressione maligna [Bosch FX. et al. 2002]. Infatti, l'infezione da HPV ad alto rischio oncogeno non è da sola sufficiente a innescare la progressione da LSIL ad HSIL e per lo sviluppo del carcinoma della cervice, ma sono necessari altri fattori dell'ospite e cofattori ambientali che favoriscono tale progressione tumorale.

Sembrano essere necessarie mutazioni genetiche nelle cellule infettate da HPV per indurre una degenerazione neoplastica. Anormalità di struttura coinvolgono di frequente i cromosomi 1, 4, 5, o 11 delle cellule coinvolte nel carcinoma della cervice.

Inoltre sono state osservate aberrazioni numeriche dei cromosomi 1, 3, 6, 13, 17, 18, 21 e X ma con frequenza minore rispetto alle anomalie strutturali. Stadi tardivi del carcinoma della cervice sono inoltre associati a riarrangiamenti, all'amplificazione o alla sovraespressione dell'oncogene cellulare c-myc. In alcuni carcinomi infatti il genoma di HPV è integrato in prossimità di oncogeni cellulari. Anche mutazioni e delezioni a livello dell'oncogene c-Ha-ras vengono riscontrate in carcinomi della cervice. E' stata osservata inoltre una certa associazione di certi alleli o aplotipi degli antigeni leucocitari (loci HLA-D) con il cancro invasivo della cervice.

Dopo il carcinoma della mammella, quello della cervice uterina è il secondo tumore maligno più comune tra le donne in tutto il mondo. L'attuazione di strumenti di screening come il test di Papanicolau (Pap test) per rilevare le cellule atipiche nella zona di trasformazione della cervice, ha ridotto l'incidenza del cancro del collo dell'utero di circa l'80% negli Stati Uniti e in Europa. L'impatto del carcinoma cervicale viene sentito maggiormente tra le donne svantaggiate da un punto di vista socio-economico nei paesi in via di sviluppo, così come in paesi che non dispongono di programmi di screening efficaci in atto. In tutto il mondo, nel 2002, circa 470.000 donne hanno avuto una diagnosi di carcinoma cervicale, e circa 230.000 sono morte [Wiley D. et al., 2006]. L' 80% dei casi di carcinoma della cervice uterina si verificano nei paesi in via di sviluppo, ed è una delle principali cause di decessi per cancro delle donne in molte regioni [Parkin DM. et al., 2006].

Lesioni cervicali ghiandolari

Le lesioni cervicali delle cellule ghiandolari vengono classificate utilizzando il Bethesda System (2001) in: AGC (cellule ghiandolare atipiche, specificare se endometriali, endocervicali o non specificabili-NOS), AGC suggestive di neoplasia (specificare se endometriali, endocervicali o non specificabili-NOS), AIS (adenocarcinoma cervicale in situ) e adenocarcinoma (specificare se endometriali, endocervicali, extrauterino o non specificabile-NOS) (Solomon et al., 2002). Sono generalmente associate ad HPV 18.

3.7. Vaccini per HPV

Nel 2006, Merck ha ricevuto l'approvazione dell'FDA (Food and Drug Administration) per la vendita di un vaccino profilattico nei confronti dei due genotipi di HPV più comunemente rilevati nel carcinoma cervicale, HPV 16 ed HPV 18, così

come per i genotipi a basso rischio HPV 6 ed HPV 11, che causano il 90% delle verruche genitali. Questo vaccino è costituito da proteine capsidiche L1 di HPV espresse in lievito nel quale esse si assemblano spontaneamente formando virus-like particles (VLP) che assomigliano a virioni completi [Zhou J. et al., 1991]. Il vaccino VLP-L1 produce alti titoli di anticorpi neutralizzanti a seguito dell'iniezione [Kirnbauer R. et al., 1992]. Un secondo vaccino è stato sviluppato da Glaxo Smith Kline e contiene VLP-L1 dei genotipi HPV 16 e 18. Numerosi studi indicano che questi vaccini sono molto efficaci nel bloccare l'infezione da HPV 16 ed HPV 18 [Harper DM. et al., 2006. Villa LL. et al., 2005]. Poiché i tumori del collo dell'utero si sviluppano dopo diversi decenni, servirà un certo lasso di tempo prima che l'utilizzo dei vaccini si ripercuota sul numero di nuovi tumori cervicali. Inoltre, bisogna considerare che questi vaccini non prevencono l'infezione da altri tipi di HPV che sono responsabili del 30% dei carcinomi cervicali. Pertanto si stanno facendo numerosi sforzi sia per distribuire il vaccino alle popolazioni dei paesi in via di sviluppo, sia per includere altri genotipi di HPV nelle formulazioni dei vaccini.

3.8. Associazione di HPV ad altri tipi di cancro nell'uomo

Nell'ultimo ventennio molti ricercatori hanno ipotizzato che una eziologia virale possa avere un ruolo nello sviluppo di alcuni tumori umani, con un'attenzione particolare rivolta ad HPV. La correlazione tra infezioni da HPV ad alto rischio e carcinoma anale e cervicale è ampiamente accettata, ma la correlazione tra HPV e tumori di altri organi, come vie aeree superiori, colon-retto, mammella non è ancora ben definito.

Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che HPV 16 ed HPV 18 possano essere associati con lo sviluppo del tumore al polmone in individui non fumatori basandosi sull'alta prevalenza di colorazioni immunologiche negative a p53 in tumori del polmone nelle donne rispetto agli uomini. [Cheng Y.W. et al. 2001]. In questo studio sono stati esaminati 141 pazienti con tumore polmonare e 60 controlli non oncologici. I campioni di tessuto sono stati analizzati per la ricerca di HPV-16 e HPV-18 utilizzando tecniche di PCR e ISH. Circa il 55% dei 141 pazienti con cancro polmonare presentava HPV-16 o HPV-18, rispetto a circa il 27% dei 60 controlli non oncologico. I campioni risultati positivi per HPV attraverso ISH presentavano anche un segnale uniforme di positività nelle cellule tumorali polmonari, ma non nelle

adiacenti cellule non tumorali. Inoltre la stratificazione per sesso, età ed abitudine al fumo ha mostrato una prevalenza di HPV-16 e HPV-18 in donne non fumatrici, di età superiore ai 60 anni con carcinoma polmonare. Tuttavia, in uno studio di Bohlmeier et al, in cui è stata ricercata la presenza di HPV in 34 campioni di carcinoma a cellule squamose di tessuti polmonari mediante PCR e ISH, non è stato osservato alcun aumento nell'incidenza di positività ad HPV o una chiara associazione tra HPV e cancro del polmone [Bohlmeier T. et al.. 1998]. Koshiol et al hanno valutato 399 pazienti con nuova diagnosi di cancro ai polmoni usando una ampia gamma di saggi per la genotipizzazione di HPV, ma tutti i campioni sono risultati negativi [Koshiol J. et al. 2011]. Attualmente, i dati rimangono contrastanti poiché diversi altri studi hanno sostenuto il ruolo diretto di HPV nel cancro del polmone, mentre altri hanno confutato la sua causalità. Diversi studi più recenti hanno suggerito che HPV possa essere un fattore di rischio nel provocare il cancro ai polmoni e che agisca in sinergia con l'uso di tabacco. Un recente ampio studio meta-analitico ha suggerito che l'ampia variabilità dei dati relativi all'associazione tra HPV e cancro del polmone possa derivare dall'area geografica dello studio e dal sottotipo istologico del tumore, piuttosto che dalle differenti tecniche utilizzate per lo screening di HPV [Syrjanen K. et al. 2012]. Allo stato attuale delle cose, quindi, non è chiaro se l'infezione da HPV abbia un ruolo diretto nella oncogenesi del cancro polmonare.

Nel corso degli ultimi anni, è stata suggerita anche una possibile correlazione tra infezione da HPV e cancro del colon, e diversi ricercatori hanno rilevato HPV nei tumori del colon-retto. In una recente lavoro, Burnett-Hartman ha analizzato la correlazione tra HPV e cancro del colon-retto con l'ausilio dei criteri Bradford, trovando alcune prove in analogia, plausibilità biologica, forza dell' associazione, ma solo deboli evidenze di consistenza, di specificità e coerenza [Burnett-Hartmann AN. et al. 2008]. Ancora più recentemente Lorenzon ha rivalutato la letteratura pubblicata dal 1988 ad oggi riguardante un possibile ruolo di HPV nel cancro colon-rettale per comprendere se HPV possa realmente svolgere un ruolo attivo nella carcinogenesi del colon-retto [Lorenzon L. et al. 2011]. Il risultato di questo lavoro ha permesso di evidenziare come HPV sia stato rilevato nella maggioranza dei lavori pubblicati, con una significativa differenza nella positività riscontrata all'infezione tra campioni tumorali e controlli; il tasso medio di HPV rilevato nei carcinomi è pari al 41,7%, rispetto ad un tasso di rilevamento medio del 32,8% nelle mucose coliche adiacenti alla neoplasia, e al 5,8% in controlli disease-free. La letteratura pubblicata, tuttavia, è

deficitaria nella trattazione di dati ottenuti con metodi standard di indagine ed utilizzando la stratificazione di gruppi e di popolazioni. Questi dati incoraggiano ulteriori studi per indagare la presenza del virus su più vasta scala, il suo possibile ruolo nella oncogenesi, l'integrazione nel genoma ospite, l'espressione delle oncoproteine virali, le mutazioni nei tumori HPV positivi e le possibili vie di infezione del colon (ematologica, diffusione linfatica o diffusione perineale).

Infine, recenti studi hanno dimostrato la presenza di virus come HPV, Citomegalovirus, EBV, virus della leucemia bovina (BLV) ed il virus omologo umano del virus tumorale mammario del topo (HHMTV) in tessuti biotici di carcinoma mammario [Joshi et al., 2012. Lawson et al., 2010. Amarante et al., 2009; Lawson, 2009. Buehring et al., 2001]. Da quando, nel 1990, fu dimostrato che HPV può immortalizzare cellule epiteliali mammarie umane. [Band V. et al. 1990], numerose ricerche si sono focalizzate sulla possibilità che HPV possa essere associato al carcinoma mammario oltre che a quello della cervice uterina. Nel 1992, Lonardo et al [Lonardo DA. et al. 1992, 21:95–100.] hanno dimostrato la presenza di HPV 16 nel 29% dei tumori della mammella e dei linfonodi metastatici utilizzando tecniche di PCR. Successivamente, HPV-16 è stato identificato in tessuti neoplastici mammari e cervicali di donne norvegesi affette sia da cancro del seno che da tumore della cervice uterina [Hennig EM. et al. 1999]. Inoltre, HPV-33 è stato identificato in tumori della mammella nel 41% delle donne cinesi e nel 11% delle donne giapponesi con carcinoma mammario [Yu Y. et al. 1999]. I genotipi di HPV ad alto rischio 16, 18 e 33 sono stati identificati in tumori al seno di popolazioni molto diverse [Amarante MK. et al. 2009]. La prevalenza di carcinoma mammario HPV positivo in questi studi varia ampiamente. Le donne con carcinoma mammario positivo ad HPV sono significativamente più giovani di quelli con cancro al seno HPV negativo, e questo sembra implicare che le giovani donne sessualmente attive, con un più alto tasso di infezione cervicale da HPV, possono essere associate all'insorgenza del carcinoma della mammella in età più precoce [Lawson JS, et al. 2008]

Quindi, dal 1992 ad oggi, numerosi studi hanno dimostrato la presenza del DNA di HPV in tessuti di carcinoma mammario attraverso saggi di PCR e saggi di ibridazione in situ (ISH), ottenendo valori di positività estremamente variabili, compresi tra lo 0% e l' 86% [de Villiers EM. et al. 2005. Gopalkrishna V. et al. 1996]. Questa variabilità sembra dovuta ad una diversa distribuzione geografica dei genotipi virali, all'utilizzo di metodiche diversamente sensibili per individuare il DNA virale e alla presenza di

un basso numero di copie genomiche [Khan et al., 2008]. In un recente studio meta-analitico [Simões PW. et al. 2012] si è individuata una prevalenza media di circa il 23% con un rischio di sviluppare un carcinoma mammario in donne HPV positive 6 volte maggiore rispetto alle HPV negative. L'HPV 33 risulta essere il genotipo prevalente (14%), seguito dai genotipi HPV 18 (7%), 16 (7%) e 35 (7%). La prevalenza degli altri genotipi è inferiore al 3% ed è significativamente superiore se si analizzano campioni biotici inclusi in paraffina piuttosto che a fresco [Simões PW et al., 2012; Li et al., 2011]. Attualmente il possibile coinvolgimento di HPV nella patogenesi del carcinoma mammario risulta di grande interesse per la recente commercializzazione di vaccini preventivi nei confronti di genotipi ad alto rischio oncogeno, in particolare nei confronti dei genotipi 16 e 18, tra i più rappresentati nella cervice uterina e associati a carcinomi cervicali più aggressivi.

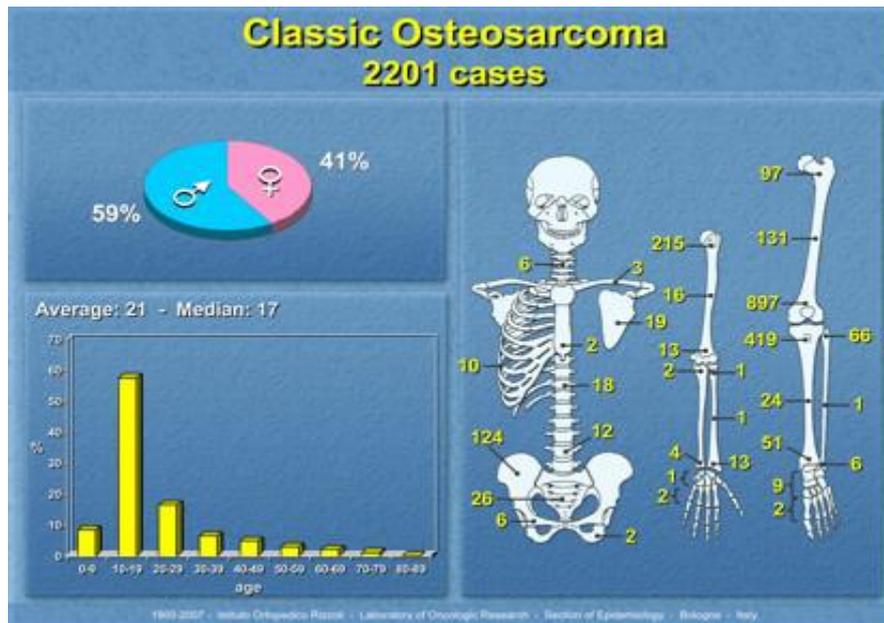
4. Tumori umani

4.1. Tumori mesenchimali

4.1.1. Tumori ossei

4.1.1.1. Osteosarcoma

L'osteosarcoma classico viene definito come un tumore ad alto grado di malignità quasi sempre di origine intramedullare e raramente insorge dalla superficie ossea. La principale caratteristica di tale neoplasia è la deposizione ex novo di materiale osteoide ed osseo da parte delle cellule mesenchimali, che formano il tessuto sarcomatoso del tumore. Questo elemento è estremamente importante in caso di dubbio sul tipo di diagnosi da attribuire alla neoplasia; infatti frequentemente il tessuto sarcomatoso assume aspetti di differenziazione fibroblastica e/o cartilaginea ed è sufficiente una minima quantità di tessuto osteoide, ritrovata in un piccolo punto della neoplasia, per stabilire che si tratta di un osteosarcoma. In questo caso si parla di osteosarcoma prevalentemente fibroblastico, condroblastico oppure osteoblastico, secondo la definizione di Dahlin [Dahlin DC and Coventry MB. 1967].



Istopatologicamente, il tessuto osseo neformato assume una struttura completamente irregolare poiché si visualizzano ammassi di trabecole contorte, che non raggiungono mai la maturazione strutturale tipica dell'osso normale. Le cellule risultano come intrappolate nella sostanza ossea neoplastica con conseguente loro diminuzione numerica, volumetrica e mitotica, fino ad arrivare alla necrosi cellulare. L'osso neoplastico, inoltre, infila gli spazi midollari dell'osso, caratteristica sufficiente alla diagnosi di osteosarcoma, qualora mancassero elementi citologici vitali o validi ai fini di una sicura valutazione. L'osteosarcoma risulta generalmente di facile identificazione attraverso l'esame radiografico e macroscopico. Sulla base delle differenze anatomo-cliniche riscontrate, ed in parte alle differenze esistenti in termini di prognosi, si rinvengono i seguenti tipi di osteosarcoma:

Tipo di osteosarcoma	Percentuale di comparsa
Classico (centrale o intramidollare)	80
teleangiectasico	6
mascellare	6
secondario	6
delle piccole cellule	1
della superficie dell'osso	0,5
multifocale	0,5

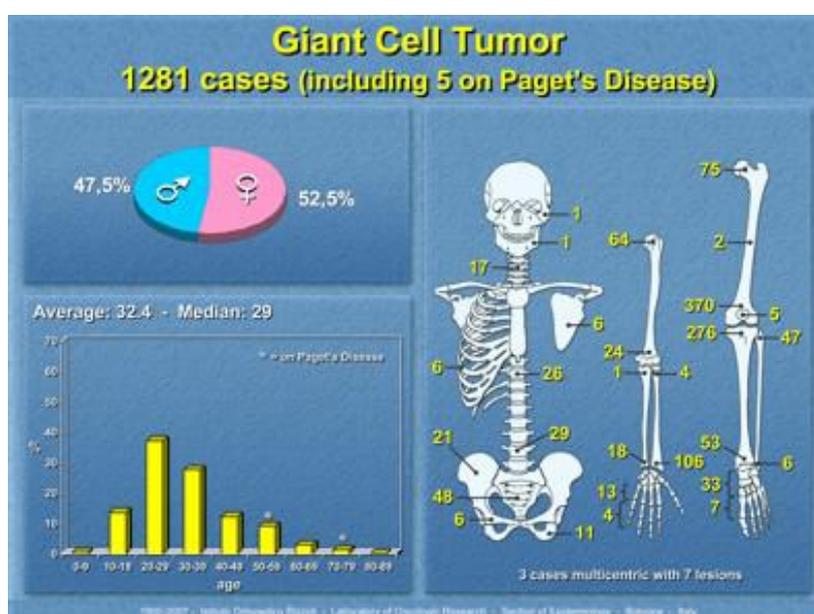
Da un punto di vista epidemiologico, l'OS rappresenta il tumore maligno primitivo dello scheletro più frequente dopo il mieloma, anche se è raro nel contesto generale

delle neoplasie (ne rappresenta solo lo 0,2%). Nei maschi si riscontra un'incidenza maggiore del tumore rispetto alle femmine, con una percentuale del 59 e del 41% rispettivamente; l'età in cui si manifesta la maggior parte dei casi è compresa fra i 10 e i 30 anni. Per quanto riguarda la localizzazione dell'OS, la più frequente è quella a livello del ginocchio o della spalla, seguono poi la parte distale del femore, la parte prossimale della tibia ed infine, la parte prossimale dell'omero; rara è la localizzazione nei piedi e nelle mani. Nelle ossa lunghe il tumore si localizza nelle metafisi e nella metadiaphisi [Campanacci M. et al., 1992]. L'insorgenza dell'OS è spesso inavvertita in quanto compare un leggero dolore a livello osseo che non desta preoccupazioni, poichè spesso attribuito ad altre cause. Dopo qualche settimana compare la tumefazione locale via via sempre più gonfia e dolente fino a limitare funzionalmente l'articolazione coinvolta, con edema infiltrante. Gli esami ematologici confermano un elevato livello delle fosfatasi alcaline sieriche, in assenza di colostasi, suggerendo la produzione di nuovo tessuto osseo. Il decorso della neoplasia è piuttosto rapido e l'invasività per via ematica si manifesta attraverso metastasi a carico dei polmoni e, in un secondo momento, a livello dello scheletro. La chemioterapia, seguita dall'intervento chirurgico, rappresenta il trattamento d'elezione dell'OS ed ha consentito, al giorno d'oggi, il raggiungimento della sopravvivenza nel 70% dei malati di OS non metastatizzanti (le metastasi possono presentarsi entro i primi 2-3 anni dall'intervento). I farmaci attualmente utilizzati comprendono l'adriamicina, metotrexene, sidiaminoplatino e isofosfamida. La chemioterapia si effettua subito dopo la diagnosi e, nella maggior parte dei casi, in seguito a pochi cicli, dopo circa due mesi, il tumore è regredito ed i valori ematologici sono ristabiliti. Quando il valore di necrosi cellulare arriva al 90-100% si ritiene raggiunta una buona risposta alla terapia [Jenkin RD. et al., 1972. Dahlin DC. et al., 1977. Larsson SE. et al., 1974]. Per quanto riguarda lo studio dell'osteosarcoma, a tutt'oggi non sono noti, in letteratura, riferimenti a modelli di studio applicabili al processo di trasformazione neoplastica che conduce alla sintesi di abbondante materiale osseo da parte delle cellule mesenchimali. Numerose sono le evidenze sperimentali che riportano il coinvolgimento di determinati oncogeni e oncosoppressori nella patogenesi di tale neoplasia, ma le specifiche alterazioni geniche che, in sequenza, si vengono a sommare per realizzare la trasformazione, rimangono ancora poco conosciute. Poco note risultano anche le condizioni predisponenti l'insorgenza dell'OS. Non è infatti ancora conosciuta la possibile esistenza di correlazioni tra il contatto con agenti

esogeni/endogeni e la comparsa della malattia, a parte l'esposizione del soggetto a forti dosi di raggi X a scopo terapeutico.

4.1.1.2. Tumore a Cellule Giganti

Il TCG è un tumore intramidollare dell'osso, costituito da cellule fondamentali mononucleate che tendono a fondersi in cellule giganti plurinucleate. E' una patologia rara che rappresenta il 5% dei tumori ossei e il 20% dei tumori di natura benigna. La sua incidenza è di 1 milione/anno. Nell' 80% dei casi insorge in una fascia d'età compresa tra i 15 e i 30 anni, mentre sono poco frequenti casi di tumore insorti prima della pubertà, ovvero prima che vengano chiuse la cartilagini di coniugazione, e dopo i 50 anni. Nonostante venga classificato come benigno può essere aggressivo, può recidivare nel 10-25% dei casi e metastatizzare nell'1-4% dei casi. La principale sede di metastasi è rappresentata dal polmone. La localizzazione principale è rappresentata dalle ossa lunghe (circa il 90% dei casi) e, nell'adulto, prevalentemente nelle porzioni meta-epifisarie; ciò è dovuto al fatto che non vi è più la cartilagine di coniugazione e quindi le epifisi e la metafisi non sono più separate a sufficienza per prevenire la propagazione del tumore, il quale tende a coinvolgerle entrambe. L'impressione generale è che il tumore si formi nella metafisi e poi diffonda. Esistono infatti casi in cui la localizzazione è puramente metafisaria ma non è mai stato riscontrato un caso di TCG localizzato esclusivamente nell'epifisi.



Le due meta-epifisi colpite più frequentemente dal tumore sono quella distale del femore e quella prossimale della tibia, confermando così che oltre la metà di tutti i TCG si localizzano a livello del ginocchio. Ulteriori regioni anatomiche in cui il tumore può svilupparsi sono l'estremità distale del radio, la prossimale del femore, la distale della tibia e la prossimale dell'omero.[Campanacci M. Bone and Soft Tissue Tumors: Clinical Features, Imaging, Pathology and Treatment. 1999].

Non è raro, inoltre, incontrare il TCG nel sacro e nel bacino; è invece rarissimo nelle restanti ossa. Clinicamente si riscontra dolore, riferito spesso all'articolazione; soprattutto negli arti inferiori; l'assottigliamento della corticale può determinare microfratture e fratture patologiche che aumentano il dolore e l'impotenza funzionale [Campanacci M. et al., 1989]. Questo tumore è caratterizzato dalla presenza di due popolazioni cellulari distinte: una popolazione stromale di origine osteoblastica ed una popolazione osteoclast-like di probabile origine monocitica. Si possono quindi identificare una fitta popolazione di cellule mononucleate di media grandezza, rotondeggianti o fusate, ed un gran numero di cellule giganti con ampie porzioni citoplasmatiche talora vacuolate, polinucleate (anche 50-100 nuclei raccolti al centro), simili ad osteoclasti, i cui nuclei non differiscono morfologicamente da quelli delle cellule mononucleate. Tra i numerosi studi fatti per comprendere al meglio la natura delle cellule giganti è importante citare quello svolto da Goldring, i quali sono riusciti ad identificare le diverse popolazioni cellulari che costituiscono questo tipo di neoplasia [Goldring SR. et al., 1987]. Il primo importante risultato di Goldring riguarda le cellule giganti che hanno la tendenza a scomparire dalla coltura; infatti, anche arricchendo il terreno, non si riesce ad aumentarne la sopravvivenza: ciò induce a considerare le cellule giganti come elemento non propriamente neoplastico. Burmester et al., sono del parere che le cellule polinucleate derivino da una delle due popolazioni di cellule mononucleate presenti nel tumore, precisamente da quelle di forma rotondeggianti [Burmester GR. et al., 1983]. Queste ultime, che come le cellule giganti tendono a scomparire dalla coltura, presentano caratteristiche morfologiche ed antigeniche proprie della famiglia dei monociti-macrofagi [Krober SM. et al., 1998]. Esprimendo l'antigene CD68, sono infatti reattive ad uno specifico anticorpo e, come d'altra parte molti macrofagi presenti nei vari tessuti dell'organismo, hanno nel loro citoplasma enzimi comuni alla maggior parte dei macrofagi stessi (fosfatasi acida, β -glucuronidasi) [Johnston J. et al., 1977]. Quindi queste cellule simili-monocitiche

possono essere considerate come le potenziali progenitrici delle cellule giganti. Per quanto riguarda una seconda popolazione di cellule mononucleate presenti nei TCG, esse sono di forma fusata ed hanno aspetto morfologico simile ai fibroblasti; il fatto che queste cellule siano le uniche a proliferare a lungo in coltura fa supporre che rappresentino l'elemento neoplastico nei TCG. Sembra quindi ormai assodato il ruolo non neoplastico delle cellule giganti; il loro compito potrebbe essere esclusivamente quello di creare lo spazio necessario all'espansione tumorale. Meno chiara è invece la loro origine, che costituisce ancora materiale di studio.

Il decorso della malattia TCG non è prevedibile: in assenza di trattamento, nella maggioranza dei casi, il tumore impiega tra i due e i sei mesi per raddoppiare la sua massa. Eccezionalmente la massa tumorale può arrestare la sua crescita, andando incontro a necrosi o fibrosi. Il trattamento è essenzialmente chirurgico e prevede l'asportazione della massa tumorale e di un margine di tessuto sano circostante. La percentuale di recidiva è del 10-15% in caso di somministrazione di terapia adiuvante e del 15-20% senza terapia adiuvante.

4.1.1.3. Condrosarcoma

Il condrosarcoma (CS) viene definito come un tumore maligno con differenziamento della cartilagine ialina che può presentare cambiamenti mixoidi, calcificazione e ossificazione. Rappresenta il secondo tumore maligno dell'osso più comune, dopo l'osteosarcoma, costituendo circa il 25% di tutti i sarcomi primari dell'osso [Dorfman HD. et al., 1995]. Circa il 90% di tutti i condrosarcomi viene istologicamente definito di tipo convenzionale, anche se vi possono essere rare varianti definite da piccole caratteristiche microscopiche e cliniche: condrosarcoma a cellule chiare, condrosarcoma mesenchimale, condrosarcoma centrale, condrosarcoma periostale e condrosarcoma indifferenziato. La distribuzione del CS nella popolazione varia a seconda dell'età, con un minimo di 0,2 ed un massimo di 0,9 casi per 100.000 persone, ma è presente, nella maggior parte dei casi, in soggetti di età compresa tra i 35 e i 60 anni, con una probabilità di comparsa più alta nei maschi piuttosto che nelle femmine. Solitamente questo tipo di tumore, rispetto a quello benigno della cartilagine, provoca dolore e rigidità prevalentemente nelle aree di sviluppo, ovvero nel tronco, nella pelvi e nelle ossa lunghe.

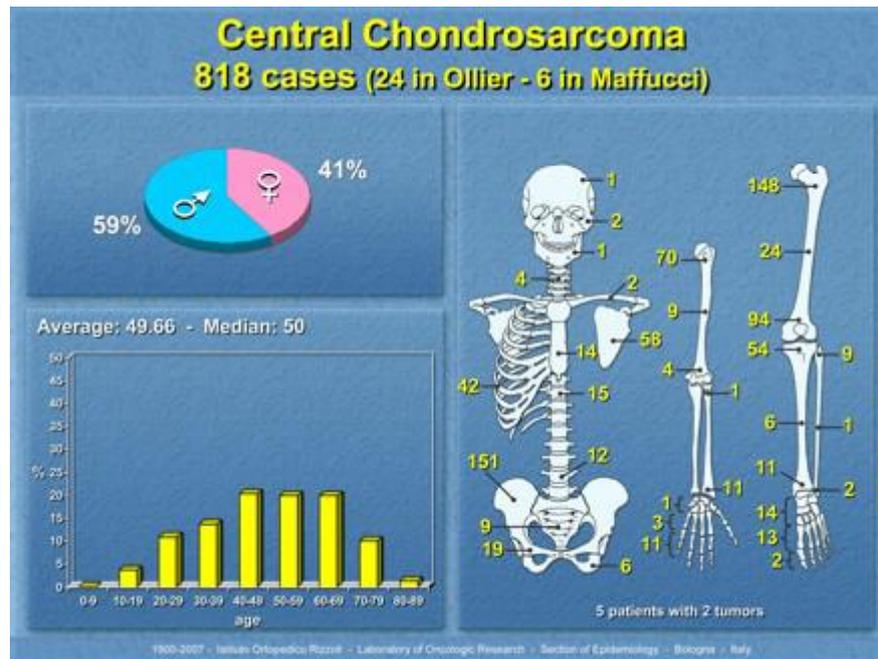
I condrosarcomi convenzionali possono essere categorizzati a seconda della loro posizione nell'osso. La maggior parte (75%) è localizzata a livello centrale, nella cavità midollare (CS centrale), una piccola percentuale dei quali sorge in seguito ad un precursore benigno preesistente (encondroma). Solitamente gli encondromi sono solitari ma, nella malattia di Ollier e nella sindrome di Maffucci, ve ne sono multipli. Una parte ridotta dei condrosarcomi (15%), si sviluppa sulla superficie dell'osso (CS periferico), come risultato di una trasformazione maligna di una punta cartilaginea di un osteocondroma ereditario preesistente. Principalmente i tumori possono essere classificati in grado I, quando le lesioni sono aggressive ma localizzate, c'è una bassa cellularità, un'atipia citonucleare limitata, poche cellule multinucleate e, principalmente, una matrice condroide e l'assenza di mitosi; grado III se il tumore è molto aggressivo, presenta un'alta incidenza di metastasi, ha un'alta cellularità con polimorfismo nucleare, mitosi e, soprattutto, matrice mixoide; ed infine grado II, una situazione intermedia dove il tumore può presentare, a volte, una lesione localizzata aggressiva, sia metastasi; si ha un aumento della degenerazione della matrice muco-mixoide e viene identificata una mitosi occasionale.

Recentemente sono anche state evidenziate delle anomalie di tipo molecolare/genico di cui, però, non si sa molto: evidenze dimostrano come vi siano delle alterazioni a livello dei cromosomi 1p, 4, 5, 9 e 20 [Mandahl N. et al. 1990] [Ozisik YY. et al., 1994], oppure dei geni soppressori tumorali CDKN2 e MTS-2, localizzati sul cromosoma 9 [Jagasia AA. et al., 1996]; in aggiunta sono state identificate anche amplificazioni del proto-oncogene c-myc, così come del gene oncosoppressore codificante la proteina p53.

Ad oggi, il trattamento è solamente chirurgico, poiché tale tipo di tumore è altamente resistente a chemio e radio-terapia.

Condrosarcoma centrale

Il condrosarcoma centrale viene definito come un tumore maligno che si manifesta principalmente nei maschi piuttosto che nelle femmine e si presenta tra i 30 e i 70 anni di età. La localizzazione del tumore è limitata al femore prossimale, alle pelvi, all'omero prossimale, alla scapola e alla tibia prossimale. Nelle ossa lunghe inizia con un'estensione di tipo metafisale per circa metà o più dell'intero osso.



Clinicamente si presenta discontinuo, profondo con presenza di dolore che difficilmente termina in una frattura. La crescita è estremamente lenta e tipicamente progredisce verso la forma maligna: si può avere una trasformazione da un grado basso ad uno più alto oppure ad un altro tumore maligno. Questo tipo di tumore può dare metastasi che ricorrono a differenti anni a seconda del grado del tumore. Il trattamento prevede una radicale resezione della zona colpita. La chirurgia è, ad oggi, il golden standard poiché né la radio né la chemio-terapia sono efficaci. La sopravvivenza nei soggetti affetti da condrosarcoma di grado 1 è piuttosto elevata, ma si riduce drasticamente nel caso di tumori di grado 2 e 3, in cui la morte può sopraggiungere nel 40 e 60% dei casi, rispettivamente.

Condrosarcoma periferico

Il condrosarcoma periferico viene definito come un tumore che deriva da un'esostosi sulla superficie dell'osso. La sua frequenza è più bassa rispetto a al CS centrale ma, anche in questo caso, il tumore è prevalente nei maschi piuttosto che nelle femmine. La distribuzione nella popolazione è concentrata per lo più nei soggetti di età compresa tra i 20 e i 50 anni. La localizzazione si ha per lo più a livello pelvico, del femore prossimale, della colonna vertebrale e dell'omero prossimale. Clinicamente, il tumore si presenta come una massa a crescita lenta, dolorosa allo sfregamento e aderente all'osso. A volte può essere asintomatico e non essere caratterizzato da una precedente

storia di esostosi. Invade il canale vertebrale e può essere, in alcuni casi, causa di paraplegia.

Condrosarcoma dedifferenziato

Il condrosarcoma dedifferenziato viene definito come un tumore cartilagineo maligno in un cui è presente un sarcoma ad alto grado. Questo tipo di tumore si manifesta in soggetti di età superiore ai 50 anni, con una probabilità di comparsa più alta nei maschi che nelle femmine. Il CS dedifferenziato può essere suddiviso in centrale o periferico, a seconda della sua localizzazione anatomica. Questo tipo di tumore si presenta principalmente a livello del femore prossimale, della pelvi e dell'omero prossimale. Clinicamente si presenta con sintomi moderati e da una rapida progressione del dolore; spesso si riscontrano fratture patologiche. Il trattamento prevede la resezione chirurgica del tumore e di una parte della regione sana circostante. Spesso, nel caso il tumore non fosse stato diagnosticato in tempo, è necessario procedere con l'amputazione. Un trattamento non adeguato può portare a recidiva e ad un alto grado di metastasi che spesso vengono visualizzate nella diagnosi.

Condrosarcoma periosteale

Questo tipo di tumore è estremamente raro e si origina dalla superficie dell'osso in soggetti adulti. Anche in questo caso la percentuale di comparsa è superiore in soggetti di sesso maschile (66%) rispetto a quelli di sesso femminile (34%). Il tumore può comparire in pazienti di età compresa tra i 10 e i 70 anni, anche se il picco si riscontra in soggetti tra i 30 e i 40 anni. Si localizza a livello del femore distale, della tibia prossimale e dell'omero prossimale. Clinicamente si manifesta senza o con poco dolore e può essere suddiviso in grado 1, considerato un condroma periostale; grado 2, il più frequente, e grado 3, che viene diagnosticato molto raramente. Anche in questo caso il trattamento prevede la resezione chirurgica del tumore.

Condrosarcoma a cellule chiare

Come suggerisce il nome, questo condrosarcoma è ricco di cellule chiare. È un tumore raro che si manifesta nella popolazione adulta con due picchi, il primo compreso tra i 20 e i 30 anni e il secondo compreso tra i 40 e i 50 anni. Anche il condrosarcoma a cellule chiare è principalmente diagnostico in soggetti di sesso

maschile (72%) rispetto a quelli di sesso femminile (28%). Si localizza a livello dell'epifisi delle ossa lunghe (femore prossimale ed omero) o nelle ossa corte. I sintomi sono costituiti solo da un dolore moderato nella zona affetta dalla neoplasia. Ha una crescita lenta e le metastasi sono poco frequenti. Anche in questo caso la terapia prevede la resezione chirurgica del tumore.

Condrosarcoma mesenchimale

Il condrosarcoma mesenchimale è un tumore maligno molto raro che si manifesta principalmente in due range di età quali quello compreso tra i 20 e i 40 e quello compreso tra i 60 e i 70 anni. Non vi sono molte differenze nella distribuzione del tumore rispetto ai due sessi, poiché i soggetti di sesso maschile costituiscono il 56% mentre, nel restante 44% dei casi, i pazienti sono femmine. Il tumore si localizza a livello del tronco e delle ossa cranio-facciali. E' caratterizzato da una rapida crescita e da un alto grado di recidiva che, nel caso di asportazione chirurgica non adeguata, può portare alla formazione di metastasi. Il trattamento prevede una resezione chirurgica radicale. Si utilizza, a volte, anche una terapia chemoterapica, ma la sua efficacia non è ancora dimostrata.

4.2. Tumori epiteliali

4.2.1. Carcinoma mammario

4.2.1.1. Ghiandola Mammaria

La mammella è una ghiandola sudoripara modificata che nella donna assume una struttura complessa mentre nel maschio residua solo come organo rudimentale. Si inizia a formare alla sesta settimana dello sviluppo fetale, ma il suo sviluppo nelle donne non è completo alla nascita, in quanto continua a subire modificazioni nell'adolescenza e durante la gravidanza.

Questa ghiandola è formata da circa 20 lobi, ognuno dei quali è diviso in lobuli, le unità funzionali del parenchima mammario. Ciascun lobo drena autonomamente nel capezzolo attraverso un dotto escretore, il dotto galattoforo. In prossimità del capezzolo i dotti galattofori si dilatano formando i seni galattofori, e diramandosi ulteriormente in senso distale formano i dotti terminali. Prima della pubertà questo

sistema di diramazioni duttali termina a fondo cieco, ma al momento del menarca si sviluppa dando luogo a 30 unità epiteliali, duttuli o acini. Ogni dotto terminale con i suoi duttuli e costituisce l'unità terminale duttulo-lobulare. I lobuli sono circondati da uno stroma interlobulare fibroso, collagene e denso (Fig. 18).

La mammella subisce delle variazioni in base ai livelli estrogenici. Durante il ciclo mestruale l'epitelio dei dotti e le cellule dello stroma proliferano, mentre nella fase mestruale l'abbassamento degli ormoni fa sì che vi sia una diminuzione del volume ghiandolare totale.

Solo con la gravidanza la mammella raggiunge la sua completa maturità morfologica e la massima attività funzionale. Da ciascun gettone ghiandolare si formano grappoli di ghiandole secretorie e la loro proliferazione determina l'inversione del rapporto ghiandola-stroma, così che alla fine della gravidanza la mammella risulta costituita quasi esclusivamente da strutture ghiandolari separate tra loro da sottili bande stromali. Immediatamente dopo il parto inizia la secrezione di latte e dopo l'allattamento, le ghiandole vanno incontro ad atrofia, i dotti si riducono e il volume della mammella regredisce notevolmente.

Con la menopausa i dotti e le ghiandole vanno incontro ad atrofia con ulteriore riduzione dello stroma intra ed interlobulare [Robbins, 1992].

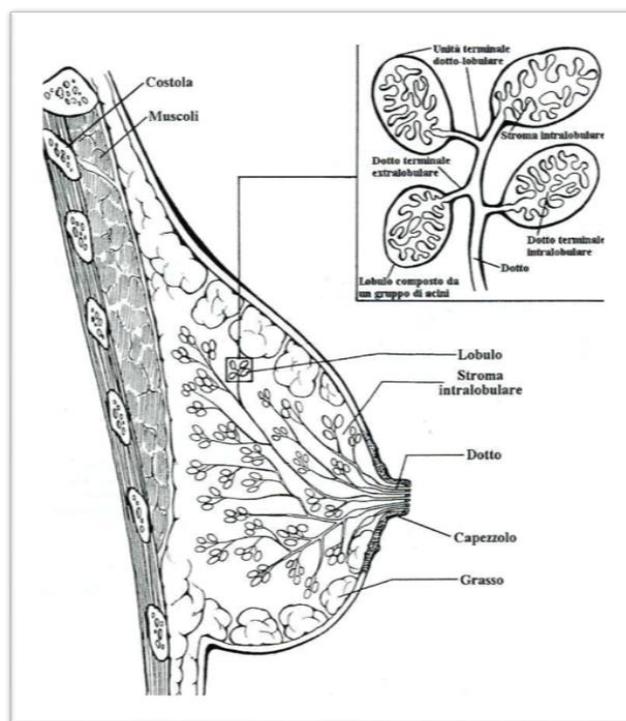


Figura 18: Struttura normale della mammella.

4.2.1.2.Cenni Epidemiologici

Il carcinoma mammario è la neoplasia più frequentemente diagnosticata e la principale causa di morte per cancro nelle donne a livello mondiale. L'incidenza del cancro della mammella presenta un'ampia variabilità geografica, in particolare è molto alta nei paesi sviluppati dell'Europa, Australia, Nuova Zelanda, Nord America e Nord Africa. Nel 2008 è stato stimato che il cancro alla mammella rappresenti il 23% di tutti i cancri che vengono diagnosticati e il 14% di tutti i casi di morte per cancro [Jemal et al., 2011].

I tassi di incidenza aumentano in maniera esponenziale con l'età ma, a differenza di altri tumori epiteliali non dipendenti da fattori ormonali e riproduttivi, l'incremento cessa intorno ai 50-55 anni, per poi riprendere meno pronunciato dopo i 60 anni [Key et al., 2001].

Il tasso di sopravvivenza per il carcinoma mammario è più alto rispetto agli altri tipi di cancro; in particolare, nei paesi sviluppati la maggior parte dei pazienti rimane in vita per almeno 5 anni dopo la diagnosi.

Recentemente, si è assistito ad un decremento, nelle statistiche, dell'incidenza del carcinoma mammario, probabilmente causato dall'introduzione di programmi di screening che consentono la diagnosi delle neoplasie anche di piccole dimensioni. La mortalità dovuta al carcinoma mammario è rimasta sostanzialmente invariata dagli anni '30 agli anni '90. Nell'ultimo decennio, invece, appare essersi leggermente ridotta grazie, molto probabilmente, alla possibilità di diagnosi precoce e all'utilizzo di terapie mirate su base ormonale e genetica [Youlten et al., 2012].

4.2.1.3.Fattori Di Rischio

Come per molti tipi di patologie, anche per il carcinoma mammario è stata individuata una serie di fattori predisponenti:

- Fattori geografici: Estremamente frequente nei paesi industrializzati, quali Stati Uniti, Europa Occidentale ed Australia, dove circa il 6% della popolazione femminile sviluppa un carcinoma mammario entro il 75° anno di età. Al contrario, è più raro nei paesi non industrializzati, quali Africa e Sud Est Asiatico, dove il rischio di sviluppare

un carcinoma mammario è circa un terzo di quello dei paesi industrializzati. L' unico Paese industrializzato che sembra avere bassa incidenza di carcinoma mammario è il Giappone [Key et al., 2001].

- Fattori riproduttivi : Maggiore frequenza in donne con menarca precoce, nullipare o con prima gravidanza in età superiore ai 30 anni [Araujo et al., 2012].

- Fattori familiari: La presenza di una parente di primo grado (madre o sorella) con carcinoma mammario rende doppio il rischio di sviluppare il carcinoma mammario rispetto alla popolazione generale. Anche se, solitamente, nei soggetti con predisposizione familiare il carcinoma compare in età giovanile (prima dei 40 anni) ed è più frequentemente bilaterale [Lakhani et al., 2000]

- Predisposizione genetica: E' stato dimostrato che pazienti affetti da mutazioni a livello dei geni BRCA1 (17q) e BRCA2 (12q) hanno circa il 56% di possibilità di sviluppare carcinoma mammario entro i 70 anni. Le mutazioni a livello di questi geni sono responsabili di circa 1/3 dei casi familiari e, complessivamente, del 5% circa dei casi di carcinoma mammario. Le mutazioni a carico del gene BRCA1 sono, inoltre, coinvolte nella predisposizione allo sviluppo di carcinomi all' apparato riproduttivo femminile (ovaio e tube) [Jeffrey et al., 2005].

- Contraccettivi orali: E' stato dimostrato un modesto aumento di rischio in donne giovani a seguito di assunzione protratta di estrogeni e progestinici a fini contraccettivi [Hulka et al., 2001].

- Terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa: Come nel caso della contraccezione orale, è stato dimostrato un lieve aumento di rischio in casi di assunzione per 5 anni. Nel caso di periodi più lunghi, i dati non sono concordanti [Hulka et al., 2001].

- Fumo e alcool: Il consumo di alcool e il fumo di sigaretta sembrano essere correlato con un lieve aumento di rischio [Xue et al., 2011; Key et al., 2006].

- Obesità: L' aumento del peso corporeo, soprattutto, ma non solo, in età post-menopausale, determina un incremento del rischio di insorgenza di carcinoma mammario probabilmente dovuto all' aumento dei livelli sierici di testosterone nelle donne in sovrappeso, rischio legato alla maggior concentrazione di ormoni steroidei a livello del tessuto adiposo [Youlten et al., 2012].

- Attività fisica: Sembra che le donne che fanno attività fisica in maniera regolare abbiano una riduzione del rischio di sviluppare un carcinoma mammario fino a 40% [Youliden et al., 2012].

4.2.1.4. Carcinoma Mammario nell'uomo

Il carcinoma mammario maschile è raro e rappresenta meno dell'1% di tutti i carcinomi della mammella. Il tasso di incidenza in Italia e nel mondo occidentale è di circa 1 caso su 100.000 e mostra un lieve incremento negli ultimi decenni, con evidenza di una riduzione del tasso di mortalità. La prevalenza aumenta con l'età e mostra una distribuzione unimodale; l'età mediana è intorno ai 67 anni, con ritardo di circa 5 anni rispetto al sesso femminile.

I fattori eziologici o predisponenti, probabilmente multifattoriali, restano controversi. Essi comprendono varie condizioni di alterato metabolismo ormonale con uno sbilanciamento del rapporto estrogeni/progesterone a seguito di patologie del testicolo, Sindrome di Klinefelter, cirrosi epatica, obesità, assunzione esogena di estrogeni, ginecomastia secondaria a farmaci o pregresso trattamento radiante nell'area mammaria.

Un'anamnesi familiare positiva per carcinoma mammario è riportata in circa 30% dei casi. Il fattore genetico più frequentemente associato è la mutazione del gene BRCA2. Studi recenti dimostrano un incremento del rischio da 80 a 100 volte per gli uomini che presentino tale mutazione, rispetto alla popolazione generale, mentre per l'alterazione del gene BRCA1 l'incremento è di circa 60 volte. La mutazione di BRCA2 si riscontra nel 15% di neoplasia mammaria maschile e la sua frequenza varia dal 4 al 40% con una maggiore incidenza nella popolazione ebraica di discendenza Askenazy [Beyrouti et al., 2007. Weiss et al., 2005. Sciacca et al., 2000].

4.2.1.5. Malattie Benigne Della Mammella

Le malattie benigne della mammella costituiscono un vasto ed eterogeneo gruppo di lesioni la cui frequenza è notevolmente superiore a quella delle lesioni maligne. La loro importanza consiste soprattutto nel fatto che alcune possono simulare clinicamente un cancro della mammella (per esempio l'ectasia duttale mammaria o

necrosi del grasso), mentre altre rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di un successivo carcinoma. In realtà solo una parte di esse rientra in quest'ultima categoria, trattandosi di poche lesioni che fanno parte del gruppo delle malattie benigne a carattere proliferativo.

A carico della mammella possono riscontrarsi vari tumori benigni, quali lipomi, adenomi, emangiomi, ecc. L'asportazione completa di questi tumori rappresenta un trattamento adeguato e definitivo. Uno dei tumori benigni più frequente nelle donne è il fibroadenoma, una proliferazione di tessuto sia fibroso che ghiandolare, che si riscontra più frequentemente prima dei 30 anni di età, aumenta di dimensioni durante la gravidanza e tende a regredire con l'aumentare dell'età della paziente. In genere è una lesione singola, ma nel 20% dei casi può essere multipla o bilaterale. Una trasformazione maligna è stata riportata molto raramente (0,1% dei casi) per la componente epiteliale in genere sotto forma di carcinoma in situ. La trasformazione sarcomatosa della componente connettivale è ancora più rara, se realmente esiste. Tuttavia, il rischio di trasformazione del fibroadenoma in cancro della mammella è maggiore se è presente iperplasia duttale o storia familiare di carcinoma mammario.

Un'altra lesione benigna della mammella è il papilloma intraduttale che, in media, si riscontra intorno ai 48 anni di età, nel 90% dei casi è solitario ed è costituito da una lesione polipoide all'interno dei dotti che può essere causa di secrezione ematica del capezzolo. L'escissione chirurgica guarisce questo tumore, e non vi è, in queste condizioni, un maggior rischio di cancro alla mammella a lungo termine. Il rischio è aumentato in presenza di papillomi multipli microscopicamente evidenti. Il papilloma intraduttale è una delle cause più frequenti di secrezione del capezzolo, che complessivamente si riscontra in circa il 5% delle donne che presentano problemi mammari.

La patologia fibrocistica rappresenta la condizione benigna più comune; si riscontra nel 60-90% delle donne, più frequentemente nell'età compresa tra i 20 e i 40 anni di età. Generalmente è bilaterale, anche se una mammella può essere notevolmente più colpita dell'altra. E' rappresentata da un insieme di alterazioni morfologiche mammarie, tra cui cisti, fibrosi, infiammazione cronica, iperplasia epiteliale. La sua origine non è del tutto nota, ma è certo che risenta di influenze ormonali [Robbins, 1992].

4.2.1.6. Tumori Maligni Della Mammella

La maggior parte di tumori che insorge nella mammella sono tumori epiteliali, cioè carcinomi, mentre sono rari i sarcomi e i tumori di origine connettivale. Nel carcinoma mammario si ha una crescita abnorme delle cellule che rivestono i dotti (90% dei casi) ed i lobuli (10% dei casi). Questi carcinomi vengono classificati in base alla cellula di origine (duttale o lobulare), alla invasione (diffusione e crescita) attraverso il dotto o il lobulo e dall'aspetto istologico [Robbins, 1992].

Carcinoma In Situ

E' un tipo di carcinoma non invasivo, nel quale le cellule tumorali si trovano ancora nella sede dove è avvenuta l'iniziale trasformazione neoplastica, confinate entro la membrana basale e non ancora diffuse in altre parti del corpo.

Esistono due tipi di carcinoma in situ:

- Carcinoma lobulare in situ (LCIS): Detta anche neoplasia lobulare, poiché inizia a livello dei lobuli, ma non si accresce attraverso la parete dei lobuli. E' un reperto occasionale e non si ritiene che si trasformi abitualmente in cancro invasivo.
- Carcinoma duttale in situ (DCIS) o carcinoma intraduttale: E' il tipo più frequente di carcinoma della mammella non invasivo ed è a sua volta, costituito da più varianti. Se non trattato può lentamente trasformarsi in carcinoma invasivo.

Carcinoma Duttale Infiltrante

E' il tipo più frequente di carcinoma mammario infiltrante e origina dalle cellule epiteliali dei dotti galattofori. Col tempo le cellule tumorali superano la membrana basale, penetrano nel tessuto adiposo mammario e possono così invadere i vasi linfatici o ematici diffondendosi in altre parti del corpo.

Carcinoma Lobulare Infiltrante

Rappresenta il 10-15% di tutti i tumori della mammella e origina dalle cellule epiteliali dei lobuli. Come il carcinoma duttale infiltrante, invade la membrana basale e si diffonde in altri distretti corporei.

Carcinoma Midollare

Tipo di carcinoma duttale infiltrante che rappresenta circa l'1% di tutti i carcinomi mammari e tende a produrre grosse masse tumorali, carnose con margini ben circoscritti, inoltre si ha una diffusa infiltrazione di linfociti e cellule tumorali di grandi dimensioni. Quando è puro, cioè non commisto ad altre varianti, ha una prognosi migliore rispetto ai precedenti.

Carcinoma Mucinoso Colloide

Detto anche carcinoma mucoso, è un raro carcinoma duttale infiltrante, prevalente nelle donne anziane, costituito da cellule che producono muco. In genere ha una prognosi migliore ed un minor rischio di metastasi rispetto al carcinoma lobulare o duttale invasivi delle stesse dimensioni.

Carcinoma Tubulare

E' un tipo particolare di carcinoma duttale infiltrante della mammella, costituito dalla proliferazione di piccoli tubuli irregolari. E' spesso multicentrico e bilaterale, e di rado si accompagna a metastasi linfonodali. La forma pura ha una prognosi molto favorevole, essendo guaribile in più del 90% dei casi.

Malattia Di Paget

E' una forma particolare di carcinoma duttale che insorge nei dotti principali della mammella dai quali si diffonde al capezzolo e all'areola, a livello dei quali si osservano alterazioni eczematose con prurito, arrossamento e secrezione sierosa o sieroematica dal capezzolo. E' una neoplasia rara che rappresenta meno dell'1% dei tumori della mammella.

Cistosarcoma Filloide

Origina da fibroadenomi che si accrescono fino a raggiungere proporzioni notevoli. Il tumore in genere ha un decorso benigno e solo raramente presenta caratteristiche maligne.

4.2.1.7. Classificazione Molecolare Del Cancro Alla Mammella

Allo scopo di capire perché pazienti con tumori mammari istologicamente identici avessero un'evoluzione clinica diversa, sono stati avviati una serie di studi mirati a

evidenziare alterazioni molecolari in modo da ottenere informazioni che consentissero di prevedere la diagnosi o la risposta alla terapia.

Il cancro alla mammella ha una notevole eterogeneità molecolare; in una singola neoplasie mammaria sono presenti in media 90 geni mutati, di cui solo 12 contribuiscono allo sviluppo del processo neoplastico. Inoltre, si è visto che le mutazioni funzionalmente importanti differiscono nei vari tumori, pur essendo tutte a carico di geni che codificano per fattori di trascrizione e molecole coinvolte nella trasduzione del segnale [Lopez et al., 2008].

Utilizzando la tecnica dei microarrays, che consente di studiare contemporaneamente l'espressione di un gran numero di geni e di combinare la quantificazione dell'espressione genica in modelli predittivi e prognostici, con un set di circa 500 geni (set di geni intrinseci) sono state individuate 4 classi di cancro alla mammella [Sørli, 2004]:

- Luminal-like: Sono tumori che esprimono le citocheratine 8 e 18 proprie delle cellule luminali che rivestono i dotti e i recettori per gli estrogeni. Sono suddivisi in due gruppi:

- ✓ Luminal like A, nei quali si ha un'elevata espressione dei recettori per gli estrogeni (ER), fattore nucleare 3 alfa dell'epatocita (HNF3A), X-box binding protein (XBP1), GATA binding protein e LIV-1.

- ✓ Luminal like B, nei quali vi è una minor espressione dei geni luminali.

- Basal like: Sono tumori che esprimono le citocheratine 5 e 17, caratteristiche delle cellule basali, geni correlati alla proliferazione, laminina e una proteina che lega gli acidi grassi.

- HER2 positivo: tumori che hanno un aumento dell'espressione di HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), proteina che promuove la crescita delle cellule tumorali, ed una maggiore espressione dei geni coinvolti nell'incremento di HER2, come GRB7 o TRAP100.

Essendo la tecnologia degli array complessa e non disponibile in tutti i laboratori, sono stati sviluppati metodi immunocistochemici (IHC) per effettuare la classificazione molecolare. Uno di questi approcci classifica le diverse neoplasie in base agli ER (Endocrine Receptor: estrogen or progesterone receptor).

Quindi, uno dei modi più utilizzati per definire la tipologia di tumore mammario è se esso sia o no:

- ✓ Positivo per Recettori Endocrini (recettori per estrogeno o progesterone).
- ✓ Positivo per HER2.
- ✓ Triplo negativo, cioè negativo per recettori degli estrogeni, progesterone, ed HER2.
- ✓ Triplo positivo, cioè positivo per recettori degli estrogeni, progesterone ed HER2

Da una parte questa classificazione richiama l'attenzione su aspetti importanti del tumore, come gli ER, ma rimane comunque molto semplificata per quanto riguardano gli aspetti molecolari [Reis-Filho et al., 2008].

Il carcinoma mammario ER positivo rappresenta i due terzi delle pazienti con tumore alla mammella; questi tumori crescono in risposta agli stimoli degli ormoni estrogeni e/o progestinici e quindi rispondono bene alle terapie ormonali atte a bloccare i recettori ormonali o ad inibire la produzione ormonale. Un quarto dei tumori ER-positivi sono anche HER2-positivi. I tumori ER- ed HER2-positivi tendono ad essere più aggressivi, meno responsivi alla terapia ormonale, e caratterizzate da rapida crescita ed alta probabilità di recidiva.

4.2.1.8.Diagnosi e Trattamenti

Indubbiamente l'esame clinico, basato sulla palpazione, costituisce il metodo di diagnosi più antico, ma ancora valido. La sua sensibilità, tuttavia, è piuttosto bassa poiché permette di rilevare solo il 60% delle lesioni, se paragonato alla mammografia. La palpazione permette, inoltre, di rilevare un eventuale nodulo ma non di discriminare con certezza tra noduli benigni (es: fibroadenomi) e maligni. Analogamente, la sola valutazione clinica dei linfonodi ascellari può portare a sovra o sottostime [IARC, Breast cancer screening, 2002].

La mammografia permette di diagnosticare noduli inferiori al centimetro di diametro e, quindi, non palpabili. E' un'indagine utile soprattutto nelle donne sopra i 35 anni, prima, infatti, le caratteristiche fisiologiche del tessuto mammario rendono difficoltosa l'interpretazione delle lastre a causa della predominanza del tessuto fibroso. Inoltre, non è opportuno indagare tramite mammografia il seno di donne in giovane età, dato il rischio connesso all'irradiamento con raggi X prolungato negli anni. Da dati presenti in letteratura si può rilevare che la mammografia è una tecnica ottimale per l'individuazione di lesioni che provocano un addensamento del tessuto

mammario o la formazione di microcalcificazioni. Al contrario, tumori che non si comportano in questa maniera (es: carcinoma lobulare in situ e infiltrante) possono sfuggire all'esame mammografico [Gøtzsche et al., 2006]. Negli ultimi anni si è introdotta, anche se per il momento non su larga scala, a livello di screening, la risonanza magnetica nucleare (RMN) come metodo di diagnosi nel caso di pazienti con un alto rischio accertato (familiare o genetico) [Morrow et al., 2011]. A queste indagini va ad aggiungersi la necessità di indagini citologiche o istologiche delle lesioni, una volta individuate con i metodi precedentemente descritti.

Prima del 1980 la mastectomia radicale veniva considerata il trattamento predominante contro il cancro alla mammella, finché non si vide che la rimozione chirurgica della massa tumorale seguita da radioterapia dava gli stessi risultati. Un'altra forma di trattamento include la chemioterapia, che prevede l'utilizzo di farmaci citostatici come il methotrexate, oppure la terapia ormonale per donne ER positive [IARC, Breast cancer screening, 2002]. Recentemente è stata introdotta una nuova terapia mirata, nella quale vengono usati alcuni farmaci, come il Trastuzumab, che hanno come target i recettori di HER2 [Tsang et al., 2012].

4.3. Tumori del tessuto neuroepiteliale

4.3.1. Glioblastoma Multiforme

Le neoplasie cerebrali costituiscono una notevole sfida nella pratica clinico-chirurgica e, più in generale, per tutta la comunità scientifica, sia perché si sviluppano in un compartimento isolato dell'organismo, separato dal circolo sanguigno sistemico mediante la barriera emato-encefalica, sia perché le cellule tumorali mostrano un comportamento particolarmente aggressivo ed infiltrante, rendendole un bersaglio estremamente complesso per qualsiasi tipo di terapia. Il miglior trattamento attualmente disponibile per queste lesioni si avvale della resezione chirurgica quanto più radicale possibile associata a chemio e radioterapia [Chamberlain, M.C. 2006; Olson, J. 2008]. Purtroppo l'inesorabile recidiva di malattia conduce a morte il paziente per deterioramento delle funzioni cerebrali.

I tumori primari del sistema nervoso centrale (SNC) comprendono un variegato insieme di entità patologiche, ciascuna con una sua distinta storia naturale. Per il fatto che i tumori della glia costituiscono da soli quasi il 40% di tutti i tumori del SNC, in

letteratura si è soliti operare una distinzione tra tumori gliali (o gliomi) e tumori non gliali. I gliomi sono lesioni neoplastiche delle cellule gliali e costituiscono il 32% di tutti i tumori cerebrali primitivi. Il glioblastoma multiforme (GMB) è il tumore più comune (17%) e più maligno tra le neoplasie della glia [Louis, Ohgaki et al. 2007] con un'incidenza di circa 2-3 casi su 100.000 persone. Il GMB fa parte dei tumori astrocitari, e per questo motivo, viene anche chiamato astrocitoma di grado IV. Dal punto di vista clinico, la maggior parte dei glioblastomi si manifesta molto rapidamente de novo in età senile (età media 62 anni), senza una lesione precursore riconoscibile; in questo caso si parla di glioblastoma primario. Circa il 5% di tumori, invece, progredisce da un glioma a basso grado, in età più precoce (età media 45 anni) e mostra un decorso meno rapido; in questo caso si parla di glioblastomi secondari.

Il tumore è caratterizzato da una rapida crescita, alto grado di invasività e resistenza ai trattamenti, ma in genere non tende a metastatizzare al di fuori del cervello [Purow and Schiff, 2009]. Il GBM è caratterizzato da un alto grado di cellularità, proliferazione vascolare, chemoresistenza e aree di necrosi circondate da cellule anaplastiche. I pazienti affetti da tale patologia hanno un'aspettativa di vita di circa 14 mesi a partire dalla diagnosi, nonostante le terapie a disposizione [Ohgaki and Kleihues 2005; Ohgaki and Kleihues 2005; CBTRUS 2010]. Soltanto il 2-5% dei pazienti sopravvive oltre i 3 anni. Nonostante gli entusiasmanti successi riportati in molti ambiti dell'oncologia, la prognosi del GBM non è significativamente cambiata nel corso degli ultimi 30 anni e molti aspetti biologici di queste lesioni neoplastiche sono tutt'ora sconosciuti [Zaidi, Kosztowski et al. 2009]. La terapia standard per i glioblastomi diagnosticati de novo consiste nella resezione della massa tumorale, quando possibile, seguita dal trattamento con una combinazione del farmaco temozolomide (TMZ), un agente alchilante citostatico, unito a radioterapia. In genere, una prognosi migliore è associata ad una più giovane età di esordio, ad un migliore status di performance e ad una più estesa resezione chirurgica seguita da TMZ e radioterapia. A parte il TMZ, l'utilizzo di agenti chemioterapici ha poca efficacia contro i glioblastomi [Bai et al, 2011].

Alcune delle più comuni cause genetiche alla base del glioblastoma sono state scoperte alcuni decenni fa, ma la loro conoscenza non ha portato a grandi miglioramenti nel trattamento del tumore. Inoltre fino a poco tempo fa le scoperte riguardanti la genetica del glioblastoma sono state piuttosto scarse. Solo negli ultimi anni è stata riportata una grande quantità di altre mutazioni genetiche che potrebbero

essere utili sia nella comprensione dei meccanismi tumorigenici, sia nel definire la capacità di risposta dei diversi tumori alle terapie.

Numerosi studi, come il progetto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) hanno permesso di capire come la genetica del glioblastoma sia altamente complessa e come le mutazioni genetiche possano influire sul funzionamento dei diversi pathway molecolari e metabolici della cellula (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Infatti, alcune alterazioni a livello dei geni EGFR e PTEN sono implicate in anomalie dei pathways che regolano la proliferazione cellulare. Il 35-40% dei GBM primari mostrano un profilo genetico caratterizzato dall’amplificazione del gene EGFR (codificante il recettore per EGF) o da una sua attivazione costitutiva a seguito di mutazione [Libermann et al, 1985]; questa alterazione ha come effetto una iper-attivazione del pathway di Ras e della via del fosfatidilinositolo 3-chinasi PI3K-AKT-mTOR [Haas-Kogan, 2005]. Inoltre, mutazioni inattivanti o delezioni del gene PTEN, potente inibitore del pathway di Akt, descritte in un’alta percentuale di glioblastomi (35-40%), portano ad una iper-attivazione di Akt con conseguente aumento della divisione cellulare, migrazione, angiogenesi e resistenza a numerose terapie. Il 35% dei GBM secondari, invece, mostrano mutazioni a carico del gene p53; questo gene viene trovato mutato o deletato in circa il 50% dei tumori nell’uomo. La proteina agisce come fattore di trascrizione nello stimolare l’apoptosi e la senescenza cellulare in seguito ad un danno al DNA ed è quindi implicata nel controllo della progressione del ciclo cellulare.

Accanto a queste “lesioni” geniche ve ne sono altre che sono comuni alle due forme di GBM: in particolare la perdita di eterozigosi a livello del cromosoma 10, ove si suppone la presenza di geni oncosoppressori. Anche il pathway di Rb è spesso alterato nei glioblastomi, come in molti altri tumori; a causa della delezione del gene p16INK4a, implicato nella via di segnale che fa capo al noto oncosoppressore. (Wiedemeyer et al, 2008). Inoltre, mutazioni o delezioni del gene Rb, frequenti in molti tumori, si ritrovano in circa l’11-14% dei glioblastomi [Ichimura et al, 1996].

In linea generale è possibile affermare che sia nei GBM primari che nei secondari sono presenti alterazioni a livello di geni connessi con la regolazione della mitosi, della trasduzione di messaggi proliferativi extracellulari e dell’apoptosi. Queste osservazioni fanno supporre che esista un susseguirsi di danni genetici che vanno accumulandosi prima dell’insorgenza della neoplasia, sebbene non sia ancora stata chiarita la sequenza secondo la quale questi danni avverrebbero.

LA VORO SPERIMENTALE

5. Scopo della tesi

Gli Oncovirus sono virus che inducono il cancro nei loro ospiti naturali o in sistemi sperimentali animali. Le prime scoperte relative ai virus tumorali risalgono solo a poco più di un secolo fa. Diversi studi compiuti sui virus oncogeni a DNA hanno mostrato come essi possano agire sia in maniera diretta sulla cancerogenesi, codificando per uno o più prodotti genici con capacità trasformante che colpiscono le vie di trasmissione del segnalazione relative a RB1, p53, interferone e PI3K-mTOR, sia in maniera indiretta, provocando alterazioni cellulari che predispongono alla cancerogenesi semplicemente attraverso il processo di infezione cronica ed infiammazione. L'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) stima che il 10-15% dei tumori umani possa essere attribuito ad infezioni da parte di oncovirus. Sebbene, ad oggi, solo sette virus tumorali siano ampiamente accettati come causa di tumori umani invasivi, esiste anche un certo numero di virus che ha un ruolo controverso nei tumori umani; nell'ultimo ventennio, infatti, molti ricercatori hanno ipotizzato che una eziologia virale possa avere un ruolo nello sviluppo di numerosi tumori umani.

Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di indagare la presenza di virus oncogeni a DNA, quali JCV, SV40 e HPV, in alcuni tumori mesenchimali, epiteliali e neuroepiteliali umani, per chiarire se essi possano avere un ruolo in questo tipo di neoplasie.

I **polyomavirus JCV ed SV40** condividono una stretta relazione evolutiva con il poliomavirus MCPyV, recentemente scoperto nell'80% dei casi di carcinoma umano a cellule di Merkel ed ascritto alla lista dei virus oncogeni umani a DNA. La regione precoce del loro genoma codifica l'oncoproteina virale T-Ag, principale responsabile della capacità trasformante di questi virus, che esplica la sua funzione legandosi agli oncosoppressori cellulari Rb e p53, ed inattivando le loro funzioni. Evidenze sperimentali dimostrano che i polyomavirus sono agenti virali coinvolti nell'oncogenesi in animali da laboratorio, poiché SV40 induce principalmente mesoteliomi, tumori cerebrali e dell'osso, e JCV principalmente tumori del cervello. Negli ultimi anni è in progressivo aumento il numero di osservazioni scientifiche atte

ad indicare i polyomavirus JC ed SV40 come agenti potenzialmente oncogeni anche nell'uomo e come possibili cause di alcuni tipi di cancro corrispondenti a quelli indotti dai virus nei modelli animali. Sebbene la presenza di sequenze virali di JCV ed SV40 in numerosi campioni tumorali abbia suggerito un ruolo co-carcinogenetico o una peggior prognosi del tumore, il loro ruolo di agenti causali nella neoplasia umana è ancora incerto. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza dei polyomavirus JCV ed SV40 in alcune neoplasie umane ossee quali osteosarcoma, tumore a cellule giganti e condrosarcoma. A tale scopo, mediante saggi di PCR specifici per la regione Large-T, sono stati analizzati campioni di tessuto tumorale fresco congelato o fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) provenienti da pazienti affetti da tali neoplasie.

Gli **HPV** ad alto rischio oncogeno sono considerati a tutti gli effetti virus tumorali umani a DNA; infatti, la loro associazione con i carcinomi della regione ano-genitale è ormai stata accertata. Negli HPV ad alto rischio oncogeno la co-espressione dei geni E6 ed E7 è sufficiente per indurre la trasformazione di cheratinociti e fibroblasti umani [Dürst M. et al. 1987. Pirisi L. et al., 1987]. Recenti studi hanno dimostrato la presenza di HPV anche in neoplasie umane delle vie aeree superiori, del colon-retto e della mammella ma, allo stato attuale, la correlazione tra HPV e questi tumori non è ancora ben definita. Il carcinoma mammario è la principale causa di morte per cancro nelle donne ed è stato associato a diversi fattori di rischio; tuttavia, nel 50-80% dei casi non è possibile individuare nessuno dei fattori di rischio riconosciuti. Ad oggi, numerosi studi hanno dimostrato la presenza del DNA di HPV in tessuti di carcinoma mammario, ottenendo valori di positività estremamente variabili (0%-86%). Uno studio meta-analitico del 2012 ha stimato una prevalenza media dell'infezione da HPV nel carcinoma mammario pari a circa il 23%, ed un rischio di sviluppare un carcinoma mammario 6 volte maggiore in donne HPV positive [Simões PW. et al. 2012]. L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare la prevalenza genotipo-specifica di HPV in campioni di tessuto mammario FFPE provenienti da interventi chirurgici di asportazione di carcinoma mammario e da galattoforectomie; inoltre, sono state analizzate anche le secrezioni mammarie provenienti dagli stessi pazienti operati di galattoforectomia. A tale scopo sono stati messi a punto saggi di PCR per l'amplificazione della regione L1 del genoma virale, saggi di PCR MULTIPLEX per l'amplificazione della regione E6/E7, e saggi di ibridazione in situ cromogenica (CISH) per la localizzazione del genoma virale all'interno del tessuto. I

risultati ottenuti sono stati integrati con i dati clinici, istologici, e con l'espressione di marcatori tumorali quali Ki-67, recettori estrogenici e progestinici, al fine di approfondire il ruolo di HPV con la patologia mammaria.

Il **glioblastoma multiforme (GBM)** è il tumore primitivo del cervello più maligno nell'adulto, con una sopravvivenza media di circa 12 mesi. Negli ultimi anni la ricerca ha permesso di identificare alcune mutazioni genetiche che possono influire sul funzionamento dei diversi pathway molecolari e metabolici della cellula, rappresentando un meccanismo importante nella genesi e nella progressione tumorale del glioblastoma. Sebbene l'iperattivazione di mTOR e la deregolazione dei pathway di pRb e p53 possano essere causati da mutazioni genetiche degli effettori a monte, l'eziologia di questi processi è ancora sconosciuta nel GBM. Ad oggi, non ci sono evidenze che HPV possa infettare il cervello umano; tuttavia, è stato osservato che topi transgenici esprimenti oncoproteine E6 ed E7 sviluppano tumori anaplastici del cervello [Arbeit JM. et al. 1993]; inoltre, HPV 16 è stato trovato in nervi periferici adiacenti a carcinomi orofaringei [Fule T. et al. 2006]; infine, solo di recente, alcuni ricercatori hanno per la prima volta osservato HPV 16 nel cervello umano, proponendone l'associazione con un disordine neurologico [Chen J. et al. 2012]. A questi dati bisogna aggiungere la ben nota capacità trasformante delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV, dovuta alla loro capacità di interagire e degradare i membri della famiglia dei soppressori tumorali p53 e pRb, rispettivamente, e la capacità di E6 di attivare la via del segnale di mTOR a diversi livelli [Lu Z. et al. 2004. Spangle JM. et al. 2010]. Pertanto, considerando queste evidenze, abbiamo voluto ricercare mediante saggi di PCR, CISH e IHC, la presenza di HPV in alcuni campioni di GBM allo scopo di evidenziare un possibile coinvolgimento del papillomavirus in questo tipo di tumore. Infine, abbiamo valutato se la presenza di HPV nel GBM possa associarsi ad una minore aspettativa di vita.

Questo lavoro, volto a chiarire il ruolo che i virus giocano nei tumori umani, ha affrontato molte difficoltà nel trovare un approccio metodologico che potesse fornire risultati adeguati negli studi relativi alla virologia del tumore. A questo bisogna aggiungere l'inevitabile presa di coscienza che l'infezione virale, da sola, generalmente non è sufficiente ad indurre il processo tumorigenico. E' improbabile, infatti, che un virus tumorale sia sufficiente a convertire una cellula normale in una cellula tumorale, ma è piuttosto probabile che la combinazione dell'azione di proteine virali e mutazioni geniche possa fornire impulso alla tumorigenesi. Il problema chiave

è capire come l'infezione virale si inserisca nel quadro più ampio della tumorigenesi. Infatti, poiché la tumorigenesi è un complesso processo composto da più fasi, è ormai evidente che molti eventi molecolari cooperano alla creazione di un fenotipo cellulare trasformato e, tra questi, anche l'infezione virale.

6. Materiali e metodi

6.1. Tumori ossei e polyomavirus SV40 e JCV

Allo scopo di valutare la presenza dei polyomavirus JCV ed SV40 in osteosarcoma (OS), tumore a cellule giganti (TCG) e condrosarcoma (CS), sono stati analizzati campioni di tessuto tumorale fresco congelato o fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) provenienti da pazienti affetti da tali neoplasie. Tutti i campioni sono stati forniti dall' Anatomia patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, che possiede una delle più ampie casistiche di tumori ossei al mondo. I campioni di tessuto tumorale sono stati analizzati mediante saggi di PCR specifici per la regione Large-T. Alcuni prodotti di PCR sono stati clonati e sequenziati per confermarne la positività.

6.1.1. Campioni clinici

Sono stati analizzati campioni di tessuto tumorale provenienti da 20 OS, 20 TCG e 30 CS escissi chirurgicamente da un totale di 70 pazienti. I campioni di tessuto osseo derivavano tutti da tumori primari. Dopo l'escissione, i campioni tissutali sono stati, in parte, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C, ed in parte fissati in formalina ed inclusi in paraffina per consentire la diagnosi ed il grading istologico che sono stati compiuti nel centro d'origine, in accordo con Evans et al [Evans HL. et al., 1977]. I 20 casi di OS ed i 20 di TCG esaminati erano tutti costituiti da campioni freschi congelati. I 30 casi di CS, invece, sono stati esaminati sia come campioni freschi congelati sia come campioni FFPE. Tutti i 70 casi di tumore osseo sono stati analizzati utilizzando saggi di Real-Time PCR per la ricerca del DNA di SV40 e JCV, mentre i 30 casi di CS sono stati analizzati anche tramite PCR Nested per la ricerca del DNA di SV40 e JCV.

I pazienti affetti da OS, avevano un'età alla diagnosi compresa tra i 7 e i 47 anni (età media 19 anni) di cui il 70% di sesso maschile. Tutti i pazienti erano affetti da OS di grado 4 localizzato a livello di tibia (30%), omero (10%) e femore (60%).

I pazienti affetti da TCG, avevano un'età alla diagnosi compresa tra i 23 e i 60 anni (età media 40 anni) di cui il 65% di sesso femminile. Il TCG era localizzato a livello del femore (45%), tibia (30%), omero (10%), radio (5%), avambraccio (5%) e ulna (5%).

Infine, i pazienti affetti da CS avevano, alla diagnosi, un'età compresa tra i 32 e i 73 anni (età media 48 anni) di cui il 67% maschi. Il grading istologico e la localizzazione tumorale sono mostrati in tabella 5.

CS (n=30)			
Male vs. female		22 vs 11	
Median age at diagnosis (years)		48 (32-73)	
Location		Peripheral (n=3)	Central (n=22)
Histology (o Tumor Grade)			
Grade I		3	4
Grade II			14
Grade III			4
Ollier's disease			1
Maffucci's syndrome			1
Dedifferentiated CS	2		
Periosteal (juxtacortical) CS	3		

Tab. 5: Dati dei pazienti con CS, grading istologico e distribuzione dei tipi tumorali.

6.1.2. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dai 70 campioni di tessuto fresco congelato (20 OS, 20 TCG, 30 CS) è stata effettuata utilizzando il DNAzol® Reagent (Life Technologies), in accordo con le istruzioni del produttore. Brevemente, 10-20 mg di tessuto tumorale è stato tagliato in fette sottili che sono state omogenate nella soluzione di DNAZOL. In seguito alla precipitazione dall'omogenato del DNA genomico tramite etanolo e un successivo lavaggio del DNA, il DNA è stato solubilizzato in in100-200µl di 8 mM NaOH. Dopo la solubilizzazione, la soluzione di DNA è stata portata a pH 7,5 mediante aggiunta di HEPES e poi mantenuta a -20°C.

Il DNA è stato estratto anche da 30 campioni di CS FFPE mediante il Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), in accordo con le istruzioni del produttore, con alcune modifiche. Il metodo di estrazione prevede l'utilizzo di cartucce Low Elution Volume (LEV) sullo strumento automatizzato Maxwell®16 configurato con LEV hardware. Lo strumento Maxwell®16 estrae acidi nucleici usando particelle paramagnetiche che ne permettono la cattura, il lavaggio e l'eluizione. E' stata compiuta qualche modifica nel protocollo del pretrattamento del campione nella fase preanalitica, allo scopo di massimizzare la resa di acidi nucleici

da campioni di tessuto osseo FFPE. La maggior modifica apportata ha comportato l'uso di un Bone Incubation Buffer, prodotto da Promega su richiesta della sua clientela. Brevemente, dopo la preparazione della Soluzione di digestione con Proteinasi K (20mg/ml) mediante l'aggiunta di 500 μ l of Bone Incubation Buffer ad ogni flacone di Proteinasi K, per ogni purificazione abbiamo inserito in una provetta 10 sezioni da 5 μ m di spessore del tessuto tumorale FFPE e l'abbiamo ricoperto con 20 μ l della Soluzione di digestione con Proteinasi K e 230 μ l di Incubation Buffer. Il campione è stato posto ad incubare a 56°overnight, e successivamente sono stati aggiunti 500 μ l of Lysis Buffer ad ogni provetta, solo al momento dell'estrazione automatizzata del DNA con lo strumento Maxwell® 16 LEV. Dopo l'estrazione, il DNA è stato eluito in 50 μ L di acqua distillata e mantenuto a -20°C fino al suo utilizzo. Il contenuto di DNA e la sua purezza sono stati quantificati spettrofotometricamente utilizzando il Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Inoltre, per verificare la qualità del DNA estratto dai diversi campioni, è stato amplificato un frammento di 99bps del gene housekeeping per la β -actina (vedi paragrafo 6.1.6).

Tutte le estrazioni sono state effettuate in un laboratorio dedicato. I campioni sono stati manipolati sotto cappa a flusso laminare costantemente irradiata da lampade UV e pulita frequentemente con candeggina, usando pipette dedicate e puntali sterili con filtro. Per monitorare la presenza di eventuali contaminazioni durante l'estrazione, insieme ai campioni è stata effettuata l'estrazione di un bianco.

6.1.3. PCR Real-time (PCR-RT)

Primers e sonde Taqman marcate -ROX, aventi come bersaglio la regione di DNA codificante il TAg di SV40 e JCV, sono stati disegnati usando il software Clone Manager 9 professional edition (Scientific & Educational Software, Cary, NC) sulla base delle rispettive sequenze genomiche di riferimento (NCBI Reference Sequence: NC_001669.1 e NC_001699.1) ; la loro rispettiva specificità per il genoma di SV40 e JCV è stata verificata usando il software BLAST 2.0 per la ricerca delle somiglianze di sequenze nucleotidiche (blastn) nel database di sequenze non ridondanti di GenBank (NCBI, Bethesda, USA). Inoltre, la mancanza di cross-reattività di amplificazione dei primers tra SV40 e JCV, e tra essi ed il polyomavirus BK, è stata confermata mediante opportuni saggi di specificità dell'amplificazione. Le sequenze dei primer oligonucleotidici e delle sonde utilizzate vengono mostrate in Tabella 6.

Primer e sonde sono state sintetizzate da Eurofins MWG operon, Germany. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in 25 μ l di mix di reazione contenente 5 μ l di DNA estratto da campione di tessuto, 0.5 μ l di primers mix 10 μ M (0,2 μ M finale), 1,25 μ l di sonda (0,5 μ M finale), 12,5 μ l di Perfect real-time premix Ex Taq (Takara RR039). La PCR-RT è stata effettuata usando il termociclatore Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Il profilo di amplificazione utilizzato è riportato in Tabella 7. Eventuali contaminazioni sono state monitorate utilizzando in ogni reazione un controllo negativo di amplificazione. Come controlli positivi sono stati usati vettori plasmidici contenenti sequenze di DNA di SV40 e JCV (vedi paragrafo 6.1.5); con questi sono state costruite curve standard per la quantificazione del DNA di SV40 e JCV usando diluizioni scalari in base 10 a concentrazione nota. A questo scopo, il software Rotor-Gene fornisce un grafico su scala logaritmica che correla i cicli (x) con la derivata seconda della fluorescenza (y). Il punto in cui la threshold interseca la curva logaritmica di crescita del segnale fluorescente di ciascuno standard a concentrazione nota, è detto ciclo soglia (Ct). Inoltre il software elabora un secondo grafico, il grafico della curva standard, che correla la quantità nota di bersaglio presente inizialmente nella reazione (x) con il corrispondente valore di Ct. La quantificazione dei bersagli nei campioni incogniti è stata ottenuta per interpolazione del valore di Ct nel grafico della curva standard.

JCV				
Posizione sul genoma	Sequenza primers	Tm in °C	Regione amplificata	Lunghezza amplificato in bps
F 4567	5' GTCACACCCAAACCATTGTC 3'	61	T-Ag	148
R 4714	3' CTGTGCCACTAATCCTTCAG 5'	59		
4606 (probe)	5' GCAATCTATCCACACAAGTGGGCTG 3'	69		
SV40				
Posizione sul genoma	Sequenza primers	Tm in °C	Regione amplificata	Lunghezza amplificato in bps
F 3670	5' TCAGCAGAGCCTGTAGAAC 3'	60	T-Ag	139
R 3808	3' GCCAACAGGCTGTTGATAC 5'	61		
3750 (probe)	5' AGTTAATTGTAGGCTATCAACCCGC 3'	67		

Tab. 6: Primers e sonde utilizzate per i saggi di PCR.

Cycle	Cycle point
Hold @ 95°C, 0 min 30 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 40 secs, acquiring to Cycling A (ROX)

Tab. 7: Profilo di amplificazione utilizzato per il saggio di PCR-RT.

6.1.4. PCR qualitativa e Nested-PCR

Per il saggio di PCR qualitativa e successiva Nested-PCR sono stati utilizzati gli stessi primer usati per la PCR-RT (Tab. 6). Per l'amplificazione è stato usato il kit Go Taq Hot Start Polymerase (PROMEGA, Milano, Italy). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate nel PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH INC, Massachusetts, USA). La PCR qualitativa è stata effettuata in un volume finale di 25µl con 0,2mM di mix dNTP, 3mM di MgCl₂, 0.2 µM di primer mix. La composizione della miscela di reazione e le condizioni di amplificazione sono riportate in Tabella 8 e 9.

REAGENTE	VOLUME	CONC. FINALE
Green GoTaq Flexi Buffer (5X)	5 µl	1X
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	3 mM
Primer Mix (10 µM)	0,5 µl	0.2 µM
GoTaq Hot Start Pol (5 U/µl)	0,125 µl	0,625 Unità
H ₂ O	10,875 µl	
Campione	5 µl	

Tab. 8.: Composizione della miscela di reazione della PCR qualitativa

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione Polimerasi	94°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	40
Appaiamento	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	60 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1

Tab. 9.: Condizioni di amplificazione della PCR qualitativa

Per la PCR-Nested è stato utilizzato come template un microlitro del volume di reazione della prima PCR. La PCR-Nested è stata eseguita abbassando la concentrazione finale del MgCl₂ a 2mM e riducendo a 30 i cicli di amplificazione. Come controllo positivo sono stati usati vettori plasmidici contenenti sequenze di DNA di SV40 e JCV. Gli amplificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% in TAE 1X contenete Gel Red (Biotium) e visualizzati mediante VersaDoc Model 1000 Imaging System (Bio-Rad, Milano, Italy).

6.1.5. Controlli positivi plasmidici per i saggi di PCR

Come controllo positivo nelle reazioni di amplificazione del DNA di JCV e per la costruzione della curva di sensibilità, è stato usato il plasmide pJCV ATCC, al cui interno è contenuta tutta la sequenza del genoma del virus (ATCC 45027; ATCC, Milano, Italy). La mancanza di cross reattività dei primer per JCV ed SV40 nei confronti del polyomavirus BK è stata confermata usando un plasmide contenente l'intera sequenza del DNA di BKV (ATCC 45025; ATCC, Milano, Italy).

Come controllo positivo per le reazioni di amplificazione del DNA di SV40 e per la costruzione della curva di sensibilità, è stato usato un plasmide in cui è stata appositamente clonata una sequenze di DNA di SV40. Brevemente, la sequenza clonata corrisponde ad una porzione della regione genomica codificante il TAg di SV40 contenuto nel genoma delle cellule COS-7 ATCC (linea cellulare costituita da cellule di rene di scimmia immortalizzate mediante trasformazione con un mutante di SV40, defettivo dell'origine di replicazione). Dopo l'estrazione del DNA cellulare, la regione di interesse è stata amplificata utilizzando la Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen®) ed il profilo di amplificazione riportato in tabella 10 ed utilizzando primer le cui sequenze sono mostrate in tabella 11.

Step	Temperatura	Tempo	n° cicli
Attivazione polimerasi	94°C	2 minuti	1
Denaturazione	94°C	30 secondi	36
Annealing	60°C	30 secondi	
Estensione e acquisizione	68°C	30 secondi	
Elongazione	72°C	5 minuti	
Cooling	10°C	Forever	1

Tab. 10: Profilo di amplificazione utilizzato per la clonazione.

SV40				
Posizione sul genoma	Sequenza primers	Tm in °C	Regione amplificata	Lunghezza amplificato in bps
FSV403620c	5' TGGGCAACAAACAGTGTAGC 3'	63	T-Ag	271
RSV403860c	3' CAGCCCAGCCACTATAAGTACC 5'	64		

Tab. 11: Sequenze dei primer usati per la clonazione.

Successivamente, l'amplificato è stato clonato nel vettore TA cloning pCR2.1 usando il TA Cloning® Kit Dual Promoter with OneShot® TOP10F' Chemically Competent E. coli (Invitrogen®), secondo le indicazioni del produttore. Il ceppo di E. coli TOP10F' è stato quindi utilizzato come cellula ricevente per il plasmide ricombinante. L'identità del frammento clonato è stata confermata mediante purificazione del plasmide con Zippy plasmid MiniPrep kit (Zymo Research), taglio con l'enzima di restrizione ECORI. e gel elettroforetico al 2% in TAE 1X.

Lo stesso protocollo di clonazione appena descritto è stato utilizzato per clonare alcuni prodotti di PCR di campioni risultati positivi all'amplificazione del DNA virale. Brevemente, gli amplificati sono stati purificati mediante Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI) e, una volta clonati, si è proceduto con il sequenziamento dei cloni di DNA con primer universali M13 Forward ed M13 Reverse (<http://www.primm.it>). Le sequenze sono state utilizzate per interrogare le

banche dati nucleotidiche per verificarne l'omologia con le sequenze di riferimento utilizzando l'algoritmo Blast.

6.1.6. Amplificazione del housekeeping per la β -actina (ACTB)

Per verificare la qualità del DNA estratto dai diversi campioni è stato amplificato un frammento di 99bps del gene housekeeping per la β -actina (ACTB) utilizzando i primer riportati in Tabella 24 [Godfrey et al, 2000].

PRIMER	SEQUENZA (3'-5')
F ACTB 1456	CCCACTGTGCCCATCTACG
R ACTB 1358	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG

Tabella 24: Primer per l'amplificazione del gene housekeeping ACTB

La PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 μ l. La miscela di reazione e le condizioni di amplificazione utilizzate corrispondono a quelle riportate in Tabella 8 e 9 rispettivamente. L'amplificato è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2,5% in TAE 1X contenente Gel Red, mediante VersaDoc Model 1000 Imaging System (Bio-Rad).

Come controllo positivo della reazione è stato usato DNA genomico umano (BIOLINE, Luckenwalde, Germany).

6.2. Carcinoma mammario e HPV

Allo scopo di valutare la presenza di HPV nel carcinoma della mammella, sono stati analizzati campioni di tessuto mammario FFPE provenienti da interventi chirurgici di asportazione di carcinoma mammario e da galattoforectomie; inoltre, sono state analizzate le secrezioni mammarie provenienti dagli stessi pazienti operati di galattoforectomia. I campioni biotici FFPE, sono stati forniti dalla sezione di Anatomia e Istopatologia Patologica del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna; le secrezioni mammarie sono state fornite dal reparto di Chirurgia Generale Taffurelli della stessa struttura.

I campioni di carcinoma mammario sono stati analizzati con 2 diversi saggi di PCR: nel primo, specifico per la regione L1 del genoma virale, sono stati utilizzati primer

consenso MY09/MY11 [Manos MM. et al., 1989] e GP5+/GP6+ [de Roda Husman AM. et al. 1995] capaci di amplificare un ampio spettro di genotipi mucosali di HPV, mentre nel secondo, specifico per la regione E6/E7, sono stati utilizzati primer per l'amplificazione di 5 genotipi di HPV ad alto rischio. Questa strategia è stata adottata per individuare il maggior numero di casi HPV positivi senza perdere troppo in termini di sensibilità. Alcuni casi di carcinoma mammario sono stati inoltre analizzati tramite ibridazione in situ cromogenica (CISH) per localizzare il genoma virale all'interno del tessuto. Poiché la PCR MY/GP sui campioni di carcinoma mammario non mostrava una soddisfacente capacità di amplificazione se confrontata con i dati di positività ottenuti con il saggio di PCR sulla regione E6/E7, si è deciso di analizzare i campioni di galattoforectomie esclusivamente con la PCR per la regione E6/E7, allestendo delle PCR MULTIPLEX che permettessero la determinazione di 16 diversi genotipi virali. Anche per i campioni di secrezione mammaria, raccolti su carta di Guthrie, il DNA di HPV è stato ricercato utilizzando la PCR MULTIPLEX per la regione E6/E7. Alcuni prodotti di PCR sono stati clonati e sequenziati per confermarne la positività.

6.2.1. Campioni clinici

Sono stati analizzati 168 campioni bioptici di carcinoma mammario, 30 campioni bioptici di galattoforectomie e 30 campioni di secreto mammario. I pazienti con carcinoma mammario avevano alla diagnosi un'età compresa tra i 29 e i 92 anni (età media 63 anni) ed erano affetti da carcinoma duttale infiltrante (CDI) nel 85% dei casi e da carcinoma lobulare infiltrante (CLI) nel 15% dei casi. Il 44% dei pazienti presentava interessamento linfonodale, con numero medio di linfonodi interessati pari ad 8 (min 1, max 45). Il 16% dei pazienti aveva mutazioni a livello del gene p53, mentre il valore medio di ki-67, marker della proliferazione cellulare, era di 24 (min 0,4, max 99). 82% dei pazienti erano positivi alla presenza dei recettori sia estrogenici che progestinici, mentre i positivi ad un solo recettore erano il 7%. 89% dei pazienti erano negativi ad Her2.

Galattoforectomie e secreti mammari provenivano dagli stessi pazienti con età compresa tra i 36 e gli 81 anni (età media 60 anni). L'esame istologico delle galattoforectomie mostrava papilloma intraduttale nel 29,6% dei casi, mastite cronica nel 29,6%, carcinoma duttale infiltrante (CDI) nel 18,5%, carcinoma duttale in situ (CDIS) nel 14,8%, ectasia duttale nel 3,7% ed iperplasia duttale. nel 3,7%.

Il 44% delle secrezioni mammarie erano sierose, il 28% siero-ematiche e il 28% ematiche. Tutti i secreti presentavano citologia positiva, pari o superiore a C3.

6.2.2. Linee cellulari.

Linee di cellule Caski (ATCC CRL 1550), SiHa (ATCC HTB35), HeLa (ATCC CCL2) ed MCF-7 (ATCC® HTB-22™) sono state utilizzate in questo studio. Le cellule SiHa contengono 1-2- copie di HPV 16 integrato a livello del cromosoma 13q21-31, le cellule Hela contengono 10-50 copie di HPV 18 integrato in 5 siti cromosomici, mentre le cellule Caski contengono 60-600 copie di HPV 16 integrato in siti multipli [John D. Meissner. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology* (1999), 80, 1725–1733]. Caski, SiHa, ed HeLa sono tutte linee cellulari provenienti da carcinoma della cervice uterina. MCF-7 invece è una linea cellulare di carcinoma mammario che non contiene il genoma di HPV. Tutte le linee cellulari sono state utilizzare per ottenere dei citoinclusi (vd. paragrafo 6.2.3) da utilizzare come controlli per i saggi di ISH. Il DNA delle cellule Caski è stato estratto ed usato come controllo positivo nelle reazioni di PCR Nested MY/GP.

6.2.3. Citoinclusi di linee cellulari.

Le cellule sono state prelevate dalle fiasche di coltura e centrifugate per 10 minuti a 1500 RPM. Una volta eliminato il surnatante le cellule sono state risospese e lasciate a fissare in formalina 10% neutra tamponata per 20' a temperatura ambiente. La formalina è stata poi eliminata mediante centrifugazione per 10 minuti a 2500 RPM. Il pellet è stato addizionato con alcune gocce di Bio-Agar (BIO-OPTICA, Milano, Italy), vortexato immediatamente e posto -20°C per 3 minuti. 1 mL di formalina 10% neutra tamponata è stato aggiunto al citoincluso, che è stato così conservato a 4°C fino al momento dell'inclusione in paraffina. Dai blocchetti ottenuti sono state tagliate fettine dello spessore di 4µm che sono state montate su vetrini portaoggetto a carica positiva. I vetrini sono stati mantenuti a -20°C fino al momento dell'uso.

6.2.4. Estrazione del DNA

I campioni di secreto mammario, in parte sono stati utilizzati per l'esame citologico, ed in parte sono stati raccolti su carta di Guthrie (WHATMAN, Milano, Italy) da cui

si sono stati tagliati dischetti di circa 3 mm di diametro in numero proporzionale all'entità del volume di secreto raccolto (1-5). Il DNA è stato estratto utilizzando il QIAamp® DNA micro kit (QIAGEN GMBH, Germany), secondo le indicazioni del produttore. I campioni sono stati eluiti in 35 µl di acqua e mantenuti a -20°C fino al loro utilizzo. Per valutare l'efficacia di questo sistema di raccolta sono state dispensate sulla carta Guthrie diluizioni scalari di cellule Caski.

Da ogni campioni FFPE di carcinoma mammario e galattoforectomia sono state tagliate 3 sezioni di 10 µm di spessore, utilizzate per estrarre il DNA attraverso il Nucleospin-DNA Isolation kit from FFPE Samples (MACHEREY- NAGEL, Milano, Italy), secondo le indicazioni del produttore. Il DNA estratto è stato eluito in 35 µl di acqua. Per rimuovere gli eventuali residui di etanolo dai campioni, essi sono stati incubati a 75°C per 12 minuti. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

Per verificare la qualità del DNA estratto dai diversi campioni è stato amplificato un frammento di 99bps del gene housekeeping per la β-actina (vedi paragrafo 6.1.6).

Tutte le estrazioni sono state effettuate in un laboratorio dedicato. I campioni sono stati manipolati sotto cappa a flusso laminare costantemente irradiata da lampade UV e pulita frequentemente con candeggina, usando pipette dedicate e puntali sterili con filtro. Per monitorare la presenza di eventuali contaminazioni durante l'estrazione, insieme ai campioni è stata effettuata l'estrazione di un bianco.

6.2.5. Tecniche di PCR per la ricerca del genoma virale

I primers per la regione E6/E7 di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 e 73 sono stati disegnati usando il software Clone Manager 9 professional edition (Scientific & Educational Software, Cary, NC) sulla base delle sequenze genomiche di riferimento dei relativi genotipi di HPV depositate in GenBank; la loro rispettiva specificità è stata verificata usando il software BLAST 2.0 per la ricerca delle somiglianze di sequenze nucleotidiche (blastn) nel database di sequenze non ridondanti di GenBank (NCBI, Bethesda, USA). I primers consenso MY09/MY11 e GP5+/GP6+ sono set di primer comunemente usati per l'identificazione del DNA di HPV in campioni clinici cervicali. Tutti i primers sono stati sintetizzati da Eurofins MWG operon, Germany. Per l'amplificazione è stato usato il kit Go Taq Hot Start Polymerase (PROMEGA, Milano, Italy). Le reazioni di amplificazione sono state

effettuate nel PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH INC, Massachusetts, USA). Gli amplificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% in TAE 1X contenete Gel Red (Biotium) e visualizzati mediante VersaDoc Model 1000 Imaging System (Bio-Rad, Milano, Italy).

✓ PCR NESTED MY-GP:

Nei campioni di carcinoma mammario, il DNA di HPV è stato ricercato mediante l'utilizzo della PCR Nested MY-GP attraverso l'uso di primer specifici per la regione L1 del genoma virale.

In particolare, i primer consenso MY09/MY11 (Tab. 12) consentono di amplificare un frammento di 450 bps di 28 genotipi di HPV mucosi: HPV-5, 6, 8, 11, 16, 18, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58 e 59.

PRIMER	SEQUENZA (3'-5')
MY 11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
MY 09	CGTCCMARRGGAWACTGATC

Tab. 12: I primer degenerati MY09/MY11 consentono l'amplificazione di un frammento di 450 bps all'interno della regione L1 del genoma virale

(**R**: A o G **Y**: C o T **M**: A o C **W**: A o T)

La PCR qualitativa con i primer consenso MY09/MY11 è stata effettuata in un volume finale di 25µl. La composizione della miscela di reazione è riportata in Tabella 8. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono mostrate in Tabella 13.

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione GoTaq	94°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	35
Appaiamento	55°C	30 sec	
Estensione	72°C	60 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1

Tab. 13: Condizioni di amplificazione della PCR qualitativa MY09/MY11.

La coppia di primer GP5+/GP6+ (Tab. 14) è in grado di amplificare un frammento di 140 bps interno a quello ottenuto con i primer MY09/MY11.

PRIMER	SEQUENZA (3'-5')
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC

Tab. 14: I primer GP5+/GP6+ consentono l'amplificazione di un frammento di 140 bps interno a quello ottenuto con il pool MY09/MY11.

La PCR Nested con i primer GP5+/GP6+ è stata effettuata in un volume finale di 25µl, utilizzando come template un microlitro del volume di reazione della prima PCR ed abbassando la concentrazione finale del MgCl₂ a 2mM. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono mostrate in Tabella 15.

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione GoTaq	94°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	30
Appaiamento	45°C	30 sec	
Estensione	72°C	60 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1

Tab. 15: Condizioni di amplificazione della PCR Nested GP5+/GP6+.

Come controllo positivo di reazione è stato usato DNA estratto da cellule CasKi.

✓ PCR MULTIPLEX

Nei campioni di carcinoma mammario, galattoforectomie e secreti mammari, il DNA di HPV è stato ricercato mediante l'utilizzo di saggi di PCR MULTIPLEX, utilizzando pool di primer specifici per la regione E6/E7 del genoma virale.

Come controlli positivi di reazione sono stati usati mix di plasmidi e campioni clinici di riferimento (Vedi Paragrafo 6.2.7.)

I. GALATTOFORECTOMIE

Sui campioni di galattoforectomia sono state eseguite 4 PCR MULTIPLEX, seguite da 4 PCR NESTED MULTIPLEX. Ogni PCR MULTIPLEX ed ogni PCR NESTED MULTIPLEX è stata allestita utilizzando un pool di 4 coppie di primer per la regione E6/E7 che, pertanto, consentono l'amplificazione di 4 differenti genotipi virali, per un totale di 16 genotipi (di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 e 73). I diversi pool di primer sono stati opportunamente assemblati affinché i prodotti della loro amplificazione avessero lunghezze differenti, tali da poter discriminare un genotipo virale dall'altro (Tab. 16 e Tab. 19).

Pool	Genotipi	Primer	Sequenza (3' - 5')	Lunghezza amplificato
1	16	HPV-16: F 206	CAACAGTTACTGCGACGTGAG	349 bps
		HPV-16: R 554	GCTGGGTTTCTCTACGTGTTT	
	31	HVP-31: F 428	AAGACCGTTGTGTCCAGAAG	257 bps
		HPV-31: R 684	GCTGGACTGTCTATGACATC	
	35	HPV-35: F 486	ATAACATCGGTGGACGGTGGAC AG	144 bps
		HPV-35: R 629	TATAGGTCAGTTGCCTCGGGTTC	
	56	HPV-56: F 357	GTGTATGGAGCTACACTAGA	488 bps
		HPV-56: R 844	CATAAGCAGCTGTTGTACAA	
2	18	HPV-18: F 156	TGCACGGAAGTGAACACTTCAC	346 bps
		HPV-18: R 501	GCCCAGCTATGTTGTGAAATCG	
	39	HVP-39: F 347	TACTCGGACTCGGTGTATGC	513 bps
		HPV-39: R 859	GTAGTTGTTCGAGAGTATCC	
	45	HPV-45: F 418	TGCGGTGCCAGAAACCATTG	149 bps
		HPV-45: R 566	TTCCCTACGTCTGCGAAGTC	
	59	HPV-59: F 223	AGAGACTGTACACCGTATGC	433 bps
		HPV-59: R 655	ATTCTCGGAGTCGGAGTCAG	
3	33	HPV-33: F 487	AATATTTTCGGGTCGTTGGGC	108 bps
		HPV-33: R 594	ACGTTGGCTTGTGTCCTCTC	
	51	HVP-51: F 472	CATGAAATAGCGGGACGTTGG	239 bps
		HPV-51: R 710	CAGCCCGTCTTTCTGGTAGC	
	52	HPV-52: F 89	CTAACGCACGGCCATGTTTG	471 basi

	58	HPV-52: R 559	CACGCATGACGTTACACTTGG	163 bps
		HPV-58: F 569	ACGCCATGAGAGGAAACAACC	
		HPV-58: R 731	TAATTAGCTGTGGCCGGTTG	
4	53	HPV-53: F 280	ACGGGTATCCGTATGGAGTG	364 bps
		HPV-53: R 643	GCATTGCAGGTCAATCTCAG	
	66	HVP-66: F 689	ATAGACCATTTGCTGGAGCG	99 bps
		HPV-66: R 787	CACCACCAACTCACACTTAC	
	68	HPV-68: F 45	AGACCTGTGCAGGACATTGG	457 bps
		HPV-68: R 501	GGGCTTTGGTCCATGCATAG	
	73	HPV-73: F 661	ACAGACAGCCATCTAGACAG	235 bps
		HPV-73: R 895	TAAACCATCCCGTACACCTC	

Tab. 16: I 4 pool di primer (e le relative sequenze) utilizzati per la PCR MULTIPLEX.

Ciascuna reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μ l. La composizione della miscela di reazione è riportata in Tabella 18. Le condizioni di amplificazione sono riportate in Tabella 9.

REAGENTE	VOLUME	CONC. FINALE
Green GoTaq Flexi Buffer (5X)	5 μ l	1X
dNTP mix (10 mM)	0,5 μ l	0.2 mM
MgCl (25 mM)	3 μ l	3 mM
<i>Primer Mix Pool (2,5 μM)</i>	0,5 μ l	<i>0.05 μM</i>
GoTaq Hot Start Pol (5 U/ μ l)	0,125 μ l	0,625 Unità
H ₂ O	10,875 μ l	
Campione	5 μ l	

Tab. 18: Composizione della miscela di reazione della PCR MULTIPLEX

I prodotti ottenuti dalla PCR MULTIPLEX sono stati amplificati attraverso PCR NESTED MULTIPLEX.

Pool	Genotipi	Primer	Sequenza (3' - 5')	Lunghezza amplificato
1NM	16	HPV-16: F 424	AAAGCCACTGTGTCCTGAAGA	130 basi

	31	HPV-16: R 553	CTGGGTTTCTCTACGTGTTCT	185 basi
		HVP-31: F 500	GTGGACAGGACGTTGCATAG	
		HPV-31: R 684	GCTGGACTGTCTATGACATC	
	35	HPV-35: F 537	CACGTAGAGAAACCGAGGTGTA ATC	93 basi
		HPV-35: R 629	TATAGGTCAGTTGCCTCGGGTTC	
	56	HPV-56: F 522	GGGTGCTGGAGACAAACATC	306 basi
HPV-56: R 827		CAACACGCAGGTCCTCTTTG		
2NM	18	HPV-18: F 424	GGTGCCAGAAACCGTTGAATC	78 basi
		HPV-18: R 501	GCCCAGCTATGTTGTGAAATCG	
	39	HVP-39: F 744	ACTACTAGCCAGACGGGATG	116 basi
		HPV-39: R 859	GTAGTTGTTCGACAGAGTATCC	
	45	HPV-45: F 418	TGCGGTGCCAGAAACCATTG	149 basi
		HPV-45: R 566	TTCCCTACGTCTGCGAAGTC	
	59	HPV-59: F 223	AGAGACTGTACACCGTATGC	433 basi
		HPV-59: R 655	ATTCTCGGAGTCGGAGTCAG	
3NM	33	HPV-33: F 487	AATATTTCCGGTTCGTTGGGC	108 basi
		HPV-33: R 594	ACGTTGGCTTGTGTCTCTC	
	51	HVP-51: F 472	CATGAAATAGCGGGACGTTGG	239 basi
		HPV-51: R 710	CAGCCCGTCTTTCTGGTAGC	
	52	HPV-52: F 89	CTAACGCACGGCCATGTTTG	471 basi
		HPV-52: R 559	CACGCATGACGTTACACTTGG	
58	HPV-58: F 569	ACGCCATGAGAGGAAACAACC	163 basi	
	HPV-58: R 731	TAATTAGCTGTGGCCGGTTG		
4NM	53	HPV-53: F 280	ACGGGTATCCGTATGGAGTG	364 basi
		HPV-53: R 643	GCATTGCAGGTCAATCTCAG	
	66	HVP-66: F 689	ATAGACCATTTGCTGGAGCG	99 basi
		HPV-66: R 787	CACCACCAACTCACACTTAC	
	68	HPV-68: F 45	AGACCTGTGCAGGACATTGG	457 basi
		HPV-68: R 501	GGGCTTTGGTCCATGCATAG	
73	HPV-73: F 661	ACAGACAGCCATCTAGACAG	235 basi	
	HPV-73: R 895	TAAACCATCCCGTACACCTC		

Tab. 19: I 4 pool di primer (e le relative sequenze) utilizzati per la PCR NESTED MULTIPLEX di campioni di galattoforectomie.

Ciascuna reazione è avvenuta in un volume finale di 25 µl, utilizzando come template un microlitro del volume di reazione della prima amplificazione. La composizione della miscela di reazione è riportata in Tabella 20. Le condizioni di amplificazione sono riportate in Tabella 21.

REAGENTE	VOLUME	CONC. FINALE
Green GoTaq Flexi Buffer (5X)	5 µl	1X
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl	0.2 Mm
MgCl (25 mM)	2 µl	2 mM
<i>Primer Mix Pool NM (5 µM)</i>	0,5 µl	<i>0.1 µM</i>
GoTaq Hot Start Pol (5 U/µl)	0,125 µl	0,625 Unità
H ₂ O	15,875 µl	
Amplificato della prima reazione	1 µl	

Tab. 20: Composizione della miscela di reazione della PCR NESTED MULTIPLEX

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione GoTaq	94°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 sec	30
Appaiamento	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1

Tab. 21: Condizioni di amplificazione della PCR NESTED MULTIPLEX.

II. CARCINOMA MAMMARIO:

Sui campioni di carcinoma mammario sono state eseguite 2 PCR MULTIPLEX, seguite da 4 PCR NESTED GENOTIPO SPECIFICHE, tutte con primer per la regione E6/E7. Una PCR MULTIPLEX è stata allestita utilizzando un pool composto da 2 coppie di primer, mentre l'altra PCR MULTIPLEX un pool composto da 3 coppie di primer; pertanto la PCR MULTIPLEX consente l'amplificazione complessiva di 5 differenti genotipi virali (HPV 16, 18, 31, 33, 35). I diversi pool di

primer sono stati opportunamente assemblati affinché i prodotti della loro amplificazione avessero lunghezze differenti, tali da poter discriminare un genotipo virale dall'altro (Tab. 22).

Pool	Genotipi	Primer	Sequenza (3' - 5')	Lunghezza amplificato
1 BC	18	HPV-18: F 156	TGCACGGA ACTGAACACTTCAC	346 basi
		HPV-18: R 501	GCCCAGCTATGTTGTGAAATCG	
	33	HVP-33: F 487	AATATTTTCGGGTCGTTGGGC	108 basi
		HPV-33: R 594	ACGTTGGCTTGTGTCCTCTC	
2 BC	16	HPV-16: F 206	CAACAGT TACTGCGACGTGAG	349 basi
		HPV-16: R 554	GCTGGGTTTCTCTACGTGTC	
	31	HVP-31: F 428	AAGACCGTTGTGTCCAGAAG	257 basi
		HPV-31: R 684	GCTGGACTGTCTATGACATC	
	35	HPV-35: F 486	ATAACATCGGTGGACGGTGGACA G	144 basi
		HPV-35: R 629	TATAGGTCAGTTGCCTCGGGTTC	

Tab. 22: I 2 pool di primer (e le relative sequenze) utilizzati per la PCR MULTIPLEX di campioni di carcinoma mammario.

Ciascuna reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl. La composizione della miscela di reazione corrisponde a quella riportata in Tabella 18, ad eccezione delle concentrazioni delle Mix di Primer che, in questo caso, sono state utilizzate allo 0,1 µM finale per il pool 1BC e 0,66 µM finale per il pool 2BC. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono quelle riportate in Tabella 9.

Un microlitro dei prodotti di amplificazione ottenuti dalla PCR MULTIPLEX sono stati utilizzati per una ulteriore amplificazione attraverso PCR NESTED GENOTIPO SPECIFICHE, utilizzando primer specifici per i genotipi di HPV 18, 16, 31 e 35 (Tab. 23).

Genotipi	Primer	Sequenza (3' - 5')	Lunghezza amplificato
18	HPV-18: F 424	GGTGCCAGAAACCGTTGAATC	78 basi
	HPV-18: R 501	GCCCAGCTATGTTGTGAAATCG	
16	HPV -16: F 424	AAAGCCACTGTGTCCTGAAGA	130 basi
	HPV-16: R 553	CTGGGTTTCTCTACGTGTTCT	
31	HVP-31: F 500	GTGGACAGGACGTTGCATAG	185 basi
	HPV-31: R 684	GCTGGACTGTCTATGACATC	
35	HPV-35: F 508	AGGTCGGTGTATGTCCTGTTG	122 basi
	HPV-35: R 629	TATAGGTCAGTTGCCTCGGGTTC	

Tab. 23: Le 4 coppie di primer (e le relative sequenze) utilizzate per la PCR NESTED GENOTIPO SPECIFICA di campioni di carcinoma mammario.

Ciascuna reazione è avvenuta in un volume finale di 25 µl. La composizione della miscela di reazione corrisponde a quella riportata in Tabella 8, ad eccezione del MgCl₂ che è stato usato ad una concentrazione finale di 2mM. Le condizioni di amplificazione utilizzate corrispondono a quelle riportate in Tabella 21.

III. SECRETI MAMMARI

Sui campioni di galattoforectomia sono state eseguite 4 PCR MULTIPLEX. Ogni PCR MULTIPLEX è stata allestita utilizzando un pool composto da 4 coppie di primer per la regione E6/E7 che, pertanto, consentono l'amplificazione di 4 differenti genotipi virali, per un totale di 16 genotipi (di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 e 73) (Tab. 16).

Ciascuna reazione è avvenuta in un volume finale di 25 µl. La composizione della miscela di reazione corrisponde a quella riportata in Tabella 18, mentre le condizioni di amplificazione corrispondono a quelle riportate in Tabella 9, ad eccezione dei cicli di amplificazione utilizzati che, in questo caso, sono stati 56.

6.2.6. Ibridazione in situ cromogenica (CISH)

Campioni di carcinoma mammario FFPE sono stati analizzati mediante ibridazione in situ cromogenica (CISH) per rivelare la presenza di sequenze specifiche di vari genotipi di HPV in cellule e tessuti morfologicamente conservati attraverso l'impiego di un pool di sonde marcate con digossigenina. A questo proposito è stato utilizzato il pool di sonde Zyto Fast HPV High Risk (HR) che riconosce i genotipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 82 (ZYTO VISION, Milano, Italy). Il protocollo della CISH è stato messo a punto in house, utilizzando anticorpo primario e secondario del kit Zyto Fast Plus CISH Implementation kit HRP-DAB (ZYTOVISION). Come controllo negativo della tecnica si è provveduto ad omettere la sonda; come controlli negativi della specificità dell'anticorpo sono stati usati citoinclusi di cellule MCF7; come controlli positivi della specificità e della sensibilità della metodica sono stati usati citoinclusi di Caski, Hela e Siha. Per il protocollo di citoinclusione si rimanda al paragrafo 6.1.7.

Brevemente, la reazione di CISH prevede il legame della sonda marcata con digossigenina al DNA, la quale, viene a sua volta riconosciuta dall' anticorpo primario di topo anti digossigenina; quest'ultimo, viene legato dall' anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) che catalizza la conversione del substrato cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), formando un precipitato di colore marrone in corrispondenza del sito di legame della sonda con il suo DNA bersaglio.

Il protocollo dettagliato è il seguente:

- Rimozione della paraffina da fettine dello spessore di 4 µm:

Incubare i vetrini a 70°C per 10' su piastra riscaldata per ammorbidire la paraffina.

Rimozione della paraffina con 2 lavaggi di 5' in xilene.

- Reidratazione:

2 lavaggi di 5' in etanolo 100% seguiti da 3 lavaggi di 1' in etanolo 96%. Poi 3 lavaggi di 1' ed 1 di 5' in acqua distillata.

- Pretrattamenti:

Smacheramento antigenico:

Incubare i vetrini 30' a 95°C in Sodio Citrato 10 mM pH6 in microonde. Lasciare raffreddare per 20 minuti. 3 lavaggi di 1' ed 1 di 10' in acqua distillata.

Digestione proteolitica:

Incubare i vetrini 15 minuti a temperatura ambiente in soluzione di Pepsina DAKO 0,01% in HCl 0,2 N. 3 lavaggi di 1' ed 1 di 5' in acqua distillata.

- Blocco delle perossidasi:

Incubare i vetrini per 25 minuti a temperatura ambiente in soluzione di H₂O₂ 0,3% in metanolo. 3 lavaggi di 1' ed 1 di 10' in acqua distillata

- Denaturazione e ibridazione:

Addizionare la sonda ed incubare i vetrini a 75°C per 5' su piastra riscaldata.

Incubare 1h a 37°C.

- Post-ibridazione e rivelazione:

Lavare i vetrini per 5' in TBST (Tris Buffer Salino, 0,05% Tween 20).

Lavare i vetrini per 5' a 55°C in TBST.

Addizionare l' anticorpo primario (mouse anti-DIG) ed incubare per 30' a 37°C.

3 lavaggi di 1' in TBST.

Addizionare l' anticorpo secondario (anti mouse HRP) ed incubare per 30' a 37°C.

3 lavaggi di 1' in TBST.

Addizionare il substrato DAB ed incubare per 10' a temperatura ambiente.

Lavare i vetrini con acqua di fonte per 2'.

Incubare 5' a temperatura ambiente con ematossilina (colorazione di contrasto)

- Deidratazione e montaggio:

Lavaggi sequenziali utilizzando la scala degli alcool: 1 lavaggio di 2' in etanolo 70%, 1 lavaggio di 2' in etanolo 85%, 1 lavaggio di 2' in etanolo 95%, 2 lavaggi di 2' in etanolo 100%. Infine 2 lavaggio di 2' in xilene.

Dopo montaggio alcolico del vetrino coprioggetto, i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Eclipse E400 (NIKON, Japan).

6.2.7. Controlli positivi per i saggi di PCR

Come controlli positivi per i saggi di PCR sono stati utilizzati plasmidi e campioni clinici di riferimento.

I plasmidi contenenti sequenze parziali dei geni E6/E7 di HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 sono stati costruiti in laboratorio utilizzando il TA Cloning® Kit Dual Promoter with OneShot® TOP10F' Chemically Competent E. coli (Invitrogen®). Per l'amplificazione del DNA da clonare è stata usata la Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen®) ed il profilo di amplificazione riportato in Tabella 10. L' amplificato è stato clonato nel vettore TA cloning pCR2.1, secondo le indicazioni

del produttore, ed il ceppo di E. coli TOP10F' è stato poi utilizzato come cellula ricevente per il plasmide ricombinante. L'identità del frammento clonato è stata confermata mediante purificazione del plasmide con Zippy plasmid MiniPrep kit (Zymo Research)., taglio con l'enzima di restrizione ECORI. e gel elettroforetico al 2% in TAE 1X.

Un plasmide contenente sequenze parziali della regione E6/E7 di HPV 53, 66, 68 e 73 è stato opportunamente disegnato ed acquistato da GeneArt® Gene Synthesis (Invitrogen®).

I campioni clinici di riferimento erano campioni citologici precedentemente analizzati con altre tecniche diagnostiche molecolari (Inno-Lipa, Hibrid Capture II e Spettrometria di massa su piattaforma SEQUENOM MASS ARRAY (California, USA)), e risultati positivi ai genotipi di interesse.

6.3. Glioblastoma multiforme e HPV

6.3.1. Campioni clinici

Allo scopo di valutare la presenza di HPV in tumori neuroepiteliali, sono stati analizzati 59 casi di glioblastoma multiforme (GBM) provenienti dalla Sezione di Patologia dell'Università di Bologna, dall'Ospedale Bellaria (Bologna) e dalla Sezione di Patologia dell'Ospedale Bufalini (Cesena) in collaborazione con il Dott. Giuseppe Gasparre della Genetica Medica del Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Ospedale S.Orsola, nell'ambito del progetto PERNO (Progetto Emiliano-Romagnolo di Neuro-Oncologia). I pazienti non sono stati sottoposti ad alcuna terapia neoadiuvante prima dell'operazione chirurgica. I campioni sono stati congelati immediatamente e la diagnosi di glioma ad alto grado è stata effettuata su una sezione di tessuto. Tutti i campioni di GBM sono stati analizzati utilizzando i primer consenso MY09/MY11 e GP5+/GP6+ , specifico per la regione L1 del genoma virale, capaci di amplificare un ampio spettro di genotipi mucosali di HPV. A causa della ridotta disponibilità tissutale, solo 8 casi sono stati utilizzati per analisi mediante saggi di CISH per localizzare gli acidi nucleici virali a livello del tessuto, e solo 1 caso è stato analizzato mediante IHC per valutare l'espressione della proteina virale L1. Di ogni caso è stato conservato un frammento a -80°C, mentre il tessuto rimanente è stato fissato in formalina e paraffinato per le diagnosi istologiche. I

blocchetti di paraffina sono stati tagliati serialmente e colorati con ematossilina e eosina (H&E) e confermati essere GBM in accordo con i criteri WHO del 2007

6.3.2. Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto da tessuto tumorale congelato tramite High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) e quantificato con QuantiT™ dsDNA BR kit (Invitrogen, Carlsbad, CCA, USA).

6.3.3. PCR Nested MY-GP

Il DNA estratto è stato amplificato per valutare la presenza di HPV mediante PCR Nested MY-GP (per i primer, la miscela di reazione e le condizioni di amplificazione si rimanda al paragrafo 6.2.4). Come controllo positivo è stato utilizzato un campione clinico di riferimento, in particolare il DNA estratto da un campione tumorale di cervice uterina analizzato con altre tecniche diagnostiche molecolari e risultato positivo ad HPV16.

6.3.4. Ibridazione in situ cromogenica (CISH)

Campioni di GBM FFPE sono stati analizzati mediante ibridazione in situ cromogenica (CISH) per rivelare la presenza di sequenze specifiche di vari genotipi di HPV in cellule e tessuti morfologicamente conservati attraverso l'impiego di un pool di sonde marcate con digossigenina. A questo proposito è stato utilizzato il pool di sonde Zyto Fast HPV High Risk (HR) che riconosce i genotipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 82 (ZYTO VISION, Milano, Italy), ed il pool di sonde ZytoFast HPV type 6/11 (LR) che riconosce i genotipi a basso rischio 6 ed 11. Il protocollo della CISH è stato messo a punto in house, utilizzando anticorpo primario e secondario del kit Zyto Fast Plus CISH Implementation kit HRP-AEC (ZYTOVISION). Come controllo negativo della tecnica si è provveduto ad omettere la sonda; come controlli negativi della specificità dell'anticorpo sono stati usati citoinclusi di cellule MCF7; come controlli positivi della specificità e della sensibilità della metodica sono stati usati citoinclusi di cellule Caski, Hela e Siha. Nessun controllo positivo è stato usato per CISH con sonde per i genotipi 6 ed 11. Per il protocollo di citoinclusione si rimanda al paragrafo 6.2.3.

Brevemente, la reazione di CISH prevede il legame della sonda marcata con digossigenina al DNA, la quale, viene a sua volta riconosciuta dall' anticorpo primario di topo anti digossigenina; quest'ultimo, viene legato dall' anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) che catalizza la conversione del substrato cromogeno 3-amino-9-etilcarbazole (AEC), formando un precipitato di colore rosso mattone in corrispondenza del sito di legame della sonda con il suo DNA bersaglio. Il montaggio dei vetrini coprioggetto è stato fatto utilizzando una soluzione acquosa. Per il protocollo della CISH si rimanda al paragrafo 6.2.6.

6.3.5. Immunoistochimica

Sezioni seriali di 3µm di spessore sono state analizzate mediante procedure standardizzate su strumento Ventana-Benchmark automatic stainer, utilizzando l'anticorpo contro la proteina oncogenica E6 di HPV (HPV16 E6/18 E6 Antibody (C1P5) sc-460 :Santa Cruz Biotechnology).

6.3.6. Analisi statistiche

Le analisi di sopravvivenza sono state effettuate mediante il software Medcalc. Le curve sono state confrontate mediante il Log-rank test, considerando un P-value inferiore a 0,05 come statisticamente significativo. Il confronto delle caratteristiche tra i diversi sottogruppi analizzati nello studio è stato ottenuto con il Fisher's exact test (P value <0,05). L'età media è stata comparata con il test t di Student (P<0,05). Sono stati calcolati in tutti i casi P value a due code, considerando l'intervallo di confidenza del 95%.

7. Risultati

7.1. Tumori ossei e polyomavirus SV40 e JCV

7.1.1. Saggi di PCR

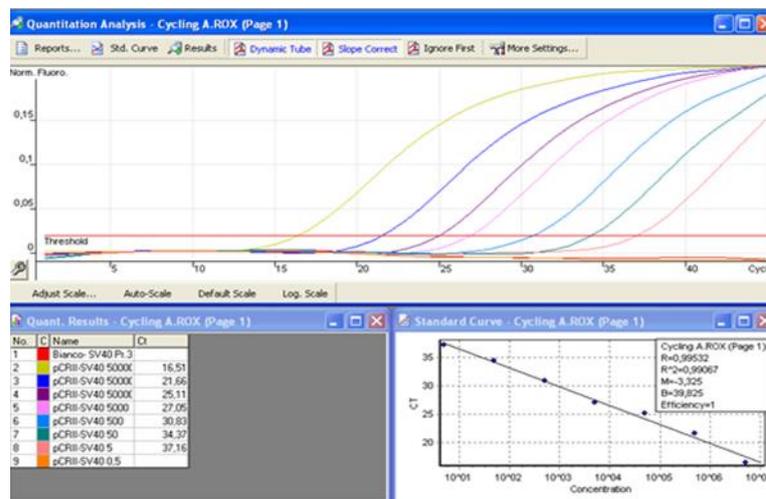
La specificità dei primer per SV40 e JCV è stata confermata usando diluizioni scalari di plasmidi contenenti il genoma di BKV, JCV, o SV40, e diluizioni scalari di genoma umano.

La sensibilità della PCR-Nested per la rivelazione di JCV ed SV40, è stata valutata utilizzando diluizioni scalari in base 10 dei plasmidi di controllo ed è risultata essere di 1 copia/reazione sia per JCV che per SV40. (Fig. 19).



Fig. 19: Sensibilità in PCR-Nested dei primer per l'amplificazione di SV40 su diluizioni scalari del plasmide di controllo.

La sensibilità della PCR-RT per la rivelazione di JCV ed SV40, è stata valutata utilizzando diluizioni scalari in base 10 dei plasmidi di controllo ed è risultata essere inferiore a 5 copie/reazione sia per JCV che per SV40. Tutti i campioni positivi in PCR-RT mostravano valori di Ct elevati (range Ct 35-40), indicando un basso numero di copie (< 50 copie/reazione) (Fig. 20).



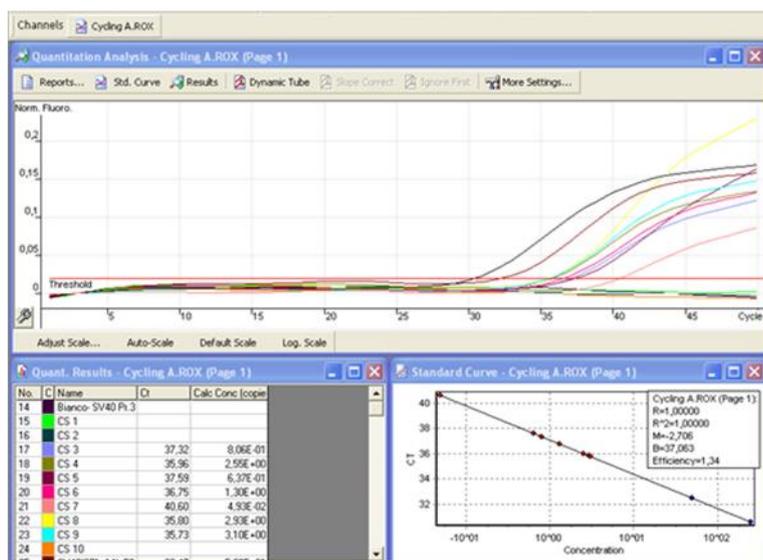


Fig. 20: Curva standard per la quantificazione di SV40 (in alto). PCR-RT di alcuni casi di CS (in basso).

7.1.2. Amplificazione del DNA virale mediante tecniche di PCR

L'analisi eseguita mediante PCR con primer specifici per la regione codificante il TAG di SV40 e JCV, ha rivelato che 25/70 campioni di tessuto osseo studiati sono positivi al DNA di SV40, e 6/70 sono positivi al DNA di JCV. In particolare, dei 25 campioni positivi ad SV40, 21 erano CS e 4 OS. Dei 6 campioni positivi a JCV, 4 erano CS e 2 TCG. 4 campioni di CS sono risultati coinfecti (Tab. 25).

	OS (n=20)	TCG (n=20)	CS (n=30)
JCV	0	2 (10%)	4 (13,3%)
SV40	4 (20%)	0	21 (70%)
SV40+JCV	0	0	4 (13,3%)
Totale	4 (20%)	2 (10%)	21 (70.0%)

Tab. 25: Risultati relativi all'amplificazione dei campioni ossei tumorali mediante PCR (tutte le tecniche) con primer specifici per la regione TAG di SV40 e JCV.

Inizialmente, i 20 casi di OS, i 20 di TCG ed i 30 di CS esaminati erano tutti costituiti da campioni freschi congelati (F/F) che sono stati analizzati utilizzando saggi di PCR Real-Time (PCR-RT) per la ricerca del DNA di SV40 e JCV. Tutti i campioni F/F

erano risultati positivi all'amplificazione del gene housekeeping. I saggi di PCR-RT su campioni F/F hanno mostrato una positività ad SV40 nel 20% dei casi di OS (4/20), una positività a JCV nel 10% dei casi di TCG (2/20) (Tab.25) e nel 6,6% dei casi di CS (2/30) ed una elevata positività ad SV40 nel 30% dei campioni di CS (9/30 casi) (Tab. 26). Poiché un dato di questo tipo non era mai stato pubblicato in letteratura, abbiamo deciso di esaminare nuovamente tutti i 30 casi di CS, partendo però da campioni FFPE. Infatti, un numero crescente di studi ha dimostrato l'utilità del DNA isolato da tessuto FFPE non solo per la semplicità di reperimento del materiale, ma anche per l'estrema concordanza con il DNA isolato da tessuto congelato, in particolare per saggi di amplificazione di frammenti di acidi nucleici non più lunghi di 500bps [Little SE. et al., 2006. Oosting J. et al., 2007. Jacobs S. et al., 2007. Huang WY. et al. 2010. Gillio-Tos A. et al., 2007]

I 30 CS FFPE sono stati esaminati nuovamente sia attraverso PCR-RT sia tramite PCR-Nested per la ricerca del DNA di SV40 e JCV (Tab. 26). Utilizzando sezioni di tessuto FFPE in cui il DNA è ben preservato, ma in cui la formalina può causarne la parziale frammentazione, abbiamo utilizzato per l'amplificazione in PCR-Nested gli stessi primer utilizzati in PCR-RT, in modo da amplificare frammenti di DNA di lunghezza inferiore alle 200bps. Tutti i campioni di CS FFPE sono risultati positivi all'amplificazione del gene housekeeping.

La PCR-RT sui 30 CS FFPE ha confermato lo stesso dato di positività ad SV40 ottenuto sui campioni F/F (9/30 SV40-positivi); tutti i casi concordavano, ad eccezione di uno. La PCR-RT sui CS FFPE non ha rilevato alcun caso JCV-positivo.

La PCR-Nested sui 30 CS FFPE ha mostrato un dato di positività ad SV40 estremamente più elevato (21/30 SV40-positivi) rispetto a quello ottenuto attraverso le tecniche di PCR-RT. Tutti i casi SV40-positivi ottenuti con le tecniche di PCR-RT erano positivi anche in PCR-Nested. Inoltre, la PCR-Nested sui CS FFPE ha rilevato 3 casi JCV-positivi, di cui solo 1 caso positivo anche in PCR-RT.

CS (n=30)	Tipo di tessuto	SV40-positivi	JCV-positivi
PCR-RT	F/F	9 (30%)	2
	FFPE	9 (30%)	0
PCR-Nested	FFPE	21 (70%)	3

Tab.26: Dati di positività ad SV40 e JCV dei campioni di CS. Confronto tra le positività ottenute a partire da differenti tipi di tessuto e con differenti saggi di amplificazione (F/F= fresh frozen; FFPE= formalin-fixed paraffin-embedded).

Alcuni prodotti di amplificazione sono stati clonati e sequenziati; le sequenze ottenute sono state utilizzate per interrogare le banche dati nucleotidiche per verificarne l'omologia con le sequenze di riferimento utilizzando l'algoritmo Blast. Tutti i campioni hanno dimostrato corrispondenza con le sequenze di riferimento. Inoltre, le sequenze sono state allineate manualmente mediante il programma informatico BioEdit Sequence Alignment Editor Versione 7.0.0. e tutte mostravano una identità del 100% tra loro e rispetto alla propria sequenza di riferimento (NCBI Reference Sequence: NC_001669.1 e NC_001699.1).

7.2. Carcinoma mammario e HPV

7.2.1. Valutazione del sistema di raccolta dei secreti mammari

La valutazione dell'efficienza di estrazione ed amplificazione del campione utilizzando la carta di Guthrie come sistema di raccolta, è stata compiuta utilizzando diluizioni scalari in base 10 di cellule Caski. Come controllo negativo di estrazione ed amplificazione è stata usata carta di Guthrie in assenza di campione. Per l'amplificazione del genoma virale di HPV 16 sono stati utilizzati i primer F424 e R553 precedentemente descritti ed il programma di amplificazione riportato in Tabella 9. Come controlli positivi della reazione di amplificazione sono stati usati 3 ng e 0,03 ng di DNA di cellule Caski.

All'analisi elettroforetica (Fig. 21) erano visibili tutti gli amplificati privi di prodotti aspecifici, anche in presenza di una bassa quantità di DNA di partenza (10 cellule).

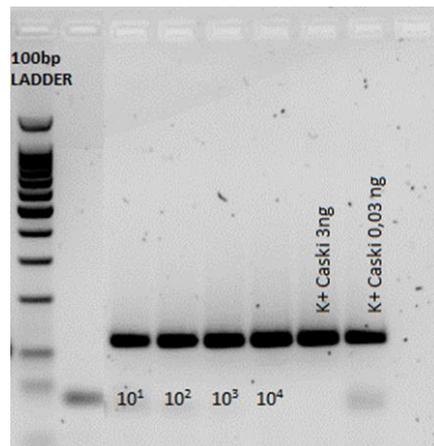


Figura 21: Elettroforesi degli amplificati ottenuti su diluizioni scalari in base 10 di cellule Caspki estratte da DBS.

7.2.2. Saggi di PCR

PCR-Nested MY/GP

Il saggio di PCR-Nested MY/GP, che utilizza primer specifici per la regione L1 del genoma virale, era già stato precedentemente allestito in laboratorio e le condizioni ottimali di amplificazioni erano già state definite. Una maggior sensibilità, in assenza di prodotti aspecifici, era stata ottenuta con temperatura di annealing di 55°C e 35 cicli di amplificazione per la PCR MY, e con temperatura di annealing di 45°C e 30 cicli di amplificazione per la PCR GP. La sensibilità della PCR-Nested MY-GP per la rivelazione di HPV 16 e 18, era stata valutata precedentemente utilizzando cellule Caspki, cellule HeLa e plasmidi contenenti la regione L1 dei genotipi 16 e 18, ed era risultata di 1 copia/reazione per entrambi i genotipi.

PCR MULTIPLEX

La PCR multiplex, definita come l'amplificazione simultanea di più regioni di uno stampo di DNA o di più templati di DNA attraverso l'uso di più coppie di primer in una provetta, è stata ampiamente utilizzata in applicazioni diagnostiche di microbiologia clinica [Akgul B. et al., 2006. Antonsson A. et al. 2003] .Per la messa a punto di una efficace reazione PCR multiplex, è di fondamentale importanza progettare una combinazione ottimale di coppie di primer. È ben noto che, in una PCR convenzionale, la coppia di primer ottimale deve avere le seguenti proprietà: 1)

lunghezza dei primer: 18-30 bp; 2) lunghezza del prodotto amplificato: 100-500 bp; 3) temperatura di melting (T_m) del primer forward e reverse: 58-65°C, con una differenza di temperatura inferiore a 3°C; 4) contenuto in GC dei primer: 40-60%; 5) ΔG (energia libera di Gibbs) degli ultimi cinque residui dei primer all' estremità 3': ≥ -9 kcal / mol; ed altro ancora. Tuttavia, nel mettere a punto il saggio di PCR multiplex abbiamo dovuto prendere in considerazione alcuni ulteriori criteri che sono: 1) la mancanza di dimerizzazione dei primer tra tutti i primer presenti nella stessa miscela di reazione, 2) la somiglianza dei T_m di ciascun primer, 3) la specificità del primer per evitare errori di mispriming; e 4) il limite della mobilità elettroforetica degli amplificati per separare e purificare facilmente i frammenti di DNA in gel di agarosio. Per la messa a punto del saggio di PCR-MULTIPLEX sono state allestite prove per determinare la miglior temperatura d'annealing, e la concentrazione ottimale di primer e cloruro di magnesio da utilizzare. Poichè la temperatura media di melting dei diversi primer era circa 65°C, sono state effettuate delle prove con temperatura di annealing di 55°C, 60°C e 65°C; la maggiore sensibilità in assenza di prodotti aspecifici è stata ottenuta con temperatura di annealing di 60°C. Inoltre, sono state testate diverse concentrazioni di $MgCl_2$ (1, 2, 3, 4 mM); è stata ottenuta una buona resa di amplificazione senza accumulo di prodotti aspecifici utilizzando $MgCl_2$ 3 mM nella PCR-Multiplex (minore stringenza, della reazione, per guadagnare in sensibilità) e $MgCl_2$ 2 mM nella PCR-Nested MULTIPLEX (aumento della specificità per diminuire la quantità di prodotti aspecifici ed evitare la dimerizzazione dei primer). Nei pool di primer composti da 2, 3 e 4 coppie di primer, la concentrazione di ogni primer è stata abbassata rispettivamente di 2 (0,1 μM), 3 (0,66 μM), e 4 volte (0,05 μM) rispetto alla concentrazione usata in reazioni di PCR condotte con una sola coppia di primer (0,2 μM). In questo modo, in ogni PCR la concentrazione complessiva dei primer nella miscela di reazione rimaneva costante (0,4 μM). Le sequenze di tutti i primer forward e reverse utilizzati per le PCR-Multiplex, e le dimensioni dei prodotti di PCR attesi, sono mostrati nelle Tabelle 16, 19 e 22. Inizialmente, abbiamo testato la funzionalità e la sensibilità di tutte le coppie di primer in singole reazioni di PCR usando come templatò diluizioni scalari plasmidiche del genotipo di HPV corrispondente. Per valutare la specificità dei primer sono state condotte reazioni di PCR utilizzando come stampo DNA genomico umano. Ogni coppia di primer consentiva di amplificare un prodotto di PCR della lunghezza attesa, con una sensibilità compresa tra 1-100 copie/reazione, a seconda del genotipo

considerato. Nessuna coppia di primer ha mostrato la formazione di prodotti aspecifici sul genoma umano. Successivamente, abbiamo testato l'efficienza dei primer in PCR-Multiplex. Le coppie di primer sono state miscelate opportunamente, in modo da formare mix di primer che amplificassero prodotti di diversa lunghezza. Alcuni primer sono stati disegnati più volte a causa della scarsa efficienza di amplificazione all'interno del pool; altri sono stati provati all'interno di diversi pool di primer a causa della formazione di prodotti aspecifici. La sensibilità dei diversi pool di primer è stata valutata utilizzando diluizioni scalari plasmidiche. Ogni pool di primer consentiva di amplificare prodotti di PCR della lunghezza attesa, con una sensibilità compresa tra 1-100 copie/reazione. Quindi l'uso dei pool di primer non causava una perdita di sensibilità rispetto all'uso di una singola coppia di primer genotipo-specifica. Per testare la specificità dei saggi sono stati infine utilizzati campioni clinici di riferimento, positivi ai genotipi di HPV in studio (Fig. 19).

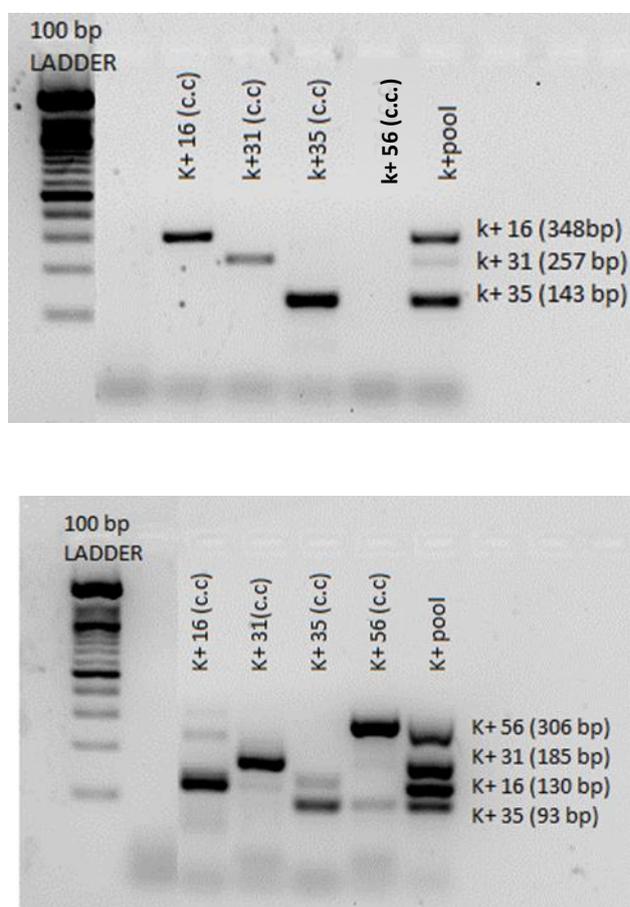


Figura 19: Elettroforesi su campioni clinici di riferimento sui quali è stato testato il POOL 1 e POOL 1NM (DIDASCALIA: c.c: campione clinico, k+pool: pool dei

campioni utilizzati come controlli positivi della reazione; ciò consente di effettuare una singola reazione di amplificazione di controllo piuttosto che una per ciascun genotipo.)

I genotipi di HPV che sono stati ricercati mediante PCR-Multiplex nei campioni di carcinoma mammario sono stati quelli che hanno una maggior prevalenza nel carcinoma mammario a livello mondiale (HPV 16, 18, 33 e 35) (Li Ni et al., 2011) e quelli prevalenti nella popolazione locale (Emilia-Romagna) nella patologia cervicale (HPV 31) (Costa et al., 2011). Utilizzando sezioni di tessuto FFPE in cui il DNA è ben preservato, ma in cui la formalina può averne causato la parziale frammentazione, abbiamo utilizzato per i saggi di PCR dei primer che permettessero di amplificare frammenti di DNA di lunghezza inferiore alle 350bps. Poiché i genotipi ricercati erano solo 5, dopo la prima amplificazione in PCR-Multiplex è stata utilizzata una PCR-Nested genotipo specifica per la ricerca dei genotipi 16, 18, 31 e 35; la presenza di HPV 33 non è stata testata in PCR-Nested poiché i primer utilizzati avevano mostrato una elevata sensibilità.

Per i secreti mammari e le galattoforectomie invece, sono stati allestiti saggi di PCR-Multiplex che permettessero l'amplificazione di tutti i genotipi ad alto rischio oncogeno, più alcuni probabili alto rischio, secondo la tabella proposta da Muñoz (Fig. 22). Non sono stati considerati nello studio i genotipi 26 e 82, poiché non esistono ancora prove consistenti del loro coinvolgimento nella patologia mammaria (Li Ni et al., 2011). Poiché i campioni di secreto mammario erano campioni freschi, e quindi non soggetti a frammentazione del DNA (al contrario dei campioni di carcinoma mammario e delle galattoforectomie) e venivano estratti non appena arrivati in laboratorio, si è ritenuto sufficiente, per una buona sensibilità, allestire una PCR-MULTIPLEX a 56 cicli di amplificazione, eliminando la PCR NESTED MULTIPLEX che invece è stata utilizzata per le galattoforectomie.

HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK
9	HPV 52	High	10	HPV 6	Low	4	HPV 57	Undetermined
	HPV 67	Undetermined		HPV 11	Low		HPV 2a	Undetermined
	HPV 33	High		HPV 13	Low		HPV 27	Undetermined
	HPV 58	High		HPV 74	Undetermined	15	HPV 71	Undetermined
	HPV 16	High		HPV 44	Low		HPV 90	Undetermined
	HPV 31	High		HPV 55	Undetermined	3	HPV 61	Low
HPV 35	High	8	HPV 91	Undetermined	HPV 72		Low	
11	HPV 34		Undetermined	HPV 7	Undetermined		HPV 62	Undetermined
	HPV 73		Probably high	HPV 40	Low		HPV 81	Low
7	HPV 59		High	1	HPV 32		Undetermined	HPV 83
	HPV 18	High	HPV 42		Low	HPV 89	Low	
	HPV 45	High	13	HPV 54	Low	HPV 84	Undetermined	
	HPV 70	Low		2	HPV 28	Undetermined	HPV 3	Undetermined
	HPV 39	High			HPV 10	Undetermined	HPV 29	Undetermined
	HPV 68	Probably high			HPV 29	Undetermined	HPV 77	Undetermined
HPV 85	Undetermined	5	HPV 26		Probably high	6	HPV 30	Undetermined
HPV 51	High		HPV 69		Undetermined		HPV 53	Probably high
5	HPV 82	Probably high	HPV 51	High	HPV 56		High	
	6	HPV 30	Undetermined	HPV 66	Probably high		HPV 53	Probably high
HPV 53		Probably high	HPV 56	High	HPV 56	High		
HPV 56		High	HPV 66	Probably high	HPV 66	Probably high		
HPV 66		Probably high						

Figura 22: Classificazione filogenetica ed epidemiologica degli HPV anogenitali (Muñoz et al., 2006). Nel riquadro arancione i 16 genotipi amplificabili con PCR-MULTIPLEX.

Nei saggi di PCR-Multiplex sono stati usati primer che consentissero di amplificare la regione E6/E7 dei 16 diversi genotipi testati. I primer per la regione L1, infatti, pur essendo capaci di amplificare un ampio spettro di genotipi mucosali di HPV, possono perdere di sensibilità nel caso di infezioni multiple [Perrons C. et al. 2002. Qu W. et al. 1997] e possono essere inaffidabili nella rivelazione di HPV in carcinomi in fase avanzata, poiché le regioni L1/E1 possono essere perse durante l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite, mentre le regioni E6/E7 sono costantemente presenti [Morris BJ. et al. 2005. Gheit et al., 2006].

7.2.3. CISH

La sensibilità di questa tecnica è stata valutata utilizzando citoinclusi di linee cellulari Caski, HeLa e SiHa, che riproducessero le stesse condizioni di fissazione dei campioni in studio e potessero essere utilizzate anche come controlli positivi. Saggi di CISH compiuti su Caski, HeLa e SiHa hanno permesso di individuare un segnale puntiforme

di positività visibile a livello nucleare in tutte le linee cellulari, indicando un'elevata sensibilità della tecnica, in particolare per la ricerca del genoma di HPV16 (Fig. 23).

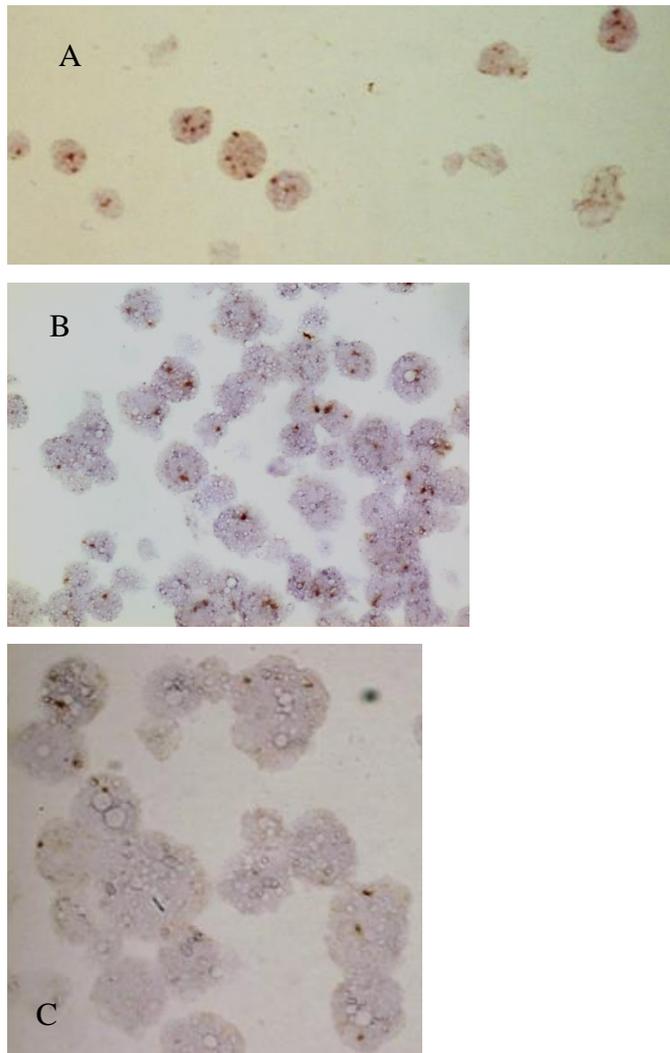


Figura 23: CISH: Prova di sensibilità effettuata su citoinclusi di Caski (A), HeLa (B) e SiHa (C) (400X). Il segnale di positività puntiforme è ben visibile anche nelle cellule SiHa.

La specificità del pool di sonde è stata valutata utilizzando la linea cellulare MCF-7, in cui non è stato rivelato alcun segnale (Fig. 24).



Figura 24: CISH: prova di specificità effettuata su cellule MCF-7 (400X).

7.2.4. Amplificazione del DNA virale mediante tecniche di PCR: prevalenza di HPV e correlazione con i dati clinici

CARCINOMA MAMMARIO

Dei 168 campioni di carcinoma mammario analizzati mediante saggi di PCR, 10 sono risultati HPV-positivi alla PCR L1, e 50 HPV-positivi alla PCR E6/E7 (Tab. 27). I 10 campioni positivi in L1 si confermano positivi anche in PCR E6/E7. Tutti i campioni di carcinoma mammario erano risultati positivi all'amplificazione del gene housekeeping.

In origine, 12 campioni erano risultati positivi alla PCR L1; i 12 amplificati sono stati sequenziati, e le sequenze ottenute sono state analizzate con il programma di allineamento di sequenze nucleotidiche BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Dei 12 campioni sequenziati, sono risultati positivi al genoma di HPV solo i 10 campioni che venivano confermati anche dalla PCR E6/E7. Inoltre, il sequenziamento degli amplificati della regione L1 ha permesso di confermare i genotipi ottenuti con la PCR E6/E7: 9 erano positivi ad HPV 16 ed uno ad HPV 18.

Campioni Totali (n=168)	Campioni positivi (n=50)	Campioni negativi (n=118)
PCR L1	10 (5,9%)	158 (94,1%)
PCR E6/E7	50 (29,8%)	118 (70,2%)

Tab. 27: Risultati relativi ai 168 campioni di carcinoma mammario saggiati mediante PCR

Nei 50 campioni HPV-positivi alla **PCR E6/E7** abbiamo ottenuto i seguenti risultati (Tab. 28):

- ✓ 47 campioni sono positivi con infezione singola
- ✓ 3 campioni sono positivi con infezione multipla, di cui 1 con una triplice infezione HPV 16/18/35 e due con duplice infezione, uno HPV 16/35 e l'altro HPV 16/18

Genotipo	Infezione singola	Infezione multipla	N° casi totali	%(n=168)
HPV 16	39	3	42	25
HPV 18	3	2	5	3
HPV 31	1	0	1	<1
HPV 33	1	0	1	<1
HPV 35	3	2	5	3

Tab. 28: Risultati relativi ai 50 campioni di carcinoma mammario saggiati mediante PCR E6/E7

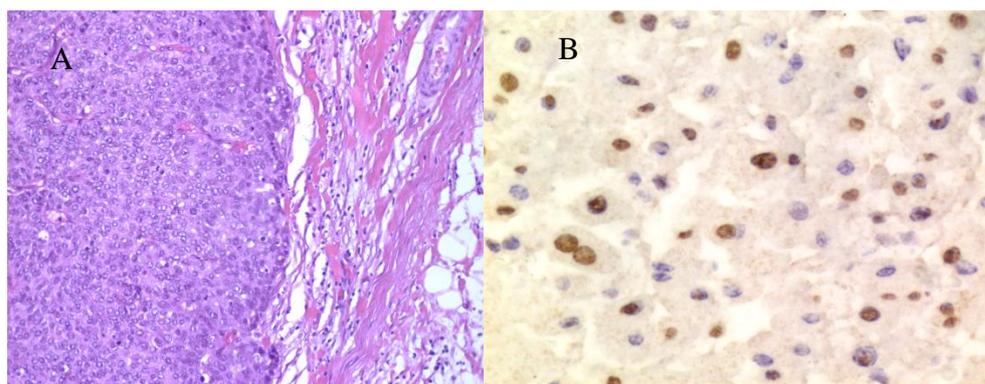
Il **25%** della popolazione analizzata è risultata positiva ad **HPV 16**. In particolare, tra tutti i casi HPV-positivi, 84% era positivo ad HPV16, il 10% ad HPV 18 ed il 10% ad HPV35.

In tabella 29 vengono mostrate le associazioni tra la presenza di HPV e le caratteristiche dei pazienti da cui provengono i campioni. Non sono state rilevate correlazioni statisticamente significative tra variabili demografiche ed istopatologiche.

	N° campioni (n=168)	HPV DNA positivi (n=50)	HPV DNA negativi (n=118)
<u>Età</u>			
≤ 40	12 (7%)	4 (2%)	8 (5%)
40 - 60	54 (32%)	13 (8%)	41 (24%)
61-80	82 (49%)	26 (15,5%)	56 (33,5%)
>80	20 (12%)	7 (4%)	13 (8%)
<u>Tipo di cancro</u>			
Duttale invasivo	142 (85%)	44 (27%)	98 (58%)
Lobulare invasivo	25 (15%)	6 (3,5%)	19 (11,5%)
Metastasi	1	0	1
<u>Coinvolgimento linfonodale</u>			
Positivo	74 (44%)	25 (15%)	49 (29%)
Negativo	94 (56%)	25 (15%)	69 (41%)
<u>Stato del gene p53</u>			
Wild type	141 (84%)	40 (24%)	101 (60%)
Mutato	27 (16%)	10 (6%)	17 (10%)
<u>Espressione ER e PgR</u>			
Positivi a entrambi recettori	137 (81,5%)	36 (21%)	101 (60,5)
Positivi a un solo recettore	11 (6,5%)	4 (2%)	7 (4,5)
Negativi a entrambi recettori	20 (12%)	10 (6%)	10 (6%)
<u>HER2</u>			
Positivo	18 (11%)	8 (5%)	10 (6%)
Negativo	150 (89%)	42 (25%)	108 (64%)

Tab. 29: Associazioni tra presenza del DNA di HPV e parametri clinico-patologici.

Con la CISH al momento sono stati analizzati 41 campioni di carcinoma mammario, di cui 16 sono risultati positivi (Fig. 25).



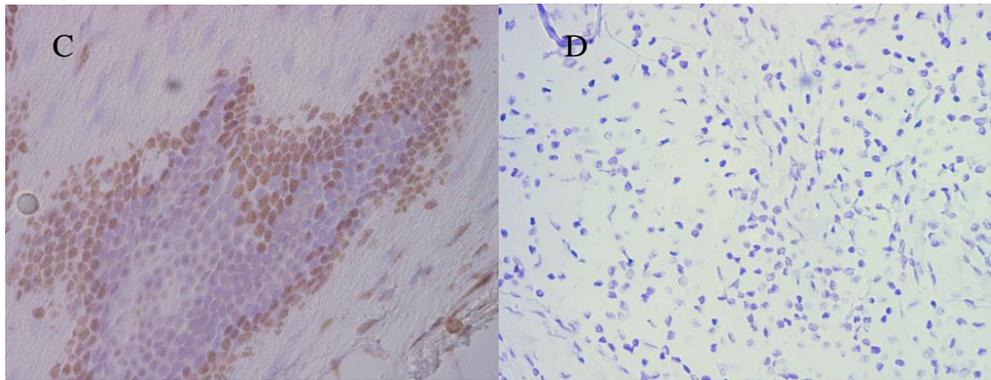


Fig. 25: Campioni di carcinoma mammario FFPE. A) Ematossilina-Eosina (200X). B e C) CISH HPV-positiva (400X e 200X). D) CISH HPV-negativa (200X).

Nella seguente tabella vengono confrontati i risultati ottenuti con i saggi PCR E6/E7 e la CISH.

	CISH Positivi (n=16)	CISH Negativi (n=25)
PCR E6/7 Positivi	12	3
PCR E6/7 Negativi	4	22

Tab. 30: Confronto tra i risultati di positività al DNA di HPV ottenuti mediante saggi di PCR E6/E7 e CISH.

I campioni negativi alla CISH ma positivi in PCR E6/E7 presentavo in 2 casi il genotipo HPV 35 e in un caso il genotipo HPV 33.

Come mostrato in figura 25, il DNA di HPV si localizza a livello delle cellule tumorali e mostra un segnale diffuso di positività nucleare. Diversi studi compiuti per la ricerca di HPV attraverso saggi di CISH hanno ipotizzato che il segnale puntiforme a livello nucleare possa indicare l'integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite, mentre un segnale diffuso possa essere indice della presenza di HPV in forma episomale [Evans MF. et al., 2002 Dec;15(12):1339-47. Evans MF. et al., 2003. Cooper K. et al., 1991].

GALATTOFORECTOMIE E SECRETI:

I risultati ottenuti dalle analisi dei 30 secreti e delle 30 galattoforectomie sono riassunti in Tabella 31.

	Secreti Positivi	Secreti Negativi
Galattoforectomie Positive	2	2
Galattoforectomie Negative	6	20

Tab.31: Confronto tra i risultati di positività al DNA di HPV ottenuti mediante saggi di PCR E6/E7 su 30 campioni di secreto mammario ed i corrispondenti campioni di galattoforectomia.

8/30 (26,6%) campioni di secreto sono risultati positivi ad HPV, contro i soli 4/30 campioni di galattoforectomie. Relativamente ai due casi positivi sia alla galattoforectomia che al secreto, solo in uno di essi si è riscontrato lo stesso genotipo in entrambe le tipologie di campione. Tra i campioni di secreto il 16,6% è risultato positivo ad HPV 16, il 6,6% ad HPV 35 ed il 3,3% ad HPV18. Tra i campioni di galattoforectomie, il 6,6% è risultato positivo ad HPV18, ed il 3,3% ad HPV31 ed PV51 (Tab.32). Il 50% dei secreti HPV-positivi proveniva da mammelle con carcinoma duttale (Tab. 33).

Genotipo	Secreti	Galattoforectomie
HPV 16	5	0
HPV 18	1	2
HPV 31	0	1
HPV 35	2	0
HPV 51	0	1

Tab. 32: Genotipi prevalenti nei campioni di secreto mammario e galattoforectomia.

n=30	Secreti HPV-positivi	Secreti HPV-negativi
Carcinoma duttale	4 (50%)	7 (32%)
Mastite	2 (25%)	8 (36%)
Papilloma intraduttale	2 (25%)	7 (32%)

Tab. 33: Associazioni tra presenza del DNA di HPV nei 30 campioni di secreto mammario e patologia.

Tutti i campioni di secreto mammario e le galattoforectomie erano risultati positivi all'amplificazione del gene housekeeping.

7.3. Glioblastoma multiforme e HPV

7.3.1. Dati clinici ed analisi istologica dei campioni

L'età dei pazienti al momento dell'intervento chirurgico variava dai 41 ai 75 anni (media 62,6 anni). Di questi, il 54% erano di sesso femminile e il 46% di sesso maschile. Il 57% dei pazienti era stato sottoposto a trattamento complementare standard, che prevede chemioterapia con temozolomide (TMZ) concomitante e coadiuvante alla radioterapia (RT); il 7% erano stati sottoposti soltanto a RT e il restante 36% non aveva ricevuto alcuna terapia adiuvante. La mediana di sopravvivenza si attesta a 13,6 mesi (range 1,8-34,7 mesi), in linea con i dati riportati in letteratura per il GBM.

Tutti i gliomi analizzati nello studio sono stati confermati essere gliomi maligni ad alto grado all'analisi istopatologica. Un solo caso è stato diagnosticato come glioblastoma secondario, derivato da oligodendroglioma. Dal punto di vista morfologico tutti i GBM risultano composti da cellule in cui si evidenzia una marcata atipia nucleare, caratteristica tipica dei glioblastomi, con numerose mitosi, indice di un'attiva proliferazione tumorale e spot necrotici. In tutte le sezioni si nota anche un'evidente proliferazione micro-vascolare.

7.3.2. Amplificazione del DNA virale mediante PCR-Nested MY/GP

La valutazione della presenza del DNA di HPV è stata compiuta tramite PCR-Nested MY/GP su tutti i 59 GBM. Per identificare anche infezioni a basso titolo virale, sono state effettuate almeno tre PCR per ogni caso in esame, a partire da diverse concentrazioni di DNA. 13 campioni (22%) sono risultati positivi alla PCR.

I prodotti della PCR-Nested sono stati sequenziati utilizzando i primer GP5+ e GP6+ e le sequenze ottenute sono state analizzate con il programma di allineamento di sequenze nucleotidiche BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) per identificare il genotipo associato all'infezione. In tre casi il genotipo identificato era HPV16, negli altri dieci HPV6.

7.3.3. Ricerca del genoma virale mediante CISH

E' stata cercata la conferma della positività ad HPV16 ed HPV6 ottenuta in PCR mediante saggi di CISH su fettine da 4µm di tessuto FFPE. A causa della limitata disponibilità di materiale, è stato possibile effettuare la CISH solo su 8 casi (i 3 HPV16-positivi e 5 HPV6-positivi).

La positività al virus è stata determinata attraverso l'osservazione della colorazione rosso mattone all'interno del nucleo della cellula, indice dell'avvenuta ibridazione della sonda. Sezioni di GBM risultate negative ad HPV in PCR non mostravano nessun segnale di positività. Nessun segnale di positività era visibile in vetrini di GBM positivi ad HPV in cui era stata omessa la sonda, ed utilizzati, quindi, come controlli negativi della specificità della metodica (Fig. 26). Nessun segnale, inoltre, era visibile in campioni di GBM HPV-negativi utilizzati come controlli negativi della specificità della sonda.

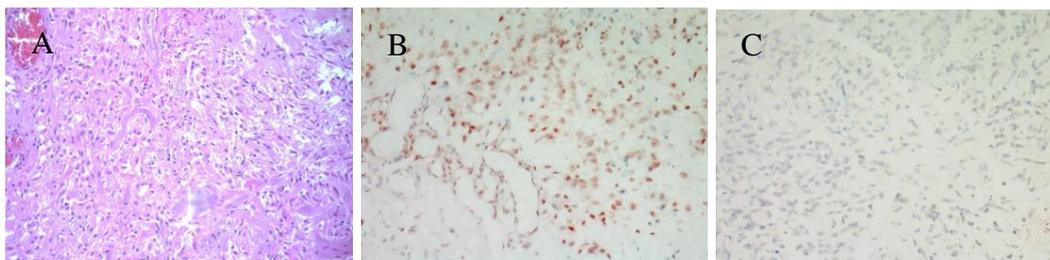


Fig. 26: (A) GBM: colorazione con ematossilina-eosina (B) ISH su campione di GBM HPV-positivo in PCR : è evidente un' area di cellule positive caratterizzata dalla colorazione rosso mattone a livello nucleare. (C) GBM: controllo negativo; ISH in assenza di sonda su un GBM HPV-positivo in PCR.

Complessivamente, 6/8 sezioni sono risultate positive ad HPV, confermando parzialmente il dato di positività già ottenuto in PCR. In queste sezioni si è potuta osservare una positività nucleare diffusa, estesa ad alcune regioni della sezione tumorale, intervallate da zone caratterizzate da assenza di segnale. Per altri casi, invece, è stato possibile identificare soltanto poche cellule positive all'interno dell'intera sezione. La positività è stata inoltre rilevata anche a livello delle cellule endoteliali dei vasi.

7.3.4. Analisi dell' espressione delle proteine oncogene virali

Al fine di valutare l'espressione delle proteine oncogene virali è stata effettuata un'analisi immunohistochimica per la proteina precoce E6 su un caso risultato positivo ad HPV16 in PCR e CISH. Nel campione si evidenzia una positività diffusa presente nell'intera sezione analizzata (fig 27). E' tuttora in corso l'analisi immunohistochimica su tutti gli altri casi di glioblastoma risultati positivi ad HPV e su campioni di controllo di glioblastomi risultati HPV negativi.

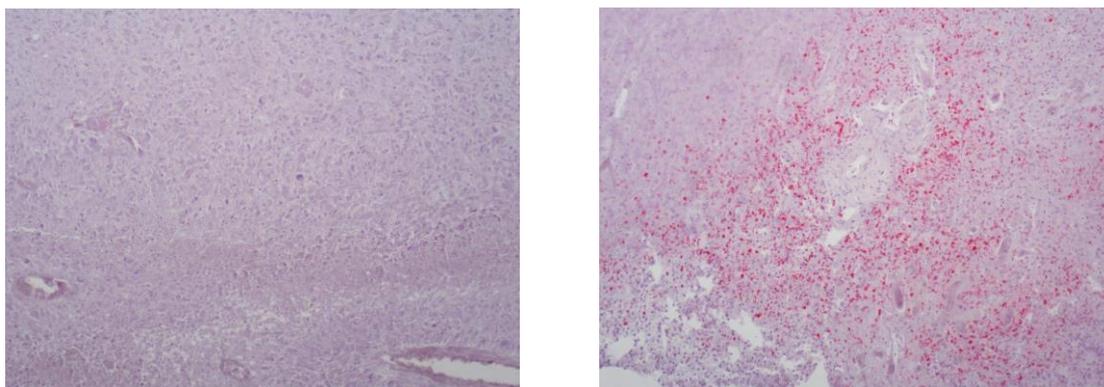


Fig. 27: Immunohistochimica con anticorpo diretto contro la proteina oncogenica E6 di HPV. (A) Controllo negativo: IHC in assenza di anticorpo su GBM HPV-positivo in PCR ed ISH (100X) . (B) IHC su GBM HPV-positivo in PCR ed ISH: la sezione si presenta con una positività diffusa tra le cellule.

7.3.5. Effetto prognostico dell'infezione virale nel GBM

Per valutare il significato prognostico dell'infezione virale è stata effettuata una analisi di sopravvivenza mediante curve di Kaplan-Meier, confrontando il gruppo di pazienti con infezione da HPV ed il gruppo senza. Poiché di sette casi di GBM non

erano disponibili dati di sopravvivenza, l'analisi è stata condotta su un numero totale di 52 GBM.

Confrontando le curve di sopravvivenza sulla base della positività/negatività dei casi di GBM ad HPV, è stato osservato un *trend* negativo nel gruppo di pazienti con HPV (HR=1,6, 95% CI=0,7552-3,3923; LogRank test $p=0,1488$), sebbene non statisticamente significativo (Figura 28).

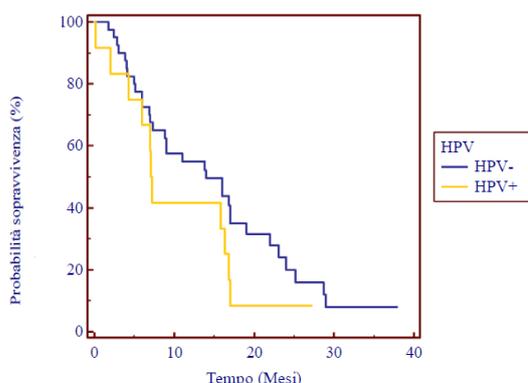
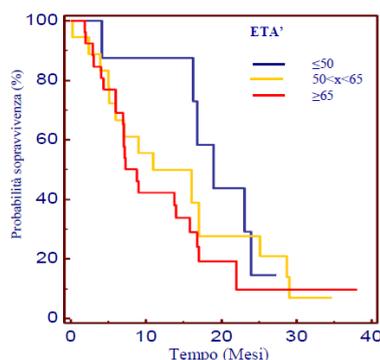


Figura 28: Curve di Kaplan Meier tra il gruppo di pazienti con GBM HPV-positivo e quelli con GBM HPV-negativo. Pur non essendo statisticamente significativo, il gruppo con GBM HPV-positivo ha una mediana di sopravvivenza più bassa rispetto al gruppo con GBM HPV-negativo (7,2 vs. 11 mesi).

Dato che l'età ed il tipo di terapia sono di per sé dei fattori prognostici, è stata compiuta una valutazione della sopravvivenza generale relativamente a ciascuno di questi fattori. In particolare, in relazione all'età, si è visto che pazienti con meno di 50 anni (8 pazienti) hanno una mediana di sopravvivenza maggiore rispetto al gruppo di pazienti con età compresa tra 51 e 65 (19) o superiore a 65 (28) (19 vs 11 vs 7,3 mesi) (Log Rank Test $pvalue = 0,2686$) (Fig. 29).



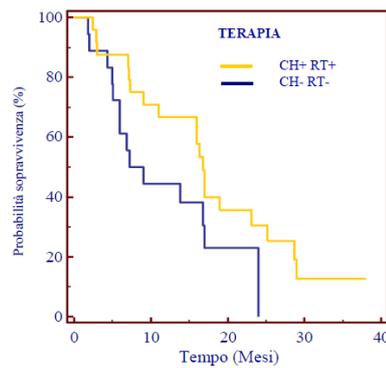


Figura 29: Curve di Kaplan-Meier per alcuni fattori prognostici: Età (in alto) e Terapia (in basso). Nessun fattore ha effetti statisticamente significativi sulla prognosi, tuttavia la giovane età ed il trattamento con radio e chemioterapia mostrano un trend verso una maggiore mediana di sopravvivenza.

Per quanto riguarda la terapia, la maggior parte dei pazienti rientra in due gruppi: quelli che sono stati sottoposti a chemio e radioterapia e quelli che non hanno ricevuto alcuna terapia adiuvante. Dall'analisi sono stati esclusi quattro pazienti, due dei quali hanno ricevuto solo radioterapia e gli altri due solo chemioterapia. Di altri nove pazienti non è stato possibile reperire informazioni a riguardo. Anche il tipo di terapia sembra avere un effetto sulla sopravvivenza generale, sebbene non significativo. Per il primo gruppo, infatti, la mediana di sopravvivenza è di 16,3 mesi per i pazienti sottoposti sia a chemio che a radioterapia, contro 7,2 dei pazienti a cui non è stata assegnata alcuna terapia (HR 0,66, 95% CI=0,2919-1,2610, LogRank $p=0,0556$) (Fig. 29).

Considerando il numero ristretto di campioni ed il fatto che solo di 48 pazienti erano disponibili tutti i dati clinico-patologici, non è stato possibile fare un'analisi multivariata. Tuttavia, come si può osservare in Tabella 34, il gruppo di pazienti con GBM HPV-positivo ed il gruppo con GBM HPV-negativo, non differiscono significativamente per nessuno dei fattori prognostici considerati, pertanto si può concludere che l'influenza che queste variabili hanno sul trend osservato può essere considerata minima.

	N° Casi HPV								% sopravvivenza a 12 mesi				
				+		-		p	+		-		p
	Casi	No	%	No	%	No	%		No	%	No	%	
Popolazione	52			12	23,1	40	76,9		5	41,7	22	51	0,52
Femmine		25	48,1	4	33,3	21	52,5	0,33	1	25,0%	11	52,4	0,59
Maschi		27	51,9	8	66,7	19	47,5		4	50	10	52,6	1
Età mediana		65		68,5		63		0,9					
range		41-78		41-77		41-78							
Età	52												
<=50		8	15,4	2	16,7	6	14,6	1	2	100	5	83	1
50<x<65		18	34,6	3	25	15	36,6	0,73	1	33	8	53	1
>=65		26	50	7	58,3	20	48,8	0,74	2	28,6	9	43	0,66

Tab. 34: Caratteristiche del sottogruppo di pazienti con GBM HPV-positivo e quello con GBM HPV-negativo, e percentuale di sopravvivenza a 12 mesi per ogni sottogruppo.

Nel sottogruppo di pazienti con età inferiore a 50 anni l'infezione da HPV non ha effetti sulla sopravvivenza, indicando che per questi pazienti, la giovane età costituisce il miglior fattore di prognosi. Considerando, invece, i pazienti con età superiore ai 50 anni, la presenza del virus ha un effetto statisticamente significativo sulla prognosi, con un rischio doppio nel gruppo HPV-positivo ed una mediana di sopravvivenza inferiore (mediana di sopravvivenza 11 vs. 7,3 mesi; HR = 2,02; LogRank test p=0,45). La percentuale di sopravvivenza a 12 mesi è del 30% in presenza del virus (3/10) e del 50% in assenza del virus (17/34) (Figura 35).

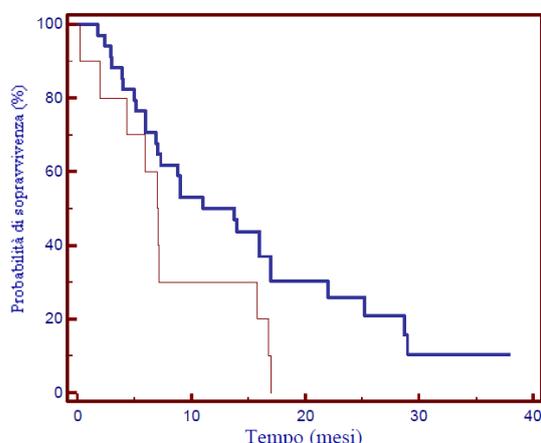


Figura 35: Curve di sopravvivenza in pazienti con età >50anni appartenenti ai due gruppi HPV-positivo e HPV-negativo. Il gruppo HPV-negativo mostra una prognosi migliore con una mediana di sopravvivenza di 11 mesi, contro i 7,3 mesi del gruppo HPV-positivo (LogRank p=0,045).

Discussione

Con il termine “Oncovirus” (ormai divenuto sinonimo di "virus tumorale" o "virus cancerogeno") si identifica un piccolo sottogruppo di circa 2000 virus a DNA ed RNA che inducono il cancro nei loro ospiti naturali o in sistemi sperimentali animali. Il primo virus tumorale umano, il virus di Epstein-Barr (EBV) , fu descritto solo nel 1964; da allora sono stati scoperti altri sei virus tumorali che, ad oggi, sono ampiamente accettati come causa di tumori umani invasivi: HTLV-I (virus T-linfotropico umano I), il virus dell'epatite C (HCV), il poliomavirus a cellule di Merkel (MCPyV), l'herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV), papillomavirus umano (HPV) e virus dell'epatite B (HBV). L'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) stima che il 10-15% dei tumori umani possa essere attribuito ad infezioni da parte di oncovirus. Diversi studi hanno dimostrato come i virus oncogeni a DNA agiscano in maniera diretta sulla cancerogenesi, codificando per una o più proteine virali che contribuiscono alla trasformazione interagendo direttamente con targets cellulari coinvolti nella vie di trasmissione del segnale relative a RB1, p53, interferone e PI3K-mTOR; altri studi, inoltre, indicano come i virus tumorali a DNA possano indurre tumori in maniera indiretta, presumibilmente attraverso un meccanismo 'hit-and-run', in cui il virus provoca alterazioni che predispongono alla cancerogenesi mediante il processo di infezione cronica ed infiammazione, per poi essere perso dalla cellula ospite non appena il tumore inizia la sua fase di accrescimento. Inoltre, per i virus tumorali è già stata riconosciuta una relazione inversa tra la permissività della replicazione virale e la trasformazione cellulare; si crede, infatti, che la tumorigenesi virale possa essere considerata un raro evento che avviene nel momento in cui il virus non riesce ad instaurare una infezione produttiva e le cellule si trovano ad esprimere in maniera continuativa gli oncogeni virali. Questo sembrerebbe giustificare una delle caratteristiche più comuni dei virus tumorali umani, e cioè che essi, a livello dei tessuti tumorali generalmente non replicano per formare particelle virali infettive. [Zur Hausen, H. (2009)], ma persistono come acido nucleico in forma episomiale, ed usano la cellula ospite per replicarsi quando la cellula si divide.

Sebbene, ad oggi, solo sette virus tumorali siano ampiamente accettati come causa di tumori umani invasivi, esiste anche un certo numero di virus che ha un ruolo

controverso nei tumori umani; nell'ultimo ventennio, infatti, molti ricercatori hanno ipotizzato una eziologia virale nello sviluppo di numerosi tumori umani.

Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di indagare la presenza di virus oncogeni a DNA, quali JCV, SV40 e HPV, in alcuni tumori mesenchimali, epiteliali e neuroepiteliali umani, per chiarire se essi possano avere un ruolo in questo tipo di neoplasie.

Polyomavirus JCV ed SV40 in tumori ossei

Il potenziale oncogeno della proteina virale regolatoria TAg di SV40 e JCV, che induce instabilità cromosomica [Ricciardiello L. et al., 2003. Ray F.A. et al., 1990. Ray, F.A. et al., 1992.] e altera la regolazione del ciclo cellulare interagendo con i soppressori tumorali p53 e Rb, è stata dimostrata in una vasta gamma di modelli animali, in cui SV40 induce principalmente mesoteliomi, tumori cerebrali e dell'osso, e JCV principalmente tumori del cervello. Numerosi studi, avviati per determinare il potenziale coinvolgimento di JCV ed SV40 nella carcinogenesi umana, hanno indicato questi virus come agenti potenzialmente oncogeni anche nell'uomo, sebbene il loro ruolo di agenti causali nella neoplasia umana sia ancora incerto.

In questo studio, l'analisi eseguita mediante PCR con primer specifici per la regione codificante il TAg di SV40 e JCV, ha permesso di rivelare una positività a basso titolo (<50 copie/reazione) per SV40 in 21/30 (70%) casi di CS e 4/20 (20%) casi di OS, mentre il DNA di JCV è stato amplificato in 4/30 (13%) casi di CS ed 2/20 (10%) casi di TCG. I 20 casi di OS ed i 20 di TCG analizzati con saggi di PCR-RT erano tutti costituiti da campioni freschi estratti manualmente utilizzando DNAzol. I 30 casi di CS, invece, sono stati estratti sia con DNAzol, partendo da campioni freschi, sia con estrazione semi-automatica su strumento Maxwell®16, partendo da campioni FFPE. In particolare, i saggi di PCR-RT effettuati su DNA estratto con le due differenti metodiche a partire dalle due diverse tipologie tissutali ha permesso di identificare 9 casi di CS SV40-positivi in entrambi i casi e 2 casi di CS JCV-positivi solo in PCR-RT su tessuto fresco. Pertanto, l'utilizzo in PCR-RT di campioni freschi di tessuto osseo estratti con DNAzol oppure di campioni FFPE estratti utilizzando lo strumento Maxwell®16, ha fornito risultati sovrapponibili, dimostrando che entrambi i mezzi di estrazione, applicati alle diverse tipologie di tessuto, forniscono acidi nucleici di buona qualità per i successivi saggi di biologia molecolare.

Per verificare che, a causa del tipo di tessuto utilizzato, non vi fossero dei falsi negati tra i campioni FFPE testati in PCR-RT, si è cercato di implementare la sensibilità della PCR per la ricerca del DNA di SV40 e JCV nei campioni di CS utilizzando una nested PCR. A questo scopo, i 30 casi di CS FFPE sono stati analizzati anche in PCR-Nested, utilizzando gli stessi primer della PCR-RT, ma aumentando il numero complessivo di cicli di amplificazione. La PCR-Nested effettuata su campioni di CS FFPE si è dimostrata la metodica di amplificazione maggiormente sensibile permettendo di identificare il DNA di SV40 in 21/30 casi (70%) ed il DNA di JCV in 3/30 casi. Tutti i casi di CS SV40-positivi ottenuti con le tecniche di PCR-RT erano positivi anche in PCR-Nested, confermando il dato di positività precedentemente ottenuto.

Il nostro studio ha permesso, innanzitutto, di identificare il DNA di JCV nel 13% dei CS e nel 10% dei TCG; ad oggi, un dato di questo tipo, che attesta un'associazione tra il genoma virale di JCV e le neoplasie ossee, non è mai stato pubblicato. Infatti, sequenze di DNA di JCV ed espressione del TAg sono state rilevate a livello di numerose neoplasie umane che originano dalle cellule del SNC [Del Valle et al., 2002. Boldorini et al. 2003. Delbue et al. 2005] e in alcune patologie tumorali non neurologiche [Laghi et al. 1999. Shin et al. 2006. Zheng H. et al. 2007], ma mai in tumori ossei.

Nel nostro studio, inoltre, abbiamo identificato il DNA di SV40 nel 70% dei CS e nel 20% degli OS. In particolare, il dato riguardante l'associazione tra SV40 e OS risulta affine a quello riportato da alcuni ricercatori in letteratura, sebbene altri riferiscano percentuali di positività molto più elevate. Infatti, il DNA di SV40 e l'espressione dell'oncoproteina TAg, sono state rilevate in molti casi di OS con percentuali considerevolmente variabili, comprese tra il 20-90%, forse relazionabili ai differenti metodi di isolamento e rivelazione del DNA o all'area geografica di appartenenza della popolazione analizzata [Carbone M. et al. 1996. Lednicky JA. et al., 1997. Mendoza SM. et al., 1998. Heinsohn et al. 2005]. Tuttavia, bisogna considerare che la positività da noi ottenuta riguardo all'associazione tra SV40 ed OS potrebbe essere sottostimata, a causa della minore sensibilità dimostrata dalla metodica di PCR-RT con cui abbiamo analizzato i campioni di OS. Pertanto questo dato dovrà essere riveduto e rivalutato alla luce di nuovi saggi di PCR-Nested. Allo stesso modo si potrebbe interpretare il dato di assoluta negatività ad SV40 ottenuto nei campioni di TCG, sebbene in letteratura esista un solo studio effettuato sulla prevalenza di SV40

in TCG, che riferisce una percentuale di positività al virus nel 28% dei casi [Gamberi et al. 2000]. Anche nel caso dei TCG, quindi, i nostri dati dovranno essere rivalutati.

Degna di nota, invece, è l'elevata percentuale di positività ad SV40 in campioni di CS (70%), poiché è la prima volta che il virus viene ricercato ed isolato a livello di questa neoplasia.

Il modo con cui JCV ed SV40 possano giungere in queste sedi anatomiche è un curioso interrogativo a cui non si è riusciti ancora a dare una risposta. Tuttavia, poiché il DNA di SV40 è stato evidenziato in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) [David et al. 2001. Li et al., 2002. Martini et al. 1996] e sequenze genomiche di JCV sono state individuate nei linfociti B, in cellule stromali delle tonsille [Monaco MC. et al., 1998. Wei G. et al. 2000] ed in PBMC [Dolei et al. 2000. Delbue et al. 2010], alcuni ricercatori ipotizzano che le cellule del sangue siano coinvolte nella disseminazione di questi virus [Wei G. et al. 2000], mentre altri che il midollo osseo possa costituire un sito di latenza per questi virus [Tan CS. et al., 2009].

La crescente quantità di pubblicazioni scientifiche in cui viene riportata la rilevazione di sequenze di JCV ed SV40 in tessuti umani normali e patologici, solleva diverse questioni importanti che devono essere attentamente considerate. In primo luogo, la presenza di DNA genomico virale di per sé non stabilisce un nesso di causalità. È necessario dimostrare l'espressione degli oncogeni virali per poter suggerire il loro coinvolgimento nella proliferazione cellulare aberrante. Infatti, per quanto probabilmente SV40 e JCV non abbiano un ruolo diretto nella patogenesi dell' OS TCG e CS, l'azione combinata delle oncoproteine virali nell'inattivare i pathways cellulari, e la presenza di mutazioni geniche, potrebbero fornire un impulso alla tumorigenesi. Numerose sono le evidenze sperimentali che riportano il coinvolgimento di una vasta gamma di alterazioni genetiche e molecolari nella patogenesi dell' OS e del CS. Nell' OS vengono comunemente riscontrati riarrangiamenti cromosomici ed inattivazione combinata dei pathways di pRb e p53 [Overholtzer M. et al., 2003. Mendoza SM. et al., 1998]; anche nei CS, oltre ad essere presenti alterazioni cromosomiche [Mandahl N. et al. 1990. Ozisik YY. et al., 1994] e di geni soppressori tumorali [Jagasia AA. et al., 1996], è stata documentata anche una aumentata espressione dell'oncogene c-myc [Morrison C. et al., 2005] e del gene p53 [Oshiro Y. et al., 1998. Schrage YM. et al., 2009]. Per i TCG, invece, non sono state evidenziate delle specifiche anomalie di tipo molecolare/genico, ad eccezione di rari

casi di TCG secondari maligni in cui sono state osservate mutazioni di p53 associate ad un anormale accumulo nucleare della proteina stessa [Oda Y. et al., 2001]

Quindi, sarebbe interessante dimostrare l'espressione degli oncogeni virali in questi sarcomi dell'osso attraverso saggi di IHC. Infatti, la presenza concomitante di sequenze virali e TAg in questi tumori potrebbe suggerire la permissività di queste cellule per l'espressione del promotore precoce virale, portando all'accumulo del TAg e, potenzialmente, favorire la trasformazione cellulare. E' interessante notare, infatti, che mentre oncoproteine virali come E6 di HPV colpiscono p53 degradandola, TAg porta all'accumulo di p53, stabilizzandola sotto forma di complesso p53-TAg [Tiemann F. and Deppert W. 1994]. In alternativa, una mancata espressione del TAg a fronte della presenza del DNA virale, potrebbe indicare che il TAg o non è espresso, o è espresso a livelli non rilevabili con analisi di IHC, o che non è necessario per il mantenimento di un fenotipo trasformato, e far propendere quindi per un meccanismo di trasformazione "hit and run" indotta dal TAg, come, d'altra parte è già stato proposto da alcuni ricercatori [Khalili K. et al., 2003. Lednický et al., 1997. Del Valle L. et al., 2001].

L'ipotesi che i virus JCV ed SV40 possano causare il cancro negli esseri umani è un campo di ricerca particolarmente discusso e che necessita di ulteriori indagini. Ad oggi, vari metodi sono stati usati per rilevare SV40 e JCV in una varietà di tumori umani, ma rimane ancora da scoprire se la presenza di questi virus contribuisca significativamente alla trasformazione maligna o se certe neoplasie umane forniscano un microambiente favorevole alla replicazione virale negli esseri umani con infezione latente da poliomavirus SV40 e JCV.

HPV e carcinoma mammario

L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare la prevalenza genotipo-specifica di HPV e la localizzazione del genoma virale in tessuti biopsici di carcinoma mammario, galattoforectomie e secreti mammari. Ad oggi il coinvolgimento di HPV nella patologia mammaria è ancora in discussione, in quanto negli ultimi 20 anni sono stati effettuati numerosi studi con risultati tra loro contrastanti. Se la maggior parte di questi studi ha identificato la presenza di HPV in tessuti di carcinoma mammario, altri non ne hanno trovato evidenza [Baltzell et al., 2012. Silva RG. et al., 2011. Cremoux P. et al. 2008]. Queste incongruenze sembrerebbero dipendere soprattutto dal diverso tipo di campionamento, dai metodi di analisi e dai primer utilizzati in PCR, e

soprattutto dalla diversa prevalenza dei genotipi di HPV nelle diverse aree geografiche (Wang T. et al., 2012).

Gli studi effettuati hanno dimostrato la presenza del DNA di HPV in tessuti di carcinoma mammario attraverso saggi di PCR e saggi di ibridazione in situ, mostrando un prevalenza compresa tra lo 0% e l' 86%. In un recente studio meta-analitico è stata individuata una prevalenza media di circa il 23% con un rischio 6 volte maggiore di sviluppare un carcinoma mammario in donne HPV positive rispetto alle HPV negative [Simões PW. et al., 2012]; l'HPV 33 risulta essere il genotipo prevalente (14%), seguito dai genotipi HPV 18 (7%), 16 (7%) e 35 (7%), mentre la prevalenza degli altri genotipi è inferiore al 3% [Li N. et al., 2011].

Per la nostra ricerca sono stati allestiti due diversi saggi di PCR. Nel primo saggio abbiamo utilizzato primer consenso degenerati comunemente utilizzati a livello internazionale, specifici per la regione L1 di HPV, che consentono di valutare la presenza di almeno 28 genotipi mucosali. Nel secondo saggio di PCR, invece, sono stati utilizzati primer genotipo specifici per la regione E6/E7 che consentissero di amplificare con maggiore sensibilità 16 diversi genotipi mucosali ad alto rischio oncogeno. I primer per la regione L1, infatti, pur essendo capaci di amplificare un ampio spettro di genotipi mucosali di HPV, possono perdere di sensibilità nel caso di infezioni multiple [Perrons C. et al. 2002. Qu W. et al. 1997] e possono essere inaffidabili nella rivelazione di HPV in carcinomi in fase avanzata, poiché le regioni L1/E1 possono essere perse durante l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite, mentre le regioni E6/E7 sono costantemente presenti [Morris BJ. et al. 2005. Gheit et al., 2006] codificando per le proteine oncogene; infine, la relativamente ampia dimensione dei frammenti di DNA che questi primer permettono di amplificare (450 bps), li può rendere meno sensibili specialmente se usati su campioni FFPE che contengono DNA parzialmente frammentato [Kleter 2009] Baay MF. et al., 1999. Kleter B. et al., 1998. Ohara, Y. et al.,1992]. I dati relativi al nostro studio, sembrano confermare la minore sensibilità della PCR L1 rispetto alla PCR genotipo specifica su campioni FFPE; infatti, mediante l'utilizzo della PCR L1 sono stati ottenuti 10/168 campioni positivi (5,9%), di cui 9 positivi ad HPV 16 ed 1 positivo per HPV 18, mentre con la PCR E6/E7 sono stati individuati 50/168 (29,8%) campioni positivi, di cui 47 (94%) con infezione singola e 3 (6%) con infezione multipla. In particolare, tra tutti i casi HPV-positivi, 84% era positivo ad HPV16, il 10% ad HPV18 ed il 10% ad HPV35, mentre i genotipi 31 e 33 erano rappresentati solo marginalmente (<1%).

HPV 16 era presente anche nei 3 casi di infezione multipla, insieme ad HPV 18 e/o HPV 35. Quindi, complessivamente, il 25% dei campioni di carcinoma mammario è risultato positivo ad HPV16. L'elevata incidenza del genotipo 16, la moderata presenza del 18 e la esigua presenza del 33 rispecchiano l'epidemiologia riscontrata nella patologia del collo dell'utero sul territorio italiano. Infatti il genotipo 16 è presente in circa il 68% delle lesioni cervicali di alto grado, il 18 in circa l'11% dei casi e il 33 nel 2,5% dei casi (Giorgi Rossi et al., 2012). Il genotipo HPV31, prevalente nella patologia cervicale della popolazione locale (Emilia-Romagna), è stato trovato solo in uno dei campioni da noi analizzati (Costa et al., 2011). Infine, la discreta percentuale di positività ad HPV35 riflette in parte la prevalenza di questo genotipo in carcinomi mammari a livello mondiale (7%) [Li N. et al., 2011]. La percentuale complessiva di campioni di carcinoma mammario positivi alla presenza di HPV (29,8%) è in linea con altri due lavori italiani; sia Di Lonardo nel 1992, che Frega nel 2012 hanno ottenuto una positività del 29%. Per confermare i dati di positività ottenuti in PCR ed escludere la possibilità di falsi positivi abbiamo allestito saggi di CISH. Questo approccio inoltre, presenta il vantaggio di dimostrare le correlazioni esistenti tra la rivelazione del DNA di HPV e l'istopatologia, poiché permette di ottenere informazioni sulla localizzazione delle sequenze virus-specifiche nella sezione di tessuto. Abbiamo analizzato 41/168 campioni, di cui 16 (39%) sono risultati positivi ad HPV in ISH e 15 (37%) in PCR. 12/16 campioni positivi in ISH erano risultati positivi anche in PCR E6/E7. Poiché i 12 campioni positivi ad entrambe le tecniche presentavano i genotipi 16 e/o 18, supponiamo che il pool di sonde commerciali utilizzato abbia una maggiore sensibilità verso questi genotipi. A conferma di ciò si può osservare che i 3 campioni positivi in PCR E6/E7 ai genotipi 33 e 35 sono risultati negativi in CISH. Per quanto riguarda, invece, i 4 campioni risultati positivi in CISH e negativi in PCR E6/E7, questi potrebbero presentare il genotipo 82 di HPV, contenuto nel pool di sonde ma non nel pannello di primer della PCR E6/E7. Un recente studio sistematico, infatti, ha messo in evidenza che HPV 82 rappresenta uno dei 7 genotipi di HPV prevalenti in carcinomi mammari a livello europeo (Simões et al., 2012). Pertanto, la prevalenza di infezione da HPV in carcinoma mammario da noi individuata mediante PCR E6/E7 potrebbe essere sottostimata; questo dato va quindi approfondito. All'analisi microscopica delle sezioni abbiamo osservato che il DNA di HPV si localizzava a livello delle cellule tumorali, mostrando un segnale nucleare diffuso di positività, indicando

probabilmente che il DNA virale si trova allo stato episomale. Infatti, diversi studi compiuti per la ricerca di HPV attraverso saggi di CISH in neoplasie cervicali hanno ipotizzato che il segnale puntiforme a livello nucleare possa indicare l'integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite, mentre un segnale diffuso possa essere indice della presenza di HPV in forma episomale [Evans MF. et al., 2002 Dec;15(12):1339-47. Evans MF. et al., 2003. Cooper K. et al., 1991]. In alcune sezioni di carcinoma risultate positive, è stato possibile evidenziare la presenza del virus sia in cellule epiteliali mammarie tumorali che a livello degli endoteli dei vasi. Questa osservazione potrebbe suggerire una modalità con cui HPV possa giungere in questo distretto dell'organismo. Generalmente, l'attività sessuale viene considerata la principale via di trasmissione per HPV [zur Hausen H. 1999. Leemans CR. et al., 2011], ma esistono evidenze che la trasmissione di HPV possa avvenire anche attraverso vie diverse dal rapporto sessuale [Veldhuijzen NJ. et al., 2010. Chen AC. et al., 2009. Chiou HL. et al., 2003. Cason J. et al., 2005]. Alcuni autori hanno dimostrato la presenza di HPV nel capezzolo e nei tessuti areolari di pazienti con carcinoma della mammella, ed hanno ipotizzato un mezzo di diffusione duttale retrograda del virus [de Villiers EM. et al., 2005]. Inoltre, è stato dimostrato che i linfociti del sangue periferico (PBL) di donatori sani possono essere infettati da HPV [Chen AC. et al., 2009]. Pertanto, è stato suggerito che l'infezione da HPV in tessuti di organi interni possa avvenire attraverso la circolazione sanguigna. Diversi studi hanno indicato che il DNA e l'oncoproteina E6 di HPV16/18 possono essere presenti non solo nelle cellule tumorali di alcune neoplasie, ma anche nei tessuti normali adiacenti, tra cui linfociti, cellule endoteliali e macrofagi [Cheng YW. et al., 2007. Chen TH. et al., 2012], facendo ipotizzare che i PBL possano dapprima essere infettati da HPV e poi agire come mediatori dell'infezione in altri tessuti tramite la circolazione sanguigna [Chiou HL. et al., 2003. Cheng YW. et al., 2007. Chen TH. et al., 2012]. Nel presente studio, il DNA di HPV è stato rilevato tramite ISH talvolta anche nelle cellule endoteliali dei vasi oltre che nei lobuli e nei dotti della mammari affetti dalla neoplasia e questo potrebbe far pensare, confermando le precedenti ipotesi di altri autori, che l'infezione da HPV in tessuti mammarie possa avvenire anche attraverso la circolazione del sangue. D'altro canto, in letteratura sono presenti alcuni studi che, basandosi sulla più giovane età delle donne con carcinoma mammario HPV-positivo e sulla più alta incidenza di cancro cervicale HPV-positivo tra giovani donne con più partner sessuali, suggeriscono che il virus possa essere trasmesso al

tessuto mammario durante l'attività sessuale [Lawson JS. et al., 2006. Lawson JS. et al., 2008]. Il dato relativo alla nostra casistica, in cui i 50 casi di carcinoma mammario HPV-positivi si associano ad una età media di 63 anni, sembra smentire questa ipotesi. Accertata la prevalenza di HPV nel tumore mammario, abbiamo valutato la presenza di HPV in secreti mammari patologici a scopo diagnostico-preventivo. In tutti i secreti vi era una alterazione maligna citologica maggiore di C3, motivo per cui le stesse pazienti sono state sottoposte alla rimozione del dotto galattoforo interessato dalla patologia responsabile della secrezione. Abbiamo quindi potuto incrociare i dati di prevalenza di HPV nei campioni di secrezione mammaria con quelli istologici ottenuti su sezioni di galattoforectomie. Le galattoforectomie contenevano alterazioni patologiche di diverso tipo: mastiti, papillomi e carcinomi duttali. In totale 8/30 (26,6%) campioni di secreto e 4/30(13,3%) campioni di galattoforectomie sono risultate positive alla presenza di HPV. Solo 2 casi erano positivi alla PCR E6/E7 sia nel secreto sia nella galattoforectomia. Il primo, un papilloma intraduttale era positivo per lo stesso genotipo di HPV (HPV18), mentre il secondo, una mastite cronica, mostrava una positività a genotipi diversi di HPV (HPV 16 nel secreto e HPV 18 nella galattoforectomia), perciò quest'ultimo caso può essere interpretato come una infezione multipla o come infezione di più regioni tissutali. Tra i campioni di secreto il 16,6% è risultato positivo ad HPV 16, il 6,6% ad HPV 35 ed il 3,3% ad HPV18. Tra i campioni di galattoforectomie, il 6,6% è risultato positivo ad HPV18, ed il 3,3,% ad HPV31 ed HPV51. Pertanto, il genotipo HPV16 è risultato essere il prevalente, seguito dal genotipo 18 e 35. Ad oggi, non vi sono studi relativi alla presenza di HPV in secreto mammario patologico, tuttavia vi sono alcune evidenze sperimentali sulla presenza di HPV nel latte materno, un secreto fisiologico nel quale è stato trovato prevalentemente il genotipo 16, seguito esiguamente dal genotipo 18 [Glenn et al., 2012; Cazzaniga et al., 2009]. E' interessante notare che i genotipi di HPV16, 18 e 35 maggiormente rappresentati nei campioni di secrezione mammaria sono gli stessi risultati prevalenti anche nei campioni di carcinoma della mammella. Questa osservazione potrebbe trovare un fondamento nel fatto che, correlando la positività ad HPV con il tipo di lesione istologica, il 50% dei secreti HPV-positivi proveniva da mammelle con carcinoma duttale, mentre il restante 50% si suddivideva equamente tra mastiti croniche e papillomi intraduttali. E' interessante notare come la positività dimezzi passando da lesioni displastiche a lesioni di tipo infiammatorio/proliferativo. Poiché l'analisi del secreto mammario riflette bene lo spettro di positività

all'infezione da HPV nel carcinoma della mammella, e poiché HPV16 18 e 35 sono risultati associati a circa il 30% di tutti i casi di carcinoma da noi analizzati, si potrebbe pensare allo screening del secreto mammario come mezzo diagnostico-preventivo per individuare questi genotipi in lesioni preneoplastiche di mammelle secernenti. Tuttavia, per sostenere pienamente questo tipo di possibilità, sarà necessario ampliare il numero di secrezioni mammarie patologiche analizzate.

La prevalenza così elevata del genotipo 16 nei campioni analizzati è estremamente interessante per la recente commercializzazione di vaccini protettivi nei confronti di genotipi ad alto rischio oncogeno, quali 16 e 18, che sono tra i più rappresentati nella cervice uterina (70%). Questi vaccini potrebbero essere protettivi anche nei confronti del carcinoma mammario, che risulta essere la prima patologia neoplastica per incidenza e la prima causa di morte per patologia tumorale nel sesso femminile nel mondo.

Concludendo, abbiamo dimostrato la presenza del DNA di HPV nel carcinoma della mammella (30%) ed in altri campioni patologici, quali secreti mammari (27%) e galattoforectomie (13%), che fino ad ora non erano stati presi in considerazione in letteratura, dimostrando la presenza di diversi genotipi, tra i quali i più rappresentati sono risultati essere HPV16 ed HPV18, che sono anche tra i più frequenti ed aggressivi nel carcinoma cervicale. Comunque, sebbene questi virus siano stati rilevati a livello di numerose neoplasie umane, questo non necessariamente conferma che il virus sia il solo fattore causale di quei tumori, ma piuttosto potrebbe agire da induttore dell'instabilità genetica o da elemento aggravante una condizione cellulare già di fatto compromessa dalla presenza di alterazioni genetiche. Pertanto, anche se è probabile che gli HPV ad alto rischio possano occasionalmente causare tumori in distretti anatomici atipici, l'inconsistenza dei dati presenti in letteratura stimola l'esecuzione di ulteriori studi.

HPV e glioblastoma multiforme

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il più comune ed il più aggressivo tumore del cervello, con una sopravvivenza media di circa 12 mesi. Ad oggi, diversi virus sono stati associati a tumori cerebrali; in particolare, HCMV e JCV sono stati identificati a livello del GBM [Dziurzynski et al, 2012. Boldorini et al, 2003], ma fino a poco tempo fa non esistevano evidenze che HPV potesse infettare il cervello umano; tuttavia, recentemente, alcuni ricercatori hanno messo in evidenza un collegamento tra

HPV16 ed una comune forma di epilessia infantile, dimostrando per la prima volta che HPV16 può essere presente nel cervello umano [Chen J. et al. 2012].

Il nostro studio, volto alla valutazione della presenza del DNA di HPV in 59 casi di GBM, ha evidenziato 13 campioni (22%) positivi in PCR, di cui 3 positivi ad HPV16, e dieci positivi ad HPV6. Pertanto, il genotipo di HPV che è risultato maggiormente rappresentato nel GBM è risultato essere HPV 6 (78%). HPV6 è un genotipo a basso rischio oncogeno con capacità trasformante, il cui meccanismo di deregolamentazione del ciclo cellulare è simile a quello dei genotipi ad alto rischio, ma in cui le proteine oncogene E6 ed E7 legano con minore affinità e destabilizzano (ma non degradano, come i genotipi ad alto rischio) gli oncosoppressori cellulari p53 e pRb, rispettivamente. La suddivisione nelle due classi di genotipi genitali di HPV, ad alto e a basso rischio oncogeno, è stata compiuta in seguito alla loro associazione con il cancro cervicale. I genotipi a basso rischio, specialmente HPV6 e HPV11, non vengono quasi mai isolati nel cancro cervicale, ma sono più comunemente associati a verruche genitali, mentre i genotipi ad alto rischio oncogeno, ed in particolare HPV-16, è il principale agente eziologico del cancro cervicale, ed è considerato il genotipo ad alto rischio prevalente in questo tipo di neoplasia.

Per confermare i dati di positività ottenuti in PCR ed escludere la possibilità di falsi positivi abbiamo allestito saggi di CISH. Questo approccio presenta, inoltre, il vantaggio, rispetto alla PCR, di dimostrare le correlazioni esistenti tra la rivelazione del DNA di HPV e l'istopatologia, poiché permette di ottenere informazioni sulla localizzazione delle sequenze virus-specifiche nella sezione di tessuto. Abbiamo analizzato 8/13 campioni risultati positivi in PCR. Sei degli otto vetrini analizzati sono risultati positivi, tre ad HPV-16 e cinque ad HPV6; l'assenza di colorazione nei controlli negativi ha confermato la specificità della sonda. In relazione ai due casi negativi, è importante notare che la metodica di ISH è significativamente meno sensibile rispetto alla PCR; quindi si può immaginare che un basso titolo virale possa non essere stato rilevato in ISH, e possano essersi ottenuti dei falsi negativi. Un'altra possibile spiegazione è che il DNA utilizzato per l'amplificazione in PCR sia stato estratto da una zona tumorale diversa da quella analizzata con ISH; HPV, infatti, potrebbe non necessariamente essere diffuso in tutto il tessuto tumorale, ma localizzarsi specificamente in alcune aree. Questa ipotesi è, comunque, incompatibile con la possibilità che il virus abbia un ruolo causale nella tumorigenesi poiché, se davvero esso rappresentasse lo stimolo oncogenico primario, il virus dovrebbe essere

rilevabile in tutte le cellule tumorali. In effetti, all'osservazione microscopica delle sezioni si è potuta osservare un segnale nucleare diffuso, esteso solo ad alcune regioni della sezione tumorale, intervallate da zone caratterizzate da assenza di segnale; per altri casi, invece, è stato possibile identificare soltanto poche cellule positive all'interno dell'intera sezione. Il segnale nucleare diffuso potrebbe indicare la presenza del virus in forma episomale; infatti, uno dei vantaggi della CISH sembra essere quello di fornire informazioni sullo stato fisico delle sequenze di HPV (episomale o integrato), poiché diversi studi compiuti sostengono che il segnale puntiforme a livello nucleare indichi l'integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite, mentre un segnale diffuso sia indice della presenza di HPV in forma episomale [Bryan JT. et al., 2006. Biedermann K. et al., 2004. Evans MF. et al., 2002 Dec;15(12):1339-47. Evans MF. et al., 2003. Cooper K. et al., 1991]. Tuttavia, questo tipo di osservazione è stata effettuata solo su sezioni di neoplasie intraepiteliali cervicali e non è ancora completamente scevra da dubbi.

Dall'osservazione di alcuni casi di ISH HPV-positivi, è possibile evidenziare la presenza del virus sia in cellule stromali del tumore che a livello degli endoteli dei vasi. Questo dato può consentirci di speculare sulla modalità con cui HPV possa giungere in un distretto tanto inaccessibile come il cervello e infettare le cellule gliali. La vascolarizzazione è una delle caratteristiche principali dei glioblastomi soprattutto nelle regioni periferiche del tumore che costituiscono il confine tra il tessuto sano e quello tumorale. Il SNC è protetto dall'ingresso di patogeni microbici e virali da un elaborato sistema di barriera che costituisce la prima linea di difesa. Per attraversare la barriera emato-encefalica alcuni virus, tra cui JCV [Chapagain, M.L., et al., 2007], poliovirus [Coyne, C.B. et al., 2007], EBV [Casiraghi, C. et al., 2011], HTLV-1 [Afonso, P.V., et al., 2008] e virus West Nile (WNV) [Verma, S., et al., 2010], hanno acquisito speciali adattamenti, poiché è stato dimostrato in vitro ed in vivo che essi infettano direttamente linee cellulari di endoteliali microvascolari del cervello umano, alterando il comportamento delle cellule endoteliali, aumentando la permeabilità vascolare e permettendo al virus di attraversare l'endotelio [Casiraghi, C. et al., 2011. Verma, S., et al., 2010]. La presenza di HPV nelle cellule endoteliali potrebbe suggerire sia un meccanismo di accesso che di diffusione del virus. Infatti HPV potrebbe passare attraverso il sistema circolatorio, infettare l'endotelio e arrivare infine nel SNC. In questo contesto, è molto interessante citare uno studio in cui HPV viene ritrovato a livello dei PBMC, portando gli autori ad ipotizzare che le cellule

mononucleate del sangue periferico possano non solo contenere HPV ma anche trasportarlo in vari distretti corporei attraverso il sangue [Bodaghi S. et al., 2005. Chen AC. et al., 2009]. Questa ipotesi, una volta dimostrata, potrebbe rappresentare una spiegazione della possibile diffusione del virus negli endoteli e, da qui, nel SNC. L'analisi dell'espressione della proteina virale E6 mediante IHC, effettuata su un caso risultato HPV16-positivo in PCR e confermato con l'ISH, ha permesso di evidenziare la produzione dell'oncoproteina in cellule della glia. Estendendo questo tipo di osservazione ad una più ampia casistica, si potrà valutare se la capacità di produrre proteine precoci dipenda da particolari condizioni cellulari o tissutali. Infatti, data la diversa architettura tissutale e la differente natura cellulare della glia rispetto agli epitelii, sarà necessario approfondire come il virus adatti il proprio ciclo vitale a questo ambiente "ectopico". L'identificazione di virus che potrebbero, ad esempio, essere difettivi in un questo tipo di cellule umane, ma conservare la capacità di esprimere le proteine precoci oncogene, potrebbe indicare la possibilità di un ruolo per HPV nella trasformazione maligna dei glioblastomi.

La sopravvivenza media dei pazienti affetti da GBM è stimata essere di circa 12 mesi. Fino ad oggi sono stati identificati solo pochi fattori prognostici, ma alcuni di essi non sono stati confermati da altri studi. È stato riportato in molti lavori che la presenza di HPV nei tumori abbia un effetto prognostico, che dipende dal tipo di tumore e dal genotipo virale [Lai et al, 2007. Liang et al, 2012. Brunner et al, 2011]. Per valutare il significato prognostico dell'infezione virale è stata effettuata una analisi di sopravvivenza mediante curve di Kaplan-Meier. In sintesi, i nostri risultati acquistano significato stratificando la popolazione in base all'età, suggerendo che l'infezione da HPV in GBM è associata ad una minore mediana di sopravvivenza e che l'età è un cofattore essenziale che contribuisce al peggioramento della prognosi. Inoltre, si è potuto notare che il tempo medio di sopravvivenza dei tre pazienti positivi ad HPV-16 era di sei mesi, mentre il tempo di sopravvivenza medio dei pazienti positivi ad HPV-6 era di 11 mesi. Il fatto che i tre pazienti con HPV16 abbiano una mediana di sopravvivenza più bassa rispetto ai soggetti con HPV6 potrebbe riflettere la maggiore efficacia con cui i virus ad alto rischio degradano p53 e pRb, indicando che il genotipo potrebbe essere considerato un marcatore prognostico. Nonostante le analisi statistiche riguardanti il differente effetto sulla prognosi dei diversi genotipi di HPV non siano significative, il trend positivo incoraggia ulteriori investigazioni. La

conferma di questa osservazione richiederà, in futuro, un'analisi estesa ad una casistica maggiore di pazienti.

L'esatta eziologia del GBM è sconosciuta, negli ultimi anni la ricerca ha permesso di identificare alcune mutazioni genetiche che possono influire sul funzionamento dei diversi pathway molecolari e metabolici della cellula, rappresentando un meccanismo importante nella genesi e nella progressione tumorale del glioblastoma, tra cui l'iperattivazione di mTOR e la deregolazione dei pathway di pRb e p53 [Furnari, F.B., et al., 2007]. L'inattivazione di questi guardiani del ciclo cellulare, con conseguente deregolamentazione e progressione del ciclo cellulare, sembrerebbe essere dovuto a mutazioni genetiche a livello di effettori ed inibitori dei pathway di pRb e p53, osservabili praticamente in tutti i casi di GBM [Furnari, F.B., et al., 2007]. Tuttavia, è interessante notare come i pathway cellulari che risultano deregolati nel GBM sono gli stessi che vengono alterati a seguito dell'azione delle oncoproteine virali di HPV. Infatti, è ormai ben nota la capacità trasformante delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV, dovuta alla loro capacità di interagire e degradare i membri della famiglia dei soppressori tumorali p53 e pRb, rispettivamente, e la capacità di E6 di attivare la via del segnale di mTOR a diversi livelli [Lu Z. et al. 2004. Spangle JM. et al. 2010]. A queste osservazioni va aggiunto il dato di una recente scoperta relativa alle ricerche compiute sull'origine dello stimolo oncogenico dei gliomi. Precedenti modelli avevano suggerito che questi tumori si generassero principalmente da cellule staminali neurali indifferenziate, ma solo recentemente è stato dimostrato che, nei topi, cellule neurali pienamente mature e differenziate possono tornare allo stato indifferenziato, simile a quello di una cellula staminale, a causa dell'azione di geni oncogeni. Questa condizione potrebbe quindi generare il tumore e sostenerne la crescita [Friedmann-Morvinski D. et al., 2012]. A questo proposito è interessante notare come sia stato già osservato che topi transgenici esprimenti oncoproteine E6 ed E7 sviluppano tumori anaplastici del cervello [Arbeit JM. et al. 1993].

L'associazione tra HPV e GBM descritta in questo lavoro non implica una causalità dell'infezione nello sviluppo del tumore. I nostri dati non sono in grado di fornire un chiarimento esauriente del ruolo di HPV nella progressione del GBM, né una relazione causale tra infezione e trasformazione maligna, tuttavia, vista la positività ottenuta nei saggi di immunohistochimica e quindi il possibile ruolo di E6 nel processo di trasformazione neoplastica, diventa di primaria importanza studiare in dettaglio il coinvolgimento ed il contributo di HPV nella progressione del GBM. Non si può

escludere, infatti, che il ruolo del virus possa essere quello di un “oncoaccessorio” e che un fattore decisivo sia da attribuire ad anomalie genetiche cellulari.

Concludendo, il nostro studio ci ha permesso di verificare che sequenze genomiche dei virus oncogeni JCV, SV40 e HPV sono presenti a livello di neoplasie umane di diversa origine. Senza dubbio questi dati incoraggiano ulteriori studi con lo scopo di indagare la presenza di questi virus in più ampia scala e chiarire il loro possibile ruolo nella oncogenesi. Per riuscire a far questo sarebbe importante stratificare gruppi di pazienti, standardizzare le metodiche e le tecniche di indagine. Inoltre sarebbe necessario focalizzare le ricerche sull'integrazione dei virus nel genoma della cellula ospite, sull'espressione delle oncoproteine virali, sulle possibili vie di infezione, e sulla valutazione della presenza di mutazioni in tumori positivi ai virus. Questo lavoro, ha affrontato molte difficoltà non solo nel trovare un approccio metodologico e tecnico adeguato a diverse tipologie di tessuti e campioni, ma in maniera più profonda anche nel coniugare i risultati ottenuti con la ormai chiara consapevolezza che l'infezione virale, da sola, generalmente non è sufficiente ad indurre il processo tumorigenico, ma piuttosto la sinergia dell'azione di proteine virali e mutazioni geniche. Pertanto, per chiarire in che modo l'infezione virale si inserisca nel quadro più ampio della tumorigenesi, sarà necessario, in prima istanza, dimostrare la produzione di proteine virali trasformanti che possano fungere da oncomodulatori del fenotipo maligno attraverso l'interazione con i pathway cellulari. Infatti, poiché la tumorigenesi è un complesso processo composto da più fasi, è ormai evidente che molti eventi genetici e molecolari cooperano alla creazione di un fenotipo cellulare trasformato e, tra questi, anche l'infezione virale.

Bibliografia

Abramson AL, Nouri M, Mullooly V, Fisch G, Steinberg BM. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J Med Virol* 2004; 72:473–477.

Acheson, N.H.. Polyomaviruses. In: N.H. Acheson, *Fundamentals of molecular virology*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2007; 98-113.

Afonso, P.V., et al., Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog*, 2008. 4(11).

Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM.. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*. 2005: Nov 21;24(52):7729-45.

Akgul, B., J. C. Cooke, and A. Storey. 2006. HPV-associated skin disease. *J. Pathol*. 208:165–175.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4130-6. Epub 2007 Feb 7.

Amarante MK, Watanabe MA (2009) The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 329–337.

Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB.. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res*. 2008; 25 (9): 2097–116.

Antonsson, A., S. Karanfilovska, P. G. Lindqvist, and B. G. Hansson. 2003. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J. Clin. Microbiol*. 41:2509–2514.

Araujo dSP, da Silva SR. Câncer de mama: factores de risco e detecção precoce. *Rev Bras Enferm* 2011; 64(6).

Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am J Pathol* 1993;142:1187–1197.

Atkin, S.J., Griffin, B.E., Dilworth, S.M.. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Semin. Cancer Biol*. 2009; 19 (4), 211–217.

Baay, M. F., W. G. Quint, J. Koudstaal, H. Hollema, J. M. Duk, M. P. Burger, E. Stolz, and P. Herbrink. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J. Clin. Microbiol*. 34:745–747.

Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med*. 2011 Jun;17(6):301-12.

Baltzell K, Buehring GC, Krishnamurthy S, Kuerer H, Shen HM, Sison JD. Limited evidence of human papillomavirus in breast tissue using molecular in situ methods. *Cancer* 2012; 118(5):1212-20.

Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R: Human papilloma virus DNAs immortalize human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:463–467.

Band V., J A De Caprio, L Delmolino, V Kulesa, and R Sager.. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol*. 1991 December; 65(12): 6671–6676.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S16-24.

Bayliss J, Karasoulos T, McLean CA.. Frequency and large T (LT) sequence of JC polyomavirus DNA in oligodendrocytes, astrocytes and granular cells in non-PML brain. *Brain Pathol*. 2012 May;22(3):329-36.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS..Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2,1129–1133.

Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*. 1997 Dec;8(12):1277-86.

Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS, Kupsky WJ, Garcea RL. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med*. 1992 Apr 9;326(15):988-93.

Beyrouiti MI, Beyrouiti R, Beyrouiti R, Ben Amar M, Affes N, Frikha F, Abid M, Mnif H, Ayadi L, Ghorbel A. Breast cancer in men. *Presse Med* 2007; 36(12 Pt 3):1919-24.

Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, Vogl G, Doppelmayr H, Moré E, Staudach A, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3758-65.

Bittner, J. J.. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 1936; 84,162.

Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visnich, S.. A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191, 541–546.

- Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, Fresco R, Tosolini A, Testa JR, Pass HI, Rizzo P, Carbone M. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):10214-9.
- Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5428-34.
- Bofill-Mas, S., Formiga-Cruz, M., Clemente-Casares, P., Calafell, F., Girones, R.. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J. Virol*. 2001; 75 (21), 10290–10299.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R.. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 66 (1), 238–245.
- Bohlmeyer T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, Shroyer KR. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:265-269.
- Boldorini R, Pagani E, Car PG, Omodeo-Zorini E, Borghi E, Tarantini L, Bellotti C, Ferrante P, Monga G. Molecular characterisation of JC virus strains detected in human brain tumours. *Pathology*. 2003 Jun;35(3):248-53.
- Bollag B, Prins C, Snyder EL, Frisque RJ.. Purified JC virus T and T' proteins differentially interact with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins. *Virology*. 2000 Aug 15;274(1):165-78.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244-65.
- Boshart, M. et al.. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*.. 1984; 3, 1151–1157.
- Bouvard V, et al.. "A review of human carcinogens-Part B: biological agents". *Lancet Oncol*. Apr; 2009; 10(4):321-2.
- Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Straif, K.. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2012. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol*. 2012; 13 (4), 339–340.
- Boyapati A, Wilson M, Yu J, Rundell K.. SV40 17KT antigen complements dna j mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts *Virology*. 2003 Oct 10;315(1):148-58.

- Brunner AH, Grimm C, Polterauer S, Hefler L, Stani J, Heinze G, Horvat R. The prognostic role of human papillomavirus in patients with vaginal cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Jul;21(5):923-9.
- Bryan JT, Taddeo F, Skulsky D, Jansen KU, Frain BM, Qadadri B, Brown DR. Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol*. 2006 Jan;78(1):117-24.
- Buchkovich, N. J., Yu, Y., Zampieri, C. A. & Alwine, J. C.. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nature Rev. Microbiol*. 2008; 6, 266–275.
- Buck, C.B., Phan, G.Q., Raiji, M.T., Murphy, P.M., McDermott, D.H., McBride, A.A.. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol*. 2012; 86 (19), 10887.
- Buehring GC, Choi KY, Jensen HM. Bovine Leukemia virus in breast tissues. Meeting abstracts 23rd Congress of the International Association for Breast Cancer Research -Düsseldorf, Germany. *Breast Cancer Res* 2001, 3(1):S1–S24.
- Burd E. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):1-17.
- Burmester GR, Winchester RJ, Dimitriu-Bona A, Klein M, Steiner G, Sissons HA. Delineation of four cell types comprising the giant cell tumor of bone. Expression of Ia and monocyte-macrophage lineage antigens. *J Clin Invest*. 1983 Jun;71(6):1633-48.
- Burnett-Hartmann AN, Newcomb PA, Potter JD (2008) Infectious agents on colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:2970–2979.
- Campanacci M, Kotz R, Gennari L, Matejovsky Z, Nilsson U, Salzer-Kuntschik M, Souhami R, Trifaud A, van der Eijken J, Winkler K. Centralized diagnosis and treatment of bone and soft tissue tumors. *J Chemother*. 1989 Aug;1(4):277-8.
- Campanacci M, Ruggieri P. Osteosarcoma. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 1992;130(4):259-64.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
- Carbone M, Rizzo P, Procopio A, Giuliano M, Pass HI, Gebhardt MC, Mangham C, Hansen M, Malkin DF, Bushart G, Pompetti F, Picci P, Levine AS, Bergsagel JD, Garcea RL. SV40-like sequences in human bone tumors. *Oncogene*. 1996 Aug 1;13(3):527-35.

Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A.. Viral infections as a cause of cancer. *Int. J. Oncol.* 2007; 30 (6): 1521–8.

Casiraghi, C., K. Dorovini-Zis, and M.S. Horwitz, Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2011. 230(1-2): p. 173-7.

Cason J, Mant CA. High-risk mucosal human papilloma virus infections during infancy & childhood. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S52–S58.

Cazzaniga M, Gheit T, Casadio C, Khan N, Macis D, Valenti F, Miller MJ, Sylla BS, Akiba S, Bonanni B, Decensi A, Veronesi U, Tommasino M. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Apr;114(3):599-605.

CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006, Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL.

Chamberlain, M. C. (2006). "Treatment options for glioblastoma." *Neurosurg Focus* 20(4): E19.

Chang, Y. et al.. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 265, 1865–1869.

Chapagain, M.L., et al., Polyomavirus JC infects human brain microvascular endothelial cells independent of serotonin receptor 2A. *Virology*, 2007. 364(1): p. 55-63.

Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4549-53.

Chen AC, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA, Antonsson A. Human papilloma virus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol.* 2009;81:1792–1796.

Chen J, Tobin GJ, Pipas JM, Van Dyke T.. T-antigen mutant activities in vivo: roles of p53 and pRB binding in tumorigenesis of the choroid plexus. *Oncogene.* 1992; Jun;7(6):1167-75.

Chen J., BA., Victoria Tsai, MS, Whitney E. Parker, BA, Eleonora Aronica, MD, PhD Marianna Baybis, MS, and Peter B. Crino, MD, PhD. Detection of Human Papillomavirus in Human Focal Cortical Dysplasia Type IIB. *ANN NEUROL* 2012;72:881–892.

Chen TH, Huang CC, Yeh KT, Chang SH, Chang SW, Sung WW, Cheng YW, Lee H. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012 Aug 14;18(30):4051-8.

Chen Y, Xu Y, Bao Q, Xing Y, Li Z, Lin Z, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y. Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; Jun;14(6):527-34.

Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995 Oct 1;9(19):2335-49.

Cheng YW Chiou HL, Sheu GT, et al. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res.* 2001;61:2799-2803.

Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, Lee H. Human papilloma virus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res.* 2007;67:10686–10693.

Cheng, J., DeCaprio, J.A., Fluck, M.M., Schaffhausen, B.S.. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19 (4), 218–228.

Chesters, P.M., Heritage, J., McCance, D.J.. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J. Infect Dis.* 1983; 147 (4), 676–684.

Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, Lee H. The presence of human papilloma virus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. *Cancer.* 2003;97:1558–1563.

Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol.* 1991 Nov;65(11):5933-43.

Choo, Q. L. et al..Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244, 359–362.

Cicala C, Pompetti F, Carbone M. SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am J Pathol.* 1993 May;142(5):1524-33.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/26-34.

Cooper K, Herrington CS, Stickland JE, Evans MF, McGee JO. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol.* 1991 Dec;44(12):990-6.

Costa S, Venturoli S, Mennini SS, Marcellusi A, Pesaresi M, Leo E, Falasca A, Marra E, Cricca M, Santini D, Zerbini M, Pelusi G. Population-based frequency assessment of HPV-induced lesions in patients with borderline Pap tests in the Emilia-Romagna Region: the PATER study. *Current Med Research & Opinion* 2011; 37(3):569-78.

Coutts AS, La Thangue NB. Mdm2 widens its repertoire. *Cell Cycle.* 2007 Apr 1;6(7):827-9.

Coyne, C.B., K.S. Kim, and J.M. Bergelson, Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *EMBO J.* 2007. 26(17): p. 4016-28.

Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, et al. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109:55-58.

Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG 3rd, Dürst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 1987 Dec 1;6(12):3745-53.

Croce CM. "Oncogenes and cancer". *The New England Journal of Medicine* 2008; 358 (5): 502–11.

Dahlin DC, Coventry MB. Osteogenic sarcoma. A study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1967 Jan;49(1):101-10.

Dahlin DC, Unni KK. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. *Am J Surg Pathol.* 1977 Mar;1(1):61-72.

Darbinyan A, Siddiqui KM, Slonina D, Darbinian N, Amini S, White MK, Khalili K. Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. *J Virol.* 2004 Aug;78(16):8593-600.

David H, Mendoza S, Konishi T, Miller CW. Simian virus 40 is present in human lymphomas and normal blood. *Cancer Lett.* 2001 Jan 10;162(1):57-64.

Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14252-7.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 2003 Mar 1;307(1):1-11.

- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995 Apr;76 (Pt 4):1057-62.
- de Ronde A, Sol CJ, van Strien A, ter Schegget J, van der Noordaa J.. The SV40 small t antigen is essential for the morphological transformation of human fibroblasts. *Virology.* 1989 Jul;171(1):260-3.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):R1-11.
- DeGregori J, Johnson DG.. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med.* 2006 Nov;6(7):739-48.
- Del Valle L, Gordon J, Assimakopoulou M, Enam S, Geddes JF, Varakis JN, Katsetos CD, Croul S, Khalili K. Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res.* 2001 May 15;61(10):4287-93.
- Del Valle L, Gordon J, Enam S, Delbue S, Croul S, Abraham S, Radhakrishnan S, Assimakopoulou M, Katsetos CD, Khalili K. Expression of human neurotropic polyomavirus JCV late gene product agnoprotein in human medulloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Feb 20;94(4):267-73.
- Del Vecchio AM., H Romanczuk, P M Howley, and C C Baker . Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol.* 1992 October; 66(10): 5949–5958.
- Delbue S, Pagani E, Guerini FR, Agliardi C, Mancuso R, Borghi E, Rossi F, Boldorini R, Veggiani C, Car PG, Ferrante P. Distribution, characterization and significance of polyomavirus genomic sequences in tumors of the brain and its covering. *J Med Virol.* 2005 Nov;77(3):447-54.
- Delbue S, Tremolada S, Elia F, Carloni C, Amico S, Tavazzi E, Marchioni E, Novati S, Maserati R, Ferrante P. Lymphotropic polyomavirus is detected in peripheral blood from immunocompromised and healthy subjects. *J Clin Virol.* 2010 Feb;47(2):156-60.
- Dhar R, Subramanian KN, Pan J, Weissman SM. Structure of a large segment of the genome of simian virus 40 that does not encode known proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(3):827-31.
- Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;21(2):95-100.

Diamandopoulos GT. Leukemia, lymphoma, and osteosarcoma induced in the Syrian golden hamster by simian virus 40. *Science*. 1972 Apr 14;176(4031):173-5.

Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*. 2000 Aug;81(Pt 8):1967-73.

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Napthine S, Sterling J, Winter G, Griffin H. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*. 1997 Nov 10;238(1):40-52.

Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):203-10.

Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, Zheng Y, Gordon J, Khalili K, Letvin NL, Koralnik IJ. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. *J Virol*. 2004;78(18):10206-10.

Duensing, S. et al.. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97, 10002–10007.

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis*. 2006; Jun;8(2):62-7.

Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*. 1987;1(3):251-6.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2245-62.

Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, Soroceanu L, Cobbs CS; HCMV and Gliomas Symposium. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012 Mar;14(3):246-55. doi: 10.1093/neuonc/nor227. Epub 2012 Feb 8.

EDDY BE, BORMAN GS, GRUBBS GE, YOUNG RD Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology*. 1962 May;17:65-75.

Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK, Roth BL, Atwood WJ. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science*. 2004; Nov 19;306(5700):1380-3.

Elsner C, Dörries K. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology*. 1992 Nov;191(1):72-80.

Emri S, Kocagoz T, Olut A, Güngen Y, Mutti L, Baris YI. Simian virus 40 is not a cofactor in the pathogenesis of environmentally induced malignant pleural mesothelioma in Turkey. *Anticancer Res*. 2000 Mar-Apr;20(2A):891-4.

Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 15, 702–703.

Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM: Prognostic factors in chondrosarcoma of bone. A clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 1977, 40:818-831.

Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol*. 2003 Jun 11;3(1):2.

Evans MF, Mount SL, Beatty BG, Cooper K. Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol*. 2002 Dec;15(12):1339-47.

Fearon ER, Vogelstein B.. "A genetic model for colorectal tumorigenesis". *Cell* 1990; 61 (5): 759–67.

Felsani A, Mileo AM, Paggi MG.. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*. 2006 Aug 28;25(38):5277-85.

Felsani A., A M Mileo and M G Paggi.Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene* (2006) 25, 5277–5285.

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S.. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319, 1096–1100.

Fredericks DN, Relman DA.. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiology Reviews* 9 (1): 1996; 18–33.

Frega A, Lorenzon L, Bononi M, De Cesare A, Ciardi A, Lombardi D, Assorgi C, Gentile M, Moscarini M, Torrisi MR, French D. Evaluation of E6 and E7 mRNA expression in HPV DNA positive breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33(2):164-7.

Fuchs B, Pritchard DJ. Review Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Apr; (397):40-52.

Fule T, Mathe M, Suba Z, et al. The presence of human papillomavirus 16 in neural structures and vascular endothelial cells. *Virology* 2006;348:289–296.

Furnari, F.B., et al., Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 2007. 21(21): p. 2683-710.

Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol*. 1990 Feb;64(2):723-30.

Gallo, R. C.. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 2005; 24, 5926–5930.

Gamberi G, Benassi MS, Pompetti F, Ferrari C, Ragazzini P, Sollazzo MR, Molendini L, Merli M, Magagnoli G, Chiesa F, Gobbi AG, Powers A, Picci P. Presence and expression of the simian virus-40 genome in human giant cell tumors of bone. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 May;28(1):23-30.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B..New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971 Jun 19;1(7712):1253-7.

Garimella R, Liu X, Qiao W, Liang X, Zuiderweg ER, Riley MI, Van Doren SR.. Hsc70 contacts helix III of the J domain from polyomavirus T antigens: addressing a dilemma in the chaperone hypothesis of how they release E2F from pRb. *Biochemistry*. 2006 Jun 6;45(22):6917-29.

Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, Chow LT, Broker TR, Fisher C. Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9041-50.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 2007 May 4;3(5).

Genovese C, Trani D, Caputi M, Claudio PP.. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene*. 2006 Aug 28;25(38):5201-9.

Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Garcia-Bragado F, Dikshit R, Boffetta P, Merletti F. Source. Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology*. 2007 Jun;39(3):345-8.

Giorgi Rossi P, Chini F, Borgia P, Guasticchi G, Carozzi FM, Confortini M, Angeloni C, Buzzoni C, Buonaguro FM; Gruppo di lavoro HPV Prevalenza. Human Papilloma Virus (HPV), cervical cancer incidence and screening uptake: differences among Northern, Central and Southern Italy. *Epidemiol Prev*. 2012 Mar-Apr;36(2):108-19.

Glenn WK, Whitaker NJ, Lawson JS. High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk. *BMC Res Notes*. 2012 Sep 1;5:477.

Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, Jensen RH. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diag* 2000; 2(2).

Goldring SR, Roelke MS, Petrisson KK, Bhan AK. Human giant cell tumors of bone identification and characterization of cell types. *J Clin Invest*. 1987 Feb;79(2):483-91.

Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*. 2001 Aug;75(16):7583-91.

Goon P, Sonnex C, Jani P, Stanley M, Sudhoff H. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur arch Otorhinolaryngol* 2008; 265(2):147-151.

Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;39(2):197-202.

Gordon-Shaag A, Ben-Nun-Shaul O, Roitman V, Yosef Y, Oppenheim A. Cellular transcription factor Sp1 recruits simian virus 40 capsid proteins to the viral packaging signal, *ses*. *J Virol*. Jun; 2002; 76(12):5915-24.

Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, Arndt C, Beardsley GP, Bernstein M, Bridge J, Cheung NK, Dome JS, Ebb D, Gardner T, Gebhardt M, Grier H, Hansen M, Healey J, Helman L, Hock J, Houghton J, Houghton P, Huvos A, Khanna C, Kieran M, Kleinerman E, Ladanyi M, Lau C, Malkin D, Marina N, Meltzer P, Meyers P, Schofield D, Schwartz C, Smith MA, Toretsky J, Tsokos M, Wexler L, Wigginton J, Withrow S, Schoenfeldt M, Anderson B. Review Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 15; 9(15):5442-53

Gøtzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 4.

Grassmann K., B Rapp, H Maschek, K U Petry, and T Iftner. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol*. 1996 April; 70(4): 2339–2349.

Gross L.. “Spontaneous” leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1951; 76, 27–32.

Gross, L.. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1953; 83(2), 414–421.

Haas-Kogan DA, Prados MD, Lamborn KR, et al. Biomarkers to predict response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cell Cycle.* 2005;4(10):1369-72.

Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, King JE, Elenbaas B, Sabatini DM, DeCaprio JA, Weinberg RA.. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol.*; 2002 Apr;22(7):2111-23.

Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006 Apr 15;367(9518):1247-55.

Hein, J. et al.. Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *J. Virol.* 2009; 83, 117–127.

Heinsohn S, Golta S, Kabisch H, zur Stadt U. Standardized detection of Simian virus 40 by real-time quantitative polymerase chain reaction in pediatric malignancies. *Haematologica.* 2005 Jan;90(1):94-9.

Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM: Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CINIII). *Breast Cancer Res Treat* 1999, 53:121–135.

Hernández-Losa J, Fedele CG, Pozo F, Tenorio A, Fernández V, Castellví J, Parada C, Ramón y Cajal S .Lack of association of polyomavirus and herpesvirus types 6 and 7 in human lymphomas. *Cancer.* 2005 Jan 15;103(2):293-8.

Hill AB.. "The Environment and Disease: Association or Causation?". *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965; 58 (5): 295–300.

Hino R, Uozaki H, Inoue Y, et al. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: surviving up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res* 2008; 68: 1427–35.

Hirsch, H.H.. Polyoma and papilloma virus infections after hematopoietic stem cell or solid organ transplantation. In: Bowden, P., Ljungman, P., Snyderman, D.R. (Eds.), *Transplant Infections*, Third ed Lippincott Williams & Wilkins, 2010; pp. 465–482.

Hirvonen A, Mattson K, Karjalainen A, Ollikainen T, Tammilehto L, Hovi T, Vainio H, Pass HI, Di Resta I, Carbone M, Linnainmaa K. Simian virus 40 (SV40)-like DNA sequences not detectable in Finnish mesothelioma patients not exposed to SV40-contaminated polio vaccines. *Mol Carcinog.* 1999 Oct;26(2):93-9.

- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):423-8.
- Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. J. RESPONSE: re: natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Natl Cancer Inst.* 1999 Aug 18;91(16):1420A-1421.
- Horvath CJ, Simon MA, Bergsagel DJ, Pauley DR, King NW, Garcea RL, Ringler DJ. Simian virus 40-induced disease in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Pathol.* 1992 Jun;140(6):1431-40.
- Huang H, Reis R, Yonekawa Y, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen. *Brain Pathol.* 1999 Jan;9(1):33-42.
- Huang WY., Timothy M. Sheehy, Lee E. Moore, Ann W. Hsing, and Mark P. Purdue. Simultaneous Recovery of DNA and RNA from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue and Application in Epidemiologic Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:973-977.
- Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 1993 Dec 25;21(25):5817-23.
- Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38:103-113.
- Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol.* 1992 Oct;66(10):6070-80.
- IARC. Hepatitis viruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.*1994; 59: 1–255.
- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, et al. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene.* 1996;13(5):1065-72.
- Imperiale MJ.. Oncogenic transformation by the human polyomaviruses.*Oncogene.* 2001; Nov 26;20(54):7917-23.
- Imperiale, M.J., and Major, E. O. Polyomaviruses, In *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley , eds (Lippincott Williams); 2007; pp. 2263-2298.
- International Agency for Research on Cancer. *IARC Handbooks of cancer prevention*, vol 7: breast cancer screening. IARC Press 2002.
- Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, et al. Genome-wide, highresolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res* 2007;67:2544–51.

Jagasia AA, Block JA, Qureshi A, Diaz MO, Nobori T, Gitelis S, Iyer AP. Chromosome 9 related aberrations and deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in human chondrosarcomas. *Cancer Lett.* 1996 Jul 19;105(1):91-103.

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001 Feb 1;353(Pt 3):417-39.

Jeang, K. T., Giam, C. Z., Majone, F. & Aboud, M.. Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 31991–31994.

Jeffrey SS, Lonning PE. Genoma-based prognosis and therapeutic prediction in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2005; 3:291-300.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.

Jenkin RD, Allt WE, Fitzpatrick PJ. Osteosarcoma. An assessment of management with particular reference to primary irradiation and selective delayed amputation. *Cancer.* 1972 Aug;30(2):393-400.

Jennifer T. Thomas, Stephen T. Oh, Scott S. Terhune, and Laimonis A. Laimins. Cellular Changes Induced by Low-Risk Human Papillomavirus Type 11 in Keratinocytes That Stably Maintain Viral Episomes. *J Virol.* 2001 August; 75(16): 7564–7571.

Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood, W.J., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Major, E.O., Ramqvist, T., Norkin, L.C. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 2011; 156 (9), 1627–1634.

Johnston J. Giant cell tumor of bone. The role of the giant cell in orthopedic pathology. *Orthop Clin North Am.* 1977 Oct;8(4):751-70.

Joshi D, Case BG. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135(1):1-15.

Kämper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol.* 2006 Jan;80(2):759-68.

Key J, Hodgson S, Omar RZ, Jensen TK, Thompson SG, Boobis AR, Davies DS, Elliott P. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* 2006; 17:759-770.

Key TJ, Verkasalo PK, Banks. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2:133-140.

Khalili K, Del Valle L, Otte J, Weaver M, Gordon J. Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5181-91.

Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *British J Can* 2008; 99:408-414.

Kim K, Greenfield W, Shotts E, Nakagawa. Detection of Human Papillomavirus Type 16-Specific T Lymphocytes by a Recombinant Vaccinia Virus-Based Enzyme-Linked Immunospot Assay. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007; 14:362-368.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):12180-4.

KIRSCHSTEIN RL, GERBER P. Ependymomas produced after intracerebral inoculation of SV40 into new-born hamsters. *Nature*. 1962 Jul 21;195:299-300.

Kitamura T, Aso Y, Kuniyoshi N, Hara K, Yogo Y. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis*. 1990 Jun;161(6):1128-33.

Kleter, B., L. J. van Doorn, J. ter Schegget, L. Schrauwen, C. van Krimpen, M. P. Burger, B. ter Harmsel, and W. G. V. Quint. 1998. A novel shortfragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* 153:1731–1739.

Knight RS, Hyman NM, Gardner SD, Gibson PE, Esiri MM, Warlow CP.. Progressive multifocal leucoencephalopathy and viral antibody titres. *J Neurol*. 1988; 235(8):458-61.

Knudson AG.. "Two genetic hits (more or less) to cancer". *Nature reviews. Cancer* 1 (2): 2001; 157–62.

Koshiol J, Rotunno M, Gillison ML, et al. Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:501-507.

Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997 May 5;102(5A):3-8.

Krober SM, Greschniok A, Brohm P, Kaiserling E. Giant cell tumor of bone. Morphological, immunohistochemical, morphometric and DNA flow cytometric findings. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1998;82:279-83.

Krynska B, Otte J, Franks R, Khalili K, Croul S. Human ubiquitous JCV(CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene*. 1999 Jan 7;18(1):39-46.

La Placa M. *Principi di Microbiologia Medica* 12 edizione 2010. Società editrice Esculapio.

Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7484-9.

Lai CH, Chang CJ, Huang HJ, Hsueh S, Chao A, Yang JE, Lin CT, Huang SL, Hong JH, Chou HH, Wu TI, Huang KG, Wang CC, Chang TC. Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3628-34.

Lakhani SR, Gusterson BA et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):782-9.

Larsson SE, Lorentzon R. The incidence of malignant primary bone tumours in relation to age, sex and site. A study of osteogenic sarcoma, chondrosarcoma and Ewing's sarcoma diagnosed in Sweden from 1958 to 1968. *J Bone Joint Surg Br*. 1974 Aug;56B(3):534-40.

Lawson JS, Glenn WK, Whitaker NJ (2008) Breast cancer, human papilloma virus and sexual activities. *Br J Cancer* 98: 510–511.

Lawson JS, Kan CY, Iacopetta BJ, Whitaker NJ. Are some breast cancers sexually transmitted? *Br J Cancer*. 2006 Dec 18;95(12):1708.

Lawson JS. Do viruses cause Breast Cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 471(21):421-38.

Lawson JS; Heng B. Viruses and breast cancer. *Cancer* 2010; 2:752-772.

Lazutka JR, Neel JV, Major EO, Dedonyte V, Mierauskine J, Slapsyte G, Kesminiene A. High titers of antibodies to two human polyomaviruses, JCV and BKV, correlate with increased frequency of chromosomal damage in human lymphocytes. *Cancer Lett*. 1996 Dec 3;109(1-2):177-83.

Lechner MS. and L A Laimins. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 1994 July; 68(7): 4262–4273.

Lednický JA, Garcea RL, Bergsagel DJ, Butel JS. Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors. *Virology*. 1995 Oct 1;212(2):710-7.

- Lednický JA, Stewart AR, Jenkins JJ 3rd, Finegold MJ, Butel JS. SV40 DNA in human osteosarcomas shows sequence variation among T-antigen genes. *Int J Cancer*. 1997 Sep 4; 72(5):791-800.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:9–22.
- Levine, A. J.. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: the inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 2009; 384, 285–293.
- Li N, Bi X, Zhang Y, Zhao P, Zheng T, Dai M. Human Papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126(2):515-520.
- Li RM, Branton MH, Tanawattanacharoen S, Falk RA, Jennette JC, Kopp JB. Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Sep;13(9):2320-30.
- Li X and P Coffino. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*. 1996 July; 70(7): 4509–4516.
- Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, Clark JR, Wein RO, Grillone GA, Houseman EA, Halec G, Waterboer T, Pawlita M, Krane JF, Kelsey KT. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012 Oct 1;72(19):5004-13
- Liang, C., Lee, J. S. & Jung, J. U.. Immune evasion in Kaposi's sarcoma-associated herpes virus associated oncogenesis. *Semin. Cancer Biol*. 2008; 18, 423–436.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985;313(5998):144-7.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. & Wigler, M.. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993; 259, 946–951.
- Little SE, Vuononvirta R, Reis-Filho JS, et al. Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffinembedded tumor DNA. *Genomics* 2006;87:298–306.
- Lonardo DA, Venuti A, Marcante ML: Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 21:95–100.
- London WT, Houff SA, McKeever PE, Wallen WC, Sever JL, Padgett BL, Walker DL. Viral-induced astrocytomas in squirrel monkeys. *Prog Clin Biol Res*. 1983;105:227-37.

Lopez M, Amodio A. Molecular Classification of breast cancer. Are we ready to use it in clinical practice? *Annali degli Ospedali, San Camillo e Forlanini* 2008; 10(4): 247-249.

Lorenzon Laura & Mario Ferri & Emanuela Pillozzi & Maria Rosaria Torrisi & Vincenzo Ziparo & Deborah French. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. *Int J Colorectal Dis* (2011) 26:135–142.

Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, IARC.

Lowy DL, Howley PM. *Field Virology* 4th Edition 2001 Vol.2. Chapter 65-66.

Lu Z, Hu X, Li Y, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin. *J Biol Chem* 2004;279:35664–35670.

M Hummel, J B Hudson, and L A Laimins. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol.* 1992 October; 66(10): 6070–6080.

M Müller, L Gissmann, R J Cristiano, X Y Sun, I H Frazer, A B Jenson, A Alonso, H Zentgraf, and J Zhou Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol.* 1995 February; 69(2): 948–954.

Major EO.. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med.*; 2010; 61:35-47.

Mandahl N, Heim S, Arheden K, Rydholm A, Mitelman F. Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. *Cancer.* 1990 Jan 15;65(2):242-8.

Manos MM, Ting Y, Wright DK et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 1989;7:209–214.

Mantovani F, Banks L.. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001 Nov 26;20(54):7874-87.

Martini F, Iaccheri L, Lazzarin L, Carinci P, Corallini A, Gerosa M, Iuzzolino P, Barbanti-Brodano G, Tognon M. SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res.* 1996 Oct 15;56(20):4820-5.

Matsuoka, M. & Green, P. L.. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 2009; 6, 71.

McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology.* 1999 Sep 1;261(2):271-9.

Mendoza SM, Konishi T, Miller CW. Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. *Oncogene*. 1998 Nov 12; 17(19):2457-62.

Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C.. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* 2010;10: 707-719.

Miller NR, McKeever PE, London W, Padgett BL, Walker DL, Wallen WC. Brain tumors of owl monkeys inoculated with JC virus contain the JC virus genome. *J Virol*. 1984 Mar;49(3):848-56.

Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4754-62.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*. 1990 Dec 21;250(4988):1694-9.

Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection., *B J Virol*. 1998 Dec;72(12):9918-23.

Moody CA, Laimins LA .. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10 (8): 550-560.

Moore, P. S. & Chang, Y.. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Microbiol.*. 2003; 57, 609–639.

Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1171-7.

Morrison C, Radmacher M, Mohammed N, et al. MYC Amplification and polysomy 8 in chondrosarcoma: array comparative genomic hybridization, fluorescent in situ hybridization, and association with outcome. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 9369–76.

Morrow M, Waters J, Morris E. MRI for breast cancer screening, diagnosis, and treatment. *Lancet*. 2011;378(9805):1804-11.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001 Nov 26;20(54):7888-98.

Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989 Dec 20;8(13):4099-105.

Munger, K. et al.. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989; 8, 4099–4105.

- Nesper J, Smith RW, Kautz AR, Sock E, Wegner M, Grummt F, Nasheuer HP.. A cell-free replication system for human polyomavirus JC DNA. *J Virol*. 1997 Oct;71(10):7421-8.
- Oda Y, Sakamoto A, Saito T, Matsuda S, Tanaka K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Secondary malignant giant-cell tumour of bone: molecular abnormalities of p53 and H-ras gene correlated with malignant transformation. *Histopathology*. 2001 Dec;39(6):629-37.
- Ohara, Y., M. Honma, and Y. Iwasaki. 1992. Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation. *J. Virol. Methods* 37:83–88.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." *Acta Neuropathol* 109(1): 93-108.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6): 479-89.
- Ohsumi S, Motoi M, Ogawa K.. Induction of undifferentiated tumors by JC virus in the cerebrum of rats. *Acta Pathol Jpn*. 1986 Jun;36(6):815-25.
- Okun MM, Day PM, Greenstone HL, Booy FP, Lowy DR, Schiller JT, Roden RB. L1 interaction domains of papillomavirus 12 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol*. 2001 May;75(9):4332-42.
- Olson, J. J. and T. Ryken (2008). "Guidelines for the treatment of newly diagnosed glioblastoma: introduction." *J Neurooncol* 89(3): 255-8.
- Oosting J, Lips EH, van ER, et al. High-resolution copy number analysis of paraffin-embedded archival tissue using SNP BeadArrays. *Genome Res* 2007;17:368–76.
- Oshiro Y, Chaturvedi V, Hayden D, Nazeer T, Johnson M, Johnston DA, Ordóñez NG, Ayala AG, Czerniak B. Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study. *Cancer*. 1998 Dec 1;83(11):2324-34.
- Overholtzer M, Rao PH, Favis R, et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11547–52.
- Ozisk YY, Meloni AM, Peier A, Altungoz O, Spanier SS, Zalupski MM, Leong SP, Sandberg AA.. Cytogenetic findings in 19 malignant bone tumors. *Cancer*. 1994 Oct 15;74(8):2268-75.
- Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971 Jun 19;1(7712):1257-60.

- Palmiter RD, Chen HY, Messing A, Brinster RL. SV40 enhancer and large-T antigen are instrumental in development of choroid plexus tumours in transgenic mice. *Nature*. 1985 Aug 1-7;316(6027):457-60.
- Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/11-25
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P.. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*. 2002; 55, 74–108.
- Parkin, DM.. "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002". *International Journal of Cancer* 2006; 118 (12): 3030–44.
- Parsonnet, J.. *Microbes and malignancy: infection as a cause of human cancers* Oxford Univ. Press 1999.
- Parton RG, Simons K.. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):185-94.
- Patel, S M Huang, L A Baglia, and D J McCance. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. 1999 September 15; 18(18): 5061–5072.
- Peden KW, Srinivasan A, Vartikar JV, Pipas JM.. Effects of mutations within the SV40 large T antigen ATPase/p53 binding domain on viral replication and transformation. *Virus Genes.*; 1998; 16(2):153-65.
- Perrons, C., B. Kleter, R. Jelley, H. Jalal, W. Quint, and R. Tedder. 2002. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J. Med. Virol*. 67:246–252.
- Pirisi L., S Yasumoto, M Feller, J Doniger, and J A DiPaolo Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol*. 1987 April; 61(4): 1061–1066.
- Poiesz, B. J. et al.. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1980; 77, 7415–7419.
- Prives C, Gilboa E, Revel M, Winocour E.. Cell-free translation of simian virus 40 early messenger RNA coding for viral T-antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; Feb;74(2):457-61.
- Purow B, Schiff D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nat Rev Neurol*. 2009;5(8):419-26.

Qu, W., G. Jiang, Y. Cruz, C. J. Chang, G. Y. Ho, R. S. Klein, and R. D. Burk. 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5/GP6 primer systems. *J. Clin. Microbiol.* 35:1304–1310.

Querbes W, O'Hara BA, Williams G, Atwood WJ.. Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J Virol.* 2006; oct; 80(19):9402-13.

Raj K, Stanley MA. The ATP-binding and ATPase activities of human papillomavirus type 16 E1 are significantly weakened by the absence of prolines in its ATP-binding domain. *J Gen Virol.* 1995 Dec;76 (Pt 12):2949-56.

Ray, F.A., Meyne, J., Kraemer, P.M., 1992. SV40 T antigen induced chromosomal changes reflect a process that is both clastogenic and aneuploidogenic and is ongoing throughout neoplastic progression of human fibroblasts. *Mutat. Res.* 284, 265– 273.

Ray, F.A., Peabody, D.S., Cooper, J.L., Cram, L.S., Kraemer, P.M., 1990. SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 42, 13–31.

Reddy VB, Thimmappaya B, Dhar R, Subramanian KN, Zain BS, Pan J, Ghosh PK, Celma ML, Weissman SM. The genome of simian virus 40. *Science.* 1978 May 5;200(4341):494-502.

Rheis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52:108-118.

Ricciardiello L, Chang DK, Laghi L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol.* 2001 Feb;75(4):1996-2001.

Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE, Boland CR. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2000 Nov;119(5):1228-35.

Ricciardiello, L., Baglioni, M., Giovannini, C., Pariali, M., Cenacchi, G., Ripalti, A., Landini, M.P., Sawa, H., Nagashima, K., Frisque, R.J., Goel, A., Boland, C.R., Tognon, M., Roda, E., Bazzoli, F., 2003. Induction of chromosomal instability in colonic cells by the human polyomavirus JC virus. *Cancer Res* 63, 7256–7262.

Rickinson A, Kieff E.. Epstein-Barr virus. In *Fields Virology*, Knipe DM, Howley PM (a cura di) edn 5^o, pp 2603-2654, 2006, Lippincott.

Robbins SL, Ramzi C, Kumar V. *Le basi patologiche delle malattie. Vol II, 4^o edizione, Casa editrice Piccin.*

Roberge, C., Bastin, M.. Site-directed mutagenesis of the polyomavirus genome: replication-defective large T mutants with increased immortalization potential. *Virology* 1988; 162, 144–150.

Rous, P.. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl). *J. Exp. Med.* 12, 696–705. Rous, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 1911; 13, 397–411.

Rundell K, Gaillard S, Porrás A.. Small-t and large-T antigens cooperate to drive cell proliferation. *Dev Biol Stand.* 1998; 94:289-95.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):495-505.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990 Dec 21;63(6):1129-36.

Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol.* 1987 Oct;61(10):3295-8.

Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, Cleton-Jansen AM, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Bovée JV. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9A):2843-52.

Sciacca P, Benini B, Marinelli C, Borrello M, Massi G. Cancer of the male breast. *Minerva Chir* 2000, 55(5):307-12.

Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kuhn, J., Hengel, H., Ehlers, B.. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV). *J. Virol.* 2011; 85 (9), 4586–4590.

Sedman J. and A Stenlund. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J.* 1995 December 15; 14(24): 6218–6228.

Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 2003 Dec;77(24):13125-35.

Shah KV, McCrumb FR Jr, Daniel RW, Ozer HL. Serologic evidence for a simian-virus-40-like infection of man. *J Natl Cancer Inst.* 1972 Feb;48(2):557-61.

Sherr CJ.. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):663-73.

Shin SK, Li MS, Fuerst F, Hotchkiss E, Meyer R, Kim IT, Goel A, Boland CR. Oncogenic T-antigen of JC virus is present frequently in human gastric cancers. *Cancer*. 2006 Aug 1;107(3):481-8.

Shivapurkar N, Harada K, Reddy J, Scheuermann RH, Xu Y, McKenna RW, Milchgrub S, Kroft SH, Feng Z, Gazdar AF. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. *Lancet*. 2002 Mar 9;359(9309):851-2.

Shope, R. E.. & Hurst, E. W. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* 1933; 58, 607–624

Shuda, M., Feng, H., Kwun, H.J., Rosen, S.T., Gjoerup, O., Moore, P.S., Chang, Y.. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105, 16272–16277.

Siebrasse, E.A., Reyes, A., Lim, E.S., Zhao, G., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., Wang, D.. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J. Virol.* 2012; 86 (19), 10321–10326.

Silva RG Jr, Silva BB. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:261-264.

Simões PW, Medeiros LR, Simões Pires PD, Edelweiss MI, Rosa DD, Silva FR, Silva BR, Rosa MI. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: A systematic review. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22(3):343-7.

Small, M. B., Gluzman, Y. & Ozer, H. L.. Enhanced transformation of human fibroblasts by origin-defective simian virus 40. *Nature* 1982; 296, 671–672.

Sørli T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Canc* 2004; 40:2667-2675.

Spangle JM, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J Virol* 2010;84:9398–9407.

Steger G. and S Corbach. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 1997 January; 71(1): 50–58.

Stewart, S.E., Eddy, B.E., Borgese, N.. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 1958; 20 (6), 1223–1243.

Straight S.W., P M Hinkle, R J Jewers, and D J McCance. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol.* 1993 August; 67(8): 4521–4532.

Stratton K., Almario DA. Immunization safety review: SV40 contamination of polio vaccine and cancer. Inst. of Med. of Nat. Acad. : The National Academies Press, 2002, pp. 1-101.

Stubenrauch F, Laimins L A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:379–386.

Stubenrauch F., Hock B. Lim,† and Laimonis A. Laimins. Differential Requirements for Conserved E2 Binding Sites in the Life Cycle of Oncogenic Human Papillomavirus Type 31. *J Virol.* 1998 February; 72(2): 1071–1077.

Sullivan CS, Cantalupo P, Pipas JM.. The molecular chaperone activity of simian virus 40 large T antigen is required to disrupt Rb-E2F family complexes by an ATP-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;20(17):6233-43.

Sweet, B.H., Hilleman, M.R..The vacuolating virus, S.V.40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960; 105,420–427.

Syrjanen K. Detection of human papillomavirus in lung cancer: systematic review and meta- nalysis. *Anticancer Res.* 2012; 32:3235-3250.

Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A.. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol.* 2005; Aug 29;170(5):769-79.

Tan CS, Dezube BJ, Bhargava P, Autissier P, Wüthrich C, Miller J, Koralknik IJ. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. *J Infect Dis.* 2009 Mar 15;199(6):881-8

Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Sep;466(9):2114-30.

Theiler RN, Farr SL, Karon JM, Paramsothy P, Viscidi R, Duerr A, Cu-Uvin S, Sobel J, Shah K, Klein RS, Jamieson DJ. High-risk human papillomavirus reactivation in human immunodeficiency virus-infected women: risk factors for cervical viral shedding. *Obstet Gynecol* 2010; 115(6):1150-8.

Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8449-54.

Tiemann F, Deppert W. Stabilization of the tumor suppressor p53 during cellular transformation by simian virus 40: influence of viral and cellular factors and biological consequences. *J Virol.* 1994 May;68(5):2869-78.

- Trabanelli C, Corallini A, Gruppioni R, Sensi A, Bonfatti A, Campioni D, Merlin M, Calza N, Possati L, Barbanti-Brodano G.. Chromosomal aberrations induced by BK virus T antigen in human fibroblasts. *Virology*. 1998 Apr 10;243(2):492-6.
- Trowbridge PW, Frisque RJ.. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol*. 1995 Jun;1(2):195-206.
- Tsai, W. L. & Chung, R. T.. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010; 29, 2309–2324.
- Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(1):6-13.
- van der Meijden, E., Janssens, R.W., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J.N., Gorbalenya, A.E., Feltkamp, M.C.. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*. 2010; 6 (7).
- Van Dyke T.. p53 and tumor suppression. *N Engl J Med*. 2007 Jan 4;356(1):79-81.
- Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijgert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papilloma virus. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:862–874.
- Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med*. 2003 Jun 1;114(8):675-84.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE, Olsson SE, Steinwall M, Brown DR, Kurman RJ, Ronnett BM, Stoler MH, Ferenczy A, Harper DM, Tamms GM, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Jansen KU, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. 2005 May;6(5):271-8.
- Wakita, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med*.. 2005; 11, 791–796.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12-9.
- Walker DL, Padgett BL, ZuRhein GM, Albert AE, Marsh RF. Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science*. 1973 Aug 17;181(4100):674-6.
- Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):821-33.

Wang T, Chang P, Wang L, Yao Q, Guo W, Chen J, Yan T, Cao C. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. *Med Oncol*. 2012; 29(1):48-55.

Watanabe T: Current status of HTLV-1 infection. *Int J Hematol*, 2011; 94:430-434.

Weber F, Goldmann C, Krämer M, Kaup FJ, Pickhardt M, Young P, Petry H, Weber T, Lüke W. Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 2001;49(5):636-42.

Wei G, Liu CK, Atwood WJ. JC virus binds to primary human glial cells, tonsillar stromal cells, and B-lymphocytes, but not to T lymphocytes. *J Neurovirol*. 2000 Apr;6(2):127-36.

Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of Male Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2005, 14(1):20-6.

White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):1-16.

Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell*. 2008;13(4):355-64.

Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv*. 2006 Jun;61(6 Suppl 1):S3-14.

Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Arch Intern Med* 2011;171(2):125-33.

Yang R, Yutzy WH 4th, Viscidi RP, Roden RB. J Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection. *Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):12546-53.

Youlten DR, Cramb SM, Dunn NAM, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology* 2012; 36:237-248.

Yu J, Boyapati A, Rundell K. Critical role for SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Virology*. 2001 Nov 25;290(2):192-8.

Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E-I, Tanigami A, Izumi K: HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res* 1999, 19:5057-5062.

Yu, G., Greninger, A.L., Isa, P., Phan, T.G., Martinez, M.A., de la Luz Sanchez, M., Contreras, J.F., Santos-Preciado, J.I., Parsonnet, J., Miller, S., DeRisi, J.L., Delwart, E., Arias, C.F., Chiu, C.Y.. Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PLoS One* 2012; 7 11.

Zaidi, H. A., T. Kosztowski, et al. (2009). "Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis." *J Neurooncol* 93(1): 49-60.

Zhang Z., Wei Chen, and Ann Roman. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 January 10; 103(2): 437–442.

Zheng H, Abdel Aziz HO, Nakanishi Y, Masuda S, Saito H, Tsuneyama K, Takano Y. Oncogenic role of JC virus in lung cancer. *J Pathol*. 2007 Jul;212(3):306-15.

Zhong, W., Wang, H., Herndier, B. & Ganem, D.. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; 93, 6641–6646.

Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 1991 Nov;185(1):251-7.

Zhu J, Rice PW, Gorsch L, Abate M, Cole CN.. Transformation of a continuous rat embryo fibroblast cell line requires three separate domains of simian virus 40 large T antigen. *J Virol.*; 1992 May;66(5):2780-91.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ. HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer*. 2001 Aug 3;85(3):398-404.

Zur Hausen H. *Infections causing human cancer*. 2006. Weinheim: Wiley-VCH; Chichester: John Wiley

zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer*. 1999;35:1878–1885.

zur Hausen H.. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80, 3812–3815.

zur Hausen H.. The search for infectious causes of human cancers: Where and why: *Virology* 2009; 392, 1–10.

zur Hausen, H.. *Condylomata acuminata and human genital cancer*. *Cancer Res.*. 1976; 36, 794.

zur Hausen, H.. Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 2001; 20, 7820–7823.