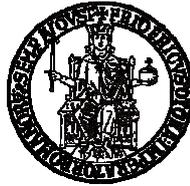


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**  
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI**  
**ANIMALI**  
**Settore di Patologia Generale**



**Dottorato di Ricerca in Biologia, Patologia e Igiene ambientale in**  
**Medicina Veterinaria**  
(Coordinatore: Prof. Giuseppe Cringoli)

**Cancerogenesi vescicale associata a papillomavirus bovino**  
**tipo 2 (BPV-2) in grossi ruminanti**

**Docente Guida:**  
**Ch.mo Prof. Franco Roperto**

**Candidato:**  
**Dott.ssa Roberta Lucà**

**XXV DOTTORATO DI RICERCA**  
**2010-2013**

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....  | 3  |
| <b>1.1 I Papillomavirus: filogenesi e tassonomia</b> .....          | 4  |
| <b>1.2 Organizzazione genomica di PVs</b> .....                     | 7  |
| <b>1.3 PVs: Ciclo vitale</b> .....                                  | 10 |
| <b>1.4 Le proteine virali</b> .....                                 | 13 |
| <i>1.4.1 Early Proteins</i> .....                                   | 13 |
| <i>1.4.2 Late Proteins</i> .....                                    | 18 |
| <b>1.5 I Papillomavirus bovini (BPVs)</b> .....                     | 19 |
| <i>1.5.1 BPV-2 E5 è la principale oncoproteina del virus</i> .....  | 24 |
| <b>1.6 Carcinogenesi vescicale: potenziale sinergismo tra</b> ..... | 27 |
| <b>felce e BPV-2</b> .....  | 27 |
| <i>1.6.1 Pteridium Aquilinum</i> .....                              | 30 |
| <b>1.7 Effetti tossici della Felce</b> .....                        | 33 |
| <b>1.8. Ematuria Enzootica Cronica</b> .....                        | 36 |
| <b>2. MATERIALI E METODI</b> .....                                  | 38 |
| <b>3. RISULTATI</b> .....   | 42 |
| <b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....  | 71 |

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 I Papillomavirus: filogenesi e tassonomia**

I Papillomavirus (PVs) sono una famiglia di virus oncogeni a DNA, ampiamente distribuiti in natura, con spiccato tropismo per gli epiteli cutanei e delle mucose ed in grado di infettare tantissime specie animali (IARC, 2007; Moody & Laimins, 2010).

Sono virus generalmente specie-specifici ad eccezione del papillomavirus bovino tipo 1, tipo 2 e, probabilmente, tipo 13, conosciuti infettare, oltre i bovini anche cavalli, bufali, leoni africani, giraffe ed antilopi.

I papillomavirus sono stati scoperti all'inizio del secolo, quando fu osservato che la verruca umana era trasmissibile con un estratto acellulare (Ciuffo, 1907).

Negli anni '30 Shope scoprì che l'agente eziologico del papilloma auricolare del coniglio selvatico, poi identificato come papillomavirus, poteva essere trasmesso allo stesso modo. L'estratto acellulare era in grado di provocare papillomi e non di rado anche carcinomi nel coniglio domestico (Rowson and Mahy, 1967).

Studi filogenetici hanno suggerito che i PVs evolvono normalmente insieme alle loro specie ospiti, siano esse mammiferi o uccelli, non si ricombinano e, nel corso del tempo, hanno mantenuto la loro organizzazione strutturale genomica per un periodo superiore a cento milioni di anni.

Su tali basi, si è permesso di creare una tassonomia per i PVs, oggi ufficialmente riconosciuta dalla Commissione Internazionale per la Tassonomia dei Virus.

Tradizionalmente i Papillomavirus sono stati classificati nella famiglia dei **Papovaviridae** insieme ai Polyomavirus in quanto entrambi mancano di un envelope, sono costituiti da un genoma a DNA a doppio filamento ed all'osservazione ultrastrutturale presentano una notevole similitudine dei capsidi virali.

Tale unificazione tassonomica è stata, poi, abbandonata in quanto, a metà degli anni '80, è risultato chiaro che i Papillomavirus ed i Polyomavirus presentano differenti dimensioni genomiche (5kb vs 8kb), diverse strategie trascrizionali e le loro proteine non risultano essere omologhe.

Tali considerazioni hanno portato, quindi, al riconoscimento della famiglia **Papillomaviridae** a cui appartengono i Papillomavirus (de Villiers et al., 2004).

Alle maggiori branche del grande albero filogenetico comprendente tutti i PVs vengono assegnati i 'Generi', identificati mediante lettere dell'alfabeto greco ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\chi$ ,  $\omicron$ ,  $\pi$ ); le branche minori costituiscono le 'Specie' ciascuna comprendente gruppi di papillomavirus distinti da un punto di vista genomico.

I Papillomavirus vengono suddivisi in 16 diversi generi in base alle proprietà biologiche e all'organizzazione del genoma.

La comprensione dell'enorme diversità dei PVs, l'ampia distribuzione mondiale, le loro potenziali differenze patogenetiche continuano ad essere oggetto di studio per la ricerca filogenetica e di considerazioni di natura eziologica sulle varianti

dei Papillomavirus umani (HPV). Infatti, il sempre più crescente interesse nello studio dei papillomavirus, ha portato alla scoperta di nuovi tipi di PV (Bottalico et al., 2012; Rogovskyy et al., 2012; Zhu et al., 2013); per cui, la classificazione dei papillomavirus (de Villiers et al., 2004) è stata implementata includendo, allo stato attuale, 189 tipi tra cui 28 nuovi HPV e 48 nuovi PV animali (Bernard et al., 2010).

## 1.2 Organizzazione genomica di PVs

Un Papillomavirus è, generalmente, costituito da un capsido proteico icosaedrico, di 55nm di diametro, costituito da 72 capsomeri, ciascuno risultante dall'assemblamento di 5 proteine strutturali L1 e racchiude una molecola circolare di DNA a doppia elica, formata da circa 8.000 coppie di basi. L'organizzazione genomica è simile per tutti i papillomavirus.

Contiene otto “open reading frames” (ORFs) o moduli di lettura aperti che vengono trascritti come messaggeri utilizzando come stampo sempre lo stesso filamento di DNA (Fehrmann and Laimins, 2003). Ciascuno ORF è capace di codificare per uno specifico mRNA e relativa proteina. Ognuna di queste proteine svolge una particolare funzione dall'interno del ciclo vitale dell'HPV.

Il genoma virale viene replicato all'interno del nucleo delle cellule ospiti infettate (Longworth and Laimins, 2004b) ed è stato trovato associato con gli istoni cellulari, a formare complessi simili alla cromatina (Howley, 1996).

Il genoma di tutti i tipi di PVs è essenzialmente diviso in tre regioni (Fig. 1):

- E (Early): regione che codifica per le early-proteins, suddivisa in 6 ORFs (open-reading frames): E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7. Sono geni responsabili dei processi di replicazione, trascrizione e trasformazione cellulare. Costituiscono il 45% del genoma virale. e contiene sei geni espressi nella fase iniziale del ciclo replicativo, che codificano proteine non strutturali, denominate da E1 a E8; tale regione genomica è implicata nella

replicazione virale e nell'oncogenesi (produce proteine ad azione trasformante in grado di indurre proliferazione e immortalizzazione delle cellule umane).

- L (Late): è una regione molto conservata che codifica per le late-proteins, suddivisa in 2 ORFs (open-reading frames): L1 (proteina capsidica maggiore) e L2 (proteina capsidica minore). Questa regione rappresenta circa il 40% dell'intero DNA virale, e codifica per le proteine strutturali del capsido virale, capaci quindi di evocare la risposta immunitaria da parte dell'ospite.
- LCR (Long-Control-Region) o URR (upstream regulatory region): regione non codificante (cioè non possiede capacità trascrizionale autonoma), priva di ORFs e che rappresenta il 7-10% del genoma virale con un peso molecolare che varia da 400 a 1000 paia di basi ; è posizionata tra la fine del gene codificante L1 e l'inizio del gene per E6. Nonostante le LCRs dei PV geneticamente più vicini non mostrino estese similarità di sequenze nucleotidiche, esiste una serie di omologie comuni a tutti i HPV's genitali. All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e trascrizione virale.

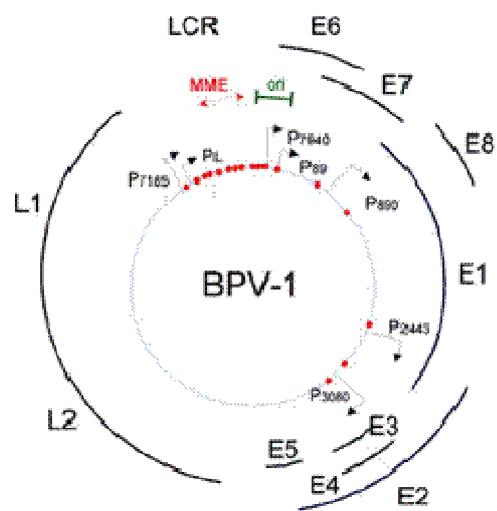


Fig.1. Struttura del genoma virale

### **1.3 PVs: Ciclo vitale**

Il ciclo vitale dei Papillomavirus (Fig. 2) è strettamente connesso al programma di differenziamento della cellula epiteliale ospite infettata. Ogni strato dell'epidermide rappresenta una fase differente del programma di differenziamento terminale del cheratinocita. Ad ogni stadio di tale programma troviamo una precisa fase del ciclo vitale del virus.

Per poter stabilire con successo un'infezione persistente, il virus deve raggiungere, attraverso microabrasioni superficiali della mucosa dell'ospite, le cellule dello strato epiteliale basale (cheratinociti basali). Questo tipo di cellule sono caratterizzate da una spiccata attività proliferativa e sono, quindi, in grado di permettere la persistenza del virus.

Il Papillomavirus penetra all'interno della cellula ospite dove permane in fase latente per anni oppure può andare incontro a replicazione attiva portando alla sintesi di virus infettivi. Molti individui possono rimanere per tutta la vita portatori sani del virus senza produrre mai lesioni cliniche apparenti.

In queste cellule, il DNA virale viene mantenuto stabilmente in forma episomale a copie multiple e replica contemporaneamente al DNA cellulare (una volta per ciclo cellulare), venendo così trasmesso alle cellule figlie ad ogni divisione cellulare.

In questa fase vengono espressi solamente i geni precoci del virus (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7). Si suppone che la trascrizione di tali proteine precoci avvenga

con l'aiuto di elementi enhancers costitutivi presenti nella regione LCR (Fields, 1990); inoltre, tali enhancers hanno mostrato possedere una specificità tissutale e cellulare, ragione che potrebbe essere alla base della mancata trascrizione dei geni tardivi nelle cellule dello strato basale dell'epidermide.

A causa delle dimensioni ridotte del loro genoma, questi virus non possono codificare la maggior parte degli enzimi necessari per la replicazione del loro DNA e di conseguenza utilizzano strutture e componenti cellulari dell'ospite. Questo tipo di replicazione, assicura l'instaurarsi di un'infezione del virus persistente nelle cellule basali dell'epidermide.

La replicazione vegetativa del virus, invece, avviene nelle cellule degli strati superiori dell'epitelio (strato granuloso). Queste cellule si trovano ad uno stadio di differenziamento avanzato e non si ha più la sintesi del DNA cellulare. Paradossalmente, si osserva ugualmente un'intensa replicazione del DNA virale (cioè si formano i DNA che verranno poi racchiusi nei capsidi della progenie virale), l'attivazione dell'espressione dei geni virali tardivi, la sintesi di proteine capsidiche e l'assemblaggio dei virioni. La formazione della progenie virale completa è presente solo nello strato più esterno dell'epitelio (strato corneo) e i virus assemblati sono espulsi nell'ambiente esterno quando le cellule epiteliali si desquamano. Di conseguenza il virus è trasmesso principalmente attraverso contatto diretto.

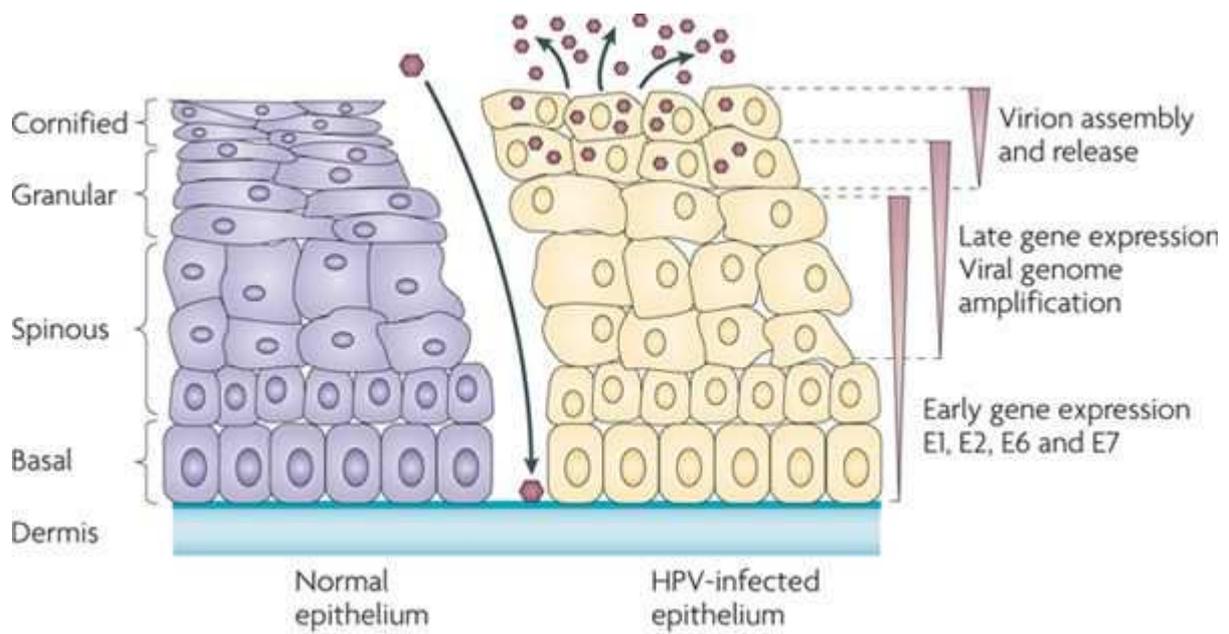


Fig. 2. Ciclo vitale dei PV

## 1.4 Le proteine virali

### 1.4.1 *Early Proteins*

La proteina E1 ha una dimensione di circa 68 kDa e viene espressa a bassi livelli nelle cellule Papillomavirus-positive. La sua funzione è di riconoscere e legare l'origine di replicazione in quanto mostra un'attività ATPasica ed elicastica 3'-5' (Hughes and Romanos, 1993; Seo et al., 1993; Yang et al., 1993).

E1 riconosce le sequenze ricche di AT delle origini di replicazione dei PVs che sono localizzate in prossimità del promotore precoce (Frattoni and Laimins, 1994; Muller et al., 1997). La proteina E1 mostra un'iniziale bassa specificità di legame con tali sequenze; tale legame viene rafforzato dalla formazione di un complesso con la proteina E2 (Frattoni and Laimins, 1994; Dixon et al., 2000; Lu et al., 1993). I siti di legame di E2 sono adiacenti alle sequenze di riconoscimento di E1.

E2 consente il corretto posizionamento di E1 sul sito di origine. Una volta legate al sito attraverso l'azione di E2, le proteine E1 formano esameri che presentano un'alta affinità per il DNA (Sedman and Stenlund, 1998).

Le proteine E1 sono in grado di legare l'enzima DNA polimerasi  $\alpha$  della cellula ospite e di indurre il reclutamento dei complessi di replicazione cellulari nell'origine di replicazione virale (Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998).

La proteina E2 è una proteina dimerica di 40-45 kDa che regola sia la replicazione del DNA virale che la trascrizione dei geni virali (Laimins, 1998). Strutturalmente si distinguono: la porzione C-terminale che lega una sequenza

palindromica di 12 paia di basi, una regione centrale e una terza regione N terminale. E2 è un importante regolatore della replicazione e della trascrizione virale ed è attiva sotto forma di dimeri.

Presenta diversi domini di legame al DNA ed una sequenza di legame a E1. E2 regola la trascrizione virale a livello di promotori precoci. A bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre, a concentrazioni elevate, reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, due importanti oncoproteine virali e la sua perdita rappresenta il primo stadio di trasformazione neoplastica. Mantenendo bassi i livelli di E6 ed E7 durante lo stadio non-produttivo, E2 assicura la mancata trasformazione neoplastica della cellula.

La proteina E4, nonostante la sua inclusione tra le proteine precoci, è espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed è una delle proteine più abbondanti presenti durante il ciclo virale. Il ruolo è legato all'infezione produttiva: sembra possa interagire con il network di filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio delle particelle virali (Doorbar et al., 1991).

La proteina E5 è una piccola proteina idrofobica transmembranaria di tipo II, costituita da 83 aminoacidi nel papilloma virus umano tipo 16 (HPV-16), che risulta essere espressa nei primi stadi dell'infezione ed è presente nell'apparato

del Golgi (AG) e a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico (RE). L'E5 del papillomavirus bovino tipo 2 è costituita da 44 aminoacidi.

La proteina E6 è una proteina basica costituita da 150 aminoacidi. E6 presenta due strutture “zinc-fingers” e due domini Cys-X-X-Cys ed interagisce con numerose proteine cellulari interferendo con la loro funzione.

Queste proteine appartengono a quattro gruppi generali: fattori di trascrizione, proteine pro-apoptotiche, proteine coinvolte nella formazione e mantenimento dell'architettura cellulare, polarità e adesione, e fattori di replicazione e riparo del DNA. Dato che molte proteine appartengono a più di un gruppo, E6 è capace di sovvertire numerose funzioni cellulari. L'attività più studiata di E6 è la sua abilità ad indurre la degradazione della proteina p53. E6 forma un complesso con un'altra proteina cellulare, la E6-AP (E6 associated protein). Questo complesso si comporta da ubiquitina-ligasi favorendo l'ubiquitinazione della p53 e la sua proteolisi a carico dei proteosomi. Poiché compito primario della proteina p53 è bloccare il ciclo replicativo in fase G1 e promuovere l'apoptosi di cellule che abbiano subito lesioni genomiche, la sua proteolisi, E6-indotta, si traduce in una prolungata sopravvivenza delle cellule infettate e in una loro maggiore proliferazione.

E6 può interferire con la via apoptotica grazie alla sua associazione con Bak, un membro della famiglia Bcl-2, che esercita funzioni pro-apoptotiche. Analogamente agli effetti indotti su p53, E6 induce la degradazione di Bak in

modo ubiquitina-dipendente.

Un altro bersaglio cellulare di E6 è la paxillina, una proteina coinvolta nella trasduzione di segnali provenienti dalla membrana plasmatica e diretti al citoscheletro di actina. Solo le proteine E6 dei tipi ad alto rischio sono in grado di legare la paxillina. Si pensa che questa interazione abbia un ruolo fondamentale nel processo di carcinogenesi promossa dall'infezione con HPV ad alto rischio.

La proteina E7 è stato il primo oncogene degli HPV ad essere scoperto ed è la principale responsabile dell'attività trasformante degli HPV ad alto rischio. Le proteine E7 di tutti gli HPV sono piccoli polipeptidi acidi di 98 aminoacidi e sono attive in forma dimerica. Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107 e p130.

Le proteine della famiglia Rb, dette anche "pocket proteins", giocano un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare (Dyson, 1998). Sono chiamate proteine "pocket" per la presenza nella struttura tridimensionale di una "tasca" di legame conservata attraverso la quale legano fattori cellulari, come i fattori di trascrizione della famiglia E2F coinvolti nella proliferazione cellulare (Dyson, 1998). La forma attivata di Rb reprime l'attività dei fattori di trascrizione E2F.

Normalmente, nel nucleo delle cellule in fase G1 la proteina pRb forma complessi con l'eterodimero E2F e con altri fattori che attivano la trascrizione dei geni richiesti per l'avvio della fase S, quindi, bloccandone l'azione. Se la cellula

riceve uno stimolo proliferativo, la pRb viene iperfosforilata da alcune chinasi cicline-dipendenti (Cdk4/6- D) e si distacca dai fattori di trascrizione che, liberi di agire, promuovono la replicazione del DNA. Interagendo con la forma attiva ipofosforilata di pRb, la proteina E7 recluta Rb, inattivando il suo compito di inibire i fattori di trascrizione E2F con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F; queste attivano la trascrizione consentendo alla cellula ospite di procedere lungo il ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni.

E' stato dimostrato che l'oncoproteina E7 di HPV è capace di down-regolare l'espressione della proteina pRb legandosi alla  $\mu$ -calpaina, attivandone quindi la sua attività proteolitica risultante nel clivaggio di pRb. Il sistema delle calpaine è composto da una famiglia di cistein proteasi Ca dipendenti e la loro attività è regolata dai livelli del Ca citosolico. Le calpaine sono una famiglia di proteine, alcune delle quali ubiquitarie (calpaina 1 e calpaina2), altre tessuto-specifiche. Le calpaine risultano essere coinvolte nella motilità cellulare, trasduzione di segnali, progressione del ciclo cellulare, regolazione dell'espressione genica ed apoptosi .

#### 1.4.2 *Late Proteins*

I geni contenuti nella regione Late (L) codificano per proteine capsidiche. L1 è la proteina maggiore del capsido con peso molecolare 55-60 KDa, mentre L2 è la proteina minore con un peso di circa 70 KDa.

Il capsido è composto da 72 capsomeri. Ogni capsomero è un pentamero di 360 molecole di proteina L1 e da 12 a 36 molecole di proteina L2. La trascrizione di questi due geni dipende dallo stato di differenziazione del cheratinocita.

L1 è la proteina maggiormente antigenica dei PVs, è scarsamente fosforilata e può essere anche glicosilata.

L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma ha anche diverse funzioni regolatorie, infatti, si lega a recettori secondari; questa interazione avviene dopo il legame del capsido. Partecipa nella determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido virale.

## **1.5 I Papillomavirus bovini (BPVs)**

I Papillomavirus bovini sono tra i virus animali più studiati per il loro potenziale legame diretto tra infezione virale e neoplasie. A tutt'oggi sono noti tredici genotipi virali (Lunardi et al., 2013).

I Papillomavirus sono stati recentemente riclassificati (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010) secondo la nomenclatura dell'alfabeto greco, per cui BPV-3, BPV-4 e BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11, BPV-12 sono definiti come Xi-papillomavirus, BPV-1, BPV-2 e BPV-13 come Delta-papillomavirus, BPV-5 e BPV-8 come epsilonpapillomavirus.

Le proprietà biologiche dei Delta-PV sono caratterizzate dalla presenza di fibropapillomi cutanei e dall'induzione di tumori vescicali in bovini e bufali mentre l'infezione da Xi-PV (epiteliotropici) induce papillomi epiteliali senza coinvolgimento dei fibroblasti (Jarrett, 1985).

Le proprietà biologiche dei virus bovini finora conosciuti sono riportati nella Tab. 1.

| Tab. 1 Localizzazioni delle principali lesioni in merito al gruppo filogenetico di appartenenza |   |
|---|---|
| $\Delta$ papillomavirus:  | BPV-1: testa, capezzoli, pene<br>BPV-2: testa, dorso<br>BPV-13  |
| $\epsilon$ papillomavirus:  | BPV-5: capezzoli, mammelle<br>BPV-8: capezzoli, cute  |
| $\Xi$ papillomavirus:   | BPV-3: dorso<br>BPV-4: tratto superiore GI<br>BPV-6: capezzoli, mammelle<br>BPV-9: capezzoli<br>BPV-10: capezzoli<br>BPV-11<br>BPV-12: lingua |
| Genere non identificato:  | BPV-7: cute, capezzoli  |

In genere, nei bovini, i papillomi risultano essere rari e normalmente regrediscono dopo circa un anno dalla loro comparsa sebbene in soggetti non immunocompetenti essi tendano a diffondersi. Nel caso di animali allo stato brado, tale immunosoppressione può derivare anche dall'ingestione di sostanze tossiche contenute nella felce (*Pteridium Aquilinum*) (Campo, 2002; Borzacchiello et al.,

2003).

La correlazione tra fattori virali, immunologici, chimici e la progressione delle lesioni benigne verso forme carcinomatose è stata descritta sia in condizioni naturali che sperimentali (Jarrett et al., 1978; Campo et al., 1994). Infatti, animali infettati con BPV-4 ed alimentati con fieni privi di felce sviluppavano forme di papillomi che regredivano dopo circa un anno; al contrario, bovini alimentati con felce sviluppavano papillomi con elevato grado di diffusione attraverso l'orofaringe e il nasofaringe e che, in alcuni casi, progredivano in forme maligne di carcinoma squamoso (Campo et al., 1994).

Recenti studi hanno ulteriormente confermato una stretta sinergia tra papillomavirus (BPV) e *Pteridium aquilinum*.

Il DNA di papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2) è stato riscontrato nel 69% dei tumori vescicali spontanei ed in circa il 46% dei tumori vescicali sperimentalmente indotti (Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003; Roperto et al., 2008; Roperto et al., 2011).

BPV-1/2 infetta l'epitelio della vescica urinaria, forse a partire da una infezione delle zone paragenitali e/o, preferibilmente, diffondendo attraverso il sangue (Campo et al., 1992; Roperto et al., 2011) e stabilendone un'infezione latente.

In bovini alimentati con felce, infatti, le sostanze tossiche contenute nella pianta causano un depauperamento del sistema immunitario, il che permette al virus di indurre una infezione clinicamente manifesta (Campo, 1997; 2003; Campo et al.,

1994).

E' ormai ampiamente accertato che BPV-2 è il papillomavirus più frequentemente coinvolto nelle neoplasie vescicali (Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003 e 2007; Lioi et al., 2004; Balcos et al., 2008; Borzacchiello e Roperto, 2008; Roperto et al., 2008; Roperto et al., 2010).

Recenti studi hanno dimostrato che altre cellule, quali le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), in particolare linfociti helper a suppressor, le cellule dell'epitelio trofoblastico, e le cellule uroteliali neoplastiche e non sono ulteriori siti di infezione produttiva di BPV-2 *in vivo* (Roperto et al., 2011; Roperto et al., 2012; Roperto et al., in press).

Le neoplasie della vescica urinaria del bufalo sono state raramente descritte (Pamukcu, 1957; Ozkul & Aydin, 1996), ciò rende tale patologia ancora poco conosciuta (Somvanshi, 2011; Somvanshi et al., 2012). Ozkul e Aydin (1996) descrissero lesioni neoplastiche vescicali in alcuni soggetti allevati nelle regioni del Mar Nero. Recentemente l'infezione da papillomavirus bovino tipo 2 (BPV-2) è stata ampiamente descritta anche in bufali nei quali il virus gioca un ruolo importante nella trasformazione cellulare dell'urotelio (Roperto et al., 2013). Sono stati, infatti, descritti i primi casi di tumori uroteliali nei bufali associati alla presenza dell'oncoproteina E5. In aggiunta, in questi tumori è stata descritta anche la presenza della proteina L1. La simultanea presenza di E5 e di L1 dimostra che l'infezione del BPV-2 a livello della vescica si manifesta sia come

infezione abortiva tramite l'E5 che come infezione riproduttiva per mezzo della proteina L1.

Il pattern morfologico dei tumori uroteliali nel bufalo è sovrapponibile a quello osservato nei tumori uroteliali dei bovini. Pertanto la terminologia usata nel Blue Book del World Health Organization (WHO) è applicabile, al pari dei bovini (Roperto et al., 2010), anche ai tumori uroteliali del bufalo (Roperto et al., 2013).

### 1.5.1 BPV-2 E5 è la principale oncoproteina del virus

BPV-1 e BPV-2 codificano tre oncoproteine, E5, E6 ed E7.

La principale oncoproteina del BPV è rappresentata da E5 (Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003; Wosiacki et al., 2005, 2006; Roperto et al., 2008).

L' E5 del BPV-2 è una piccola proteina idrofobica transmembranaria di 44 aminoacidi che risulta essere espressa nei primi stadi dell'infezione sia a livello del citoplasma delle cellule profonde dell'epitelio (Anderson et al., 1997; Burnett et al., 1992; Chang et al., 2001; Venuti et al., 2002) che in quelle degli strati basali e soprabasali dell'epitelio trasformato con un tipico pattern juxtannucleare dovuto alla sua localizzazione prevalentemente nell'apparato del Golgi (Borzacchiello et al., 2003; Roperto et al., 2012).

In vitro, infatti, è stato dimostrato che, grazie alla sua natura idrofobica, E5 si localizza a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico (RE), e a livello dell'apparato del Golgi (AG) (Burkhardt et al., 1989; Pennie et al., 1993).

Secondo studi sperimentali recenti, E5 interagisce con la subunità c di 16KDa, una componente della pompa vacuolare H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase D). Studi proteomici *in vivo* dimostrano, però, che la sub unità principalmente coinvolta nella interazione E5/pompa ATPasica è la componente D della pompa stessa (Roperto et al., 2012; Roperto et al., manuscript in preparation). Normalmente, questa pompa acidifica il lume dei compartimenti intracellulari, compresi endosomi, lisosomi ed apparato del Golgi, siti di processazione dei fattori di

crescita. Una conseguenza di tale interazione, è la mancata acidificazione dei suddetti compartimenti cellulari (Goldstein et al.,1991), la quale comporta una difficoltà ad esporre in superficie gli antigeni virali i quali persistono all'interno del citoplasma evitando i meccanismi difensivi dell'organismo.

E' stato, infatti, suggerito che le cellule neoplastiche possono sfuggire al controllo del sistema immunitario attraverso una down-regolazione mediata da E5 nei confronti del MHC classe I. Tale down-regolazione sembra essere correlata all'interazione tra E5 e la pompa adenosintrifosfatase, il che comporterebbe un'impropria glicosilazione e processazione delle molecole del complesso MHC di classe I (Marchetti et al., 2002).

E' stata dimostrata anche in vivo l'interazione tra E5 ed il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF $\beta$ -R) in forma fosforilata suggerendo non solo la funzionale attivazione del recettore su interazione con E5, ma anche l'importante ruolo di E5 nella trasformazione neoplastica delle cellule della vescica di grossi ruminanti (Borzacchiello et al., 2006; Roperto et al., 2013).

Anche l'attivazione delle proteine c-Src è stata dimostrata nella cancerogenesi epiteliale E5-dipendente (Suprynowicz et al., 2002; Borzacchiello et al., 2006, 2007).

Nuovi pathways molecolari, tuttavia, sono stati trovati nei tumori della vescica del bovino associati a BPV-2. E' stato dimostrato che il BPV-2 si rende responsabile dell'over-espressione del fattore di crescita E2F3 attraverso

l'attivazione della forma proteolitica della Calpaina 3 (Capn 3). La Capn3 idrolizza il legame pRB/E2F3 rendendo libero il fattore di crescita E2F3 che induce, così, la proliferazione delle cellule uroteliali (Roperto et al., 2010; 2013).

Anche i papillomavirus umani down-regolano la pRb liberando i fattori di crescita della famiglia E2F con meccanismi diversi. Infatti, l'E7 degli HPV's ha un dominio con il quale lega la pRb determinandone la down regolazione attraverso la calpaina ubiquitaria I o  $\mu$ -calpaina.

## **1.6 Carcinogenesi vescicale: potenziale sinergismo tra felce e BPV-2**

Le neoplasie a carico della vescica urinaria nei grossi ruminanti sono alquanto rare ed, in particolare nella specie bovina, costituiscono solo lo 0,001% di tutte le neoplasie maligne riscontrate (Meuten, 2002).

Tuttavia, negli animali che pascolano allo stato brado in zone in cui cresce rigogliosa la felce (*Pteridium aquilinum*) è piuttosto frequente il reperto di tumori della vescica urinaria che, nella maggioranza dei casi, riconoscono una istogenesi epiteliale e, in percentuali più ridotte (38/40%), anche una istogenesi mesenchimale (Pamukcu et al., 1976; Roperto et al., 2010; Gil da Costa et al., 2012; Martano et al., 2013, in press).

Numerose indagini hanno permesso di identificare che, alla base di tale patologia, è presente una condizione di intossicazione cronica da felce aquilina (*Pteridium aquilinum*) (Fig.3), pianta cosmopolita contenente numerose sostanze immunosoppressive, clastogene e carcinogenetiche (Smith et al., 1997; Alonso-Amelot et al., 2002; Yamada et al., 2007).



Fig. 3. Pteridium Aquilinum

Il ruolo di BPV-1 e di BPV-2 nella carcinogenesi della vescica urinaria, come accennato precedentemente, è stato per la prima volta ipotizzato da Olson nel 1965, le cui ricerche suggerirono una possibile azione sinergica tra papillomavirus e sostanze della felce; solo nel 1992, Campo e collaboratori sono riusciti ad isolare il DNA di BPV-2 a livello di neoformazioni a carico della vescica in bovini alimentati con felce, sia in condizioni naturali che indotte sperimentalmente, confermando, in

tal modo, l'importante ruolo di tale virus nella trasformazione neoplastica a carico della vescica urinaria (Campo et al., 1992; Campo et al., 1994; Borzacchiello et al., 2003) (Fig.4). Infatti, un possibile meccanismo eziopatogenetico potrebbe prevedere che il papillomavirus sia responsabile di un'infezione latente a livello dell'epitelio vescicale e che la contemporanea presenza di sostanze immunosoppressive e carcinogenetiche contenute nella felce possa favorire, in sinergia con il virus, lo sviluppo di lesioni neoplastiche (Campo et al., 1992).

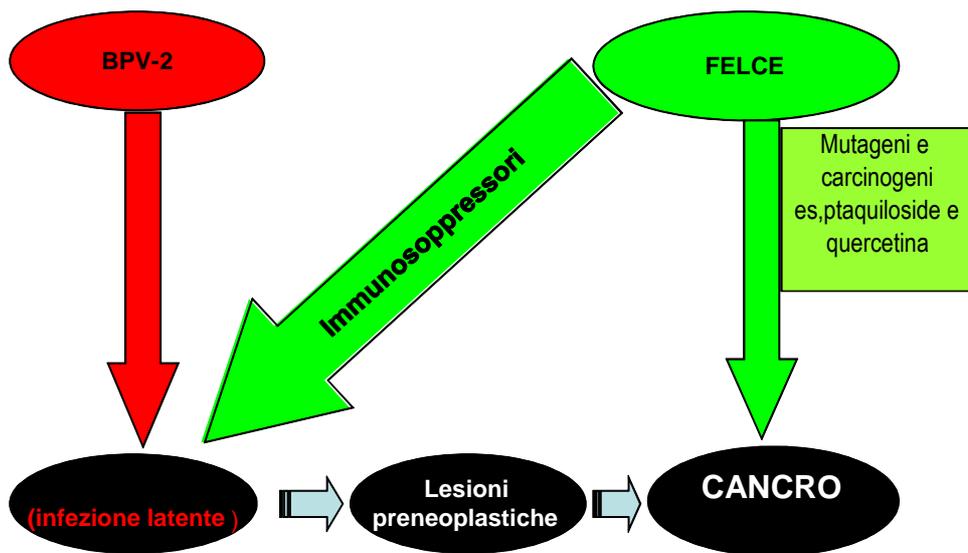


Fig. 4. Schema rappresentante la relazione tra il papilloma virus BPV-2 e la felce nella eziopatogenesi dei tumori vescicali del bovino in corso di ematuria enzootica.

### 1.6.1 *Pteridium Aquilinum*

La felce aquilina, appartenente alla classe delle Pteridopsida, famiglia Pteridaceae, è una delle cinque piante più comuni al mondo, diffusa in tutte le aree temperate e subtropicali sia dell'emisfero settentrionale sia di quello meridionale. E' una pianta erbacea perenne di notevole sviluppo che può raggiungere i due metri di altezza, provvista di un grosso rizoma strisciante da cui emergono le fronde annuali di profilo triangolare (Fig. 5). Le fronde sono lunghe fino ad un metro con una larghezza che può superare i 50 cm; le spore (sori) sono disposte sui bordi delle foglie protetti dall'orlo della foglia stessa ripiegato; la sporificazione ha inizio in tarda primavera e si protrae per tutta la stagione calda. Nel nostro paese essa risulta essere presente su tutto il territorio nazionale, isole comprese, fino a circa 2000 metri di altitudine; la sua distribuzione è presente maggiormente nelle aree deforestate a partire da pascoli semi-abbandonati che hanno subito un ritorno alla vegetazione naturale; in tali terreni, infatti, può dare origine ad estese e fitte coperture fino a diventare un vera e propria pianta infestante (Taylor., 1990).



Fig. 5. Pteridium Aquilinum

Inizialmente, *Pteridium aquilinum* è stata considerata come singola specie vegetale, ma in realtà, le sono state attribuite diverse sottospecie (Tryon, 1941): *aquilinum*, distribuita a livello dell'emisfero settentrionale con le varietà *decompositum*, *pubescens*, *feei*, *latiusculum*, *wrightianum*, *pseudocaudatum* ed *africanum*, e la sottospecie *caudatum*, distribuita nell'emisfero meridionale, che comprende le varietà *caudatum*, *arachnoideum*, *revolutum*, *yarrabense* ed *esculentum* (Tryon, 1941; Taylor, 1990; Smith et al., 1994).

La felce contiene diverse sostanze chimiche ad azione flogogena tra cui le

**braxina A, B e C**, in particolare la Braxina C si rende responsabile di gravi cistiti emorragiche; sostanze immunosoppressive, mutagene e clastogene come la **quercetina** (Bjieldanes e Chang, 1977; Nakayasu et al., 1986) unitamente a sostanze ad azione oncogena quali **ptaquiloside o Aquilide A**, un glicoside norsesquiterpenoide capace di indurre clastogenesi in colture cellulari e carcinogenesi in vivo (Alonso-Amelot et al., 2002). Castillo et al. (1998) hanno inoltre isolato da *Pteridium aquilinum*, varietà *caudatum*, un nuovo glicoside sesquiterpenoide tossico, denominato **Ptaquiloside Z**.

## **1.7 Effetti tossici della Felce**

I primi studi circa il potenziale effetto carcinogenetico da parte della felce maschio sono stati riportati nel 1960 da Rosenberger ed Heeschen, i quali descrissero condizioni neoplastiche di tipo polipoide a carico della vescica associate a fenomeni di ematuria in bovini alimentati per lunghi periodi con tale pianta. Nel 1965, studi sperimentali su animali da laboratorio misero in evidenza la sua tossicità associata ad un alto potenziale oncogeno (Evans e Mason, 1965). Infatti, i ratti sottoposti a diete contenenti foglie secche di felce sviluppavano adenocarcinomi, e sarcomi multipli intestinali, e/o carcinomi a carico della vescica urinaria; anche l'applicazione sulla cute di ratti bianchi di estratti di urine da bovini nutriti con felce portava allo sviluppo di escrescenze simili a papillomi (Georgijev et al., 1963).

Nel decennio successivo, l'ematuria enzootica è stata riprodotta sperimentalmente in bovini alimentati con felci appena falciate o stoccate come fieno (Pamukcu et al., 1978; Hirono et al., 1984; Shanin et al., 1998), confermando l'importante ruolo svolto da tale vegetale nella genesi dell'affezione.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il tempo di esposizione all'ingestione della felce gioca un ruolo cruciale nell'incidenza dello sviluppo dei tumori; infatti, è stata riscontrata un'alta incidenza di tumori della regione terminale dell'ileo in

ratti nutriti con felce per un periodo della durata di almeno 4 mesi, mentre il coinvolgimento della vescica insorgeva in animali alimentati per periodi più lunghi della durata di almeno 8 mesi (Hirono et al., 1970; 1982; 1983).

Le concentrazioni di ptaquiloside variano in base al genotipo del vegetale e talvolta possono raggiungere concentrazioni elevate fino all'1,3% sulla sostanza secca (Smith et al., 1994). Alcuni autori hanno suggerito che a seconda della più o meno elevata concentrazione di ptaquiloside e, quindi, del genotipo della felce presente sul territorio, la distribuzione geografica dell'ematuria enzootica può notevolmente variare (Shahin et al., 1998); infatti, si ritiene che in aree geografiche dove la malattia è presente, la felce contenga una grande quantità di ptaquiloside (300-700 µg/g/s.s.), mentre in aree dove la malattia non è presente, o assume un carattere sporadico, la concentrazione di tale sostanza risulti inferiore a 100µg/g/s.s. (Smith et al., 1994).

Di particolare interesse è la presenza di altri animali allevati nelle aree in cui è presente la felce aquilina e che mostrano sindromi legate all'ingestione di tale vegetale, quali la **deficienza di tiamina in cavalli e suini** (Somogyi, 1971; Evans, 1976), le **neoplasie** del canale gastrointestinale nei ruminanti (Evans, 1968; McKenzie, 1978; Smith et al., 1988) ed, infine, la **degenerazione della retina nella pecora ('bright blindness')**.

La felce aquilina contiene, infatti, anche fattori anti-tiamina, in particolare una **tiaminasi di tipo 1** in grado di separare la molecola di tiamina nelle sue due

strutture ad anello. Al contrario dei ruminanti, i quali sono in grado di sintetizzare la tiamina, gli animali monogastrici richiedono la somministrazione esogena di tale aminoacido risultando particolarmente suscettibili all'azione delle tiaminasi presenti nella dieta. I sintomi clinici dell'intossicazione sono essenzialmente di natura nervosa e sono legati a lesioni necrotiche bilaterali cerebrocorticali (*poliencefalomalacia dei monogastrici*) (Evans, 1976). Per quanto attiene la **degenerazione della retina nella pecora ('bright blindness')**, tale patologia è stata descritta nel lontano 1965 da Watson e collaboratori che osservarono una grave stenosi vasale e progressiva atrofia della retina, anomalie sperimentalmente riprodotte mediante somministrazione di estratti essiccati di felce.

Nell'ultimo ventennio, diversi ricercatori hanno, inoltre, posto la loro attenzione sulla possibile assunzione da parte dell'uomo di tali sostanze attraverso il latte e i suoi derivati; Villalobos–Salazar (1989) ha infatti messo in evidenza una maggiore incidenza di neoplasie dell'apparato gastroenterico in persone che si alimentano di latte e/o formaggi provenienti da bovini allevati in aree endemiche.

## 1.8. Ematuria Enzootica Cronica

L'eziologia dell'ematuria enzootica del bovino è plurifattoriale e, come già accennato in precedenza, sembra sia legata all'effetto sinergico delle sostanze cancerogenetiche presenti nella pianta, e del papillomavirus sebbene altre co-cause non possono essere del tutto escluse.

A seconda della quantità di felce assunta attraverso l'alimentazione ed in funzione del tempo di esposizione ed ingestione di tale pianta, la felce aquilina è responsabile, nei bovini, di una sindrome emorragica acuta o di una forma ad andamento cronico.

La sindrome emorragica acuta è stata descritta in bovini che vengono alimentati con grandi quantità di felce per un periodo di tempo da 1 a 3 mesi. L'Ematuria Enzootica colpisce di solito bovini adulti di età superiore ai 3 anni, sebbene la sua massima incidenza si osserva intorno ai 7-9 anni di età. Gli animali colpiti sono bovini utilizzati in alpeggio, o in genere liberi di pascolare in zone ricche di *Pteridium aquilinum*. La malattia non ha carattere stagionale, sebbene le forme acute sono più frequenti in tarda primavera in concomitanza della presenza di germogli teneri particolarmente appetibili. Fenomeni di riacutizzazione sono presenti durante il periodo primavera-estate.

Nelle aree geografiche in cui cresce rigogliosa la felce (*Pteridium spp*) i tumori della vescica urinaria si osservano in circa il 90% dei bovini (Pamucku et al.,

1976; Gava et al., 2002; Roperto et al., 2010). I soggetti che più frequentemente sono colpiti dalla sindrome dell'Ematuria Enzootica sono animali della stessa mandria, provenienti soprattutto da allevamenti di razze podoliche condotti allo stato brado e semi-brado in zone ricche di felce; quest'ultima viene ingerita in notevoli quantità dagli animali al pascolo, soprattutto quando presente allo stadio germinativo, durante il quale si presenta tenera e facilmente commestibile. Anche pecore e bufali esposti ad ingestione di felce per periodi superiori ai due anni possono contrarre la malattia (Radostitis et al., 1994; Roperto et al., 2013). I bovini di età superiore ad un anno sono più frequentemente colpiti senza alcuna predisposizione di età, sesso e razza.

L'ematuria enzootica si presenta come problematica ambientale che interessa intere aree con notevoli perdite economiche in considerazione del suo decorso cronico e del carattere letale della malattia; l'affezione non è strettamente associata ad un particolare tipo di terreno, sebbene essa venga più comunemente osservata nelle aree a suolo poco compatto e/o roccioso (Radostitis et al., 1994).

## **2. MATERIALI E METODI**

In questi tre anni di dottorato sono stati raccolti campioni di tumori della vescica di bovini, prelevati in pubblici macelli da animali regolarmente macellati nel contesto di un programma di ricerca sui tumori della vescica dei ruminanti che da vari anni si sta portando avanti nel settore di Patologia generale del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali. I soggetti, di età compresa tra 4 e 30 anni, clinicamente affetti da ematuria enzootica cronica (EEC), provenivano da allevamenti condotti allo stato brado e/o semibrado ubicati in diverse aree del Centro-Sud Italia, i cui pascoli risultano notoriamente ricchi di *Pteridium aquilinum*. Sono stati inoltre raccolti 34 campioni di tumori della vescica urinaria di bufali, anch'essi clinicamente affetti da grave ematuria, provenienti da macelli delle regioni turche quali Marmara e Mar Nero (Bafra, Coskun, Bartin), zone in cui i bufali sono allevati su terreni ricchi di felce (Fig.6). Di entrambe le specie, sono stati raccolti anche campioni di vesciche provenienti da animali sani.

Ogni campione è stato diviso in più parti che sono state fissate in formalina al 10% ed in glutaraldeide al 4% in 0,1M buffer fosfato per le indagini istologiche ed ultrastrutturali e congelate in azoto liquido per le analisi di biologia molecolare.



Fig. 6. Bufali che vivono in zone ricche di *Pteridium Aquilinum*

La diagnosi istologica dei campioni di vescica bovina e dei campioni di vescica di bufalo, è stata effettuata mediante allestimento di sezioni in paraffina di circa 4  $\mu\text{m}$ , colorate con ematossilina eosina (H&E), utilizzando sia la classificazione istologica dei tumori uroteliali del bovino suggerita in Medicina Veterinaria nel 2010 da Roperto e collaboratori sia i criteri morfologici suggeriti nel 2004 dal World Health Organization (WHO) Blue Book sulla patologia e la genetica dei tumori del sistema urinario dell'uomo e in accordo con i recenti studi sui tumori dei tessuti molli della vescica urinaria nell'uomo (Eble et al., 2004; Lott et al.,

2007).

Con l'ausilio di tecniche d'indagine molecolare (PCR) si è proceduto all'amplificazione del DNA del BPV-2 ed al suo sequenziamento. La proteina E5 è stata ricercata in tutti i campioni bovini e bufalini tramite immunoprecipitazione e, morfologicamente, mediante immunoistochimica ed immunofluorescenza.

La proteina maggiore del capside, L1, espressa durante l'infezione produttiva da papillomavirus e la proteina E2, espressa durante la replicazione virale, sono state studiate attraverso l'analisi Western Blot, corroborate morfologicamente da indagini immunoistochimiche.

Infine, sono state ricercate le particelle virali nei nuclei delle cellule uroteliali infette, attraverso l'uso del microscopio elettronico a trasmissione.

### **3. RISULTATI**

I risultati di questi tre anni sono stati ottenuti sia in bovini che in bufali con tumori della vescica.

Sono state ottenute due tipologie di risultati degni di essere menzionati.

In bovini affetti da tumori uroteliali, è stata evidenziata la presenza dell'oncoproteina E5 principalmente nel citoplasma di linfociti helper (CD4+) e suppressor (CD8+) (Fig. 7) ma anche in quello di monociti, il che ha permesso di dimostrare chiaramente che le cellule del sangue periferico di bovino possono essere considerati vero reservoir del virus (Roperto et al., 2011) (Fig. 8 e Fig. 9).

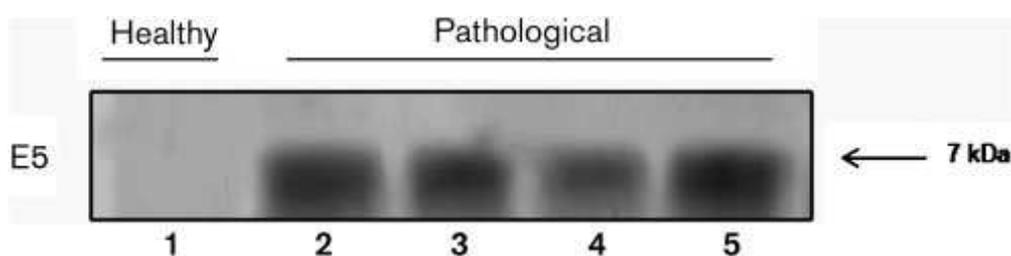


Fig. 7. **Immunoprecipitato per E5.** Espressione della proteina E5 nei linfociti del sangue periferico. Linea 1, controllo negativo (sangue normale da bovini sani); linee 2-5, cellule del sangue periferico prelevato da quattro animali con ematuria.

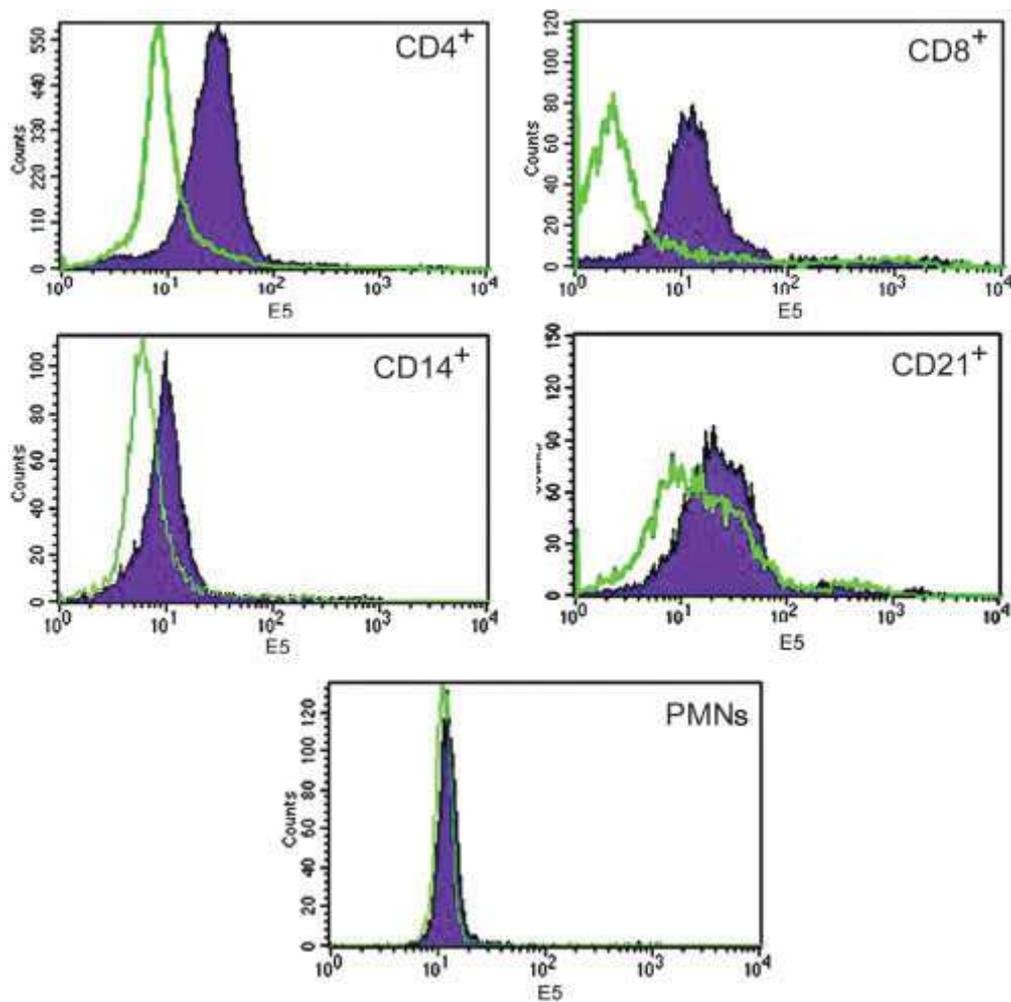


Fig. 8. **Espressione dell'oncoproteina E5 nelle cellule del sangue periferico (PBMCs) attraverso citometria a flusso.** La proteina E5 (colore viola) è stata rilevata nel citoplasma di linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Le cellule controllo sono indicate da una linea di colore verde. Anche se con minore intensità, l'espressione di E5 è stata identificata anche nei monociti CD14<sup>+</sup> e nei linfociti B CD21<sup>+</sup>. I granulociti polimorfonucleati sono risultati negativi in tutti i casi.

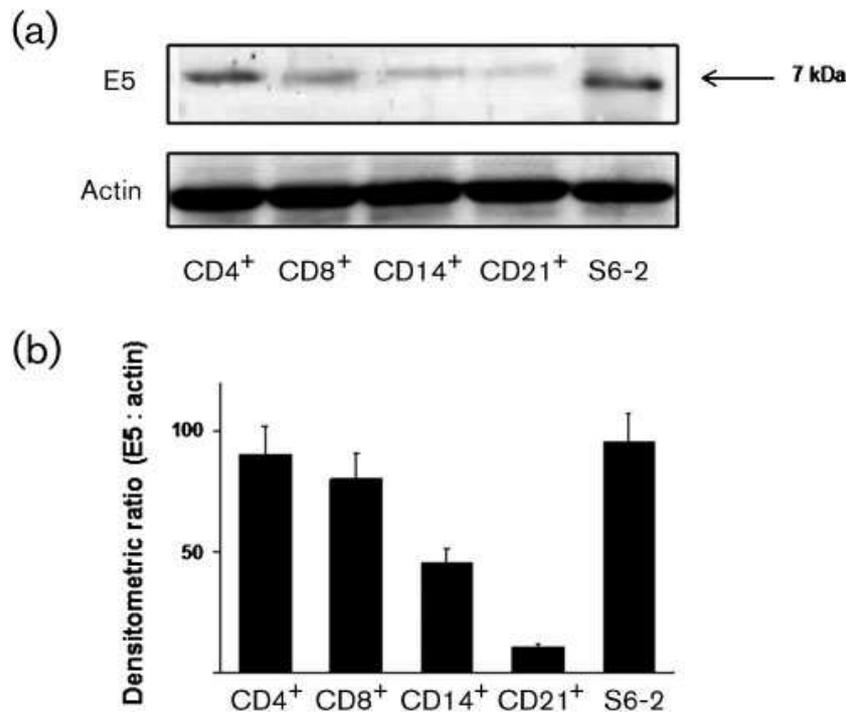
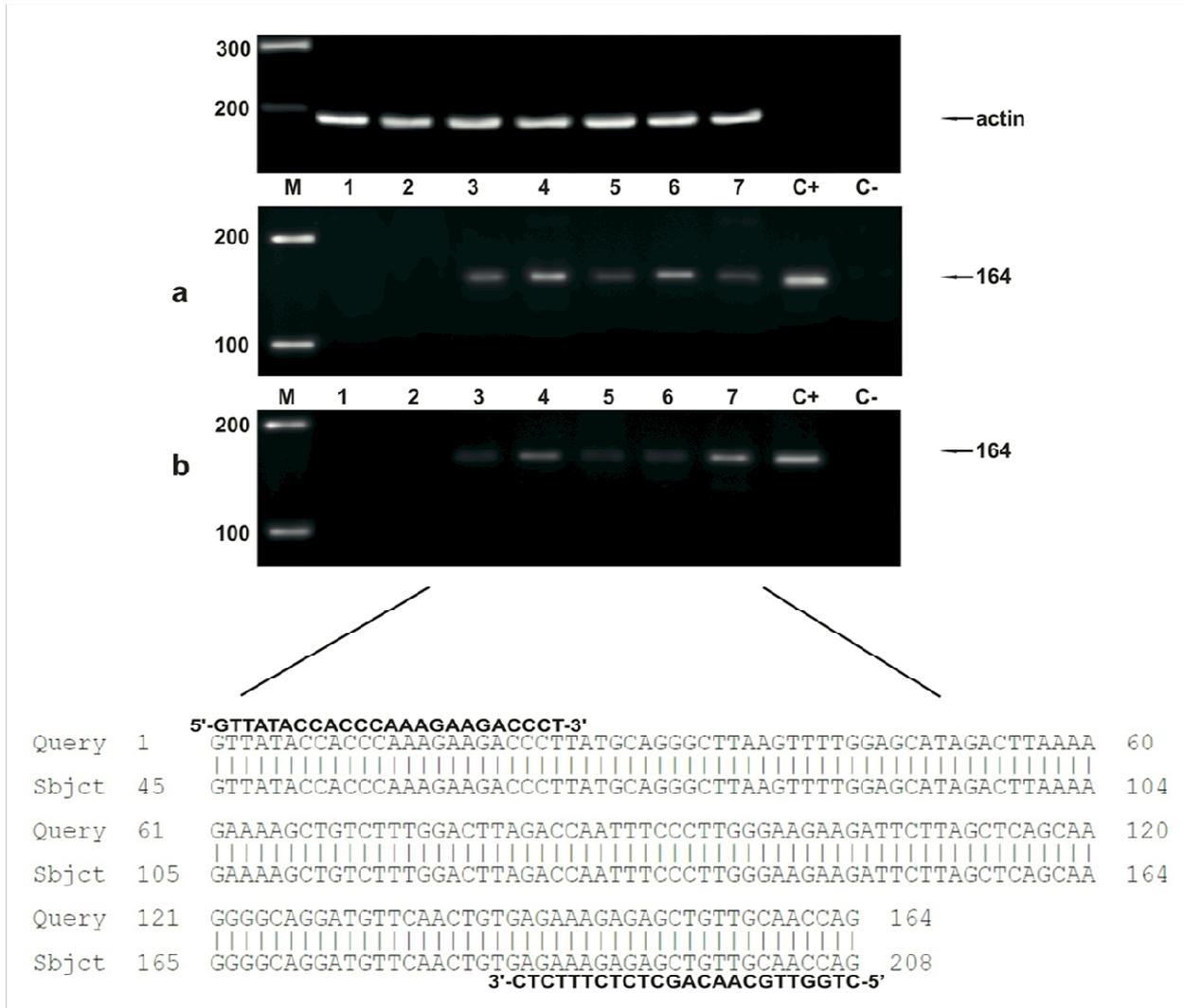


Fig. 9. **Espressione di E5 nelle cellule PBMCs.** (a) I livelli più alti della proteina E5 sono stati trovati nelle cellule CD4+ e CD8+ mediante analisi Western Blot. S6-2 era il controllo positivo costituito da cellule fetali di palato equino trasfettate con BPV-1 DNA (EqPalF). Secondo RT-PCR (a kind gift of Dr L. Nasir, Glasgow University, UK) questa linea cellulare esprime sia geni early che late. (b) Analisi densitometrica quantitativa.

La presenza di un'infezione attiva delle cellule del sangue indica che il virus giunge potenzialmente in tutti i tessuti e, probabilmente, questa è la via principale che il virus segue per raggiungere ed infettare le cellule uroteliali della vescica dei ruminanti. Nelle cellule uroteliali, nelle quali il virus può giungere anche attraverso un'infezione ascendente per via vaginale, il virus induce un'infezione subclinica e/o latente. Tutto ciò è testimoniato dalla presenza di DNA virale nelle cellule uroteliali di circa il 50% di bovini clinicamente sani (Borzacchiello et al., 2003). Le sostanze presenti nella felce che compromettono il sistema immunitario possono "slatentizzare" il virus il quale si renderebbe responsabile di una infezione clinicamente evidente della vescica. Infatti, nei tumori della vescica bovini il virus è

presente nelle cellule uroteliali trasformate in circa l'80% dei bovini (Borzacchiello et al., 2003) (Fig. 10).



**Fig.10. Amplificazione PCR di campioni di DNA.** a) Linea M, DNA Ladder (HyperLadder II Bioline); linee 1-2: campioni di vescica urinaria di bovini sani senza BPV-2 L1 DNA; linee 3-7: campioni di tumori di vescica bovina che mostrano BPV-2 L1 DNA; linea C+, controllo positivo (clone BPV-2 DNA); linea C-, controllo negativo (no DNA added). La freccia indica la posizione del 164 bp BPV-2 L1 PCR prodotto. b) Linea M, DNA Ladder (HyperLadder II Bioline); linee 1-2: campioni di vescica urinaria di bufali sani senza BPV-2 L1 DNA; linee 3-7: campioni di tumori di vescica bufali che mostrano BPV-2 L1 DNA; linea C+, controllo positivo (clone BPV-2 DNA); linea C-, controllo negativo (no DNA added). La freccia indica la posizione del 164 bp BPV-2 L1 PCR prodotto. In basso, si osserva il 100% di omologia tra le sequenze nelle linee 3-7 e le sequenze di BPV-2 L1 trovate in Italia (GenBank M20219).

Più recentemente è stato dimostrato che il BPV-2 svolge un ruolo principale anche nella cancerogenesi vescicale dei bufali che vivono allo stato brado e/o semibrado in territori ricchi in felce come accade in alcune regioni del Mar Nero in Turchia.

Praticamente inesistente è la cancerogenesi vescicale in bovini e bufali allevati in sistemi intensivi tipici delle nazioni zootecnicamente più evolute come l'Italia. Questo dimostra ulteriormente che la cancerogenesi vescicale nei ruminanti riconosce un'azione sinergica tra il BPV-2 e le sostanze oncogene (ptaquiloside) contenute nella felce.

Nelle cellule uroteliali il virus ha la possibilità di integrarsi con il genoma cellulare o persistere allo stato episomale, non integrato.

Nel primo caso, quando il virus si integra, diviene parte integrante del DNA della cellula; questo meccanismo permette al virus di indurre una infezione cosiddetta abortiva con l'amplificazione dei geni Early (E) che si rendono responsabili dell'espressione di oncoproteine quali l'E5, l'E6 e l'E7 (Fig. 11).

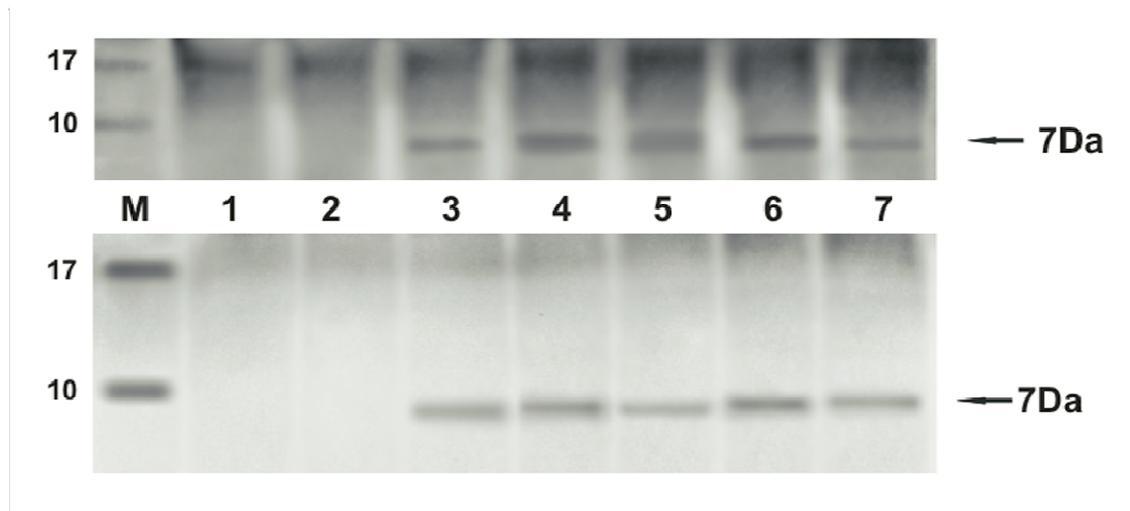


Fig. 11. **Immunoprecipitato per E5. Presenza della proteina E5.** a) Linea 1-2: campioni di vescica urinaria di bovini sani. Linea 3-7: campioni di tumori di vescica urinaria di bovini. b) Linea 1-2: campioni di vescica urinaria di bufali sani. Linea 3-7: campioni di tumori di vescica urinaria di bufali

Nei papillomavirus umani responsabili di tumori della cervice e di un gruppo eterogeneo definito con il nome di “tumori della testa e del collo” le oncoproteine principali sono rappresentate dall’E6 e dall’E7; nel BPV-2, l’oncoproteina E5 è considerata la proteina trasformante principale.

L’infezione abortiva si manifesta prevalentemente negli strati basali e soprabasali dell’urotelio, nei quali è possibile individuare le prime cellule trasformate (Fig. 12).

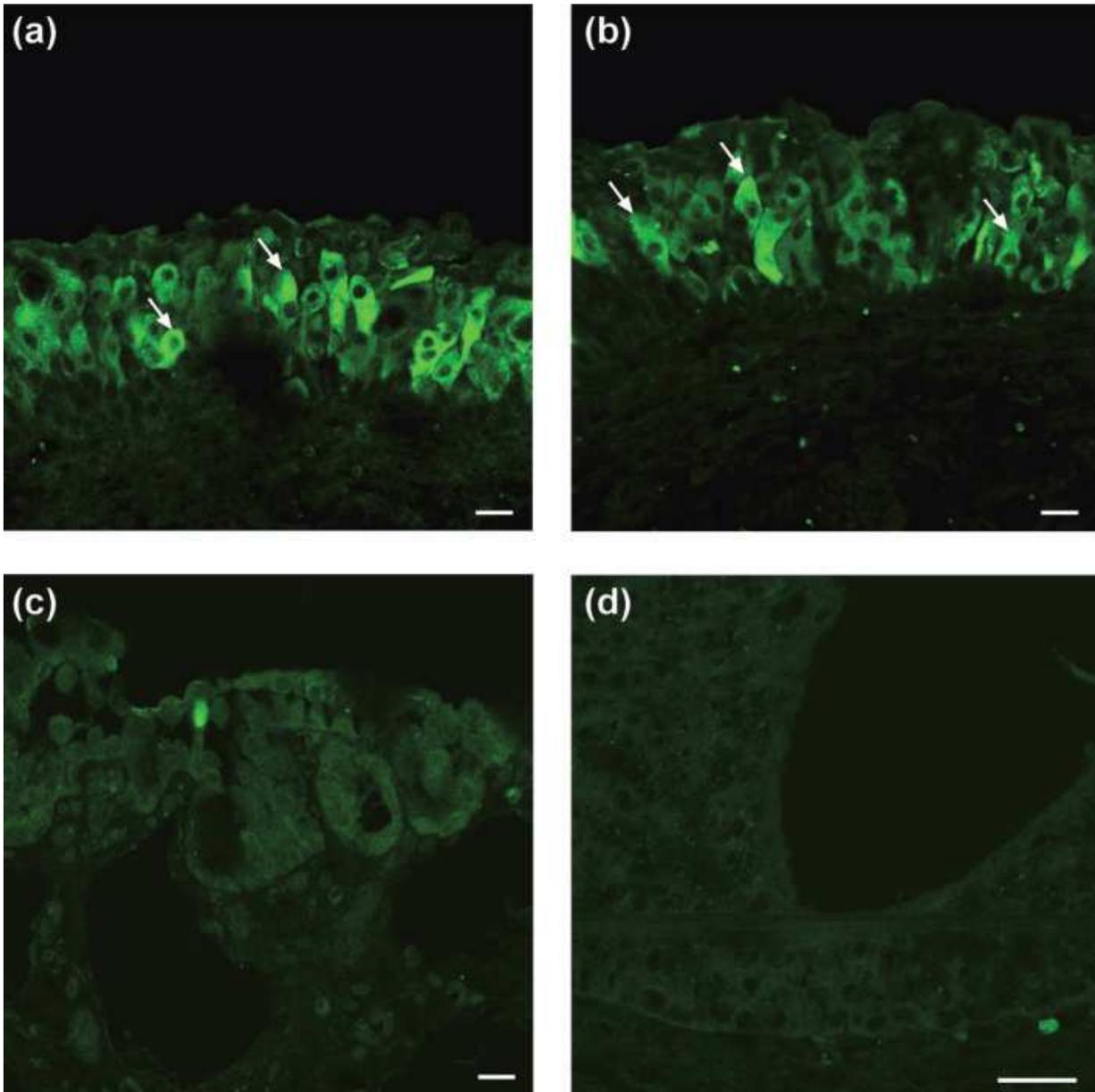


Fig. 12. **Espressione mediante immunofluorescenza della proteina E5 nella mucosa della vescica di bovino.** (a) Campione di urotelio BPV-2-positivo con grave displasia. La maggior parte delle cellule displastiche mostra una forte immunoreattività citoplasmatica (frece bianche). (b) Campione di carcinoma uroteliale grado I BPV-2-positivo. Le frecce bianche mostrano la presenza di E5 in sede juxtannucleare. (c) Campione di carcinoma uroteliale infiltrante grado II BPV-2-negativo. Non c'è immunoreattività per E5. (d) Campione di urotelio normale BPV-2-positivo. Non si evidenzia immunoreattività per E5. Bar, 10 mm.

La presenza della proteina E5 nei tumori del bovino (Fig. 13a/b) e nel bufalo (Fig. 14a/b) è stata ulteriormente confermata dalle indagini di immunohistochimica.

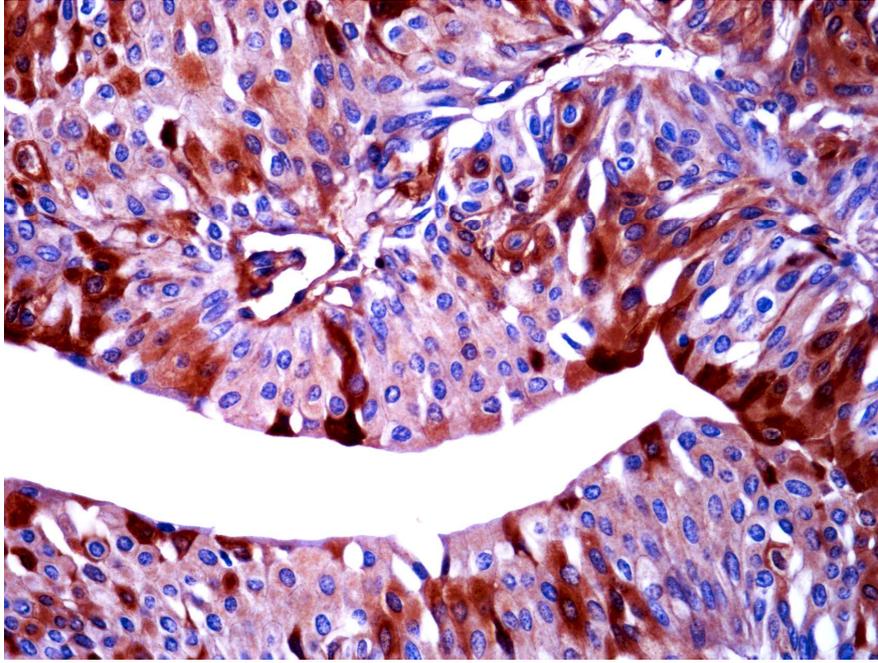


Fig. 13a. **E5 IHC in campioni patologici di bovino.** Cellule neoplastiche E5 positive. Magnification X550

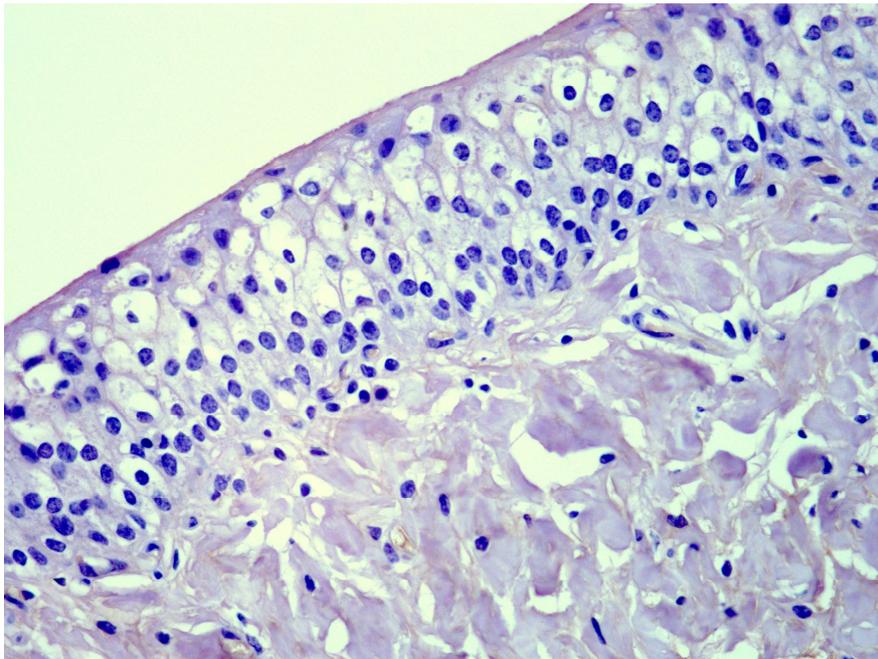


Fig. 13b. **E5 IHC in campioni sani di bovino.** Non si evidenzia positività nelle cellule normali ed in quelle con lesioni non-neoplastiche BVP-2 DNA positive.

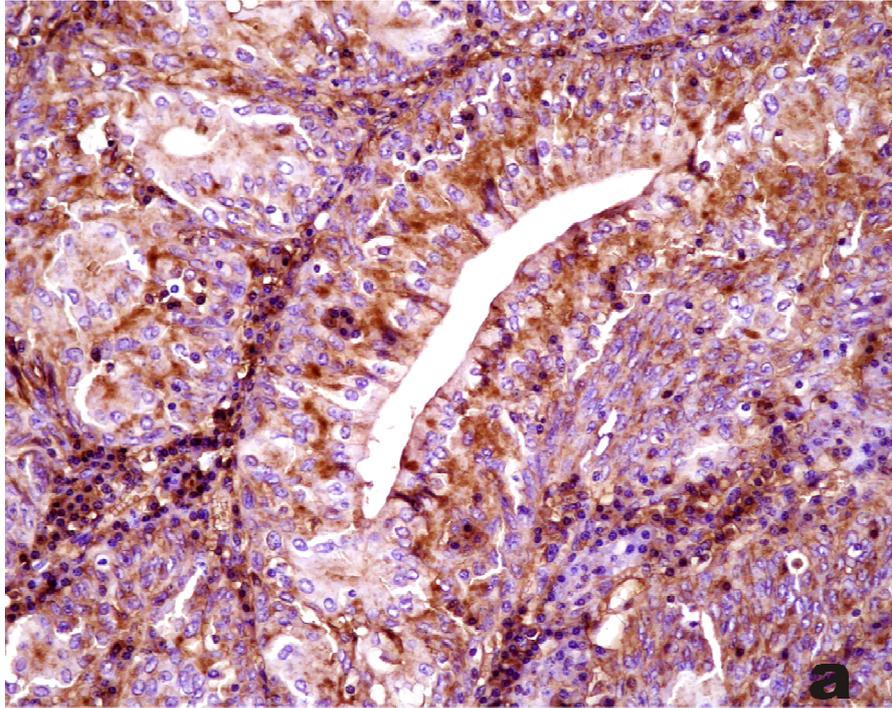


Fig. 14a. **E5 IHC in campioni patologici di bufalo.** Le cellule dell'urotelio neoplastico mostrano positività alla reazione immunocistochemica. Magnification X550

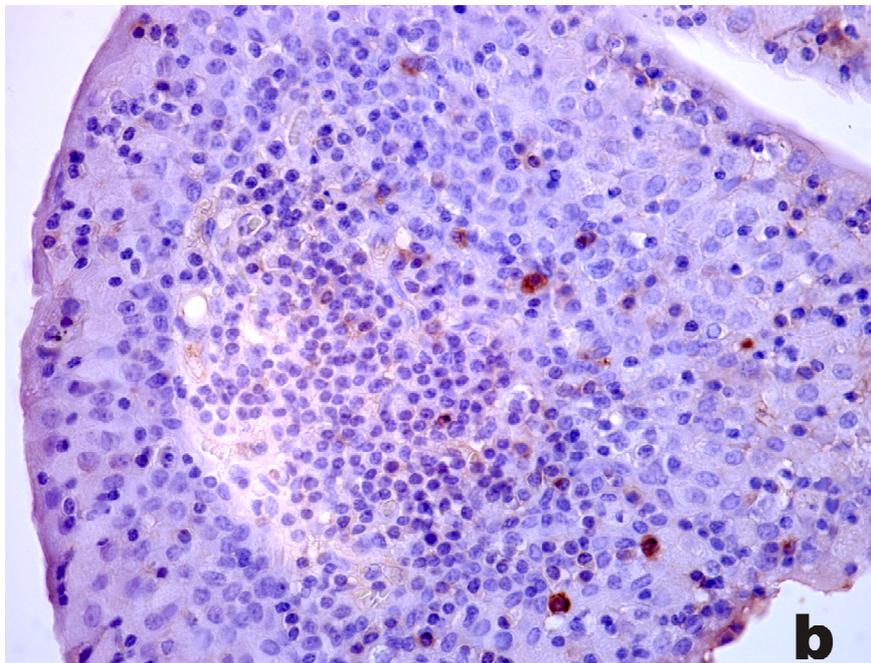


Fig. 14b. **E5 IHC in campioni sani di bufalo.** Non si evidenzia immunoreattività all'E5 in campioni di bufalo sano BVP-2 DNA positivi. Magnification X550

Numerosi pathways molecolari sono stati messi in evidenza dal gruppo di ricerca con cui ho svolto la ricerca del mio Dottorato.

E' stato già dimostrato, nel bovino e recentemente anche nel bufalo, che l'E5 del BPV-2 trasforma le cellule uroteliali *in vivo* attivando (fosforilando) e determinando un'overespressione del recettore  $\beta$  del platelet derived growth factor (PDGF) (Fig. 15a/b).

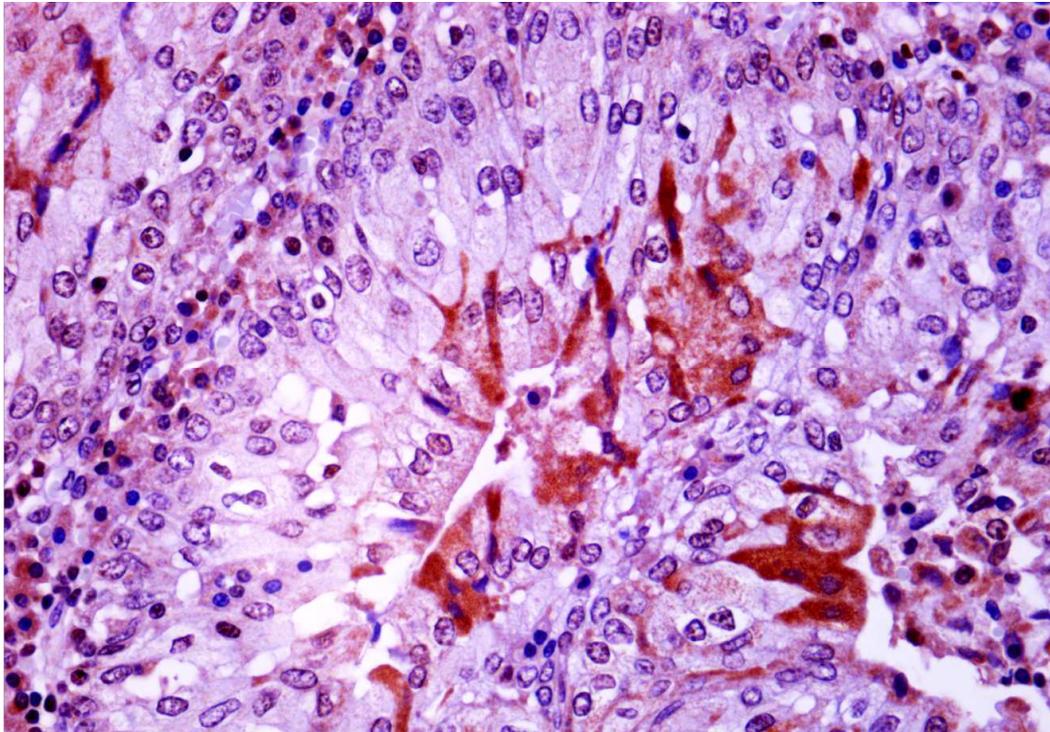


Fig. 15a. **p-PDGFB-R IHC in vesciche patologiche di bufalo.** Over-espressione della forma fosforilata attiva del PDGFB-R. Magnification X550

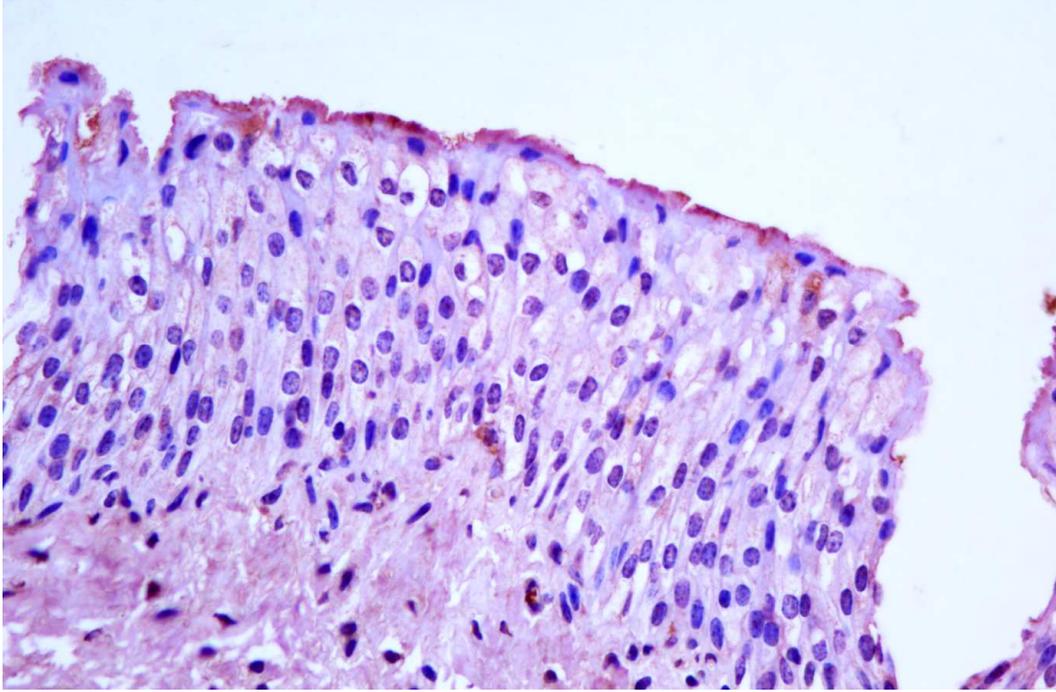


Fig. 15b. **p-PDGFB-R IHC in campioni di vesciche di bufalo sano.** Espressione della forma fosforilata attiva del PDGFB-R in alcune cellule uroteliali. Magnification X550

L'espressione della proteina E5 e del recettore fosforilato PDGFB è stata rilevata mediante tecniche di immunofluorescenza e la loro co-localizzazione citoplasmatica si osserva chiaramente attraverso il microscopio confocale laser (LSCM) (Fig. 16).

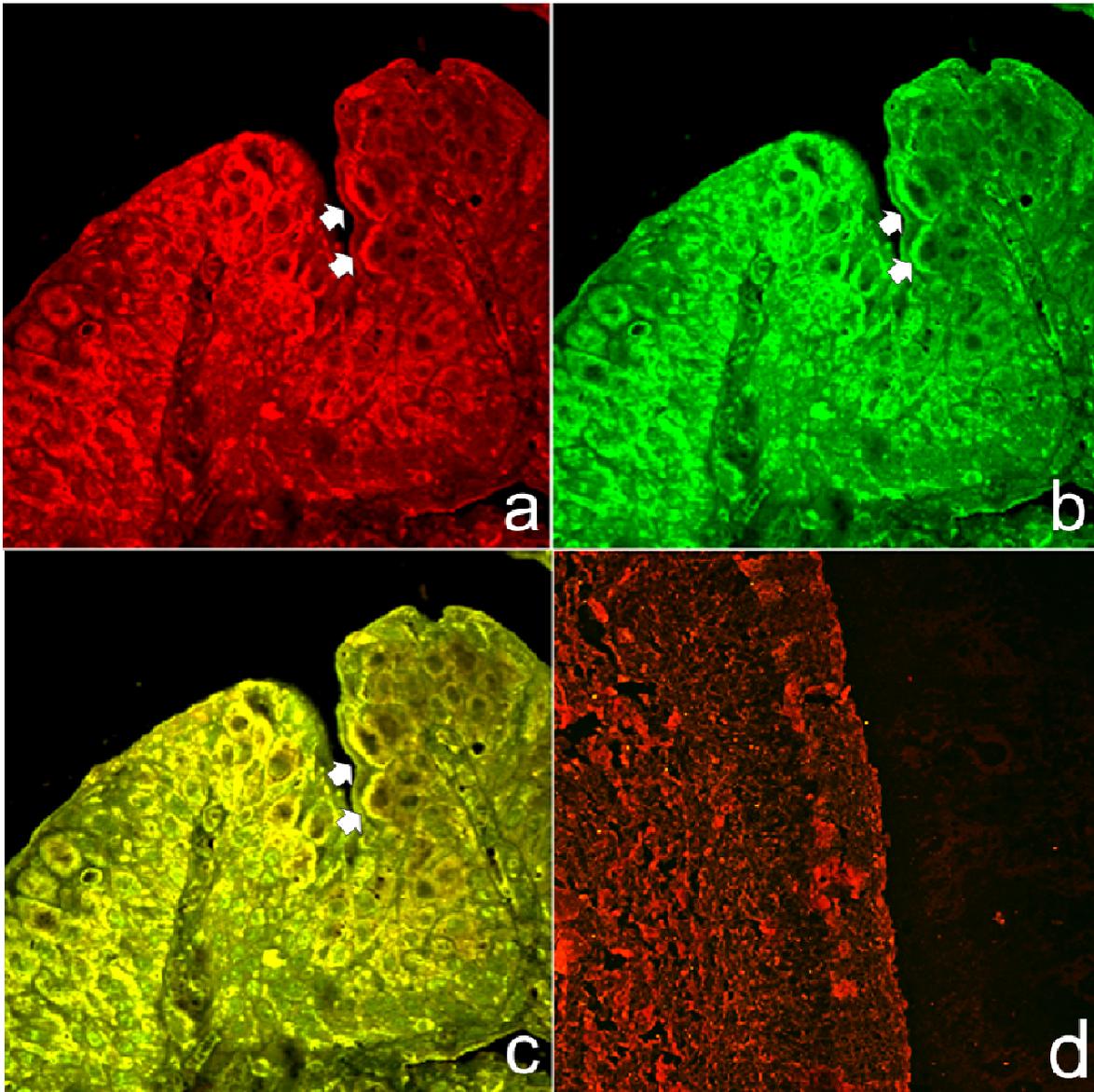


Fig.16. **Colocalizzazione E5- p-PDGFR**. (a) In rosso si osserva l'overespressione della forma fosforilata attiva del recettore PDGFR. Magnification, X550 (b) In verde si osserva l'espressione dell'oncoproteina E5. Magnification, X550 (c) Co-localizzazione del recettore e dell'oncoproteina documentata dalla immunofluorescenza di colore giallo dell'immagine merged. Le frecce mostrano la frequente localizzazione juxtacellulare di tali proteine. Magnification, X550 (d) Urotelio normale da bufali E5 negativi. In questo caso, l'immunofluorescenza dell'immagine merged non ha fornito alcuna colocalizzazione del recettore con l'oncoproteina E5. Magnification, X550.

Recentemente è stato messo in evidenza un altro meccanismo molecolare.

E' stato dimostrato che l'E5 del BPV-2 attiva una proteina considerata tessuto-specifica, perché espressa solo nei muscoli, e chiamata Calpaina 3 o p94 per il suo peso molecolare. La Calpaina 3 che è presente nella vescica dei ruminanti idrolizza il

legame pRb/E2F. Il fattore di crescita E2F, in particolare E2F3 libero provoca un abnorme ciclo mitotico delle cellule uroteliali che può portare alla trasformazione cellulare (Roperto et al., 2010). (Fig. 17, Fig. 18, Fig. 19a/b/c).

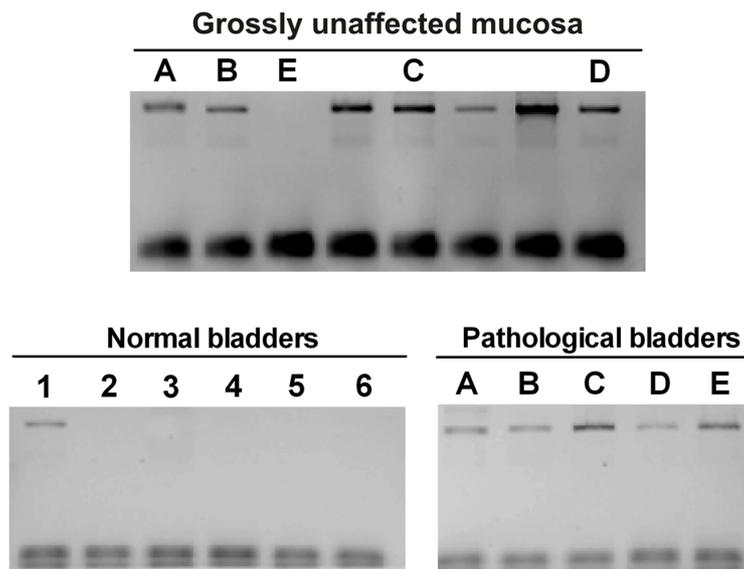


Fig. 17. **Espressione della proteina attivata Capn3 nei tumori uroteliali di bovino.** In tutti i campioni patologici e nei campioni apparentemente sani sono presenti trascritti di Calpaina 3.

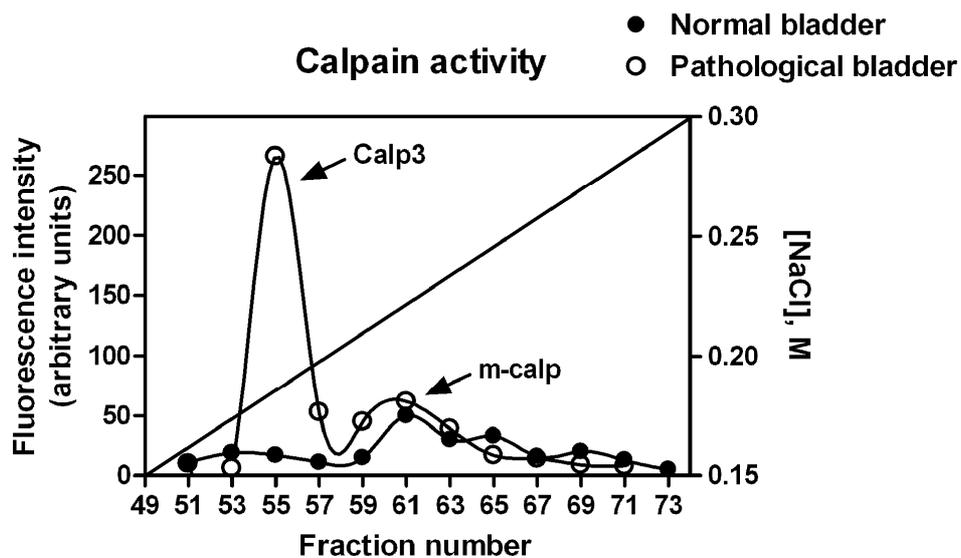


Fig. 18. **Espressione della Capn3 attivata nei tumori uroteliali di bovino mediante cromatografia.**

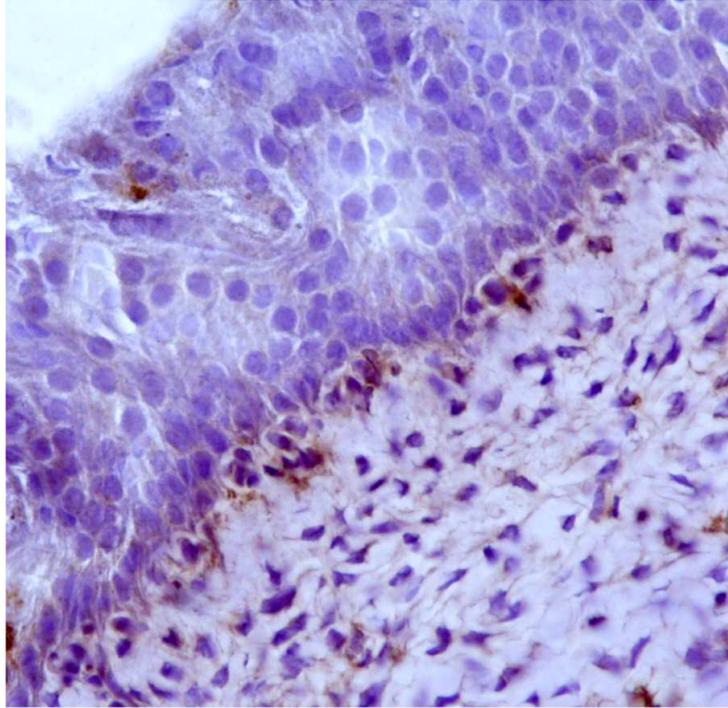


Fig. 19a. **IHC Capn3 nei campioni sani di bovino.** La proteina non è espressa nell'urotelio normale.

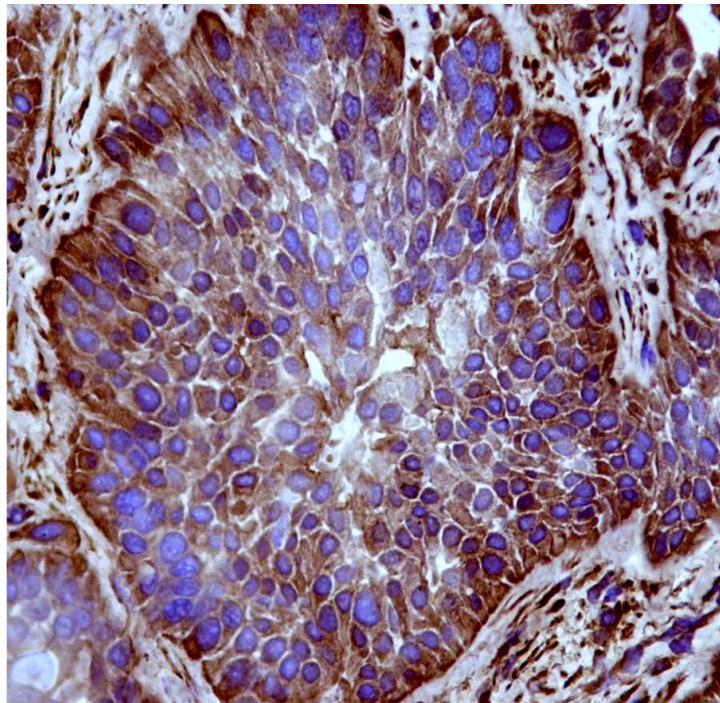


Fig. 19b. **IHC Capn3 nei campioni patologici di bovino.** L'espressione della proteina si evidenzia soprattutto nel citoplasma delle cellule basali dell'urotelio neoplastico.

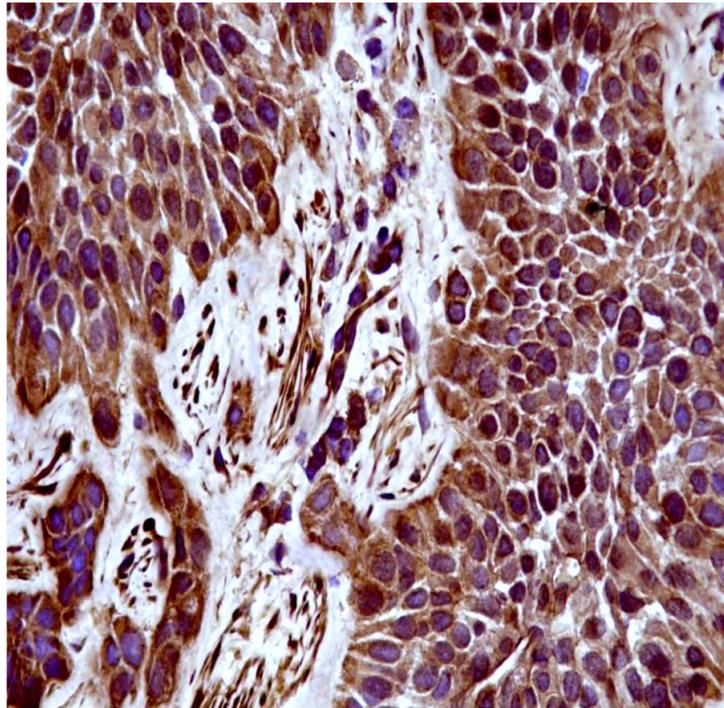


Fig. 19c. **IHC Capn3 nei campioni patologici di bovino.** L'immunoreattività alla proteina Capn3 si evidenzia anche in alcuni nuclei.

E' stato dimostrato che anche i papillomavirus umani idrolizzano tale legame attraverso l'attivazione, da parte dell'E7, della Calpaina 1, definita anche proteina ubiquitaria perché espressa in tutti i tessuti.

Recentemente, però, è stato documentato che nei tumori uroteliali dei bovini e dei bufali, il BPV-2 può anche non integrarsi e rimanere allo stato episomale rendendosi responsabile di una infezione produttiva nelle cellule più superficiali dell'urotelio. In questo caso, il virus amplifica i geni Late (L), in particolare L1 che codifica la proteina strutturale più importante del capsido (Fig. 20 e Fig. 21a/b), il cui assemblaggio porta alla formazione di nuovi virioni, documentati con immagini di

microscopia elettronica a trasmissione (Fig. 22a/b/c/d) e che vengono liberati attraverso la desquamazione delle cellule più superficiali.



Fig. 20. **Espressione della proteina L1.** Presenza della proteina L1 rilevata mediante Western blot.  
a) Linee 1-2: campioni di vescica urinaria da bovini sani. Linee 3-7: 5 campioni di vescica bovina patologica. Linea 8: controllo positivo, (placenta bovina BPV-2 infetta).  
b) Linee 1-2: campioni di vescica urinaria da bufali sani. Lanes 3-7: 5 campioni di vescica bufalina patologica. Linea 8: controllo positivo, (placenta bovina BPV-2 infetta).

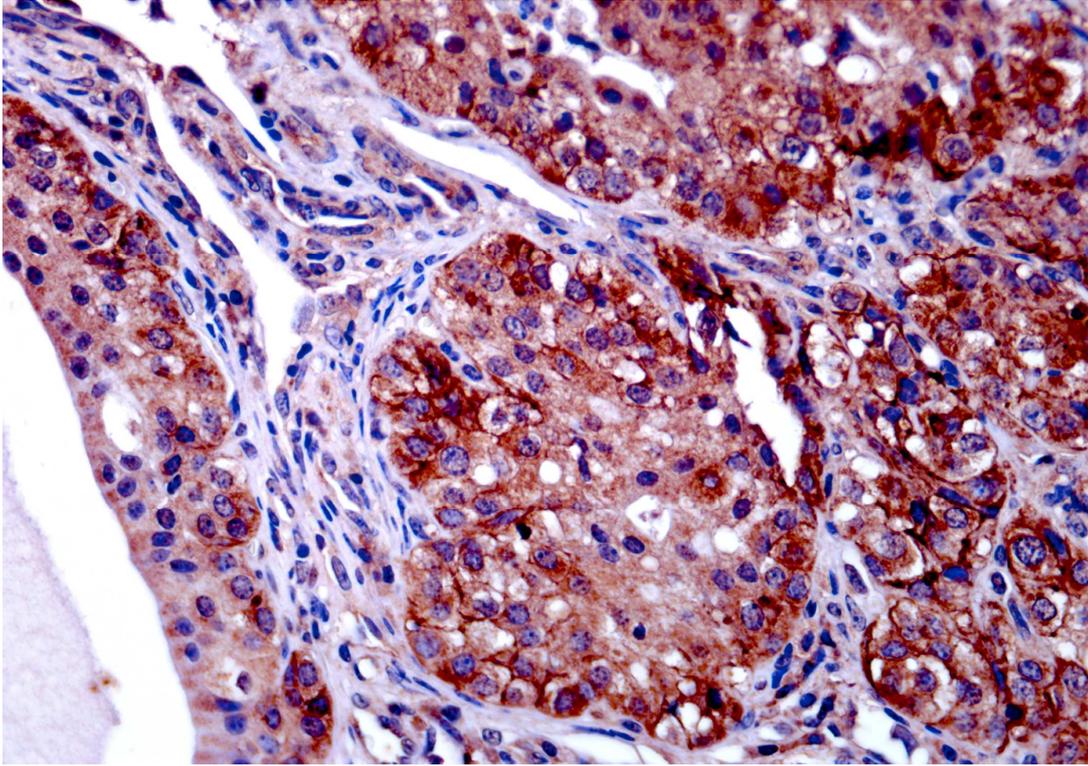


Fig. 21a. **IHC L1.** Evidenza immunoistochimica della proteina L1 nelle cellule dell'urotelio neoplastico.

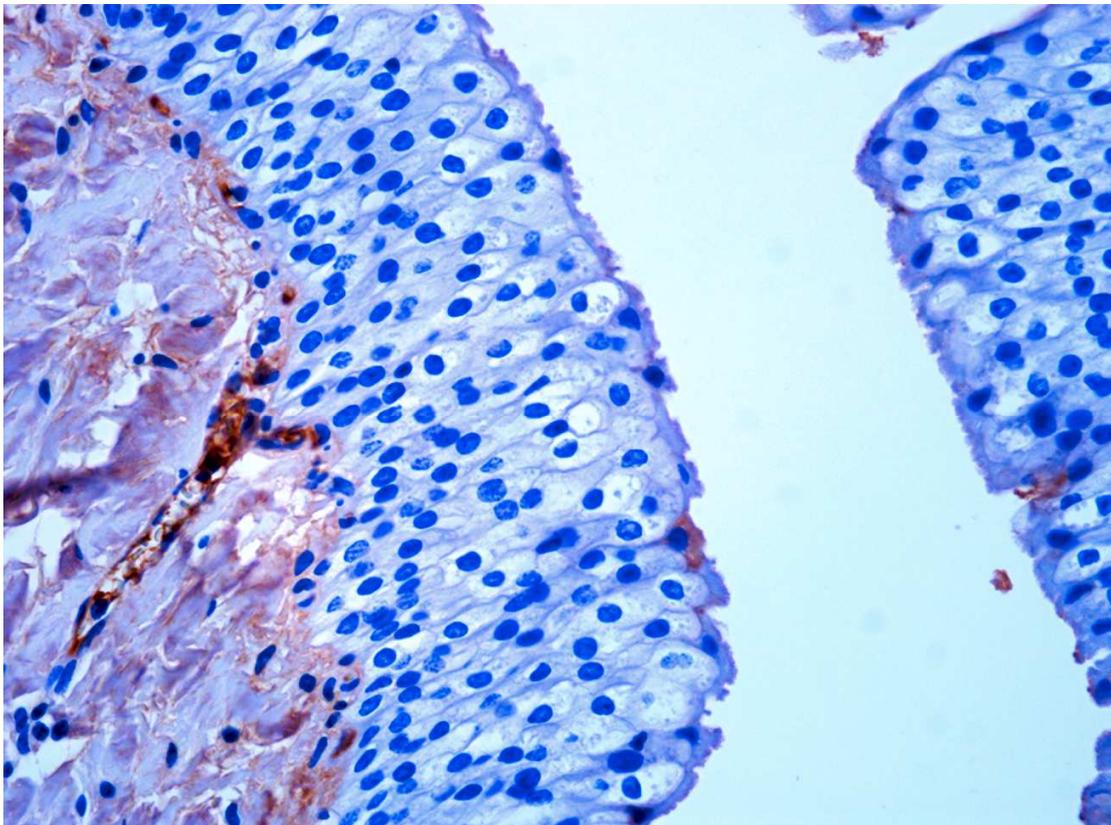


Fig. 21b. **IHC L1.** Non si osserva alcuna espressione della proteina L1 nelle cellule uroteliali normali .

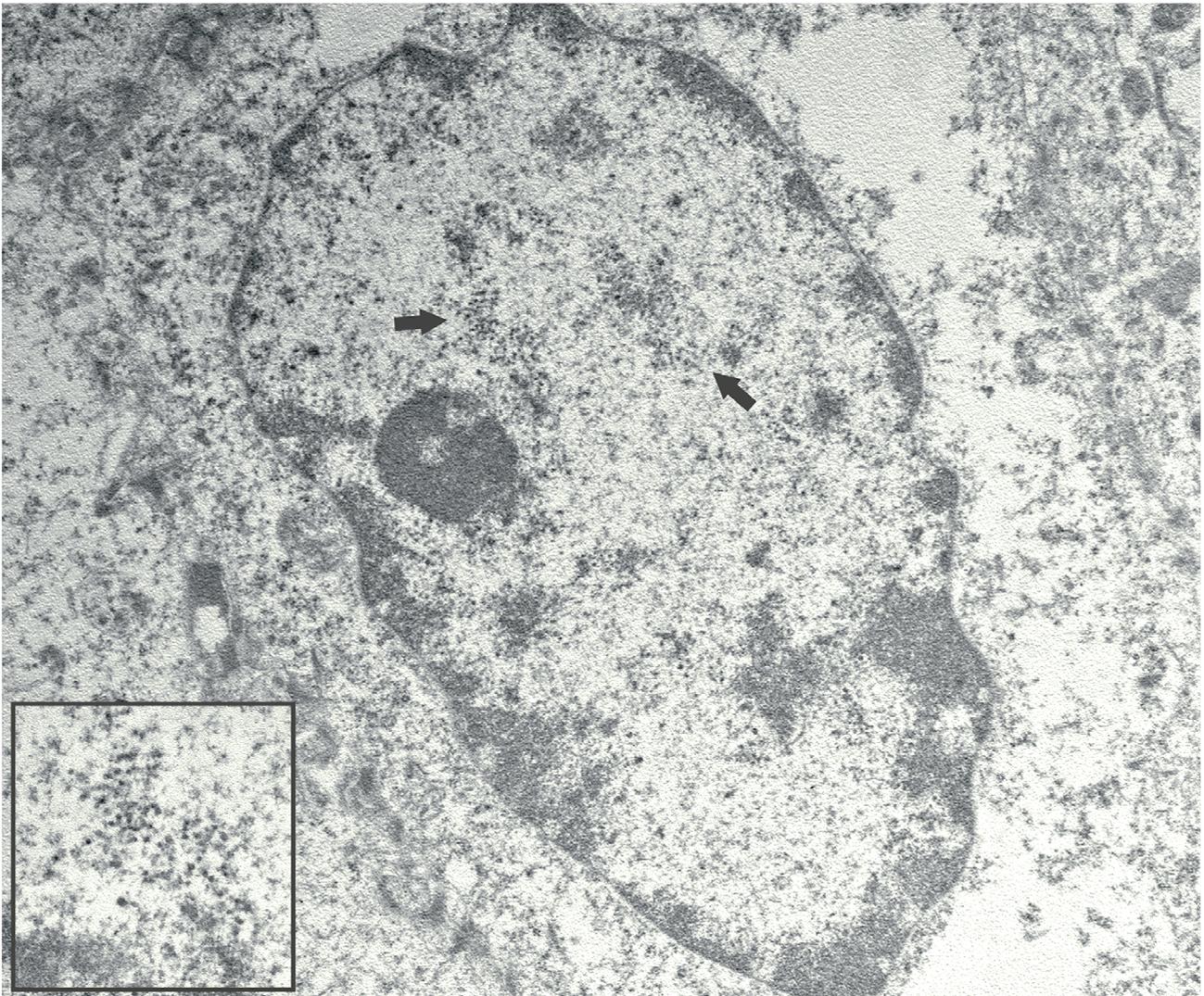


Fig 22a. **Presenza di particelle virali nelle cellule uroteliali di bovino.** Al TEM sono state documentate numerose particelle elettrondense intranucleari, del diametro di 45-50 nm (freccie nere). Magnification X15,000. La grandezza e la forma corrispondono alle caratteristiche ultrastrutturali delle particelle virali (particolare). Magnification X50,000.



Fig. 22b. **Assenza di particelle virali nelle cellule uroteliali di bovino sano.** Al TEM non si evidenziano strutture virali elettrondense nei nuclei di cellule uroteliali normali. Magnification X15,000.

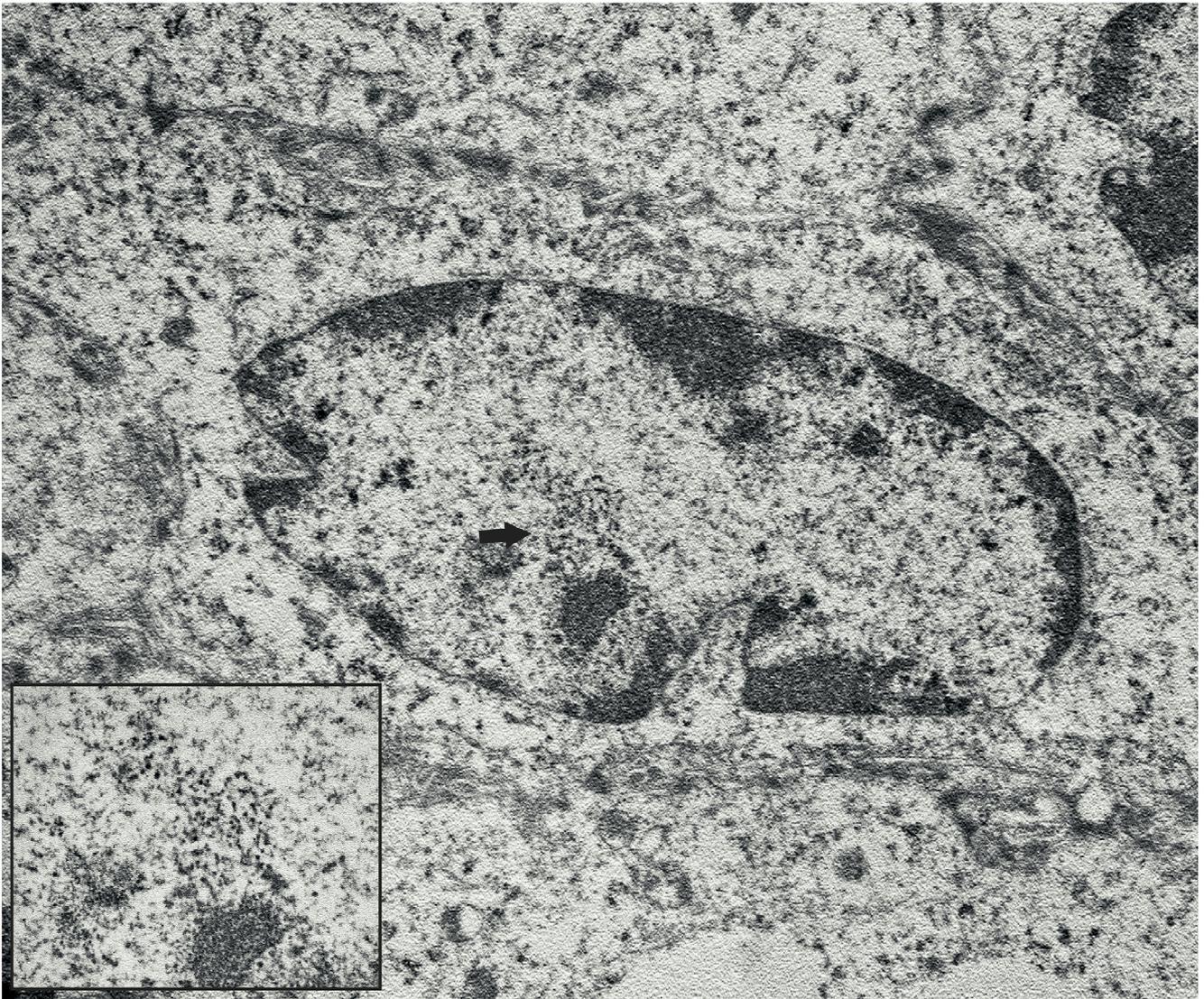


Fig. 22c. **Presenza di particelle virali nelle cellule uroteliali di bufalo.** Numerose particelle elettrondense, del diametro di 45-50 nm (freccie nere), sono state osservate nei nuclei mediante TEM. Magnification X15,000. Grandezza e forma delle particelle corrispondono alle caratteristiche ultrastrutturali delle particelle virali (particolare). Magnification X50,000.

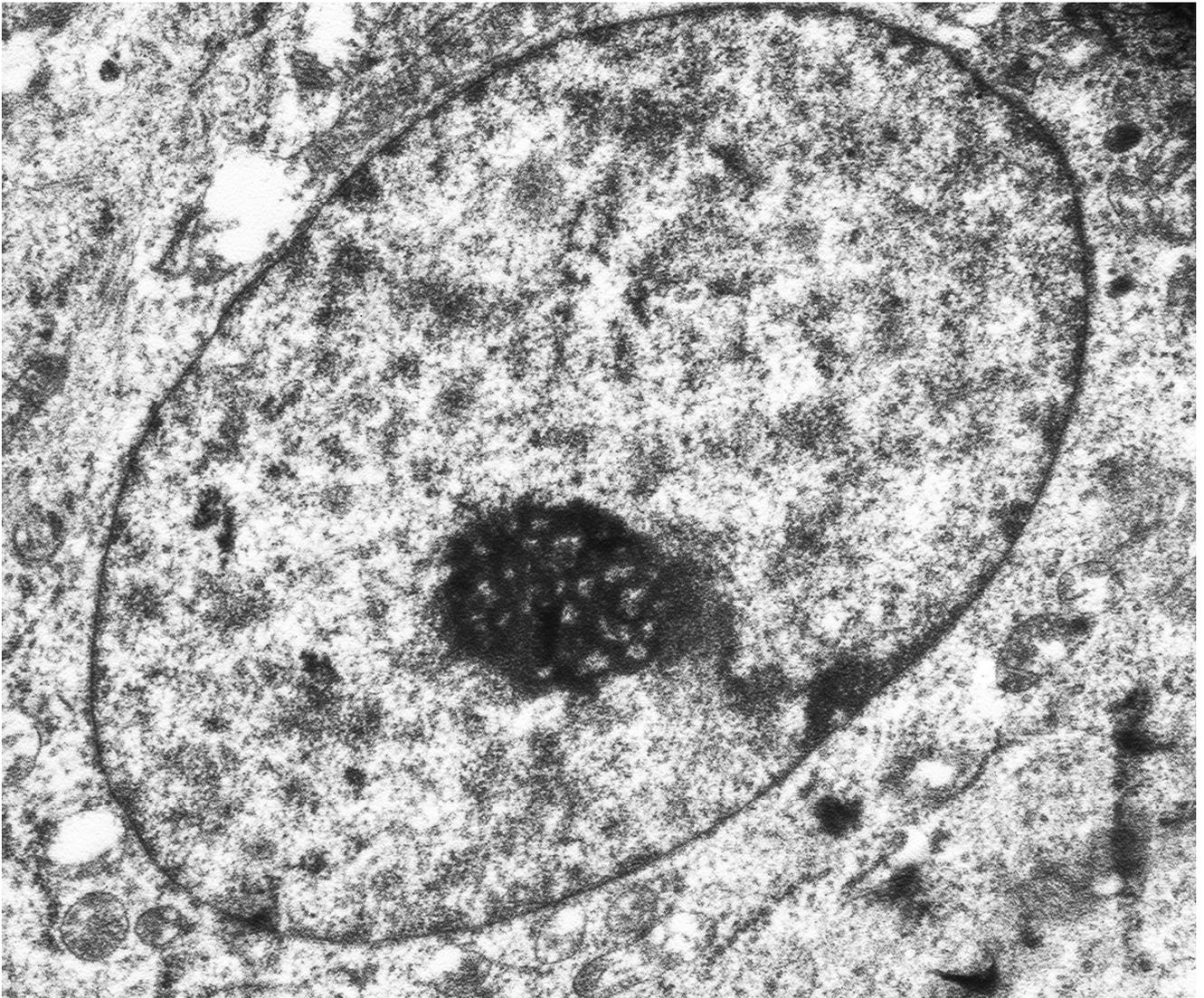


Fig. 22d. **Assenza di particelle virali nelle cellule uroteliali di bufalo sano.** Non si evidenziano particelle virali elettrondense nei nuclei di cellule uroteliali normali mediante TEM. Magnification X15,000.

E' accertato che la proteina L1 stimola il sistema immunitario rendendosi responsabile di vere infezioni. La presenza di una costante risposta stromale dei tumori della vescica viene giustificata, infatti, con l'infezione produttiva e la persistenza dello stato episomale del virus (Roperto et al., 2013, in press).

Il BPV-2 è un virus che infetta sia le cellule epiteliali che quelle mesenchimali.

Molti dei tumori vescicali dei ruminanti sono tumori misti (uroteliali e mesenchimali). E' stato appena dimostrato che su 650 tumori della vescica, 253 pari a circa il 40% delle neoplasie, hanno una istogenesi mesenchimale (Martano et al., submitted). Mediante indagini di microscopia laser confocale, è stato dimostrato che il complesso E5/PDGF $\beta$ R è attivo ed espresso anche nelle cellule endoteliali trasformate (Fig. 23a/b).

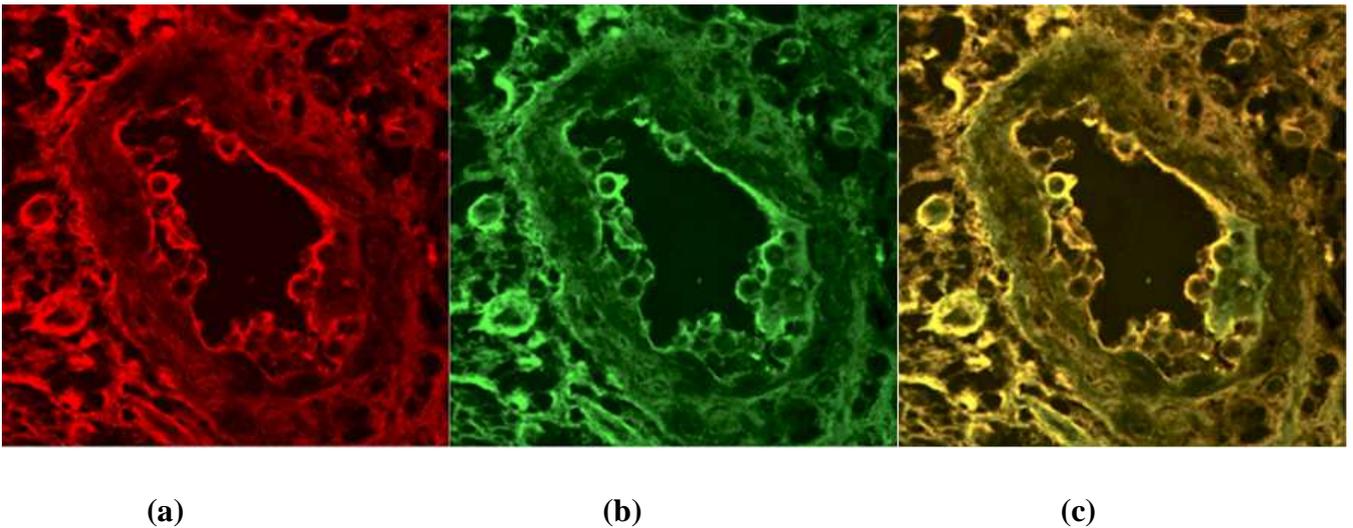
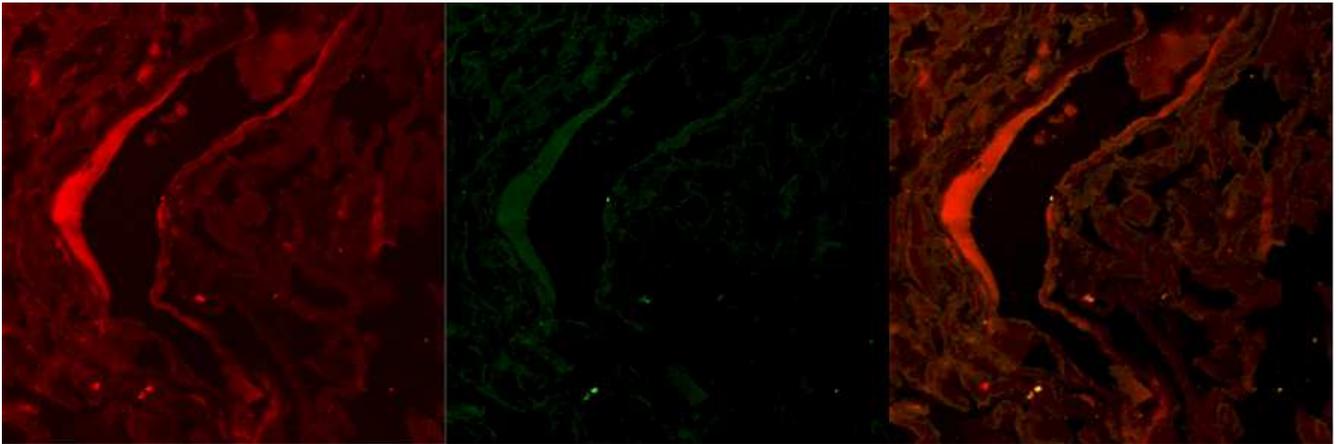


Fig. 23a. **Emangioma osservato al microscopio confocale laser.**

(a) L'immunofluorescenza rossa mostra l'over-espressione del p-PDGF $\beta$ R.

(b) L'immunofluorescenza verde mostra l'espressione dell'oncoproteina E5.

(c) Nell'immagine merged è possibile osservare la colocalizzazione del recettore e dell'oncoproteina.(Objective 40x).



(a)

(b)

(c)

Fig. 23b. **Campione normale osservato al microscopio confocale laser.**

(a) L'immunofluorescenza rossa mostra l'espressione del p-PDGFR costitutivo del tessuto.

(b) L'immunofluorescenza verde mostra l'assenza dell'oncoproteina E5.

(c) Nell'immagine merged non si osserva alcuna colocalizzazione.(Objective 40x).

Si ritiene pertanto che il BPV-2, oltre che un ruolo centrale nella cancerogenesi uroteliale, svolge un ruolo principale anche nella cancerogenesi mesenchimale della vescica trasformando le cellule mesenchimali con gli stessi meccanismi conosciuti per le cellule uroteliali (Roperto et al., 2013; Martano et al., submitted).

Benchè il BPV-2 sia considerato un virus prettamente oncogeno, non sempre, però, si rende responsabile di trasformazione cellulare.

Numerosi casi di infezioni in vitro della cellula trofoblastica sono stati riportati in letteratura (Hermonat et al., 1998). Non ci sono dati certi la reale incidenza dell'infezione verticale in vivo. Alcuni ritengono che PVs possono essere messi in evidenza come veri agenti infettanti nei trofoblasti di donne gravide (Weyn et al., 2010), altri, invece, ritengono che la presenza di PVs in trofoblasti e/o negli invogli

fetali rappresentino fenomeni di contaminazione piuttosto che infezioni attive reali (Syrjänen S., 2010).

Per la prima volta nella letteratura medica, è stato dimostrato che l'infezione da BPV-2 degli invogli fetali può avvenire realmente anche *in vivo* (Roperto et al., 2012).

In bovini affetti da tumori uroteliali, è stata dimostrata l'espressione della proteina L1, conosciuta essere espressa solo nelle infezioni produttive, nei trofoblasti di bovine gravide (Fig. 24 e Fig. 25).

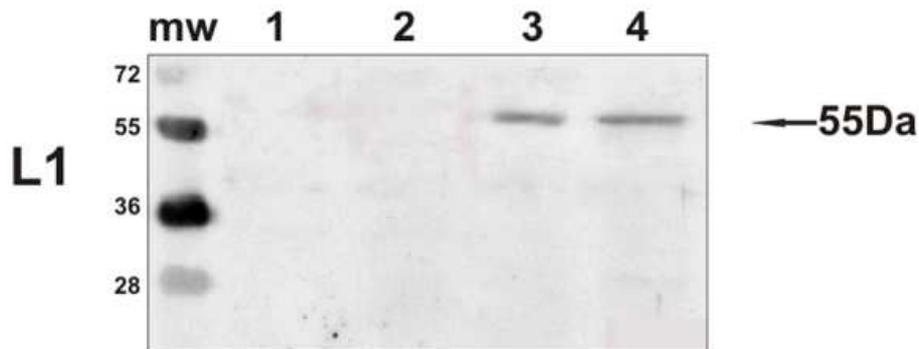


Fig. 24. **Espressione della proteina L1.** La presenza della proteina L1 nella placenta è stata documentata mediante analisi Western Blot. Linee 1-2: placenta di bovine sane. Linee 3-4: placenta di bovine con tumori della vescica associati a papillomavirus.

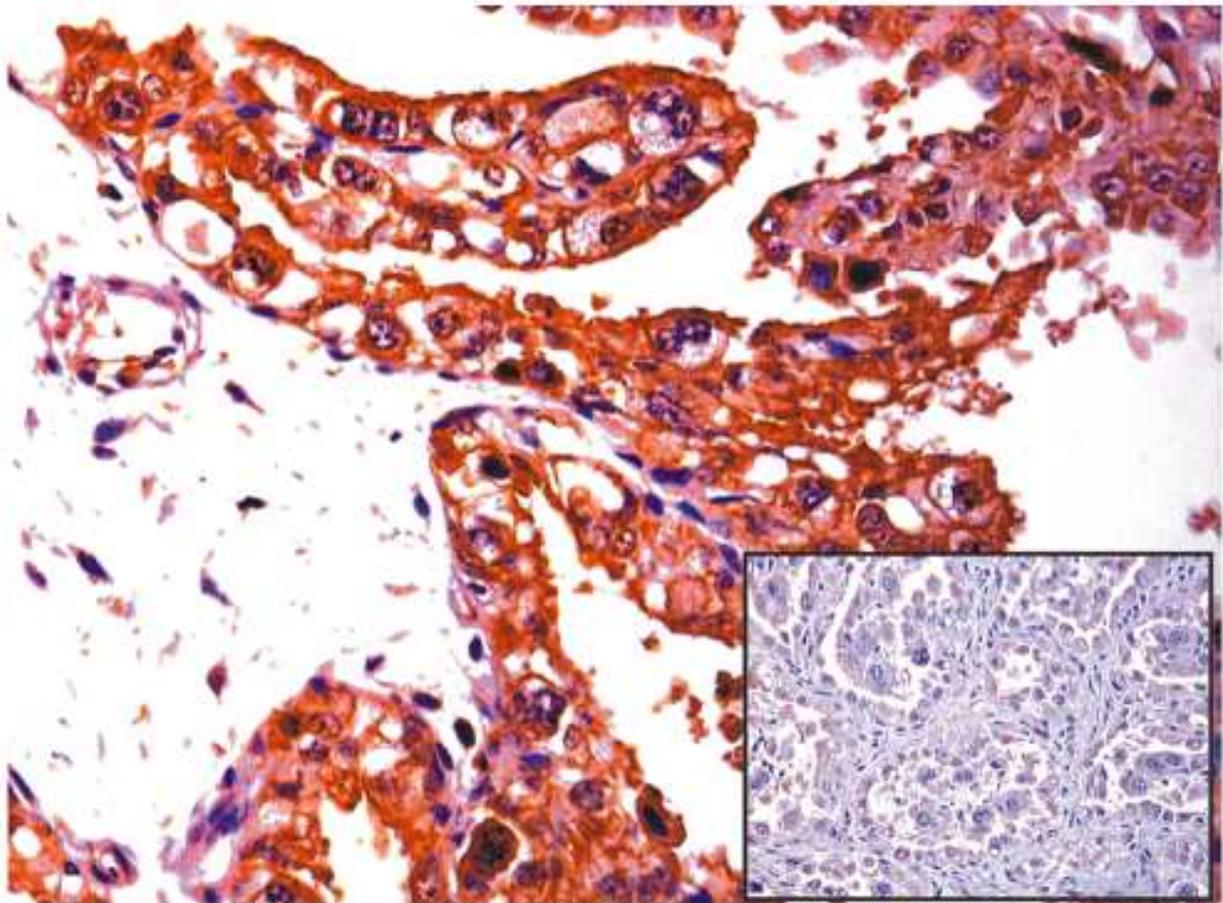


Fig. 25. **IHC L1.** L'indagine immunoistichimica conferma la presenza della protein L1 nell'epitelio uterino e corionico. Nel particolare: controllo negativo.

Il microscopio elettronico a trasmissione ha ulteriormente rafforzato il dato molecolare evidenziando, nei nuclei dei trofoblasti, la presenza di particelle virali (Roperto et al., 2012) (Fig. 26a/b).

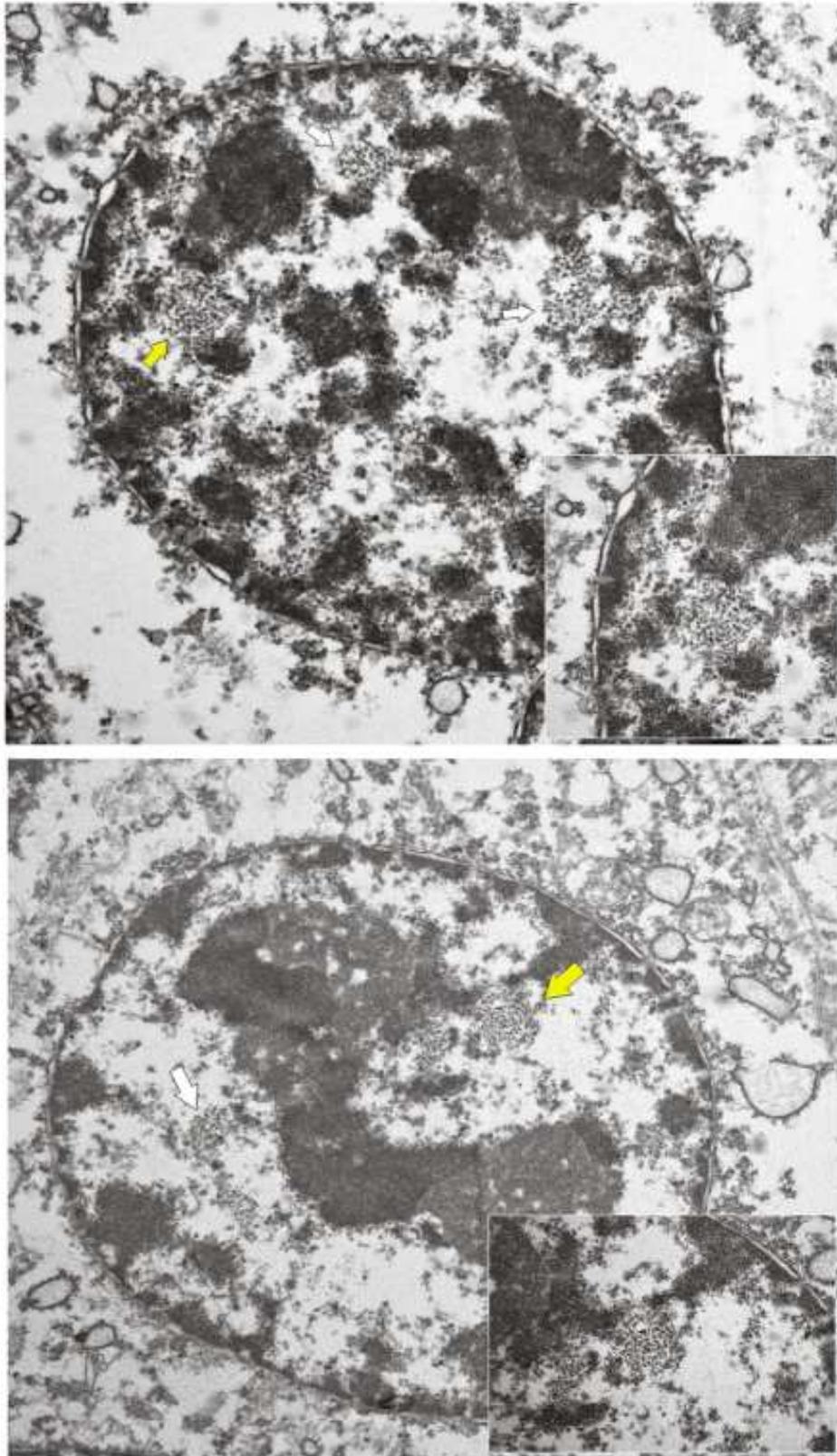


Fig. 26a. **Presenza di particelle virali.** L'indagine al microscopio elettronico a trasmissione mostra particelle virali elettrondense in un nucleo di una cellula trofoblastica (freccie Bianca e gialla). Magnification  $\times 15,000$ . Nel particolare: ingrandimento delle particelle virali mostrate dalla freccia gialla. Magnification  $\times 50,000$ .

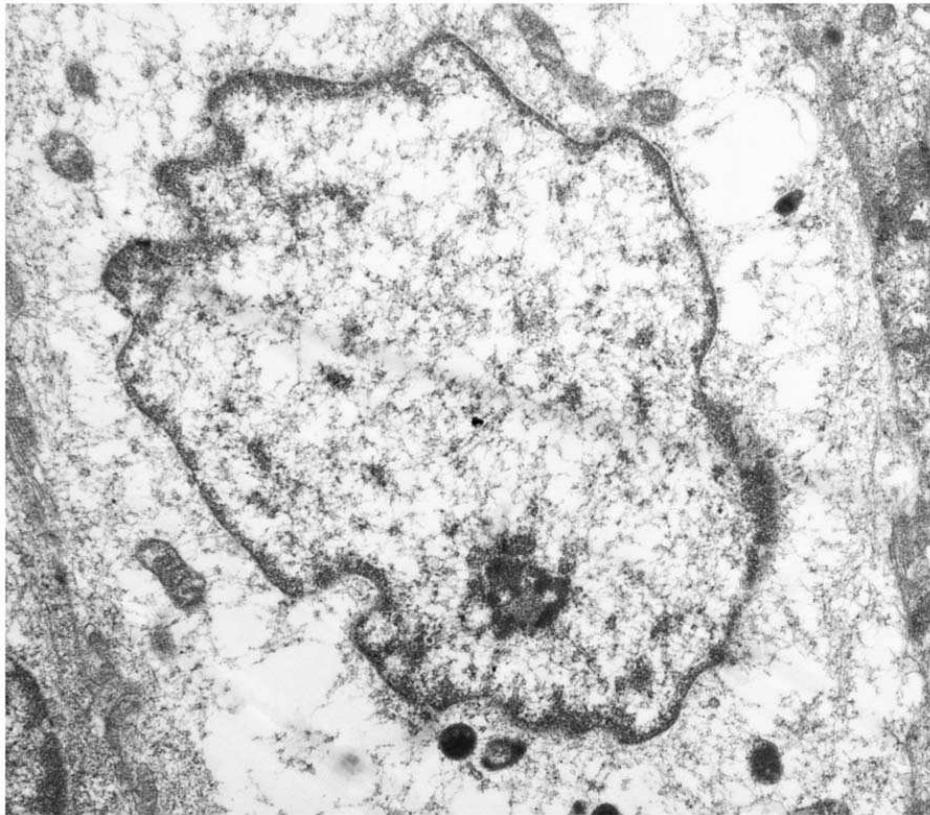


Fig 26b. **Assenza di particelle virali.** Nucleo di un trofoblasto prelevato da una placenta sana di un soggetto non infetto in cui non si osservano particelle virali. Magnification X15,000.

La presenza del virus nella placenta di bovine gravide solleva due problematiche che necessitano di ulteriori approfondimenti:

- a) L'infezione verticale può essere un evento reale anche *in vivo* e non solo *in vitro*;
- b) Quale ruolo il papillomavirus svolge nei disordini riproduttivi dei bovini?

E' bene ricordare che i disordini della sfera riproduttiva rappresentano la principale causa di perdite economiche nell'industria bovina, che l'eziologia della maggior parte di tali disordini risulta non definita e che agenti infettivi vengono sempre più individuati come responsabili di eventi quali aborti, infertilità, etc.

## **4. BIBLIOGRAFIA**

Alonso-Amelot M.E. & Avendano M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Curr Med Chem*, **9**: 675-686, 2002.

Anderson R.A., Scobie L., O'Neil B.W., Grindlay G.J., Campo M.S., Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours, *Vet. J.*, 69-78, 1997.

Balcos L.G., Borzacchiello G., Russo V., Popescu O., Roperto S., Roperto F. Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladders tumours in cattle from Romania, *Res. Vet. Sci.*, 8: 145-148, 2008.

Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., Hausen H. & de Villiers E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70–79, 2010.

Bjeldanes L.F. & Chang G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197: 577-578, 1977.

Borzacchiello G., Ambrosio V., Roperto S., Poggiali F., Tsirimonakis E., Venuti A., Campo M.S., Roperto F. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas in cattle from the south of Italy, *J. Comp. Path.* 128: 203-206, 2003.

Borzacchiello G., Iovane G., Marcante M.L., Poggiali F., Roperto F., Roperto S., Venuti A. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumors in cows, *J. Gen. Virol.* 84: 2921- 2926, 2003

Borzacchiello G., Russo V., Gentile F., Roperto F., Venuti A., Nitsch L., Campo M. S., Roperto S. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor b receptor in naturally occurring bovine urinarybladder tumours, *Oncogene* 25: 1251–1260, 2006.

Borzacchiello G., Russo V., Spoleto C., Roperto S., Balcos L., Rizzo C., Venuti A., Roperto F., Bovine papillomavirus type-2 DNA expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle, *Canc Lett* 18, 250 (1): 82-91, 2007.

Borzacchiello G. & Roperto F., Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle, *Vet Res* 39:45, 2008.

Bottalico D., Chen Z., Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. & Burk R.D. Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomical niches. *J Gen Virol* 93: 1774–1779, 2012.

Burkhardt A., Willingham M., Gay C., Jeang K.T., Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes, *Virology* 170: 334-339, 1989.

Burnett S., Jareborg N., DiMaio D. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue, *Proc Natl Acad Sci* 89: 5665-5669, 1992.

Campo M.S., Jarrett W. F.H., Barron R., O'Neil B.W., Smith K.T. Association of bovine Papillomavirus Type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle, *Cancer Res* 52: 6898-6904, 1992.

Campo M.S., Anderson R.A., Cairney M., Jackson M.E. Bovine papillomavirus type 4: from transcriptional control to control of disease; in "128<sup>th</sup> SGM Symposium- Viruses and Cancer ", A.C. Minson Editor, Cambridge University Press: 47-70, 1994.

Campo M.S., Jarrett W.F.H., O'Neil B.W., Barron R.J. Latent papillomavirus infection in cattle, *Res. Vet. Sci.* 56: 151-157, 1994.

Campo M.S., O'Neil B.W., Barron R.J, Jarrett W.F.H., Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle, *Carcinogen* 15: 1597-1601, 1994.

Campo M.S. Bovine papillomavirus and cancer, *Vet J* 154: 175-188, 1997.

Campo M.S. Vaccination against papillomavirus in cattle, *Clinics in Dermatology*, 15: 275-283, 1997.

Campo M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis, *Virus Res* 89:249-261, 2002.

Campo M.S. Papillomavirus and disease in human and animals *Vet Comp Oncol* 1: 3-14, 2003.

Castillo U.F., Ojika M., Alonso-Amelot M.E., Sakagami Y. Ptaquiloside Z, a new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical bracken fern

*Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9: 2229-2233, 1998.

Chang J.L., Tsao Y.P., Liu D. W., Huang S.J., Lee W.H., Chen S.L. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix, *J. Biomed Sci* 8: 206-213, 2001.

Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* 48: 12-17, 1907.

Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S. Human papillomavirus DNA replication,. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274(5):2696-705, 1999.

de Villiers E-M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U., zur Hausen H., Classification of papillomavirus, *Virology* 324: 17-27, 2004.

Dixon E.P., Pahel G.L., Rocque W.J., Barnes J.A., Lobe D.C., Hanlon M.H., Alexander K.A., Chao S.F., Lindley K., Phelps W.C. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270(2): 345-57, 2000.

Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352(6338): 824-7, 1991.

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

Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, IARC Press, Lyon, 2004.

Evans I.A. & Mason J. *Nature*, 1965; 208: 913-914.

Evans I.A. The radiomimetic nature of bracken toxin, *Cancer Res.* 28, 1968; 2252-2261.

Evans W.C. Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndroms, *Bot. J. Linn. Soc.* 73, 1976; 113-131.

Fehrman F. & Laimins L.A. Human papillomaviruses: targeting

differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003, 22: 5201-5207.

Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds) *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1990.

Frattini M.G. & Laimins L.A. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology*. 1994 Nov 1; 204(2):799-804.

Gava, D. da Silva Neves, D. Gava et al., "Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil," *Veterinary and Human Toxicology*, vol. 44, no.6, pp. 362-365, 2002.

Georgijev R., Vrigosov A., Antonov S., Dimitrov A., Versuche zur Feststellung der Anwesenheit kanzerogener Stoffe im Harn in mit Heu aus Hämaturiegebieten gefütterten Kühen, Wien. Tierarztl. Mschr, 1963; 50:589-595.

Gil da Costa R.m., Oliveira P.A., Bastos M.M.S.M. et al., "Ptaquiloside-induced early-stage urothelial lesions show increased cell proliferation and intact  $\beta$ -Catenin and E-Cadherin expression," *Environmental Toxicology*, vol. 27, no.8, pp. 1-5, 2012.

Goldstein D.J., Finbow T., Andresson T., Mc Lean P., Smith K., Bubb R., Schlegel R. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16-K component of vacuolar H(+)-ATPases, *Nature* 352, 1991, 347-349.

Hermonat PL, Kechelava S, Lowery CL, Korourian S (1998) Trophoblasts are the preferential target for human papilloma virus infection in spontaneously aborted products of conception. *Hum Pathol* 29: 170–174.

Hirono I., Shibuya C., Fushimi K., Haga M. Studies on Carcinogenic Properties of Bracken, *Pteridium Aquilinum*, *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 1970, 182-188.

Hirono I., Hosaka S., Kuhara K. Enhancement by bracken of induction of tumours of upper alimentary tract by N-propyl-N-Nitrosourethane, *Br. J. Cancer* 46, 1982, 423-427.

Hirono I., Aiso S., Hosaka S., Yamaji T., Haga M. Induction of mammary cancer in CD rats fed bracken diet, *Carcinogenesis* 4, 1983, 883-887.

Hirono I., Yamada K., Niwa H., Shizuri Y., Ojika M., Hosaka S., Yamaji T., Wakamatsu K., Kigoshi H., Niiyama K., Uosaki Y., *Cancer Lett.*, 1984; 21: 239-246.

Hirono I., Kono Y., Takahashi K., Yamada K., Niwa H., Ojika M., Kigoshi H., Hiiyama K., Uosaki Y. Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Vet. Rec.* 115, 1984, 375-378.

Howley P.M. Papillomaviridae: the viruses and their replication; in Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virology* ed. 3, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp 2045-2076.

Hughes F.J. & Romanos M.A. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 1993 Dec 25;21(25):5817-23.

IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses 2007*, vol. 90. Lyon: IARC Press.

Jarrett W.F.H., Mc Neal P.E., Grimshaw T.R., Selman I.E. & McIntyre W.I.M. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus, *Nature*, 1978; 274: 215-217.

Jarrett W.F.H. The natural history of bovine papillomavirus infections. *Advances in Viral Oncology*, 1985: 5: 83-102.

Laimins, L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201-223. *In* D. J. McCance (ed.), Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Lioi M.B., Barbieri R., Borzacchiello G., Dezzi S., Roperto S., Santoro A., Russo V., Roperto F. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic Haematuria, *J. Comp. Path.*, 2004; 131: 233-236.

Lott S., Lopez-Beltran A., MacLennan G.T. et al., Soft tissue tumors of the urinary bladder, Part I: myofibroblastic proliferations, benign neoplasms, and tumors of uncertain malignant potential, *Human Pathology*, vol.38, no.6, pp.807-823, 2007.

Longworth M.S. & Laimins L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):362-72. Review.

Lu J.Z., Sun Y.N., Rose R.C., Bonnez W., McCance D.J. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 1993 Dec;67(12):7131-9.

Lunardi M., Alfieri A.A., Otonel R.A., de Alcantara B.K., Rodrigues W.B., de Miranda A.B., Alfieri A.F. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol* 22, 162 (1): 207-2013, 2013.

Maiolino P., Özkul A., Sepici-Dincel A., Roperto F., Yücel G., Russo V., Urraro C., Lucà R., Riccardi M.G., Martano M., Borzacchiello G., Esposito I., Roperto S. Bovine Papillomavirus Type 2 (BPV-2) Infection and Urothelial Tumors of the Urinary Bladder in Water Buffaloes. *Biomed Res Intern* (submitted).

Marchetti B., Ashrafi G.H., Tsirimonaki E., O'Brien P.M., Campo M.S. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogene* 2002, Nov 7;21(51):7808-16.

Martano M., Roperto F., de Cassia Stocco R., Russo V., Borzacchiello G., Paciello O., Leonardi L., Maiolino P., Restucci B., Papparella S., Roperto S. Bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) infection and a series of mesenchymal tumors of the urinary bladder in cattle. *Biomed Research International* (submitted).

Masterson P.J., Stanley ;M.A., Lewis A.P., Romanos M.A. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol.* 1998 Sep;72(9):7407-19.

McKenzie R.A Bovine enzootic haematuria in queensland (F), *Aust. Vet. J.* 54, 1978: 61-64.

Meuten D.J. Tumors of the urinary bladder and urethra. In: *Tumors in Domestic Animals*, DJ Meuten, Ed., Iowa State Press, Ames, 2002; pp. 524-546.

Moody C.A. & Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):550-60.

Muller F., Giroglou T., Sapp. M. Characterization of the DNA-binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J Gen Virol.* 1997 Apr;78 ( Pt 4):911-5.

Nakayasu M., Sakamoto H., Terada M., Nagao M., Sugimura T. Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutat. Res.*, 1986; 174:79-83.

Olson C., Pamukcu, A.M., Brobst, D.F. Papilloma like-virus from bovine urinaty

bladder tumors. *Cancer Res.* 1965; 25: 840-849.

Ozkul, I. A. & Aydin, Y. Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. *Br Vet J* 1996, 152, 473–475.

Pamukcu, A. M. Tumors of the urinary bladder in cattle and water buffalo affected with enzootic bovine hematuria. *Zbl Vet Med* 1957, 4, 185–197.

Pamukcu A.M., Price J.M., Bryan G.T. Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumours, *Vet Pathol*, 1976; 13: 110-122.

Pamukcu A.M., Erturk E., Yalciner S., Milli U., Bryan G.T. *Cancer Res.*, 1978; 38: 1556-1570.

Pennie W.D., Grindlay G.J., Cairney M., Campo M.S. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4, *Virology* 193, 1993; 614-620.

Radostitis, O.M., Blood, D.C. and Gay, C.C. (1994) *Veterinary Medicine*, 8<sup>th</sup> edition. Baillière Tindall, 1559-1562.

Rogovskyy A.S., Baszler T.V., Bradway D.S., Bruning D.L., Davitt C.M., Evermann J.F., Burk R.D., Chen Z., Mansfield K.G. & Haldorson G.J. A novel papillomavirus isolated from proliferative skin lesions of a wild American beaver (*Castor canadensis*). *J Vet Diagn Invest* 2012, 24, 750–754

Roperto S., Brun R., Paolini F., Urraro C., Russo V., Borzacchiello G., Pagnini U., Raso C., Rizzo C., Roperto F., Venuti A. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumors: possible biological role, *J Gen Virol*, 2008; 89: 3027-3033.

Roperto S., De Tullio R., Raso C., Stifanese R., Russo V., Gaspari M., Borzacchiello G., Aversa M., Paciello O. et al. Calpain3 is expressed in a proteolytically active form in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle. *PLoS ONE* 2010, 5, e10299.

Roperto S, Borzacchiello G, Brun R., Leonardi L., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S., Restucci B., Russo V., Salvatore G., Urraro C., Roperto F., A review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder, *J.Comp.Path*, 2010; Oct. 7.

Roperto S, Comazzi S, Ciusani E, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Lucà R, Russo V, Urraro C, Venuti A, Roperto F. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papilloma virus type 2. *J Gen Virol.* 2011 Aug;92(Pt 8):1787-94.

Roperto S., Borzacchiello G., Esposito I., Riccardi M.G., Urraro C., Lucà R., Corteggio A., Tatè R., Cermola M., Paciello O., Roperto F. Productive infection of bovine papilloma virus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. *PLoS One.* 2012;7(3):e33569.

Roperto S., Paciello O., Borzacchiello G., Esposito I., Riccardi M., Lucà R., Urraro C., Ceccarelli DM., Russo V., Roperto F. – Is Bag 3 protein involved in autophagic mechanisms in papilloma virus-associated urothelial tumors in cattle? – Proceedings 30th Meeting of European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists – ESVP/ECVP Leon, Spain, p.67, 2012.

Roperto S., Russo V., Ozkul A., Sepici-Dincel A., Maiolino P., Borzacchiello G., Marcus I., Esposito I., Riccardi M.G. and Roperto F. Bovine papillomavirus type 2 infects the urinary bladder of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and plays a crucial role in bubaline urothelial carcinogenesis. *J. Gen. Vir.* 2013, 94, 403-408

Roperto S., Russo V., Ozkul A., Corteggio C., Sepici-Dincel A., Catoi C., Esposito I., Riccardi M.G., Urraro C., Lucà R., Ceccarelli D.M., Longo M., Roperto F. Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the urothelial cells of naturally occurring urinary bladder tumors in cattle and water buffalo. Plos one 2013, in press.

Rosenberger G. & Heeschen W., Dtsch Tieraerztl. Wochenschr., 1960; 67: 201-208.

Rowson K.E.K. & Mahy B.W.J. Human Papova (Wart) Virus, Bacteriol. Reviews 1967, 31, 110-131

Sedman J, Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. J Virol. 1998 Aug;72(8):6893-7.

Seo Y.S., Müller F., Lusky M., Hurwitz J. Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15;90(2):702-6.

Seo Y.S., Müller F., Lusky M., Gibbs E., Kim H.Y., Phillips B., Hurwitz J. papillomavirus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 1;90(7):2865-9.

Shahin M., Moore M.R., Worrall S., Smith B.L., Seawright A.A., Prakash A.S., H-ras activation is an early event in the ptaquiloside- induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998; 250: 491-497.

Smith B.L., Embling P.P., Agnew M.P., Lauren D.R., Holland P.T., Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium esculentum*) in New Zealand, N.Z. Vet. J. 36, 1988; 56-58.

Smith B.L., Shaw G., Prakash A.S., Seawright A.A., Studies on Dna formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (*Pteridium* spp.), in: S.M. Colegate, P.R. Dorling (Eds), Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects, CAB International, Wallingford, UK, 1994; pp. 167-172

Smith B.L., Seawright A.A., Ng J.C., Hertle A.T., Thomson J.A., Bostock P.D., Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* spp),

from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia, *Nat. Toxins* 2, 1994; pp. 347-353.

Smith, B.L. The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*, J.P.F. D'Mello, Ed., CRC Press, London, 1997; 63-76

Somogyi J.C., On antithiamine factors of fern, *J. Vitaminol.* 17, 1971: 165-174.

Somvanshi, R. Papillomatosis in buffaloes: a less-known disease. *Transbound Emerg Dis* 2011, 58, 327–332.

Somvanshi, R., Pathania, S., Nagarajan, N., Pangty, K. & Kumar, P. Pathological study of non-neoplastic urinary bladder lesions in cattle and buffaloes: a preliminary report. *Trop Anim Health Prod* 2012, 44, 855–861.

Suprynawicz, F. A., Baege, A., Sunitha, I. & Schlegel, R. c-Src activation by the E5 oncoprotein enables transformation independently of PDGF receptor activation. *Oncogene* 2002, 21, 1695–1706.

Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children.

APMIS 2010, 118: 494–509.

Taylor J.A., The bracken problem: a global perspective, AIAS Occasional Publication, No. 40, 1990; pp. 3-19.

Tryon R.M., A revision of the genus *Pteridium*, J.N. Engl. Bot. Club 43, 1941; pp. 1- 66.

Venuti A., Campo M.S., The E5 protein of papillomavirus, in: D. McCance (Ed.), human Papillomavirus- Perspectives in medical Virology, vol.8, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002, pp.143-164.

Villalobos- Salazar J., Meneses A, Rojas J.L., Mora J., Porras R.E., Herrero M.V., Bracken- derived carcinogens as affecting animal health and human health in Costa Rica, presented at International Bracken Group Meeting, Bangor, Wales, 1989.

Yamada K, Ojika M, Kigoshi H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. Nat Prod Rep. 2007 Aug;24(4):798-813.

Yang L., Mohr I., Fouts E., Lim D.A., Nohaile M., Botchan M. the E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 1;90(11):5086-90.

Watson W.A., Barnett K.C., Terlecki S., Vet. Rec., 1965; 77: 1060-1069.

Weyn C., Thomas D., Jani J., Guizani M., Donner C., et al. Evidence of human papillomavirus in the placenta. J Infect Dis 2010, 203: 341–343.

Wosiacki SR, Barreiro MAB, Alfieri AF, Alfieri AA, Semi-nested PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type-2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria, Journal of Virological Methods, 2005; 126: 215-219.

Wosiacki SR, Claus MP, Alfieri AF, Alfieri AA, Bovine papillomavirus type-2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2006; 101: 635-638.

Zhu, W., Dong, J. B., Zhang, J., Uchida, K., Watanabe, K. I., Goto, Y. & Haga, T. Bos grunniens papillomavirus type 1 (BgPV-1): a novel Deltapapillomavirus associated with fibropapilloma in yak. J Gen Virol. 2013 Jan;94(Pt 1):159-65.