

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE**

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 06/A3

Settore Scientifico Disciplinare: MED/07

**IL RUOLO DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA
NELLE ALTERAZIONI LINFOCITARIE
E NELLA COINFEZIONE DA *LEISHMANIA***

Presentata da: Dott.ssa Serena Longo

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Supervisore

Chiar.ma Prof.ssa Maria Carla Re

Esame finale anno 2018

INDICE

ABSTRACT	1
1. Introduzione.....	2
1.1 Il virus.....	3
1.2 Human Immunodeficiency Virus (HIV)	5
1.2.1 Classificazione	5
1.2.2 Struttura del virione	5
1.2.3 Genoma virale	6
1.2.4 Proteoma virale.....	9
1.2.5 Ciclo replicativo di HIV	11
1.2.6 Patogenesi	13
1.2.6.1 Co-morbilità	15
1.2.6.2 Co-infezioni.....	17
1.3 HIV e linfomi	19
1.3.1 Biologia delle cellule B.....	20
1.3.2 Linfomi	26
1.3.2.1 Epidemiologia dei linfomi a cellule B HIV-correlati.....	27
1.3.2.2 Patogenesi dei linfomi HIV-correlati.....	27
1.3.2.3 Sottotipi di linfomi HIV-correlati	28
1.4 Coinfezione <i>Leishmania</i>/HIV	31
1.4.1 Epidemiologia della Coinfezione <i>Leishmania</i> /HIV nel Mediterraneo	32
1.4.2 Immunopatogenesi della coinfezione <i>Leishmania</i> /HIV	34
1.4.3 Manifestazioni cliniche nel paziente coinfecto	36
1.4.4 Diagnostica della coinfezione <i>Leishmania</i> /HIV	37
1.4.5 Strategie terapeutiche e profilassi del paziente coinfecto.....	39
1.4.6 Impatto della HAART nel paziente coinfecto	40
1.4.7 Infezione asintomatica da <i>Leishmania</i>	40
2. Obiettivo della tesi.....	42
3. Materiali e metodi	44
3.1 Sottostudio 1	44
3.1.1 Determinazione di un protocollo specifico di attivazione dei linfociti B.....	44
3.1.1.1 Separazione delle cellule da sangue periferico	44
3.1.1.2 Purificazione dei linfociti B naïve	44
3.1.1.3 Purificazione dei linfociti B memory	46
3.1.1.4 Valutazione della purezza	48
3.1.1.5 Stimolazione dei linfociti B	48

3.1.1.6	<i>Analisi citofluorimetrica delle cellule attivate</i>	48
3.1.2	Analisi della correlazione HIV-1 Tat/NF-kB	49
3.1.2.1	<i>Estrazione delle cellule mononucleate da tonsilla</i>	49
3.1.2.2	<i>Separazione immunomagnetica delle cellule B</i>	49
3.1.2.3	<i>Purificazione delle cellule GCs</i>	50
3.1.2.4	<i>Coltura delle GCs</i>	51
3.1.2.5	<i>Western blotting</i>	51
3.2	Sottostudio 2	54
3.2.1	Monitoraggio virologico, parassitologico e immunologico di pazienti coinfecti <i>Leishmania</i>/HIV	54
3.2.1.1	<i>Monitoraggio della parassitemia (<i>Leishmania</i>)</i>	56
3.2.1.2	<i>Monitoraggio della viremia da HIV</i>	56
3.2.2	Studio di prevalenza dell'infezione asintomatica da <i>Leishmania</i>	57
3.2.2.1	<i>Disegno dello studio</i>	57
3.2.2.2	<i>Test sierologici</i>	57
3.2.2.3	<i>Test molecolari</i>	58
4.	Risultati	60
4.1	Sottostudio 1	60
4.1.1	Attivazione dei linfociti B	60
4.1.2	Valutazione dell'espressione di NF-kB	63
4.2	Sottostudio 2	64
4.2.1	Analisi dei pazienti coinfecti <i>Leishmania</i>/HIV	64
5.	Discussione e conclusioni	71
6.	Bibliografia	79

ABSTRACT

Tra le proteine codificate da HIV-1, Tat sembrerebbe essere responsabile della regolazione dei linfociti B del centro germinativo mediante l'attivazione costitutiva del fattore NF-kB, coinvolto nella linfomagenesi.

Per cercare di definire questa interazione, nella prima parte del progetto è stata ricercata la presenza di un'eventuale correlazione tra Tat e NF-kB in colture di cellule germinal center (GCs), isolate da organi linfoidi. L'espressione di NF-kB è stata valutata mediante Western blot a partire da colture di GCs attivate e trattate con Tat.

I dati ottenuti indicano che l'espressione di NF-kB nelle cellule GCs è finemente regolata nel tempo e la sua modulazione è connessa alla presenza di Tat.

In futuro, l'analisi micro-array dei profili di espressione genica in presenza/assenza di Tat è necessaria per determinare i *pathways* di trasduzione del segnale e i fattori di trascrizione coinvolti.

Dal momento che durante l'infezione da HIV si verificano numerose infezioni, nella seconda parte dello studio, è stata analizzata la coinfezione *Leishmania*/HIV.

La diagnosi precoce di infezione da *Leishmania* è indispensabile per poter introdurre una terapia mirata, ma viene raramente considerata negli algoritmi diagnostici con conseguente sotto-diagnosi.

Recentemente, in Emilia Romagna è stato registrato un aumento di casi di leishmaniosi, pertanto, è stato condotto uno studio su donatori sani in Valsamoggia (BO) per dimostrare la reale prevalenza delle infezioni asintomatiche. Gli anticorpi anti-*Leishmania* sono stati rilevati in 27/260 campioni analizzati mediante Western blot (10,4%), mentre il DNA di *Leishmania* è stato ritrovato in 4/260 campioni sottoposti a real-time PCR (prevalenza totale=11.5%).

Da questo studio è emerso che la Valsamoggia è una zona ad alta prevalenza di infezioni asintomatiche, dato rilevante soprattutto perché la leishmaniosi è solo la punta di un iceberg in cui bisogna considerare il rischio di riattivazione in soggetti immunocompromessi, come i pazienti HIV positivi, che necessitano di una diagnosi precoce.

1. Introduzione

Riportata in letteratura nel 1981, la Sindrome da Immunodeficienza Acquisita, altrimenti nota come AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), fu descritta per la prima volta dal Centro per la prevenzione e il controllo delle malattie (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) negli Stati Uniti [1]. Questa malattia fu definita come uno stato morboso associato principalmente a segni evidenti di compromissione del sistema immunitario, la cui perdita di integrità determina la comparsa di infezioni opportunistiche e neoplasie. Due anni più tardi, fu noto che l'AIDS rappresenta lo stadio clinico terminale dell'infezione da parte del virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus) [2].



1.1 Il virus

Il virus HIV fu isolato, pressoché contemporaneamente in Francia da Montagnier e negli USA dal gruppo di Gallo ed inizialmente etichettato come LAV (Lymphadenopathy associated virus) o HTLV-III, perché erroneamente ritenuto correlato ai retrovirus oncogeni umani già noti: HTLV-I e HTLV-II. I due prestigiosi istituti di ricerca rivendicano entrambi la paternità della scoperta, tanto clamorosa da valere il premio Nobel.

Solo negli ultimi due anni, il numero di persone che vivono con HIV è aumentato di circa un terzo, raggiungendo 17 milioni di persone infette. Dal 2003, da quando l'espansione dell'accesso alle cure è al centro di una serie di obiettivi di trattamento globale, i decessi annuali correlati all'AIDS sono diminuiti del 43% [3]. Nel mondo, la regione più colpita è l'Africa orientale e meridionale, che conta quasi 10,3 milioni di persone HIV positive, sebbene il numero di persone in trattamento sia raddoppiato dal 2010. Tuttavia, nel 2015 sono stati registrati 2,1 milioni di nuove infezioni da HIV in tutto il mondo, fino ad un totale di 36,7 milioni di persone che vivono con l'HIV [3].

Oggi sono noti due virus responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita umana: HIV-1 e HIV-2.

HIV-1 è il tipo più comune, presente in tutto il mondo, ed è responsabile della maggior parte dei casi di AIDS. HIV-2 è diffuso soprattutto in Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America meridionale ed è di gran lunga meno virulento, poiché provoca una malattia a decorso relativamente più attenuato. Virus analoghi, responsabili di sindromi assai simili (immunodeficienza acquisita), sono stati isolati anche in varie specie animali: scimmie (SIV), felini (FIV), etc. [4, 5].

Solo il 40% delle sequenze di HIV-1 e HIV-2 sono identiche. Sulla base delle similarità genetiche tra i due tipi virali, sono stati identificati quattro gruppi maggiori di HIV-1: M, N, O, P. All'interno del gruppo M, ci sono almeno nove sottotipi o cladi (A-D, F-H, J, K) che differiscono di circa il 15% nella sequenza del virus, distribuiti in modo non uniforme in tutto il mondo [6]. Quasi il 50% di tutte le infezioni da HIV sono dovute al sottotipo C di HIV-1, anche se il sottotipo B è quello più diffuso in Italia. L'infezione da HIV-2 ha invece una bassissima prevalenza (<50.000 infezioni) con due gruppi dominanti, A e B. Le diversità nella sequenza dei

gruppi HIV-1 non sembrano influenzare sostanzialmente il decorso della malattia, tranne forse per un tasso di progressione più lenta per quanto riguarda il sottotipo A [6, 7].

Una delle principali caratteristiche di HIV è la sua altissima variabilità genetica, che è il risultato dell'elevato tasso di errori introdotti dalla trascrittasi inversa, enzima che genera anche le forme virali ricombinanti circolanti (Circulating Recombinant Forms, CRFs) [8].

Tutti i sottotipi di HIV descritti possono avere diverse proprietà biologiche e sierologiche, ma le modalità di trasmissione sono le stesse: via sessuale; via parenterale, attraverso contatto con sangue o emoderivati infetti; via verticale, dalla madre al figlio durante la gravidanza (trans-placentare), durante il parto o successivamente con l'allattamento.

1.2 Human Immunodeficiency Virus (HIV)

1.2.1 Classificazione

HIV appartiene alla grande famiglia dei *Retroviridae*, suddivisa a sua volta in tre sottofamiglie, *Oncovirinae*, *Spumavirinae* e *Lentivirinae*, e in sette generi.

Alla famiglia *Oncovirinae* appartengono cinque generi diversi (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* ed *Epsilon-retrovirus*), la maggior parte dei quali correlati all'insorgenza di manifestazioni neoplastiche nell'animale, ma anche nell'uomo.

Alla famiglia *Lentivirinae* appartiene il genere *Lentivirus*, ed alla famiglia *Spumavirinae* appartiene il genere *Spumavirus*.

Interessano la patologia umana il genere *Delta-retrovirus* con i virus HTLV-I e HTLV-II (*Human T-lymphotropic virus I e II*) ed il genere *Lentivirus* con i virus HIV di tipo 1 e di tipo 2 [4].

1.2.2 Struttura del virione

I retrovirus, in generale, sono un gruppo di virus assolutamente peculiare per quanto riguarda l'organizzazione del virione.

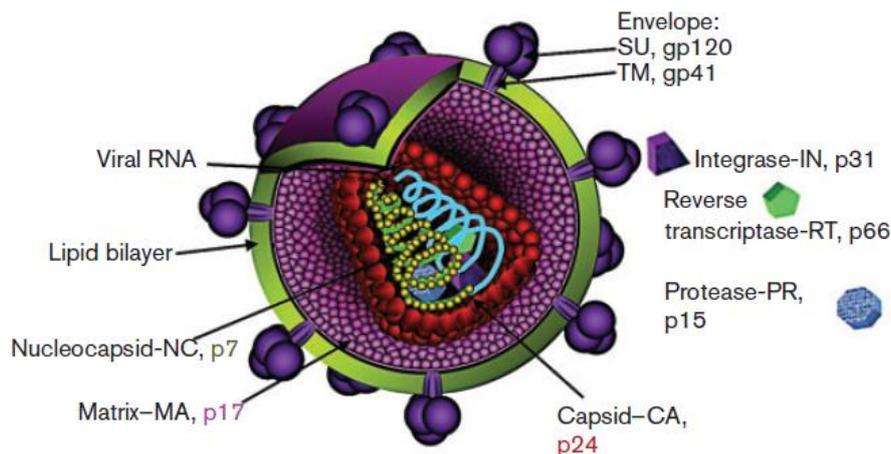


Figura 1. Struttura del virione di HIV. Rappresentazione schematica di un virione maturo di HIV con in dettaglio le proteine virali e le strutture della particella. La rappresentazione non è in scala [16].

Il virione di HIV (Figura 1) ha una struttura icosaedrica, con un diametro di 80-130 nm, ed è costituito da un *envelope* o pericapside, con peplomeri in genere evidenti, il quale racchiude un capsidico di forma tronco-conica ed un nucleocapsidico di probabile organizzazione elicoidale [4]. Il pericapsidico è costituito da un doppio strato fosfolipidico al quale sono associate le glicoproteine gp120 e gp41, mentre il capsidico riveste la struttura genomica del virus ed è costituito dalle proteine p24 (proteina del capsidico, CA), p9 e p7 (proteine nucleocapsidiche, NC). All'interno del capsidico si trova il genoma diploide di HIV, costituito da due molecole identiche di RNA monocatenario, di senso positivo di 8,3-11 kb. Inoltre, nel virione è presente un enzima importante per il virus, rappresentato dalla trascrittasi inversa o *DNA polimerasi RNA-dipendente*, essenziale per il ciclo replicativo del virus. [4, 9]

L'assemblaggio delle particelle virali neofornate avviene nel citoplasma contemporaneamente all'acquisizione dell'*envelope* mediante gemmazione attraverso la membrana cellulare. La proteina transmembrana gp41 è inserita nell'involucro lipidico, mentre gp120 resta ancorata all'estremità amino-terminale di gp41 ed è esposta sulla superficie della particella virale. Le due proteine si associano tramite interazioni idrofobiche formando i peplomeri.

La proteina p17 forma la matrice, costituita da uno strato continuo di 7 nm tra il pericapsidico e il nucleocapsidico ed è fondamentale nella fase di assemblaggio.

Le proteine p24, p9 e p7 sono codificate dal gene *gag* e hanno il compito di costituire l'involucro capsidico. In particolare, la proteina p24 matura forma il caratteristico *core* conico che avvolge il complesso RNA-proteine del virus.

1.2.3 Genoma virale

Nel capsidico virale si trova il genoma di HIV, costituito da due molecole di RNA a polarità positiva di circa 10 kb poliadenilate all'estremità 3' e mantenute insieme, a livello dell'estremità 5', in un dimero speculare. Codifica diverse informazioni necessarie al ciclo di replicazione virale, sia per la sintesi proteica sia per la trascrizione del virus. Alle estremità di ciascuna molecola di RNA genomico sono presenti delle sequenze di basi delle quali quella più esterna (sequenza R) è ripetuta, mentre quella più interna è unica al 5' (sequenza U5) e al 3' (sequenza U3). Le due sequenze uniche sono retroscritte ad entrambe le estremità del DNA provirale, che risulta quindi più lungo della molecola di RNA di partenza. La sequenza U3-R-U5 di ogni estremità forma la regione *Long Terminal Repeat* (LTR), che costituisce la

sequenza *promoter-enhancer* necessaria alla trascrizione del provirus [10, 11]. All'estremità 5' del genoma è posizionata la regione transattivante altamente conservata (TAR), che rappresenta il sito di legame per la proteina virale Tat. Questa è seguita dalla regione *polyA-hairpin* contenente un elemento di regolazione negativa, ma che gioca un ruolo importante nell'esporto nucleare, nella dimerizzazione e nell'assemblaggio dei virioni [12]. Le due molecole di RNA sono appaiate a una corta molecola di *RNA transfer* della cellula ospite, che funge da *primer* per l'enzima trascrittasi inversa. Il genoma viene assemblato grazie al riconoscimento di un segnale di *packaging* contenuto nella sequenza *Psi* (Ψ) al 5', che contiene a sua volta il sito di iniziazione della dimerizzazione (DIS) nel *loop* distale, il quale, tramite una sequenza palindroma, media interazioni RNA-RNA tra i due filamenti di RNA mediante la formazione di un 'kissing loop'. A seguire, la regione *splice donor* (SD) contiene il sito principale di *splicing* coinvolto nella generazione degli RNA messaggeri (mRNA) virali *spiced*. Più a valle nella regione codificante, la regione *gag-pol frameshift* controlla il rapporto tra le poliproteine Gag e Gag-Pol. Verso l'estremità 3' del genoma nella regione codificante Env, l'elemento di risposta Rev (RRE), composto da circa 350 nucleotidi, costituisce una piattaforma di legame per più proteine virali Rev, consentendo l'esportazione nucleare degli *unspliced* e *singly spliced* mRNA virali [13].

L'organizzazione genomica di HIV è estremamente efficiente: è costituito da nove geni che codificano per quindici proteine virali (Figura 2) [14]. I tre geni principali *gag* (*group antigen*), *pol* (*polymerase*) ed *env* (*envelope*), codificano, rispettivamente, per le proteine strutturali (matrice, capside, nucleocapside, p6), per gli enzimi (proteasi, trascrittasi inversa (RT), integrasi) e per le proteine dell'envelope (gp120, gp41). I geni rimanenti codificano per le proteine regolatorie (Tat, Rev) e le proteine accessorie (Vif, Vpr, Vpu/Vpx, Nef) [15]. Queste proteine virali possono espletare molteplici funzioni e sono in grado di interagire con varie proteine umane durante il ciclo di replicazione di HIV.

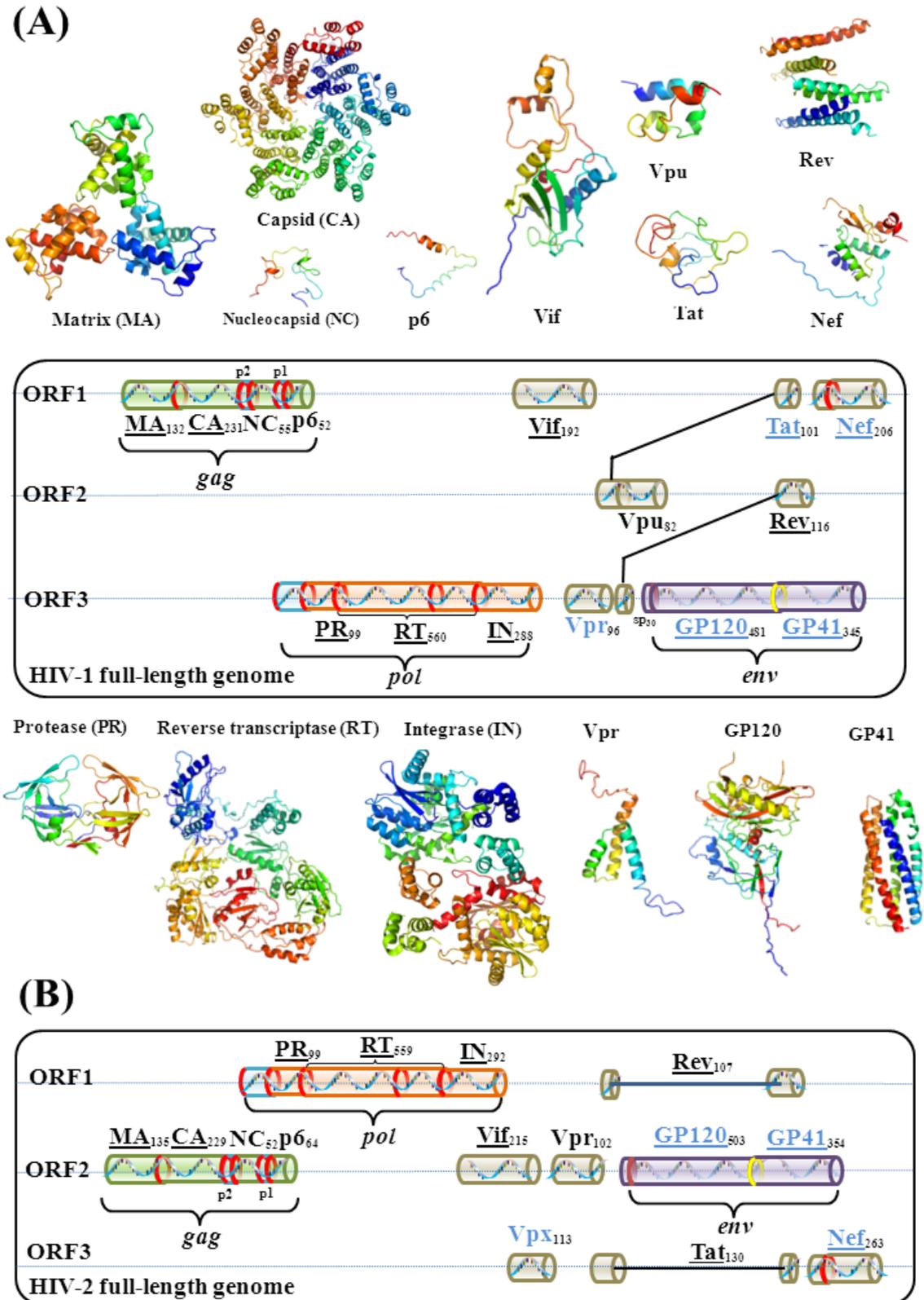


Figura 2. (A) Regioni codificanti del genoma di HIV-1 con mappe geniche, nomi e strutture proteiche. (B) Regioni codificanti del genoma di HIV-2 con mappe geniche, nomi e strutture proteiche [16].

1.2.4 Proteoma virale

I tre geni gag, pol ed env sono tradotti nelle rispettive poliproteine, successivamente scisse nelle proteine funzionali definitive, comuni a tutti i retrovirus.

Inizialmente, i geni gag e pol sono co-tradotti in una poliproteina unica di 180 kDa (p180), in seguito scissa in una proteina di 55 kDa (p55) e negli enzimi virus-specifici (proteasi, trascrittasi inversa e integrasi). La proteina p55 è a sua volta scissa in tre proteine ovvero p17 (di matrice), p24 (capsidica) e p9 (nucleocapsidica), che rappresentano le proteine strutturali del core del virione. Il gene env viene tradotto prima nella proteina p88, che viene poi glicosilata (gp160) e scissa nelle due glicoproteine gp41 (transmembrana) e gp120 (di superficie), componenti fondamentali dell'envelope virale. Ogni peplomero presente sulla superficie del virione è formato da tre eterodimeri gp41-gp120.

Il genoma di HIV codifica per sei proteine addizionali, due delle quali svolgono essenziali funzioni regolatrici e sono Tat e Rev; le altre quattro proteine (Vif, Vpr, Vpu e Nef) sono invece chiamate proteine accessorie [4, 15].

Tra le proteine regolatrici, *Tat* (*transactivation of transcription*) è una proteina di 14 kDa che funziona da transattivatore della trascrizione del provirus, rientrando nel nucleo una volta sintetizzata. La sua funzione scaturisce dal legame con una specifica sequenza (*tat-responsive o TAR*) degli RNA nascenti, a cui si lega Tat favorendo il reclutamento di fattori trascrizionali sul promotore provirale e attivando degli “adattatori” trascrizionali costituiti dalla proteina p300 e dalle proteine correlate CBP (*CREB binding protein*) con attività acetiltransferasica nei confronti degli istoni della cromatina che, modificandosi nella conformazione, favoriscono la trascrizione del DNA. Inoltre, Tat è in grado di legare il complesso CT1/CDK9 (ciclina T1/cycline-dependent kinase 9), che fosforila diversi siti presenti nell'estremo c-terminale della RNA polimerasi II, la quale, in questo modo, porta a termine la completa trascrizione del genoma provirale. Tat viene anche secreta all'esterno della cellula e può interagire sia con la membrana della stessa cellula produttrice (loop autocrino), sia con quella delle cellule vicine non-infette (loop paracrino). In questo modo, all'esterno della cellula, Tat innesca una cascata di *signalling* che si traduce in un incremento della quantità di fattori trascrizionali attivati disponibili nella cellula e, quindi, in un incremento della trascrizione del provirus. Nelle cellule vicine, invece, la proteina può transattivare la trascrizione di

numerosi geni cellulari produttori di citochine e/o fattori di crescita anche in cellule non-infette.

La proteina *Rev* (*regulatory of virus*) di 19 kDa è implicata nella regolazione della produzione di RNA virus specifici. Interagisce, infatti, con specifiche sequenze (*Rev-responsive elements* o *RRE*) presenti nella regione env degli RNA messaggeri, proteggendoli dallo *splicing* e consentendone l'esportazione dal nucleo come messaggeri di dimensioni maggiori.

La proteina *Vpu* (*virus protein U*) è una proteina di 16 kDa, la cui funzione è quella di facilitare il trasporto del prodotto del gene env verso la membrana cellulare, in quanto gp160 viene spesso trattenuta nel reticolo endoplasmatico dai linfociti T CD4 neosintetizzati dalla cellula. *Vpu* induce il turnover dei CD4 reclutando un complesso ubiquitina-ligasi, causando quindi la degradazione proteasomica di queste molecole. In secondo luogo, ha anche il compito di impedire la localizzazione sulla membrana cellulare di una proteina di membrana, Tetherin, un fattore di restrizione della cellula ospite in grado di interferire con il rilascio dei virioni neoformati dalla cellula infetta, bloccando così la diffusione dell'infezione. *Vpu* è assente in HIV-2, dove è presente *Vpx*, che ha una funzione ancora incerta ma che viene utilizzata per la diagnosi differenziale tra i due tipi virali.

La proteina *Nef* (*negative factor*) è una proteina di 27 kDa, ritenuta erroneamente con funzione di regolazione negativa della replicazione virale, ma che, invece, ha una funzione positiva sia sulla replicazione virale sia sull'infettività. È una delle prime proteine ad essere espresse dopo l'infezione e riveste un importante ruolo nella regolazione di proteine cellulari di superficie dei linfociti T citotossici, aiutando così il virus a sfuggire alla risposta immunitaria cellulo-mediata.

La proteina *Vif* (*virion infectivity factor*) è una proteina di 23 kDa che condiziona la capacità del virus di produrre una progenie virale infettante. Favorisce la degradazione attraverso il sistema ubiquitino-dipendente di una citosina-deaminasi (APOBEC3G), che di norma provoca la degradazione della catena nascente del DNA provirale deaminando i residui citidinici.

Infine, la proteina *Vpr* (*viral proteine R*) di 14 kDa, viene incorporata nel virione e favorisce il trasporto nel nucleo del genoma provirale e delle proteine associate, che successivamente andranno incontro ad integrazione nel genoma cellulare [4].

1.2.5 Ciclo replicativo di HIV

La replicazione virale di HIV a livello cellulare prevede una serie di fasi che iniziano nel momento in cui il virus si lega a specifici recettori sulla superficie cellulare e finiscono quando le particelle virali nascenti maturano in virioni infettanti. Durante questo processo, HIV recluta una miriade di fattori cellulari per eseguire compiti specifici e allo stesso modo i fattori di restrizione della cellula ospite contrastano la diffusione dell'infezione virale [17, 18].

Ingresso virale. L'infezione inizia con l'ancoraggio del virione alla cellula bersaglio: le *spikes* dell'velope virale, costituite da trimeri di eterodimeri uniti da legami non-covalenti della glicoproteina di superficie gp120 e della glicoproteina transmembrana gp41, danno inizio a una cascata di cambiamenti conformazionali che culminano nella fusione tra la membrana del virus e quella della cellula ospite e il rilascio del core virale nel citoplasma. L'interazione virus-cellula richiede il riconoscimento, da parte di gp120, di due proteine recettoriali presenti sulla superficie della cellula ospite [19-21]. La presenza o l'assenza di tali proteine limita la gamma di cellule suscettibili all'infezione da HIV. Il recettore fondamentale, per il quale la gp120 presenta un'elevatissima affinità, è rappresentato dalla molecola CD4, presente sulla superficie dei linfociti T-helper. La molecola CD4 funziona da ligando specifico per le molecole MHC II (Major Histocompatibility Complex di classe II), durante i processi di interazione cellulare legati al riconoscimento dell'antigene, ed è presente anche su monociti presenti nel sangue circolante, nei macrofagi tissutali, nelle cellule dendritiche follicolari dei linfonodi, nelle cellule della microglia dell'encefalo e nelle cellule dendritiche della cute e delle mucose. Il virus HIV infetta primariamente i linfociti T CD4 positivi e i macrofagi. Un'interazione iniziale tra gp120 e il recettore di superficie CD4 induce la formazione di un ponte tra il dominio interno ed esterno del monomero di gp120, esponendo il sito di legame per una seconda molecola di superficie. Infatti, oltre al CD4, è necessaria la presenza di corecettori per consentire l'ingresso del virus, rappresentati da molecole transmembranarie con sette domini. La gp120 è deputata, quindi, alla presa di contatto con entrambi i recettori cellulari, sia primario che secondario. In particolare, è l'ansa variabile V3 che, esposta in seguito al legame con il recettore primario o CD4, protrude spazialmente e va ad interagire elettrostaticamente con i primi due loops extracellulari del recettore secondario [22]. Nello specifico, alla superficie dei

macrofagi, il corecettore è rappresentato dalla molecola CCR5 (recettore specifico per le chemochine RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) e la sua presenza è essenziale per l'infettività degli stipiti macrofagotropi. Gli stipiti di HIV-1 linfotropi, invece utilizzano come corecettore la molecola di superficie CXCR4, che è il recettore per la chemochina SDF-1 (stromal cell derived factor-1) [4, 23]. Esiste anche un certo numero di stipiti duotropici in grado di infettare sia cellule macrofagiche sia linfociti CD4. Il legame al corecettore causa l'esposizione e l'apertura della porzione distale del trimero della subunità gp41 che si inserisce nella membrana cellulare provocandone la fusione con contenuto del virione [24].

Retrotrascrizione e integrazione. Una volta entrato nella cellula, il virus intraprende un processo chiamato “uncoating”, durante il quale si libera della struttura esterna e forma un complesso di retrotrascrizione. Il genoma a RNA è prima retrotrascritto nel DNA corrispondente (cDNA) a singolo filamento, poi convertito in DNA a doppio filamento, il quale forma con le proteine virali e cellulari il complesso che viene trasportato al nucleo della cellula. L'endonucleasi/integrasi virale consente l'inserzione del cDNA nel DNA cromosomico della cellula ospite. Il *provirus* integrato può essere trascrizionalmente attivo oppure rimanere in uno stato di latenza nei *reservoir* virali, costituiti da cellule (in particolare CD4+ *memory*) in cui il virus non si replica e non può essere rilevato dal sistema immunitario o raggiunto dalla terapia.

Trascrizione. Il DNA provirale integrato può dare l'avvio ad un ciclo di replicazione virale, andando a instaurare un'infezione produttiva. Il provirus è caratterizzato dalla presenza di copie identiche dell'LTR che fiancheggiano le regioni codificanti. Il 5' dell'LTR funziona come promotore, regolando la produzione dei trascritti di RNA, i quali sono anche regolati da fattori trascrizionali della cellula ospite e dalla proteina virale Tat [25]. Gli mRNA virali che vengono esportati nel nucleo sono di piccole dimensioni e vengono prodotti da una serie di *splicing* alternativi. La proteina Tat è una delle prime proteine ad essere codificate, poiché gioca un ruolo chiave in questo processo. Essa rientra nel nucleo e recluta il fattore positivo cellulare di elongazione P-TEFb, complessato all'eterodimero ciclina T1/CDK9 sul sito TAR dei trascritti. Successive fosforilazioni dei residui Ser2 e Ser5 della subunità maggiore della RNA polimerasi II da parte della CDK9 attivata,

stimoleranno l'elongazione trascrizionale [26-30]. Anche la proteina Rev rientra nel nucleo, dove si lega agli RNA messaggeri virali e li protegge dall'azione degli spliceosomi nucleari, legandosi alla struttura RRE dell'RNA codificante. In questo modo permette l'uscita dal nucleo dei messaggeri più lunghi, che verranno in parte tradotti nelle poliproteine strutturali e in parte vanno a costituire il genoma dei virioni neoprodotti [25].

Assemblaggio e maturazione virale. Le proteine strutturali del retrovirus del capsido, della matrice e del nucleocapsido (CA, MA e NC, rispettivamente) sono sintetizzate come parte integrante del polipeptide precursore di Gag e sono sufficienti alla promozione dell'assemblaggio della particella virale, all'associazione alle glicoproteine e alla gemmazione del virione neoformato. Il dominio MA di Gag, situato all'estremità aminotermine di p55, è responsabile del legame alla membrana plasmatica, mediata dall'aggiunta di acido miristico. L'incapsidamento è mediato da interazione tra il segnale di *packaging* e il dominio NC di Gag, che permette il *folding* nella struttura energeticamente più favorevole. La tappa conclusiva del processo consiste nella gemmazione della particella virale dalla membrana della cellula ospite, che è regolata dalle sequenze *late* (L) presenti in p6. In seguito al rilascio del virus, l'enzima proteasi processa le poliproteine Gag e GagPol per produrre le proteine strutturali definitive. Attraverso una serie di tagli proteolitici, le modifiche strutturali risultanti portano alla maturazione del virione, il quale acquisisce un core conico elettrondenso, dovuto alla presenza di p24.

1.2.6 Patogenesi

Nella maggior parte dei casi, l'infezione da HIV-1 rappresenta la tappa iniziale di un processo che si traduce, dopo un periodo di tempo piuttosto lungo di latenza clinica, in un drammatico quadro patologico che si conclude invariabilmente con la morte del paziente.

L'infezione è sempre la conseguenza della trasmissione di sangue o di altri liquidi biologici, anche in tracce non avvertite, da un soggetto infetto a un soggetto sano. HIV-1 è stato isolato da sangue, sperma, secrezioni vaginali, liquido cefalorachidiano e latte materno. La trasmissione si verifica nella maggior parte dei casi attraverso rapporti sessuali non protetti e l'uso promiscuo di siringhe. Il fattore più importante che aumenta il rischio di trasmissione sessuale di HIV-1 è la carica virale, ovvero il

numero di copie di HIV-1 RNA per mL di plasma (viremia), con un rischio incrementato di 2-4 volte per ogni log₁₀ [31]. Nei vari materiali biologici, il virus si può trovare sotto forma di virioni isolati o virioni contenuti in cellule mononucleate infette del sangue periferico. L'infezione può trasmettersi anche dalla madre infetta al feto per via diaplacentare, oppure al neonato durante il parto o il successivo allattamento.

Tipicamente, la trasmissione di HIV attraverso le membrane mucosali è stabilita da un unico virus fondatore, che possiede caratteristiche fenotipiche uniche [32].

L'*infezione primaria* comprende il periodo di tempo che va dal momento dell'infezione iniziale allo sviluppo di una reazione anticorpale evidenziabile con i test di routine (sieroconversione). Dopo un periodo di 3-6 settimane, si manifesta clinicamente la cosiddetta "sindrome retrovirale acuta" con sintomi aspecifici come febbre, linfadenopatie, stanchezza, esantema maculo-papulare fugace, che si esaurisce spontaneamente in pochi giorni. Durante l'infezione primaria, la viremia raggiunge spesso valori elevati che però declinano rapidamente, grazie al controllo della risposta immunitaria dell'organismo. In particolare, i linfociti T citotossici CD8 sono soggetti ad una marcata espansione clonale per il controllo dell'infezione. In questa fase, il numero di linfociti T CD4 in genere diminuisce e può determinare la comparsa di infezioni opportunistiche [33].

In seguito all'infezione acuta, si stabilisce un equilibrio tra la replicazione virale e la risposta immunitaria dell'ospite e il soggetto entra in quella che viene definita la "fase cronica" dell'infezione o di "latenza clinica". Durante la latenza clinica, il soggetto non presenta segni patologici importanti, sebbene il virus continui a replicare attivamente; questa fase può perdurare molti anni (in media sette) anche in assenza di terapia specifica. Allo stesso tempo, i soggetti infetti presentano un calo progressivo del numero di linfociti T CD4 periferici, che viene ripristinato grazie all'uso di farmaci antiretrovirali che comportano una soppressione della replicazione del virus [4]. Precocemente si verifica un massivo incremento della viremia, che determina la disseminazione del virus ai tessuti linfoidi, in particolare al GALT (Gut-associated lymphoid tissue), ed avrà come risultato lo sviluppo dell'AIDS conclamato, stadio finale della malattia. L'instaurarsi di quest'ultimo, in genere, coincide con il calo del numero dei linfociti T CD4 al di sotto di 200 cellule/ μ l di sangue e la comparsa di una serie di infezioni opportunistiche da microrganismi o virus scarsamente patogeni per la popolazione normale, nonché di manifestazioni

neoplastiche e, infine, la cosiddetta encefalopatia da HIV (e conseguente AIDS-related dementia). Nonostante la disponibilità di farmaci antivirali e antibiotici, lo stadio di AIDS conclamato è destinato a concludersi con la morte del paziente, anche a causa della risposta inefficace di un sistema immunitario ormai inesistente.

L'integrazione stabile del DNA virale nel cromosoma della cellula ospite permette la persistenza e latenza dei genomi virali per tutta la durata della vita delle cellule infette. Tuttavia, se la cellula ospite viene riattivata, la latenza può essere revertita e la cellula può produrre attivamente la progenie virale. Il meccanismo principale attraverso il quale HIV-1 elude la risposta immunitaria non è la latenza, ma piuttosto la rapida evoluzione di mutazioni che annullano il riconoscimento da parte degli anticorpi neutralizzanti e dei linfociti T citotossici [34].

La popolazione linfocitaria T CD4 HIV-specifica è quella più esposta all'azione letale dell'infezione virale. Poiché una quota dei linfociti CD4 attivati ed infetti si ridifferenziano in cellule della memoria non più attivate, essi finiscono col formare un importante *reservoir* di cellule portatrici del genoma provirale integrato (infezione latente) dove il virus può persistere al riparo dagli effettori della risposta immunitaria.

Ad oggi, l'introduzione della terapia antiretrovirale nella pratica clinica ha migliorato radicalmente l'aspettativa di vita dei pazienti con infezione da HIV. Tuttavia, le interazioni tra il virus e l'ospite, l'attivazione cronica del sistema immunitario e l'infiammazione persistente possono provocare un aumento dell'incidenza di varie comorbidità e dell'infezione da parte di altri patogeni nel paziente HIV positivo [35].

1.2.6.1 Co-morbidity

Oltre alla progressiva compromissione del sistema immunitario e alla perdita dei linfociti T CD4+, l'infezione da HIV comporta anche disfunzioni a livello di altre cellule e tessuti. L'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (cART) in pratica clinica ha drasticamente modificato l'evoluzione di questa infezione, che si può definire ormai cronica con una lunga aspettativa di vita per i pazienti. Nonostante questi progressi registrati in campo terapeutico, la cART non è in grado di eradicare l'infezione e nei pazienti HIV-infetti è possibile notare un aumento di patologie generalmente definite "non-AIDS". Il progressivo invecchiamento dei soggetti con HIV genera, infatti, un costante e crescente numero di pazienti con comorbidità direttamente associate all'infezione da HIV. Attualmente, gli effetti

della soppressione cronica di HIV in questo gruppo di pazienti non sono ancora stati del tutto studiati.

L'immunodeficienza e l'immunoattivazione sostenute da HIV e dalle coinfezioni associate contribuiscono al rischio di sviluppo di eventi che condizionano negativamente la prognosi del paziente. In particolare, tra le comorbidità più riscontrate si annoverano quella ai danni dell'osso, portando osteopenia e osteoporosi, ma anche al sistema cardiovascolare e renale [36-40]. Inoltre, il sistema nervoso centrale è soggetto al danno da parte del virus, con conseguente demenza HIV-indotta e danni neuronali [41, 42].

Uno studio di coorte prospettico ha mostrato come le più comuni comorbidità che conducono alla morte del paziente HIV positivo siano neoplasie non-AIDS, patologie cardiovascolari e malattia del fegato [43]. Da uno studio svizzero condotto da Hasse è emerso che l'incidenza di ictus, infarto del miocardio, diabete mellito, fratture delle ossa fragili, e patologie non-AIDS è significativamente elevata in persone che hanno più di 65 anni [44].

Neoplasie considerate AIDS-correlate, come il sarcoma di Kaposi, il linfoma primario del sistema nervoso centrale e il cancro alla cervice, hanno avuto un calo drammatico con l'avvento della terapia soppressiva ART [45]. Oltretutto, l'incidenza di queste neoplasie insieme a cancro anale, carcinoma epatocellulare, cancro testa-collo, cancro al polmone, linfoma non-Hodgkin e melanoma è aumentata così significativamente che ora rappresentano una delle più comuni cause di morte in pazienti HIV positivi negli USA [46].

La deregolazione del sistema immunitario e l'infiammazione cronica nei pazienti HIV infetti possono promuovere l'aumentare della proliferazione cellulare e generare specie reattive dell'ossigeno potenzialmente dannose [47]. La disfunzione immune associata all'infezione da HIV potrebbe anche compromettere il sistema immunitario che non sarebbe più in grado di trovare ed eliminare le cellule tumorali precoci [48]. I fattori di rischio tradizionali associati all'insorgenza del cancro sono più prevalenti nei soggetti HIV infetti [49,50]. Alcuni di questi includono il fumo, con conseguente cancro al polmone, ma anche i virus dell'epatite B e C, associati a insorgenza di carcinoma epatocellulare. L'incidenza è più alta anche per il linfoma di Hodgkin, spesso associato a coinfezione con EBV [51].

1.2.6.2 Co-infezioni

Durante l'infezione da HIV, la deplezione dei linfociti T CD4+ porta ad allentare la sorveglianza immunologica di infezioni che sono asintomatiche in soggetti sani.

Prima dell'avvento della terapia antiretrovirale, l'attenzione è stata rivolta alle coinfezioni in pazienti HIV positivi e al loro effetto sull'immunità dell'ospite. Dai primi studi in vitro, è emerso che le infezioni endemiche nei paesi poveri aumentano la trascrizione di HIV e attivano fortemente l'immunità cellulare [52-55]. Successivi studi in vivo hanno mostrato che il trattamento delle coinfezioni potrebbe tradursi in una riduzione della carica virale di HIV [56]. Alcuni organismi, infatti, possono facilitare la replicazione di HIV, ma questi effetti non sono stati ancora ben elucidati.

Mycobacterium tuberculosis è uno dei principali patogeni coinvolti in coinfezioni con HIV in pazienti dei paesi in via di sviluppo. Dai risultati di alcuni studi è emerso che questa coinfezione si traduce in un aumento dell'attività replicativa di HIV [57].

Dati sperimentali suggeriscono che l'infezione da *Plasmodium falciparum* potrebbe causare un aumento della replicazione di HIV attraverso l'induzione di citochine proinfiammatorie ed, inoltre, potrebbe aumentare la suscettibilità all'acquisizione del virus (ad esempio da madre a figlio) mediante l'*upregulation* dei recettori chemochinici [58].

Studi funzionali sugli effettori immuni nella coinfezione HIV/elminti hanno riportato una riduzione della capacità di stimolare la risposta immune dei linfociti T a vari antigeni [59]. Risultati di esperimenti in vivo e studi su animali suggeriscono che la diminuzione dell'attività cellulare immune è attribuibile a uno stato di iperresponsività e a un incremento dell'attività apoptotica dei linfociti [60,61].

Le infezioni sessualmente trasmesse aumentano il rischio di acquisizione di HIV, prima di tutto facilitando la trasmissione attraverso infiammazione e ulcerazione delle mucose genitali, ma anche aumentando la concentrazione di HIV RNA nelle secrezioni plasmatiche e genitali dei pazienti infetti [62-64].

Altre coinfezioni virali, come virus dell'epatite C, citomegalovirus e morbillo, accelerano il ciclo replicativo di HIV [65].

Un'altra importante coinfezione è *Leishmania*/HIV. La leishmaniosi viscerale è implicata nella progressione di HIV in America Latina, parte del Sud-est asiatico, Europa settentrionale e Mediterraneo orientale. Diversi studi hanno dimostrato che i

promastigoti di *Leishmania* inducono la replicazione di HIV e causano un continuo incremento delle concentrazione di HIV RNA nel siero di pazienti coinfecti [66-68].

1.3 HIV e linfomi

I pazienti con infezione da HIV, rispetto alla popolazione generale, presentano un rischio considerevolmente aumentato di sviluppare neoplasie virus indotte come i linfomi [69]. L'aumentato rischio di sviluppare un linfoma sembra essere correlato a fattori multipli, che includono le proprietà di trasformazione stesse del retrovirus, l'immunosoppressione e la deregolazione delle citochine derivate dalla malattia, e le infezioni opportunistiche con altri herpesvirus linfotropici, come il virus Epstein-Barr (EBV) e l'herpesvirus umano 8 (HHV8). Questa eterogeneità nella patogenesi dei linfomi nei pazienti HIV-infetti si riflette nella loro classificazione in diversi sottotipi morfologici.

La classificazione WHO delle neoplasie linfoidi definisce varie classi di linfomi HIV-associati sulla base dei pazienti in cui si presentano: (1) in pazienti immunocompetenti, (2) in pazienti HIV-positivi, e (3) in pazienti con altre forme di immunosoppressione (Figura 3) [70]. Di questi linfomi, la maggior parte è rappresentata da neoplasie delle cellule B, che si verificano anche nel paziente immunocompetente, in particolare disordini B-linfoproliferativi (soprattutto linfomi di non-Hodgkin a cellule B).

Box 1 Categories of HIV-associated lymphomas
(1) Lymphoma also occurring in immunocompetent patients
• Burkitt and Burkitt-like lymphoma
• Diffuse large B-cell lymphoma
– Centroblastic
– Immunoblastic (including primary CNS lymphoma)
• Extranodal marginal zone lymphoma of MALT type
• Peripheral T-cell lymphoma
• Classical Hodgkin lymphoma
(2) Lymphoma occurring more specifically in HIV-positive patients
• Primary effusion lymphoma
• Plasmablastic lymphoma of the oral cavity type
(3) Lymphoma also occurring in other immunodeficiency states
• Polymorphic B-cell lymphoma (PTLD-like)
Adapted and modified from Raphael <i>et al.</i> ¹

Figura 3. Categorie di linfomi HIV-associati [70].

La maggior parte dei linfomi a cellule B deriva da disordini nel normale sviluppo dei linfociti B del centro germinativo (*germinal center cells, GCs*). Nel centro germinativo le cellule B vanno incontro a ipermutazione somatica (SHM, somatic hypermutation) e switch isotipico di classe (CSR, class switch recombination), fenomeni per cui queste cellule sono particolarmente suscettibili a mutazioni oncogeniche e traslocazioni cromosomiche [71].

1.3.1 Biologia delle cellule B

Le cellule B, o linfociti B, sono cellule del sistema immunitario che giocano un ruolo primario nell'immunità umorale dell'immunità acquisita. Rappresentano, infatti, la linea di difesa successiva all'immunità innata e aspecifica, costituita da elementi cellulari e solubili, le cui principali caratteristiche sono legate ai concetti di specificità, memoria e tolleranza immunologica.

I linfociti circolano nel sangue e nella linfa, ma possono localizzarsi anche a livello di specifici tessuti o organi linfoidi, costituiti sostanzialmente da aggregati linfocitari in un'impalcatura di cellule stromali non linfoidi. Gli organi linfoidi vengono suddivisi in primari, detti anche centrali, dove si generano e maturano i linfociti, e in organi linfoidi secondari o periferici, ovvero le sedi in cui viene innescata la risposta immunitaria adattativa. Midollo osseo e timo sono organi primari; degli organi secondari fanno invece parte i linfonodi, la milza e il tessuto associato alle mucose (MALT) [72].

Maturazione dei linfociti B. Il midollo osseo contiene cellule B a diversi stadi di sviluppo, dai progenitori più precoci alle cellule B mature [73].

Lo sviluppo dei *lineage* B procede attraverso diverse fasi di riarrangiamento ed espressione dei geni che codificano per le immunoglobuline. Il riarrangiamento delle catene pesanti inizia durante lo stadio pro-B e dà origine a catene I μ che vengono espresse sulla superficie delle cellule insieme a catena SCL (*surrogate light chain*) a formare il *pre B-cell receptor* (BCR) nelle cellule pre-B larghe. Il *signalling* innescato dal pre-BCR induce una proliferazione clonale, la *downregolazione* del pre-BCR e la ricombinazione delle catene leggere delle immunoglobuline. Lo stadio successivo di *small pre-B cells* si contraddistingue per l'assenza del pre-BCR e per l'espressione di catene pesanti μ esclusivamente nel citoplasma. In questa fase avviene il riarrangiamento delle catene leggere che risulta successivamente

nell'espressione del BCR, composto da due catene pesanti μ e due catene leggere λ o κ (IgM) sulla superficie dei linfociti immaturi. Questi ultimi danno luogo a cellule B mature, che producono, attraverso meccanismi di *splicing* di mRNA, catene pesanti δ e μ ed esprimono sulla loro superficie IgM e IgD.

I diversi stadi di linfopoiesi B sono accompagnati dall'espressione di specifici marcatori superficiali e dalla mediazione di diversi fattori di trascrizione. CD19 e CD45 sono gli antigeni più precoci ad essere espressi che, insieme al CD20, sono *markers* di appartenenza al sistema linfocitario B. Le cellule pro-B si distinguono anche per l'espressione di CD43, IL-7 R e CD117 (detto c-kit). Lo stadio avanzato pro-B è caratterizzato dalla espressione del CD24 e del recettore dell'interleuchina 2, CD25. Le cellule pre-B si distinguono fenotipicamente per l'espressione dell'enzima BP-1, mentre c-kit e IL-2 tendono ad essere persi.

Lo stadio pre-B è caratterizzato dall'espressione del pre-BCR, sostituito negli stadi successiva dall'espressione di IgM nelle cellule immature e di IgM/IgG in quelle mature, *naïve* [73-75].

I linfociti *naïve* possono essere suddivisi in due popolazioni, CD5- e CD5+, entrambe IgM+IgD+; esprimono bassi livelli di CD38 e sono negative per alcuni marcatori, quali CD10 e CD27, che vengono espressi dai linfociti B in fasi più tardive.

Il processo di maturazione dei linfociti B è sottoposto ad un processo di fine regolazione trascrizionale. I fattori E2A e EBF cooperano nello stimolare il differenziamento delle cellule pro-B, quindi giocano un ruolo chiave nell'indirizzare specificamente il processo di linfopoiesi verso la linea B [75]. I due fattori promuovono l'espressione dei geni che codificano per le catene SCL ($\lambda 5$ e VpreB), dei geni RAG1 e RAG2 che attivano la ricombinasi, e dei geni mb1 e B29 che codificano per componenti del pre-BCR e del BCR. Inoltre E2A ed EBF inducono Pax-5 che è fondamentale per il commissionamento e il mantenimento del *lineage* B. Pax-5 reprime l'espressione di Notch e M-CSF R, che rispettivamente sono determinanti per il differenziamento verso la linea T e verso quella mieloide. Inoltre, attiva l'espressione dei determinanti delle cellule B, tra cui il CD19 e la proteina *linker* BLNK, oltre che promuovere la ricombinazione dei segmenti VDJ.

Organizzazione e funzioni del germinal center. I *germinal centers* rappresentano uno snodo cruciale per lo sviluppo delle risposte umorali, la cui

formazione inizia quando i linfociti B *naïve* vengono attivati dal legame con l'antigene e dalla contemporanea stimolazione da parte dei linfociti T *helper*.

A seguito del contatto con l'antigene, i linfociti B presenti nei tessuti linfoidi periferici cominciano a raccogliersi nella zona a limite tra i follicoli e le aree dove sono presenti le cellule T. Il loro movimento è guidato dalla rapida *up-regolazione* del recettore chemochinico CCR7, conseguente all'attivazione da parte dell'antigene. L'incontro tra linfociti *helper* e B innesca l'iniziale proliferazione dei linfociti B, che è richiesta per poi dare origine a quelle risposte che sono dipendenti dal *germinal center*. Per la sua formazione risulta cruciale l'interazione tra il recettore CD40, membro della famiglia dei recettori TNF costitutivamente prodotto dalle cellule B, e il suo ligando CD40L (CD154) che è espresso dai T *helper* attivati. Si è osservato che il *signalling* mediato dal recettore CD40 gioca un ruolo importante in eventi multipli legati all'attivazione delle risposte umorali T-dipendenti, che includono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule B, la formazione del *germinal center* e delle cellule di memoria e il *class switching* delle immunoglobuline. In particolare il CD40 può innescare *pathways* molecolari che attivano diversi fattori di trascrizione tra cui AP-1 e NF- κ B. Quest'ultimo è considerato l'effettore principale del *signalling* CD40 mediati [76]. Inoltre, gli *helper* secernono citochine segnale che guidano la proliferazione e il differenziamento dei linfociti B e hanno la funzione di innescare fenomeno di *class switching* necessari per la produzione dei diversi isotipi anticorpali.

Dopo l'iniziale attivazione, le cellule B in fase proliferativa possono procedere verso due distinti *pathways* di migrazione e differenziamento. Da una parte migrano verso le aree extrafollicolari, dove sono indotte a espandersi e a differenziare in plasmablasti e poi plasmacellule, che rappresentano la più immediata fonte di anticorpi antigene-specifici e che assicurano una protezione rapida prima che vengano attivate le risposte umorali dipendenti dai *germinal centers*. Altre cellule B antigene-attivate si localizzano a livello dei follicoli, dove danno origine ai *germinal centers*.

La migrazione dei linfociti B attivati verso distinti microambienti che supportano il loro differenziamento in plasmacellule o cellule GC è mediata dall'espressione differenziale di recettori chemochinici: CXCR5, CCR7 e CXCR4 e i loro rispettivi ligandi. Nelle cellule che differenziano in plasmacellule viene *down-regolato* il CXCR5 e *up-regolato* il CXCR4, ed inoltre viene espressa la proteina EB12,

importante per la migrazione delle cellule alla periferia dei follicoli. I linfociti che danno luogo ai *germinal centers*, invece, mantengono l'espressione del CXCR5, mentre esprimono bassi livelli di EBI2 con conseguente accumulo di queste cellule nel centro del follicolo B, dove originano i *germinal centers*.

L'organizzazione di queste strutture è emersa da analisi istologiche di tonsille umane e tessuti linfoidi murini. Nei *germinal centers* maturi vengono stabiliti due compartimenti, ovvero una zona scura e una zona chiara, così definiti sulla base del loro aspetto istologico, circondate da un mantello di cellule B *naïve* follicolari. La zona scura è localizzata in prossimità dell'area occupata dalle cellule T e contiene centroblasti ad elevata densità. Si tratta di cellule B di grandi dimensioni e in attiva proliferazione, sulla cui superficie viene *down-regolata* l'espressione delle immunoglobuline. Nella porzione distale del *germinal center* è situata la zona chiara dove la densità delle cellule B è minore a causa della presenza di una rete di cellule dendritiche follicolari (FDC). I linfociti B che occupano questa zona sono i cosiddetti centroцити, cellule piccole, non più in fase di divisione, che esprimono immunoglobuline sulla loro superficie. La compartimentalizzazione dei *germinal centers* dipende dalla diversa concentrazione di chemochine nelle due zone e dall'espressione del recettore CXCR4. I centroblasti esprimono livelli più alti di questo recettore e la concentrazione del suo ligando, CXCL12, è più abbondante nella zona scura. Quindi la regolazione positiva del CXCR4 guida la loro localizzazione in questa zona del *germinal center*. Nella zona chiara è invece espresso il CXCR5 e il suo ligando CXCL13.

Centroцити e centroblasti si distinguono tra loro, oltre che per una diversa organizzazione topologica e per un diverso stato proliferativo, anche sulla base di caratteristiche fenotipiche. In generale, i marcatori molecolari delle cellule del *germinal center* sono il CD10, il CD38 e le mutazioni nei geni delle regioni variabili delle immunoglobuline. I centroblasti esprimono l'antigene nucleare Ki67 e possono essere identificati attraverso l'espressione del CD77 sulla loro superficie cellulare. I centroцити perdono l'espressione di entrambe le proteine [77].

Le popolazioni accessorie del *germinal center* sono le cellule dendritiche FDC, cellule stromali con lunghi processi che occupano la zona chiara e che non derivano da precursori ematopoietici. Esse trattengono gli antigeni senza processarli, ma complessandoli con i loro recettori (CD32, CD35, CD23) e sembrano avere un ruolo nella selezione di cloni ad alta affinità per l'antigene. Una seconda popolazione

accessoria è rappresentata dai linfociti T *helper*, che hanno un ruolo cruciale nel regolare la sopravvivenza cellulare dei linfociti B.

I *germinal centers* sono i siti in cui avviene la diversificazione e la maturazione dell'affinità per l'antigene da parte dei linfociti B. Durante la proliferazione nei *germinal centers*, le cellule B sono soggette a fenomeni di ipermutazione somatica che interessano le regioni variabili delle immunoglobuline. Il tasso di mutazione è molto alto (circa 10^{-3} bp/generazione). Le mutazioni risultano in cambiamenti casuali della specificità e dell'affinità degli anticorpi verso l'antigene. I cloni che esprimono varianti con un'aumentata capacità di legare l'antigene vengono selezionati positivamente e si espandono, mentre quelli che hanno una ridotta capacità di legame vanno in apoptosi. In questo processo di selezione, sembra che i centroblasti, che nella zona scura si dividono e vanno incontro a ipermutazioni somatiche, tornino ad esprimere sulla loro superficie le Ig, e migrino nella zona chiara formando i centrociti. Nella zona chiara, i cloni mutanti con un'incrementata affinità vengono selezionati positivamente attraverso l'interazione con gli antigeni trattenuti dalle cellule FDC. I cloni di cellule B selezionati positivamente possono differenziare in cellule di memoria e plasmacellule, che escono dal *germinal center* [78, 79].

Fattori di trascrizione del germinal center. Diversi fattori sono coinvolti nella formazione del *germinal center*, tra i quali BCL6, Pax-5, OCT binding factor (OBF1), i membri della famiglia ETS (SPIB, BACH2), l'interferon regulatory factor 8 (IRF8). Anche le proteine STAT, in particolare la forma fosforilata attiva STAT5 è stata rilevata in un *subset* di cellule B, che probabilmente rappresentano i centrociti. Il fattore NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), costituito da diverse subunità (p50, p65 e c-REL) viene espresso in tutte le cellule B mature, ma viene trattenuto in uno stato inattivo nel citoplasma, legato al suo inibitore I κ B. La traslocazione di queste subunità nel nucleo attiva l'espressione di specifici geni coinvolti nell'attivazione, nella sopravvivenza e nel differenziamento cellulare. La maggior parte delle cellule GC non mostra l'attivazione di NF- κ B, tuttavia è stata rilevata la localizzazione nucleare di p65 e c-REL in alcuni *subset* di centrociti [80].

La regolazione trascrizionale a livello del *germinal center* viene mediata da molteplici fattori, tra i quali svolgono un ruolo fondamentale BCL-6 e Pax-2. In generale, la loro funzione è legata all'inibizione transitoria del differenziamento

terminale delle cellule B per consentire i processi di maturazione di affinità anticorpale. Topi defettivi per BCL-6 non sviluppano le reazioni e le risposte ad esso legate. Si tratta di un repressore trascrizionale che agisce su geni bersaglio reclutando complessi di corepressori. Questo fattore è determinante poiché conferisce alle cellule B del *germinal center* la capacità di avere un elevato tasso proliferativo mentre si realizzano i processi di rimodellamento genomico. BCL-6, infatti, sopprime l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare bloccando la trascrizione dei geni bersaglio di p53. In particolare, permette alla cellula di sostenere lo stress genotossico fisiologico associato all'elevata proliferazione e mantiene le rotture sul DNA indotte dai processi di ipermutazione e ricombinazione. Inoltre, inibisce i geni coinvolti nell'attivazione T-dipendente delle cellule B, tra cui CD9, STAT1 e CD80, prevenendo l'attivazione prematura dei linfociti B. Un'altra funzione di BCL-6 consiste nell'inibire il differenziamento delle cellule GC in plasmacellule, mediante la repressione di BLIMP1 [80]. Il fattore Pax-5, invece, è richiesto sia per il commissionamento delle cellule verso il *lineage* B, ma agisce anche da regolatore negativo dei geni associati alla secrezione di anticorpi nelle plasmacellule, quali XBP-1 e IgH [81].

Plasmacellule e cellule di memoria. Il differenziamento dei linfociti del *germinal center* in plasmacellule richiede l'attivazione di specifici fattori trascrizionali, tra i quali di particolare importanza sono Blimp-1 e XBP-1. Una volta indotto, Blimp-1 viene espresso e va a reprimere i geni richiesti per le funzioni del *germinal center*, tra cui BCL6 e Pax-5, i geni legati alla proliferazione (c-Myc, E2F) e i geni che codificano per i componenti del *signalling* di BCR. In primo luogo, avviene la repressione di BCL6 da parte del fattore IRF4 attivato da NF- κ B, a seguito della stimolazione del CD40 indotta dai linfociti T *helper*. La repressione di Pax5 inoltre fa sì che XBP1 venga espresso e possa attivare i geni coinvolti nella secrezione delle immunoglobuline [81].

Anche i linfociti B di memoria originano dal *germinal center*. Il marker principale che contraddistingue queste cellule è il CD27, che appartiene alla famiglia dei recettori del *tumor necrosis factor* (TNF). I linfociti B del sangue periferico o degli organi linfoidi secondari sono presenti per un 50-60% come cellule *naïve* CD27- e un 40-50% come cellule di memoria CD27+. Nell'uomo si distinguono diversi *subset* di cellule B di memoria, le cosiddette *class switched cells*, che esprimono IgG, IgA e

IgE (40%), ma anche linfociti IgM positivi. Le cellule di memoria rispondono alla stimolazione degli antigeni differenziandosi in plasmacellule [82].

1.3.2 Linfomi

I linfomi sono un gruppo eterogeneo di tumori che originano dai tessuti linfoidei e derivano da processi di trasformazione neoplastica a carico dei linfociti. Queste neoplasie interessano, quindi, gli organi del sistema linfatico, linfonodi, milza e midollo osseo, ma possono manifestarsi anche in sede extranodale se insorgono nei tessuti linfoidei associati alla mucosa.

I linfomi sono patologie linfoproliferative che determinano un ingrossamento degli organi linfatici interessati dal processo tumorale. I sintomi clinici più ricorrenti sono linfadenopatie superficiali o profonde, e splenomegalia accompagnate spesso da sintomi sistemici.

La diagnosi di linfoma, di fondamentale importanza per individuare una terapia corretta, viene effettuata definendo le caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche, citogenetiche e molecolari e individuando la stadiazione, ovvero l'estensione della patologia.

La classificazione dei linfomi che è attualmente valida è quella redatta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2008, revisionata nel 2016. Schematicamente si possono raggruppare i linfomi in due famiglie principali: linfomi di Hodgkin (HL) e linfomi di non-Hodgkin (NHL) di derivazione linfocitaria B, T o a carico delle cellule natural killer (NK).

I linfomi a cellule B rappresentano circa l'80-90% dei tumori NHL diagnosticati e comprendono numerose tipologie tumorali con caratteristiche diverse [83]. Le cellule B sono particolarmente predisposte a sviluppare fenotipi maligni perché l'apparato generico che serve per la diversificazione degli anticorpi si avvale non soltanto di meccanismi di riarrangiamento genico, ma anche di processi di ipermutazione somatica e *class switching*, che rendono più probabile il verificarsi di traslocazioni cromosomiche e mutazioni oncogeniche. Queste alterazioni risultano spesso nella deregolazione dei *pathways* molecolari che i linfociti B utilizzano per attivarsi a seguito dell'esposizione antigenica [77]. Tra i geni più frequentemente implicati nella linfomagenesi B si annoverano c-Myc, BCL6, NF-κB, BCL2, la Ciclina D1, Pax5 [83].

Molti tumori possono derivare dai *germinal centers*, nei quali i linfociti B mostrano un'instabilità genomica particolarmente spiccata. L'analisi genetica, insieme alla determinazione delle caratteristiche fenotipiche cellulari, permettono di discriminare i linfomi pre-*germinal center* da quelli che originano dai *germinal centers* o sono post-germinali. Questi ultimi mostrano mutazioni somatiche a carico delle sequenze geniche che codificano per le regioni variabili degli anticorpi [75].

1.3.2.1 Epidemiologia dei linfomi a cellule B HIV-correlati

Nei pazienti HIV-infetti il rischio relativo di sviluppare NHL è superiore di almeno 20-200 volte rispetto alla popolazione generale [84, 85]. Per alcuni sottotipi di linfoma, in particolare il linfoma primario del sistema nervoso centrale, il rischio nei pazienti positivi era 1000 volte superiore nei primi anni dell'epidemia AIDS [86]. La diffusione della terapia antiretrovirale HAART dal 1996 ha permesso una riduzione significativa del rischio, di pari passo all'incremento della conta dei CD4 [87-89]. Inoltre, la HAART ha avuto altri effetti sulle caratteristiche epidemiologiche dei linfomi HIV-correlati. Uno studio dei registri di dati San Diego County Cancer Registry e San Diego County AIDS registry ha mostrato che l'incidenza dei linfomi a cellule B si è ridotta dal 38% al 19% dopo l'introduzione della HAART. Inoltre, ogni sottotipo di linfoma è correlato a un diverso livello di immunosoppressione: il linfoma di Burkitt, ad esempio, insorge in pazienti con normale conta dei CD4; linfomi del sistema nervoso centrale molto spesso si presentano più tardi nel corso dell'infezione da HIV in un contesto di marcata immunodeficienza.

1.3.2.2 Patogenesi dei linfomi HIV-correlati

Studi in vitro suggeriscono che HIV ha proprietà trasformanti, anche se le cellule neoplastiche non sono infette dal virus. Laurence and Astin hanno mostrato che l'infezione da HIV di cellule B derivate da individui EBV-sieropositivi induce immortalizzazione delle cellule B, deregolazione di MYC, e attivazione di EBV [89]. Alcuni prodotti genici di HIV, in particolare la proteina regolatoria Tat, sono potenzialmente oncogeni per il loro ruolo di transattivatori di geni cellulari, come IL6 e IL10 [91]. Inoltre, la proteina Tat può direttamente interferire sul controllo del ciclo cellulare mediante l'interazione con le proteine regolatorie Rb2/p13017. Nello specifico, questo ruolo di Tat è implicato nella patogenesi del linfoma di Burkitt HIV-correlato [92].

L'infezione da HIV contribuisce primariamente alla linfomagenesi mediante meccanismi indiretti. Il rischio aumentato di sviluppare linfoma tra i pazienti HIV positivi sembra essere correlato a fattori multipli, che includono la durata e il grado dell'immunosoppressione, l'induzione delle citochine che stimolano la proliferazione delle cellule B, e la concomitanza di infezioni opportunistiche da herpesvirus oncogeni (EBV e HHV8) [93]. EBV sembra giocare un ruolo preminente, essendo presente nel 40-50% dei linfomi associati ad HIV. La perdita dell'antigene nucleare 1 (EBNA1) di EBV, specifico delle cellule T CD4 e CD8, è associata alla progressione verso il linfoma maligno nei pazienti AIDS [94]. Il contesto immunologico deregolato e permissivo di questi pazienti favorisce l'accumulo di alterazioni genetiche che inducono la trasformazione maligna.

1.3.2.3 Sottotipi di linfomi HIV-correlati

Il *linfoma di Burkitt* e i *linfomi Burkitt-like* o *linfomi atipici di Burkitt* appartengono al gruppo dei NHL HIV-associati, che comprendono almeno il 35–50% di queste neoplasie [95]. In altri studi, correlati probabilmente alle differenze nella classificazione patologica, il linfoma di Burkitt è il secondo sottotipo più comune dopo il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). La classificazione di questi linfomi nei pazienti HIV segue gli stessi criteri diagnostici della popolazione generale. Per quanto riguarda la diagnosi di questi linfomi, è necessaria una popolazione di cellule B CD10-positivo con un alto tasso di proliferazione e la presenza di una traslocazione nel gene MYC [70]. Un coinvolgimento del sangue periferico è meno comune nei pazienti HIV infetti rispetto ai pazienti negativi con linfoma di Burkitt, anche se potrebbe verificarsi [95]; quando presente, le cellule circolanti neoplastiche hanno le caratteristiche della leucemia linfoblastica acuta L3 (ALL). La popolazione cellulare del linfoma di Burkitt è uniforme, con nucleoli indistinti, mentre nel linfoma Burkitt-like mostra un maggior grado di pleomorfismo nucleare e potrebbe contenere più nucleoli prominenti. Un *subset* di linfomi di Burkitt potrebbe mostrare un differenziamento plasmacitoide, variazione morfologica che si osserva soltanto nei pazienti AIDS. Nella variante plasmacitoide, le cellule hanno nuclei eccentrici e citoplasma abbondante contenente immunoglobuline. Il linfoma di Burkitt HIV-associato è caratterizzato da tumori genetici multipli, dal significato ancora sconosciuto nella patogenesi di questo linfoma. Oltre alla traslocazione in MYC, sono comuni mutazioni puntiformi in

regioni regolatorie associate a MYC e all'interno di del gene oncosoppressore p53. È interessante notare che, sebbene il linfoma di Burkitt sia comune nei pazienti HIV-infetti, esso non è associato ad altre forme di immunosoppressione. Questo potrebbe indicare che le proprietà oncogene stesse del retrovirus giocano un ruolo nella patogenesi di questi tumori altamente proliferativi.

La deregolazione delle proteine del ciclo cellulare è implicata nello sviluppo del linfoma di Burkitt. Mutazioni inattivanti nel gene oncosoppressore RBL2 (Rb2/p130) sono state frequentemente riscontrate nelle forme endemiche di linfoma di Burkitt e anche in casi sporadici. Al contrario, nei casi HIV-correlati, è stata riscontrata un'anormale overespressione di RLB2 wild-type. Questi risultati, insieme a studi che dimostrano che la funzione di Rb2/p130 nel controllo della transizione G0/G1 può essere bloccata dall'interazione fisica con la proteina Tat di HIV-1, potrebbero suggerire un ruolo diretto delle proteine di HIV, sinergico all'attivazione di MYC, nella patogenesi del linfoma di Burkitt [92].

Il *linfoma diffuso a grandi cellule B* o *DLBCL* HIV-associato può svilupparsi nei linfonodi, o virtualmente in altre sedi extranodali. Il cervello è l'organo extranodale più comune, con il *linfoma primario del sistema nervoso centrale*, che rappresenta il 15-30% dei linfomi NHL HIV-associati. Questi tumori si sviluppano più frequentemente nel telencefalo come tumori multipli, ma possono anche coinvolgere il cervelletto, i gangli basali o il tronco cerebrale. Le cellule si distribuiscono in fasce perivascolari, con frequenti aree di necrosi.

Altre sedi extranodali coinvolte includono il tratto gastrointestinale, il fegato e il midollo osseo. Come nei pazienti negativi, la categoria dei DLBCL HIV-associati è un gruppo eterogeneo. Questi linfomi mostrano uno spettro morfologico simile a quello visto in assenza di infezione da HIV, con una diffusa infiltrazione di cellule dai nuclei larghi, cromatina vescicolare, e spesso nucleoli prominenti. La popolazione cellulare è costituita da cellule centroblastiche caratterizzate da contorni nucleari irregolari e uno dei vari nucleoli associato alla membrana nucleare, e cellule immuno/plasmablastiche caratterizzate da contorni nucleari tondeggianti o ovali e nucleoli larghi e centrali. In queste cellule sono presenti anche caratteristiche citologiche plasmablastiche, con citoplasma abbondante basofilo e nuclei eccentrici. Un linfoma con predominanza di centroblasti è definito DLBCL centroblastico, mentre quello con più del 90% di immuno/plasmablasti sono chiamati DLBCL

immunoblastici. Questi due sottotipi morfologici mostrano una correlazione nelle caratteristiche cliniche e nel profilo molecolare e si presentano con la stessa frequenza nei pazienti HIV infetti. Il DLBCL centroblastico si sviluppa in un contesto di lieve immunosoppressione, ha una bassa frequenza di positività per EBV (30-40%) senza espressione di LMP-1, mostra un fenotipo germinal center (espressione di CD10 e BCL6, e mancanza di CD138 e MUM1), e frequentemente mostra riarrangiamenti del gene BCL6. Al contrario, il DLBCL immunoblastico generalmente si presenta in un contesto di severa immunosoppressione, ha un'alta frequenza di positività EBV (80-90%) con espressione di LMP-1 e EBNA-2, mostra un fenotipo non-germinal center e mancanza di riarrangiamenti in BCL6. Il linfoma primario del sistema nervoso centrale di solito rappresenta la variante immunoblastica del DLBCL. Recentemente, studi sul profilo di espressione di geni e proteine hanno permesso di identificare almeno tre sottogruppi della categoria eterogenea di DLBCL che correlano con la prognosi. Questi sottogruppi sono classificati in quelli con profilo germinal center, con profilo a cellule B, e con profilo di "tipo 3" [96-99].

Studi epidemiologici hanno evidenziato un lieve incremento tra i soggetti HIV positivi dell'incidenza del *linfoma a cellule B di basso grado* [100]. Questi linfomi indolenti rappresentano il 3-7% dei linfomi HIV-associati [101-103], si sviluppano in pazienti con normale conta dei CD4 nel sangue periferico, e hanno una percentuale di sopravvivenza simile a quella osservata nei pazienti HIV negativi.

1.4 Coinfezione *Leishmania*/HIV

La leishmaniosi viscerale (VL) è considerata una grave condizione tra i pazienti HIV positivi caratterizzata da un alto tasso di mortalità e un alto rischio di ricaduta.

VL è endemica nel Mediterraneo, dove è causata dal protozoo *Leishmania infantum*. Questo parassita è trasmesso dal morso da parte di un flebotomo femmina infetto del genere *Phlebotomus* ed è mantenuto in un ciclo zoonotico, di cui i cani sono il serbatoio principale [104].

I casi del Mediterraneo contribuiscono al 5-6% del peso globale di VL, con un tasso di incidenza annuo stimato tra 1200-2000 casi [105,106]. Nei paesi del Mediterraneo, inoltre, più di 27000 nuove infezioni da HIV sono state diagnosticate nel 2012 [107]. La coinfezione *Leishmania*/HIV ha presentato un picco di incidenza nel Mediterraneo durante gli anni '90, soprattutto in Francia, Italia, Portogallo e Spagna. Al momento, questi paesi riportano ancora casi di coinfezione in queste regioni, sebbene l'introduzione della terapia antiretrovirale (HAART) nel 1997 abbia contribuito al decremento dei casi di coinfezione (da 1440 casi nel periodo 1990-1998 a 299 casi dal 2001 al 2006) (Figura 4) [106].

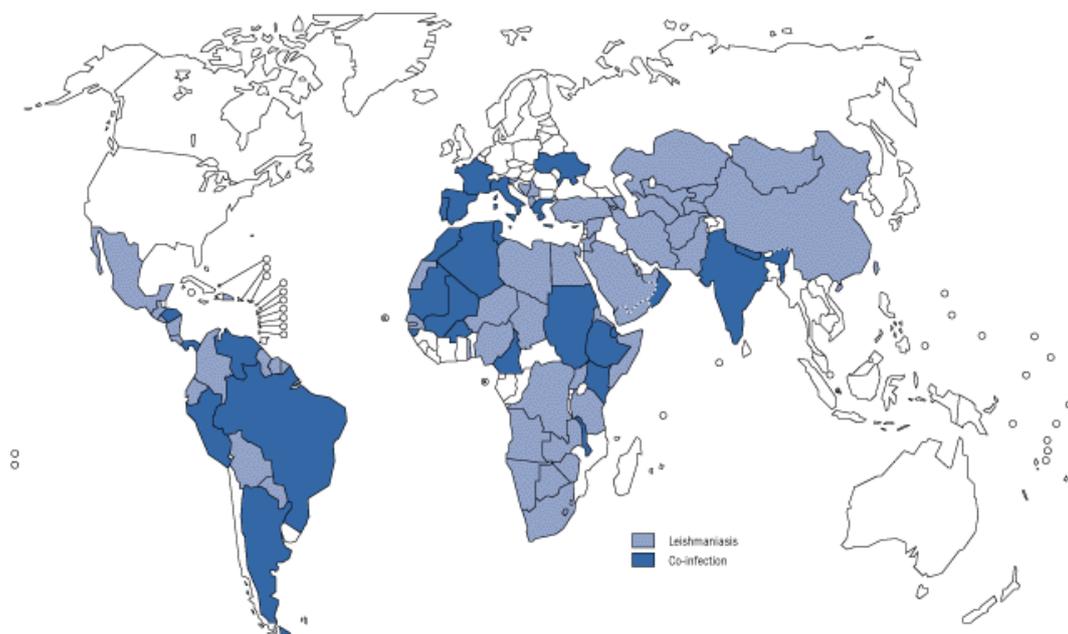


Figura 4. Distribuzione globale dei casi riportati di leishmaniosi e coinfezione *Leishmania*/HIV negli anni 1990-1998 [The Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV Co-Infection" WHO Fact Sheet No. 116. May 2000].

Le manifestazioni cliniche di leishmaniosi in pazienti HIV-positivi nel bacino del Mediterraneo non sono molto differenti da quelle che si verificano nei pazienti immunocompetenti, anche se si possono evidenziare sintomi e segni atipici [106].

L'analisi del sangue periferico mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) è uno strumento sensibile e specifico per rilevare il parassita nei pazienti coinfecti usando un approccio poco invasivo [108]. Recentemente, l'uso della PCR real-time si è dimostrato uno strumento adatto per il monitoraggio della carica del parassita durante il follow-up dei pazienti coinfecti, aiutando a predire il rischio di ricaduta dopo trattamento [109,110].

Le interazioni specifiche *Leishmania*-HIV a livello cellulare influenzano il corso dell'infezione per entrambi i patogeni, ma i meccanismi con cui questo avviene non sono ancora del tutto chiariti. VL sembra ostacolare la competenza immunologica dei pazienti HIV-positivi e aumentare la carica di HIV. Viceversa, lo sviluppo di VL in pazienti HIV positivi è caratterizzato da un alto tasso di ricaduta e di mortalità e da un'alta tossicità dei farmaci antiprotozoari in confronto a pazienti VL HIV-negativi.

L'introduzione della HAART in Europa ha permesso un aumento della qualità della vita del paziente coinfecto, riducendo il numero di recidive e la mortalità, e ha significativamente abbassato il numero di nuovi casi di coinfezione. Tuttavia, ricadute si possono verificare in pazienti sottoposti ad HAART nonostante l'incremento della conta dei CD4+ e carica di HIV non rilevabile [107,111]. Inoltre, VL sembra ostacolare la guarigione immunologica del paziente HIV-positivo trattato con HAART [112,113].

1.4.1 Epidemiologia della Coinfezione *Leishmania*/HIV nel Mediterraneo

L'aumento dell'incidenza dei casi di coinfezione *Leishmania*/HIV può essere attribuito in parte alla sovrapposizione geografica delle due infezioni [114]. Nelle aree endemiche per VL, i pazienti immunocompromessi a causa dell'infezione da HIV sono più suscettibili allo sviluppo di infezione clinicamente conclamata rispetto ai pazienti non coinfecti. Infatti, *L. infantum* è attualmente la terza infezione più frequente negli individui HIV positivi nelle aree endemiche per *Leishmania* [115].

A partire dal 1994, l'incidenza della coinfezione *Leishmania*/HIV è stata monitorata da un sistema di sorveglianza costituito da 16 istituzioni [116] in quattro paesi europei: Francia, Italia, Portogallo e Spagna [117]. In Spagna è stato registrato il più

alto numero di casi, probabilmente a causa di alcuni fattori, tra cui la riattivazione dell'infezione asintomatica [118].

La tipizzazione degli isoenzimi dei ceppi di *Leishmania* isolati da pazienti HIV positivi nel Mediterraneo mostra alti livelli di polimorfismi [119]. Infatti, sebbene molti casi di VL siano causati da zimodemi viscerotropici, ceppi dermatropici e dermo-viscerotropici possono essere responsabili di VL. Inoltre, i pazienti HIV positivi sono anche colpiti da ceppi di *Leishmania* finora non identificati in pazienti HIV negativi [119,120].

L'infezione da *L. infantum* viene trasmessa dal pappatacio vettore infetto del genere *Plebotomus* ed è mantenuta in un ciclo zoonotico, di cui i cani sono il principale *reservoir* [104]. In altri mammiferi, sono stati riportati alcuni casi di infezione da *Leishmania*, anche se il loro ruolo nella trasmissione non è stato ancora ben elucidato [121]. Inoltre, animali selvatici come il lupo (*Canis lupus*), la volpe rossa (*Vulpes vulpes*), la lepre (*Lepus granatensis*) sono implicati nella trasmissione del parassita in Europa [122].

La trasmissione di *L. infantum* tramite insetto vettore può avvenire anche tra individuo e individuo in soggetti HIV positivi, come dimostrato nella regione del Mediterraneo mediante studi di xenodiagnosi [123]. La trasmissione di *Leishmania* da individuo ad individuo può anche avvenire attraverso lo scambio di siringhe contaminate tra tossicodipendenti [124]. Oltretutto, è stato dimostrato che il rilevamento della parassitemia in campioni di sangue periferico mediante PCR è più frequente tra i pazienti coinfecti rispetto ai pazienti con VL HIV negativi [125]. Questi dati suggeriscono che i pazienti coinfecti sono più infettanti dei pazienti HIV negativi e che un ciclo antroponotico, concomitante al ciclo zoonotico principale, potrebbe essere preso in considerazione nell'epidemiologia della VL nell'area del Mediterraneo [123]. Inoltre, *L. donovani*, che è principalmente associata alla trasmissione antroponotica, è stata recentemente identificata come agente eziologico di casi di VL in Cipro e Turchia [126].

Da quando l'Organizzazione mondiale della sanità (WHO) ha interrotto il suo database nel 2006, non esiste un sistema centralizzato europeo di aggiornamento dei dati di VL/HIV. Le ultime informazioni disponibili risalgono al 2007 [127]. Da allora, WHO si è impegnata per mettere a punto un programma in aree selezionate delle regioni europee [128,129].

I paesi dell'Europa Meridionale sono ipoendemicici per leishmaniosi, con un'incidenza di 0.4 casi per 100.000 abitanti/anno nel caso della Spagna. In passato, i due terzi dei pazienti con VL erano bambini, ma dal 1985 con l'inizio della pandemia da HIV, più del 70% dei pazienti con VL sono adulti, età più a rischio per infezione da HIV [125]. L'infezione da HIV è pertanto tra i principali fattori di rischio per lo sviluppo di VL in Europa [66].

In Italia, la regione Campania ha il tasso di incidenza di VL più alto, anche se in questa area la coinfezione con HIV è estremamente rara. Le regioni che storicamente hanno registrato più casi di coinfezione nel nostro paese sono la Sicilia, la Lombardia, il Lazio, ma anche le regioni del nord industrializzato come Valle d'Aosta e Veneto, dove l'infezione da HIV è più frequente. E' pertanto necessario sviluppare un sistema di sorveglianza per questa coinfezione [119].

La terapia HAART ha contribuito al decremento dell'incidenza dei casi di VL/HIV in Europa, dato riportato in tutti i paesi tranne il Portogallo, dove, per motivi sconosciuti, 107 casi di coinfezione su 173 pazienti VL sono stati trovati tra il 2000-2009 [130].

La leishmaniosi viscerale e la leishmaniosi cutanea (CL), acquisite nel bacino del Mediterraneo in paesi come Grecia, Francia, Spagna, Italia, Portogallo, Turchia e Croazia, considerati importanti mete turistiche, sono state importate dai paesi dell'Europa settentrionale [131-133].

1.4.2 Immunopatogenesi della coinfezione *Leishmania*/HIV

La presenza di *Leishmania* e HIV nella stessa cellula influenza la moltiplicazione e l'espressione di uno o entrambi i microrganismi [134]. Si ritiene che nei pazienti coinfecti esista una relazione simbiotica tra il parassita e il virus; i parassiti stimolano l'attivazione immunitaria cronica, portando ad un aumento della carica virale di HIV con più rapida progressione ad AIDS [52]. Tuttavia, uno studio recente ha mostrato che il sistema immunitario può essere attivato anche senza un concomitante aumento della viremia di HIV, in quanto i pazienti coinfecti presentano bassa conta di linfociti T CD4+ ma alte percentuali di linfociti T attivati con soppressione viremica [135]. D'altra parte, l'immunosoppressione causata da HIV è un fattore favorevole per la moltiplicazione del parassita [118]. Nel tempo, diverse ricerche sono state portate avanti per determinare il meccanismo alla base della sinergia tra *Leishmania* e HIV a livello cellulare e molecolare [118]. I parassiti e il

virus infettano e interagiscono sia con le cellule dendritiche che con i macrofagi [136,137]. Le conseguenze di questa interazione non sono ancora state pienamente determinate. L'infezione delle cellule dendritiche e dei macrofagi da parte di entrambi i patogeni altera le funzioni di queste cellule, soprattutto per quanto riguarda la presentazione dell'antigene [138]. L'infezione da HIV, inoltre, influenza la fagocitosi da parte dei macrofagi e la replicazione dei parassiti in queste cellule [139,140]. In aggiunta, HIV altera la risposta fisiologica correlata alla produzione di molecole immunomodulatorie. Ad esempio, la proteina Tat di HIV aumenta l'espressione della prostaglandina E₂, della ciclossigenasi 2 e del TGF- β in macrofagi e cellule dendritiche, aumentando in questo modo la replicazione dei parassiti [141].

Il lipofosfoglicano (LPG) è uno dei maggiori glicofosfati espressi sulla superficie dei promastigoti di *Leishmania*. Dopo fagocitosi, i promastigoti sono assemblati nel fagolisosoma delle cellule presentanti l'antigene, soprattutto macrofagi, in cui si trasformano nella forma intracellulare (amastigote). Nel fagolisosoma, le molecole di LPG sono importanti per la sopravvivenza e stabilità del parassita e giocano un ruolo cruciale nella modulazione delle funzioni macrofagiche [142]. Studi in vitro hanno descritto come gli amastigoti di *L. infantum* nelle cellule dendritiche causino l'aumento della produzione di HIV-1, attribuito alla produzione di citochine proinfiammatorie dalle cellule dendritiche infettate [143]. In linea con questi dati, è stato dimostrato che l'induzione della replicazione di HIV dai parassiti in cellule T CD4+ latentemente infettate è dipendente da TNF- α e la sua inibizione mediante talidomide previene la replicazione del virus [144]. Collettivamente, questi dati suggeriscono che la coinfezione potrebbe accelerare la progressione verso l'AIDS.

Parallelamente, anche il virus HIV influisce negativamente sull'esito dell'infezione da *Leishmania*. Da studi in vitro su macrofagi coinfetti con HIV-1 e *L. donovani* o *L. infantum* è emerso che i promastigoti promuovono l'aumento della crescita del parassita nelle cellule coinfette rispetto alle cellule infettate solo con *Leishmania* [145,146]. In Spagna, studi in vivo hanno riportato un aumento di leishmaniosi disseminata e della parassitemia in pazienti AIDS [147,148]. Sebbene non sia ancora stato dimostrato in vivo, è possibile che l'alta parassitemia nei pazienti AIDS possa essere correlata al danneggiamento delle funzioni effettrici dei macrofagi in vitro [140]. Inoltre, pazienti coinfetti presentanti leishmaniosi cutanea, HIV e immunospressione moderata sono soggetti a reinfezione, con numerose lesioni e

bassa risposta al trattamento rispetto ai pazienti HIV negativi [149]. Infine, poiché la risposta immune dei linfociti T helper 1 (Th1) all'infezione da *Leishmania* è associata a protezione, uno spostamento verso una risposta specifica Th2 nei confronti di *Leishmania* in pazienti con disfunzione dei linfociti T indotta da HIV-1, potrebbe spiegare la severità dell'infezione da *Leishmania* in pazienti HIV-positivi [106,125,150].

1.4.3 Manifestazioni cliniche nel paziente coinfecto

Le manifestazioni tipiche di VL includono febbre, perdita di peso, epatosplenomegalia e pancitopenia, risultanti dalla replicazione delle forme amastigoti di *Leishmania* nei macrofagi soprattutto in fegato, milza e midollo osseo. Queste caratteristiche tipiche della leishmaniosi, come la splenomegalia, possono essere assenti nei pazienti coinfecti [151], nei quali, invece, possono insorgere coinvolgimenti d'organo atipici, che possono interessare i polmoni e il tratto gastrointestinale. In pazienti HIV positivi con infezione cronica da *Leishmania*, altre patologie, come l'amiloidosi AA, sono state associate a insufficienza renale [152-153].

Come già menzionato, in pazienti HIV positivi, l'immunodepressione può favorire la riattivazione delle infezioni latenti da *Leishmania* e la leishmaniosi può promuovere la replicazione virale e accelerare la progressione verso lo stadio AIDS. Il coinvolgimento cutaneo è possibile in un contesto di coinfezione *Leishmania*/HIV. Studi riportano un possibile passaggio alla patologia viscerale dell'infezione a partire dalla forma cutanea, così come la forma cutanea può essere preceduta dal coinvolgimento viscerale [147]. Inoltre, lesioni mucose causate da *L. infantum* sono state descritte in pazienti HIV positivi [154] e protozoi sono stati identificati in biopsie ottenute da pazienti coinfecti [155]. Nei pazienti HIV positivi è stata infine descritta la leishmaniosi cutanea disseminata atipica (con lesioni maculopapulari diffuse e non ulcerate), seguita o contemporanea a VL e, più raramente, a leishmaniosi dermica post-kala-azar (PKDL) causata da *L. infantum* [156, 157].

La maggior parte della popolazione generale dell'area mediterranea presenta infezione asintomatica da *L. infantum*, determinata mediante positività a test cutanei, test sierologici o PCR su campioni di sangue periferico. Di conseguenza, è possibile aspettarsi una elevata prevalenza di infezione asintomatica anche nei pazienti HIV positivi. Infatti, sebbene i pazienti infetti da HIV abbiano un alto rischio di

sviluppare leishmaniosi sintomatica, molti studi sottolineano che una considerevole porzione di questi pazienti possono essere portatori asintomatici di *L. infantum* (infezione criptica). Dati recenti ottenuti mediante test sierologici indicano che l'infezione da *Leishmania* è presente in circa il 10% e il 17% degli individui HIV positivi in Francia e Spagna, rispettivamente [158,159]. In un altro studio del sud della Spagna, il DNA del cinetoplasto di *L. infantum* è stato amplificato da campioni di sangue periferico in circa il 30% dei pazienti asintomatici HIV positivi [160]. In un ulteriore studio, è stata riportata un'associazione tra alta carica virale di HIV e alta parassitemia, probabilmente correlata ad un rischio aumentato di progressione verso la malattia sintomatica, anche se sono necessari studi aggiuntivi per stabilire il rischio di sviluppo della infezione sintomatica in questi pazienti [125].

1.4.4 Diagnostica della coinfezione *Leishmania*/HIV

Le tecniche utilizzate per la diagnosi di infezione da *Leishmania* nei pazienti HIV positivi non sono cambiate significativamente negli ultimi anni, e i test sierologici effettuati attualmente non sono considerati metodi accurati a causa della loro sensibilità limitata.

In linea con una recente meta-analisi in Europa, metodiche come l'immunoblotting hanno mostrato le migliori performance, con un 75-91% di sensibilità e 65-94% di specificità. Tuttavia, è stato dimostrato che i test sierologici non dovrebbero essere utilizzati per escludere VL in pazienti HIV positivi [160]. L'uso combinato del test di agglutinazione diretta (DAT) e del test immunocromatografico-rK39 (rK39-ICT), entrambi metodi rapidi e semplici, si è rivelato idoneo nella diagnosi di VL nei pazienti HIV positivi in Etiopia, ottenendo una sensibilità del 98% [161]. Nel Mediterraneo, l'utilizzo di questi due approcci alla diagnosi di HIV associata a VL non è ancora stato ben valutato nei pazienti coinfecti. In Italia, uno studio sull'utilizzo di rK39-ICT ha mostrato una sensibilità e specificità del 100% in 19 pazienti con VL confermata, ma solo tre di questi erano positivi ad HIV [162]. Considerando l'ampio utilizzo e approvazione di DAT e rK39-ICT per la diagnosi di VL in diverse aree endemiche [163], questi due test dovrebbero essere valutati nella regione mediterranea per determinare se il loro uso da soli o in combinazione possa migliorare la sierodiagnosi di coinfezione VL/HIV in questa regione. Recentemente, l'analisi PCR su sangue periferico è stata validata come strumento specifico e sensibile per la determinazione dei parassiti nei pazienti coinfecti, ma anche come

tecnica minimamente invasiva [108,164]. Pertanto, anche se i classici metodi diagnostici, come la microscopia e la coltura dell'aspirato midollare, sono ancora in uso, la diagnostica di VL in Europa è principalmente basata sulla combinazione di metodiche molecolari per la determinazione del DNA del parassita nel sangue periferico mediante PCR e metodiche sierologiche [108]. Tuttavia, la maggior parte dei laboratori utilizza PCR in house, e non è stato possibile finora raggiungere una standardizzazione del metodo molecolare. Dunque, lo sviluppo di test standardizzati e di linee guida comuni sono necessari per la diagnosi di VL nell'area mediterranea. E' inoltre fondamentale identificare marker predittivi delle ricadute di leishmaniosi, che avvengono nonostante il trattamento antiretrovirale e antiparassitario. Alcuni autori hanno proposto la real-time PCR come strumento utile per il monitoraggio della carica parassitaria durante il follow-up dei pazienti coinfecti e per la predizione del rischio associato a ricaduta dopo trattamento [109,110,148]. La carica parassitaria nelle ricadute varia nei diversi pazienti, come mostrato in molti studi [109,110,148,165]. Cota et al. [166] hanno identificato alcuni fattori predittivi di ricaduta nei pazienti HIV positivi, come ad esempio l'assenza di aumento dei linfociti CD4+ al follow-up, la mancanza di profilassi secondaria, e una precedente storia di ricaduta. La conta dei CD4+ al di sotto di 100 cells/ml al momento della prima diagnosi, potrebbe essere un ulteriore fattore predittivo di ricaduta. Questi parametri insieme alla real-time PCR sono degli strumenti utili per il monitoraggio della coinfezione, anche se sono necessari nuovi marker soprattutto per la determinazione del trattamento più efficace [104]. Inoltre, Bourgeois et al., studiando una corte di 27 pazienti francesi, hanno osservato che una conta di CD4+ 200 cells/ml è fortemente associata a episodi di ricaduta, indipendentemente dalla terapia HAART e/o profilassi secondaria contro *Leishmania* [167]. Studi pionieri sull'utilizzo di saggi di blastogenesi dei linfociti e determinazione delle sottopopolazioni di cellule T in una serie di pazienti coinfecti in Spagna hanno mostrato che l'abilità di stabilire e mantenere una risposta specifica delle cellule T contro *Leishmania* dopo trattamento è necessaria per ridurre il rischio di ricaduta [168]. Le ricerche future dovrebbero essere focalizzate alla valutazione del profilo citochinico nei pazienti. In un'area endemica in Brasile, la risposta proliferativa linfocitaria e la produzione di interferon gamma nelle colture di linfociti di pazienti HIV negativi stimolati ex vivo con antigeni leishmanici, erano più alte in individui infetti asintomatici rispetto a pazienti con VL attiva della stessa area [169].

Attualmente, saggi sul rilascio di citochine dopo stimolazione ex vivo nelle cellule del sangue periferico sono un'importante area di ricerca per studi epidemiologici sulla valutazione dell'esposizione a *Leishmania* [170-172], ma anche per studi atti a definire il profilo immunologico dei pazienti VL a rischio ricaduta e degli individui immuni [173].

1.4.5 Strategie terapeutiche e profilassi del paziente coinfecto

La gestione dei pazienti *Leishmania*/HIV può essere molto complessa. Generalmente, questi pazienti sono soggetti ad un tasso di mortalità più alto dei pazienti HIV negativi, sono inoltre presenti più fallimenti terapeutici, una maggiore tossicità ai farmaci antiprotozoari [174], e più ricadute di VL, specialmente se la conta dei CD4+ è < 200 cells/ml. Questi fattori riducono le opzioni farmacologiche in quanto la risposta al trattamento diminuisce dopo ricadute multiple [166]. I trials clinici relativi all'efficacia del trattamento nei pazienti coinfecti sono pochi. Ad oggi, non esiste un protocollo generale per la scelta del farmaco, la dose o la durata, oppure la scelta di una terapia combinata efficace e una terapia di mantenimento come profilassi secondaria. Sulla base di studi pubblicati nell'area del Mediterraneo, l'amfotericina B (deossicolato, formazione lipidica o formazione liposomiale) è l'opzione terapeutica di prima linea. Nella routine, viene utilizzato l'Ambisome, farmaco a base del principio attivo amfotericina B; il meccanismo d'azione del farmaco nei confronti di *Leishmania spp*, si traduce in un'inibizione dell'ergosterolo, principale sterolo di membrana delle Leishmanie, con conseguente formazione di alterazioni strutturali della membrana cellulare e morte dei parassiti.

Sebbene gli unici trials clinici siano stati condotti con amfotericina B deossicolato (AB) e amfotericina B complesso lipidico (ABLC), attualmente le linee guida internazionali raccomandano l'amfotericina B liposomiale (LAB) come prima opzione per il suo profilo di sicurezza e il tasso di guarigione [175,176]. Gli antimoniali sono stati comparati con AB e ABLC e hanno mostrato tasso di guarigione simile, ma tossicità più severa, per cui dovrebbero essere considerati come terapia di seconda linea [112,113,174,177]. Molti esperti raccomandano una terapia combinata per i pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV in modo da aumentare l'efficacia, specialmente in quei pazienti con ricadute multiple, e per ridurre l'emergenza dei parassiti resistenti. Ad ogni modo, i dati riguardo alla valutazione dell'efficacia della terapia antileishmania combinata sono insufficienti, e non sono

stati condotti trial clinici nel Mediterraneo in pazienti HIV positivi [106]. Future ricerche dovrebbero focalizzarsi su regimi basati sulla combinazione di LAB e un altro farmaco di seconda linea come miltefosina, paromomicina o pentamidina.

1.4.6 Impatto della HAART nel paziente coinfecto

La ricostituzione dell'immunità cellulare indotta dall'HAART sembra essere il principale determinante nella riduzione delle infezioni opportunistiche nel paziente HIV positivo. Inoltre, gli inibitori della proteasi di HIV-1 (PI) potrebbero esercitare direttamente un effetto antiparassitario: questo potrebbe essere spiegato dal fatto che le proteasi di alcuni parassiti possono essere un target aspecifico per i PI di HIV-1 [178]. La terapia antiretrovirale nei pazienti coinfecti dell'area mediterranea ha permesso di ottenere una riduzione del 50-60% nell'incidenza di VL, con un tasso di sopravvivenza più alto e una riduzione delle ricadute [66,112]. Nonostante ciò, la HAART può produrre una sindrome infiammatoria da immuno-ricostituzione (IRIS) con leishmaniosi associata a AIDS anche molti mesi o anni dopo la diagnosi di VL [179,180]. La HAART può anche favorire l'instaurarsi delle forme asintomatiche di infezione e di conseguenza far aumentare il rischio di trasmissione nelle aree dove il flebotomo vettore è presente [110].

1.4.7 Infezione asintomatica da *Leishmania*

Le forme asintomatiche caratterizzano individui infettati dal parassita in assenza di sintomi. Attualmente, la maggior parte delle persone infette da *Leishmania* non progredisce verso VL; la malattia clinicamente evidente è solo la punta dell'iceberg (Figura 5). Diversi studi prospettici hanno riportato la prevalenza delle infezioni asintomatiche rispetto ai casi clinici, suggerendo che molti pazienti infetti con *Leishmania* sviluppano una risposta immunitaria efficace e non manifestano la malattia [181-184]. Tuttavia, il parassita permane in stato latente nell'ospite, e in condizioni di immunosoppressione si può avere una riattivazione dell'infezione stessa con progressione a VL.

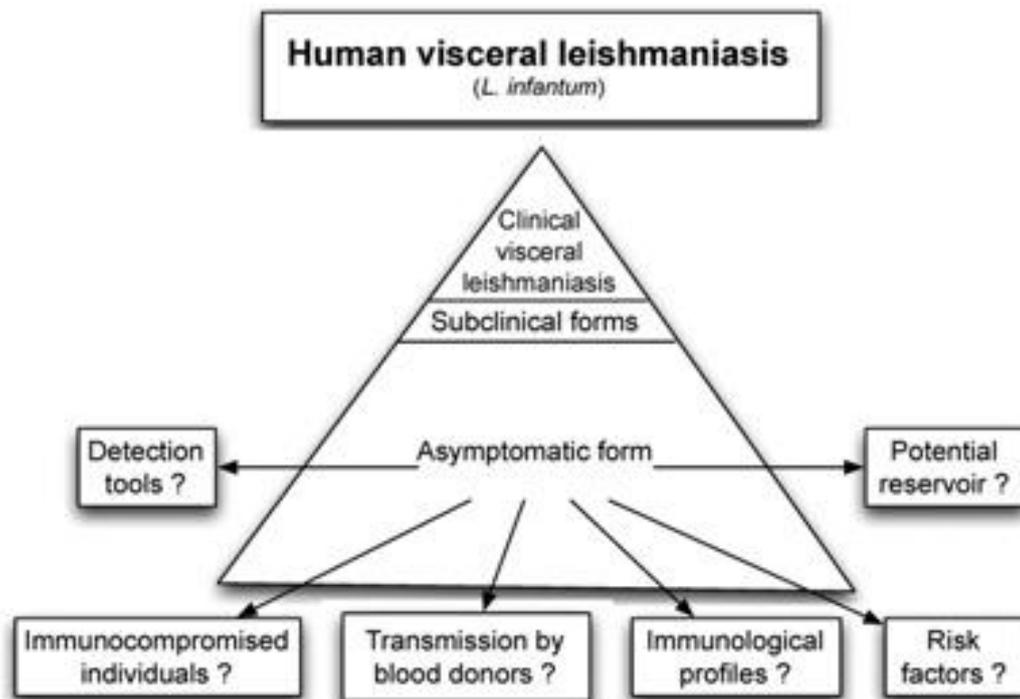


Figura 5. Piramide della leishmaniosi umana e possibile coinvolgimento dei portatori asintomatici nella trasmissione di *Leishmania* [182].

Per quanto riguarda i pazienti HIV positivi, il numero dei portatori asintomatici di infezione da *Leishmania* sembra essere maggiore rispetto a quello dei pazienti con segni clinici evidenti di VL [125,185].

L'associazione tra alta parassitemia e alta carica virale è stata dimostrata nei pazienti HIV positivi e sembra essere correlata al rischio di sviluppo della malattia: è stato infatti dimostrato che l'infezione da HIV può aumentare il rischio di sviluppare VL da 100 a 2300 volte nelle aree endemiche [185].

L'infezione asintomatica può essere determinata in pazienti senza una storia precedente di VL mediante l'evidenza di anticorpi anti-*Leishmania*, con la ricerca del DNA del parassita in campioni di sangue, o con lo skin test (leishmania skin test, LST). La possibile evoluzione dell'infezione asintomatica non è ancora chiara; studi recenti suggeriscono che un contatto precedente con *L. infantum* in pazienti asintomatici in zone endemiche non indichi un rischio di progressione verso VL [186].

Il DNA del parassita può essere ricercato in campioni di sangue e la sua presenza potrebbe riflettere la presenza recente dei parassiti vitali nell'ospite, dal momento in cui la degradazione del DNA è molto rapida dopo la morte del parassita [187].

2. Obiettivo della tesi

Nell'ambito del dottorato di ricerca, l'attenzione è stata focalizzata su due filoni principali, che riguardano sia lo studio del ruolo di HIV nelle comorbidity, in particolare nell'insorgenza dei linfomi (1), sia il monitoraggio della coinfezione *Leishmania*/HIV (2).

1. I pazienti con infezione da HIV presentano un rischio considerevolmente aumentato di sviluppare linfomi a cellule B, che derivano da disordini nel normale sviluppo dei linfociti B del centro germinativo. Alcuni step critici del differenziamento delle cellule B avvengono negli organi linfoidi, che rappresentano anche i siti elettivi per la replicazione del virus.

Tra le proteine codificate da HIV-1, la proteina Tat sembra avere un potenziale ruolo oncogeno e potrebbe essere implicata nella regolazione della proliferazione e differenziamento dei linfociti B del centro germinativo mediante l'attivazione costitutiva del *pathway* antiapoptotico del fattore NF- κ B, coinvolto nella linfomagenesi. Probabilmente, HIV-1 Tat, prodotta localmente negli organi linfoidi dei pazienti HIV-infetti, potrebbe agire direttamente sulle cellule B primarie e partecipare all'instaurarsi delle anomalie osservate in vivo.

La prima parte del progetto di ricerca è stata dedicata alla messa a punto di uno schema sperimentale per la determinazione di un protocollo specifico di attivazione dei linfociti B, sui quali sono stati condotti gli esperimenti successivi. In seguito, è stata analizzata la presenza di un'eventuale correlazione tra la proteina virale Tat e l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B in colture di cellule germinal center (GCs), isolate da organi linfoidi e stimulate mediante specifici protocolli.

2. L'obiettivo principale della seconda parte del progetto è stato quello di analizzare l'importanza della leishmaniosi nell'ambito della coinfezione *Leishmania*/HIV, problema emergente nel Mediterraneo a partire dagli anni '90.

La coinfezione è essenzialmente dovuta al fatto che *Leishmania* e HIV circolano nelle stesse aree geografiche e che entrambi i patogeni infettano lo stesso tipo

cellulare, ovvero i monociti/macrofagi. Nei pazienti HIV-positivi, si assiste alla frequente riattivazione dell'infezione latente da *Leishmania* a causa dell'immunodepressione.

La concomitanza di VL e infezione da HIV è caratterizzata da un tasso di guarigione significativamente ridotto, alta tossicità dei farmaci, e alto tasso di ricaduta e mortalità in confronto a pazienti HIV-negativi.

Nel corso di questo progetto di tesi, è stato eseguito un monitoraggio virologico, parassitologico e immunologico di tre pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV presso l'U.O Microbiologia dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, e i dati ottenuti sono stati valutati insieme ai dati clinici, in modo da analizzare l'andamento della coinfezione.

E' stato condotto uno studio sui donatori sani della provincia di Bologna per valutare la reale prevalenza delle infezioni asintomatiche da *Leishmania* a livello locale. I risultati preliminari di prevalenza sulla popolazione sana saranno importanti per estrapolare la prevalenza di infezione asintomatica da *Leishmania* nei pazienti HIV positivi, soggetti ad alto rischio di riattivazione dell'infezione latente, per cui è necessaria una diagnosi precoce.

3. Materiali e metodi

3.1 Sottostudio 1

3.1.1 **Determinazione di un protocollo specifico di attivazione dei linfociti B**

3.1.1.1 *Separazione delle cellule da sangue periferico*

Inizialmente, le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) sono state isolate a partire da campioni di sangue fresco provenienti da donatori sani anonimizzati. In particolare, sono stati utilizzati i “buffy coat” provenienti dal Centro Trasfusionale dell’Ospedale Sant’Orsola-Malpighi di Bologna, ed è stato prelevato l’anello linfo-monocitario, che si forma in seguito a centrifugazione in gradiente di densità nell’interfaccia tra plasma e globuli rossi. Il protocollo utilizzato è stato il seguente:

- Diluizione del sangue 1:3 in Phosphate Buffered Saline (PBS);
- Stratificazione delicata di 20 ml di sangue in provetta contenente 20 ml di Ficoll-Paque Plus (Ficoll-Histopaque, Pharmacia, Uppsala, Sweden);
- Centrifugazione senza freno a 1500 RPM per 30 minuti a temperatura ambiente (RT);
- Recupero dell’anello centrale di PBMCs;
- Lavaggi successivi in PBS, centrifugando a 1500 RPM per 10 minuti a RT;
- Determinazione del numero dei PBMCs isolati, tramite l’utilizzo della camera di Burker.

3.1.1.2 *Purificazione dei linfociti B naïve*

I *linfociti B naïve* sono stati isolati dai PBMCs ottenuti precedentemente mediante selezione immunomagnetica negativa utilizzando il kit Human naïve B cell enrichment kit (Stem Cell, Grenoble, France). In breve, le cellule non-B sono state legate da complessi tetramericici di anticorpi monoclonali, che riconoscono gli antigeni specifici CD2, CD3, CD14, CD16, CD27, CD36, CD43, CD56, CD66b, la glicoforina A e il destrano che riveste le particelle magnetiche (Figura 6). La separazione è stata eseguita sul magnete Purple EasySep (Stem Cell).

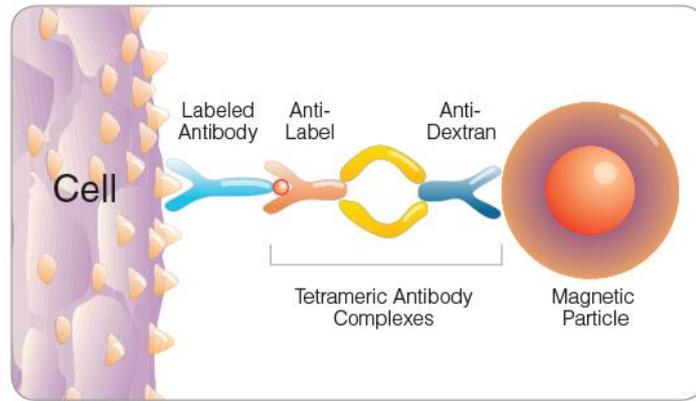


Figura 6. Rappresentazione schematica della marcatura immunomagnetica delle cellule [Human naïve B cell enrichment kit (Stem Cell, Grenoble, France)].

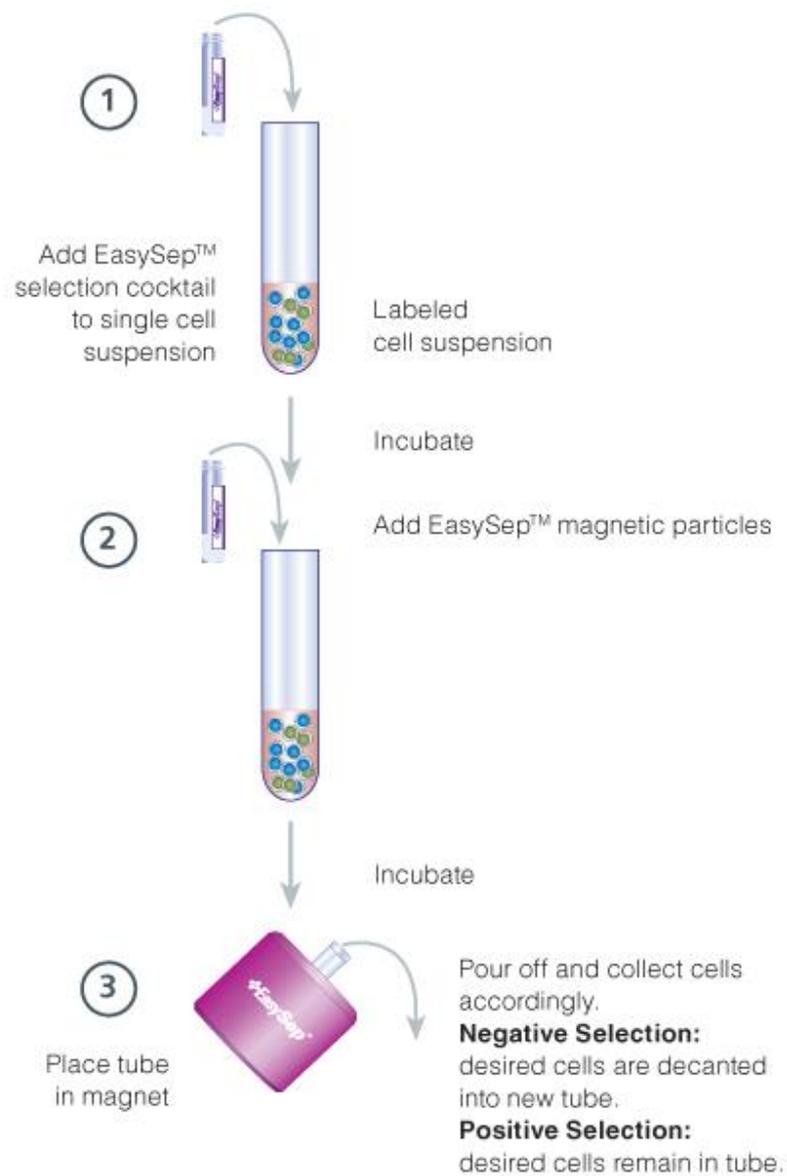


Figura 7. Illustrazione schematica del protocollo di separazione immunomagnetica mediante kit Stem Cell [Human naïve B cell enrichment kit (Stem Cell, Grenoble, France)].

È stato utilizzato il protocollo che la ditta produttrice indica per il processamento di 250 μ l – 1.75 ml di campione, che può contenere fino a 8.75×10^7 cellule. I PBMCs sono stati centrifugati a 1500 RPM per 10 minuti e risospesi in un *medium* costituito da PBS con il 2% di FBS e 1mM di EDTA ad una densità di 5×10^7 cellule/ml. La sospensione cellulare è stata messa all'interno di tubi di polistirene da 5 ml, i quali saranno poi trasferiti nel magnete. È stato aggiunto il cocktail di anticorpi monoclonali, che riconoscono gli antigeni di superficie, alla concentrazione di 50 μ l/ml di medium. Dopo aver risospeso delicatamente, la sospensione è stata incubata a temperatura ambiente (15-25°C) per 10 minuti. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 250 μ l/ml di EasySep™ D Magnetic Particles, precedentemente vortexate per 30 secondi. La sospensione contenente i PBMCs, gli anticorpi e le particelle magnetiche è stata risospesa e incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente, questa sospensione è stata portata a un volume totale di 2,5 ml mediante aggiunta del medium raccomandato e risospesa per 2-3 volte. A questo punto, il tubo è stato collocato all'interno del magnete e, dopo 5 minuti, è stato invertito il magnete attraverso un movimento unico e continuo per pochi secondi. In questo modo è stata ottenuta la frazione contenente le cellule B *naïve*, poi trasferita in un nuovo tubo di polistirene, mentre le cellule indesiderate sono state trattenute dal magnete sulla parete del tubo di partenza. In Figura 7 è illustrata schematicamente la procedura.

3.1.1.3 Purificazione dei linfociti B memory

I *linfociti B memory* sono stati isolati dai PBMCs di donatori sani utilizzando il kit di separazione Memory B-cell isolation kit (Miltenyi, Auburn, CA).

La purificazione è stata ottenuta mediante una procedura che prevede due fasi. In primo luogo, è stata effettuata la deplezione delle cellule non-B, quindi linfociti T, natural killer, monociti, cellule dendritiche, eritrociti e piastrine, che sono state marcate indirettamente utilizzando un cocktail di anticorpi biotinilati (B cell biotin-antibody cocktail) diretti contro gli antigeni CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 e CD235a insieme a microsfere magnetiche coniugate con anticorpi monoclonali anti-biotina. Successivamente, i linfociti B di memoria sono stati selezionati positivamente mediante microsfere magnetiche coniugate con anticorpi monoclonali anti-CD27.

La separazione è iniziata centrifugando 10^8 PBMCs a 300 giri per 10 minuti, che sono stati poi risospesi in 400 μ l di tampone freddo (PBS a pH 7,2 con 0,5% di albumina di siero bovino e 2 mM di EDTA). Dopodiché, sono stati aggiunti 100 μ l di B cell biotin-antibody cocktail alla sospensione cellulare, poi incubata per 10 minuti a 2-8°C. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 300 μ l di buffer freddo e 200 μ l di anti-biotin MicroBeads, e le cellule sono state incubate per 15 minuti a 2-8°C. È stato effettuato un lavaggio successivo aggiungendo 10 ml di buffer e centrifugando a 300 giri per 10 minuti. Il surnatante è stato completamente asciugato e il *pellet* risospeso in 1 ml di tampone freddo.

A questo punto, è stata effettuata la deplezione immunomagnetica delle cellule non-B utilizzando una colonna MACS di tipo LD, che è stata inserita in un separatore MACS e sottoposta ad un campo magnetico. La colonna è stata prima equilibrata con 2 ml di tampone, poi su di essa è stata applicata la sospensione cellulare. Le cellule B non complessate alla microparticelle magnetiche, non vengono trattenute ma passano attraverso la colonna e vengono raccolte. Sono stati effettuati due lavaggi consecutivi con 1 ml di tampone e infine è stato raccolto tutto l'eluato.

La fase successiva è stata la selezione positiva dei linfociti B di memoria. Le cellule B ottenute dalla precedente separazione sono state centrifugate a 300 giri per 10 minuti. Il *pellet* cellulare asciugato completamente è stato risospeso in 100 μ l di tampone, a cui sono stati aggiunti 100 μ l di CD27 MicroBeads. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate aggiungendo 10 ml di buffer e centrifugando a 300 giri per 10 minuti. La sospensione, accuratamente miscelata, è stata incubata per 15 minuti a 2-8°C. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 500 μ l di buffer in modo da procedere alla separazione dei linfociti B di memoria. In questo caso, è stata utilizzata una colonna MS, inserita nel separatore MACS e sottoposta a campo magnetico. È stata preparata la colonna equilibrandola con 500 μ l di tampone, quindi è stata applicata la sospensione di cellule B e sono state raccolte in una provetta le cellule che, non essendo coniugate con le biglie, passano attraverso la colonna. Sono stati effettuati tre lavaggi della colonna utilizzando 500 μ l di tampone e successivamente la colonna è stata rimossa dal separatore, messa in una provetta e al suo interno è stato aggiunto 1 ml di tampone. Infine, è stata effettuata l'eluizione, applicando una pressione alle cellule trattenute all'interno della colonna. La frazione cellulare ottenuta è costituita dalle cellule B di memoria.

3.1.1.4 Valutazione della purezza

Le cellule B *naïve* e *memory* così isolate sono state analizzate mediante citometria a flusso per la determinazione della purezza di questi *subset* cellulari. La positività per il CD19 e per i due antigeni CD19/CD27 dovrebbe risultare superiore al 95% rispettivamente nei linfociti B *naïve* e *memory* purificati.

Dopo aver saggiato la purezza, le cellule sono state messe in coltura in terreno RPMI 1640 (Lonza, Germany) contenente 2mM di L-Glutammina, 10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco) e 100 IU/ml-100 µg/ml di soluzione antibiotica Penicillina-Steptomomicina (PS).

3.1.1.5 Stimolazione dei linfociti B

Le diverse sottopopolazioni di linfociti B sono state trattate con varie combinazioni di citochine a concentrazioni scalari:

- 1) 5 µg/ml αIgM Ab (Sigma) + 5 ng/ml Interleuchina-4 (IL-4, Sigma);
- 2) 5 µg/ml αIgM Ab + 1 µg/ml anti-human CD40 mAb (Mabtech)
- 3) 1 µg/ml αCD40 mAb + 5 ng/ml IL-4
- 4) 1 µg/ml αCD40 mAb + 20 ng/ml IL-2 (Sigma) + 50 ng/ml IL-10 (Sigma).

Sono state eseguite raccolte dopo 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con i vari protocolli di attivazione.

3.1.1.6 Analisi citofluorimetrica delle cellule attivate

La percentuale di cellule attivate, è stata valutata in citometria a flusso mediante l'analisi del marker CD80, espresso dai linfociti B attivati.

Le cellule sono state prima fissate in paraformaldeide 0,5% per 15 minuti e quindi lavate in PBS. Poi, è stata eseguita la marcatura di superficie delle cellule con l'anticorpo α-CD80 FITC-coniugato (coniugato al fluorocromo isotiocianato di fluorescina) (Miltenyi, Auburn, CA, USA) per l'analisi al citofluorimetro FACScalibur (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) utilizzando il software CellQuest (Becton-Dickinson).

3.1.2 Analisi della correlazione HIV-1 Tat/NF- κ B

3.1.2.1 Estrazione delle cellule mononucleate da tonsilla

Le cellule primarie mononucleate sono state estratte da campioni di tonsille fresche e/o adenoidi ottenute da pazienti immunocompetenti, sottoposti a tonsillectomia per patologie non neoplastiche, e trattate entro poche ore dall'espianto. Per la purificazione delle cellule tonsillari, il tessuto dell'organo è stato disgregato accuratamente mediante procedura meccanica e le cellule mononucleate contenute separate mediante Ficoll.

Il protocollo di estrazione manuale della frazione di cellule mononucleate da tonsille utilizzato è stato il seguente:

- Le tonsille sono state raccolte in PBS e soluzione antibiotica PS 1X;
- sono state trasferite in una piastra Petri e, aiutandosi con un bisturi, è stato raschiato il tessuto connettivo di supporto da scartare e sminuzzata la porzione midollare;
- la parte sminuzzata è stata trasferita in una provetta da 50 ml con PBS;
- per 30 secondi la provetta è stata *vortexata* e lasciata a riposo per 1 minuto per la precipitazione delle microparticelle;
- 20 ml di sospensione cellulare sono stati percolati su 20 ml di Ficoll;
- È stata eseguita una centrifugazione a 1500 RPM per 30 minuti;
- l'anello linfo-monocitario è stato raccolto e sono stati effettuati lavaggi successivi;
- le cellule sono state contate (camera di Burker).

Successivamente, le cellule B sono state quindi purificate.

3.1.2.2 Separazione immunomagnetica delle cellule B

I *linfociti B totali* sono stati purificati a partire dalle cellule estratte da tonsilla mediante kit di separazione immunomagnetica utilizzando il kit Human B cell enrichment kit (Stem Cell, Grenoble, France).

Come descritto precedentemente nel protocollo di purificazione dei linfociti B *naïve*, le cellule non-B vengono legate da complessi tetramericici di anticorpi monoclonali, che riconoscono gli antigeni specifici CD2, CD3, CD14, CD16, CD27, CD36, CD43,

CD56, CD66b, la glicoforina A e il destrano che riveste le particelle magnetiche (Figura 7). La separazione è stata eseguita sul magnete Purple EasySep (Stem Cell).

È stato utilizzato il protocollo che la ditta produttrice indica per il processamento di 500 μ l – 2 ml di campione, che può contenere fino a 1×10^8 cellule. Le cellule mononucleate sono state centrifugate a 1500 RPM per 10 minuti e risospese in un medium costituito da PBS con il 2% di FBS e 1mM di EDTA ad una densità di 5×10^7 cellule/ml. La sospensione cellulare è stata trasferita all'interno di tubi di polistirene da 5 ml. È stato aggiunto il cocktail di anticorpi monoclonali, che riconoscono gli antigeni di superficie, alla concentrazione di 50 μ l/ml di medium. Dopo aver risospeso delicatamente, la sospensione è stata incubata a temperatura ambiente (15-25°C) per 10 minuti. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 75 μ l/ml di EasySep™ D Magnetic Particles, precedentemente vortexate per 30 secondi. La sospensione contenente le cellule, gli anticorpi e le particelle magnetiche è stata risospesa e incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente, questa sospensione è stata portata a un volume totale di 2,5 ml mediante aggiunta del medium raccomandato e risospesa per 2-3 volte. A questo punto, il tubo è stato collocato all'interno del magnete e, dopo 5 minuti, il magnete è stato invertito attraverso un movimento unico e continuo per pochi secondi. In questo modo è stata ottenuta la frazione contenente le cellule B totali, che è stata trasferita in un nuovo tubo di polistirene, mentre le cellule indesiderate sono state trattenute dal magnete sulla parete del tubo di partenza. In Figura 7 è illustrata schematicamente la procedura.

3.1.2.3 Purificazione delle cellule GCs

Le cellule GCs sono state purificate a partire dalle cellule B totali mediante kit di selezione positiva Human CD10 positive selection kit (Stem Cell, Grenoble, France).

Anche in questo caso, la separazione è stata effettuata sul magnete Purple EasySep (Stem Cell), sul quale rimangono adese le cellule GCs che esprimono sulla loro superficie l'anticorpo CD10.

È stato utilizzato il protocollo che la ditta produttrice indica per il processamento di 1×10^8 cellule/ml risospese in medium freddo costituito da Hank's balanced salt solution modified con il 2% di FBS. La sospensione cellulare è stata messa all'interno di tubi di polistirene da 5 ml. È stato aggiunto il cocktail di anticorpi

monoclonali anti-CD10 alla concentrazione di 100 µl/ml di sospensione cellulare. Dopo aver risospeso delicatamente, la sospensione è stata incubata a temperatura ambiente (15-25°C) per 20 minuti. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 50 µl/ml di EasySep Magnetic Nanoparticles, precedentemente risospese uniformemente. La sospensione contenente le cellule, gli anticorpi e le particelle magnetiche è stata risospesa e incubata per 15 minuti in ghiaccio. Successivamente, questa sospensione è stata portata a un volume totale di 2,5 ml mediante aggiunta del *medium* raccomandato e risospesa per 2-3 volte. A questo punto, il tubo è stato collocato all'interno del magnete e, dopo 5 minuti, il magnete è stato invertito attraverso un movimento unico e continuo per pochi secondi. In questo modo è stata ottenuta la frazione contenente le cellule GCs trattenute dal magnete sulla parete del tubo.

Le cellule GCs così isolate sono state analizzate mediante citometria a flusso per la determinazione della purezza. La positività per il CD10 dovrebbe risultare superiore al 95%.

3.1.2.4 Coltura delle GCs

Sono state allestite le colture delle cellule GCs, precedentemente separate e purificate, in RPMI 1640 medium (Lonza, Germany) contenente 2mM di L-Glutamina, 10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco) e 100 IU/ml-100 µg/ml di soluzione antibiotica Penicillina-Steptomycin (PS). Le cellule sono state mantenute a 37°C e 5% di CO₂, ad una densità di 1x10⁶ cellule/ml. Le colture primarie sono state stimulate con 0,1 µg/ml di αCD40 e 5 ng/ml IL-4 e/o trattate con la proteina HIV-1 Tat ricombinante (100 ng/ml; Diatheva, Pesaro) e sono state raccolte dopo 0, 15, 30, 60 minuti dopo la stimolazione.

3.1.2.5 Western blotting

L'espressione proteica è stata valutata mediante Western blot, tecnica che permette di rilevare gli antigeni mediante l'impiego di anticorpi specifici.

Di ciascun campione raccolto è stata eseguita l'estrazione delle proteine mediante il protocollo RIPA, che è costituito da diversi fasi:

- Per ottenere il *pellet* cellulare, è stato centrifugato il campione in PBS freddo a 4000 RPM per 4 minuti a 4°C, poi eliminato il surnatante;

- Sono stati aggiunti 20 µl per milione di cellule di RIPA Buffer 1X, costituito da RIPA lysis buffer 10X (Upstate Biotechnology, USA), dall'inibitore delle proteasi Complete 25X (Roche) e PBS;
- Ogni campione è stato incubato per 10 minuti a 4°C;
- È stata eseguita una centrifugazione a 13000 RPM per 10 minuti a 4°C;
- Il surnatante è stato raccolto e diluito 1:2 con Laemmli Buffer, contenente Laemmli 2X (Sigma) e β-mercaptoetanololo (Sigma);
- I campioni sono stati bolliti e il marker di peso molecolare a 100°C per 5 minuti e frammentati in siringa per la lisi completa;
- Infine è stato eseguito il dosaggio delle proteine per determinarne la concentrazione.

La quantificazione proteica è stata effettuata utilizzando i reagenti del Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen) sullo strumento QUBIT (Invitrogen).

Successivamente, è stata eseguita la metodica Western blot, utilizzando come controllo interno la β-tubulina, proteina costitutivamente espressa dalle cellule. Il protocollo utilizzato è stato composto da varie fasi:

Elettroforesi delle proteine:

- 10 µl di campione/well e di marker sono stati caricati su gel di poliacrilammide 4-20% Precise pre-cast Tris-Glycine (Thermo Scientific);
- la camera di corsa è stata riempita con soluzione di corsa (TRIS Base 0,1 M, hepes 0,1 M, SDS 3 mM, H₂O_d);
- la corsa elettroforetica è stata avviata a 185 V per 55 minuti.

Trasferimento:

- recuperato il gel, è stato eliminato lo stacking gel;
- il gel è stato immerso nella soluzione di trasferimento (TRIS Base 25 mM, glicina 192 mM, metanolo, SDS 10%, H₂O_d);
- è stato preparato un "sandwich" di trasferimento costituito da spugna, carta assorbente, gel e membrana di nitrocellulosa ed inserirlo nella cella di trasferimento con il tampone di trasferimento;
- il trasferimento è stato avviato a 350 mA per 1 ora.

Recupero della membrana:

- la membrana è stata recuperata e colorata con soluzione di Rosso Ponceau nella vaschetta messa su un agitatore oscillante per 5 minuti;

- il colorante è stato drenato e decolorato con acqua distillata fino a quando non erano visibili le bande. Questo passaggio è servito per valutare l'efficienza del trasferimento;
- la membrana è stata tagliata per ridefinire l'area utile.

Blocking:

- nel processo di trasferimento sono rimasti dei siti liberi sulla membrana con una miscela di proteine non specifiche, quindi deve essere evitato il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti. È stata utilizzata albumina di siero bovino (BSA) al 3% in soluzione di lavaggio (Tris HCl 20 mM, NaCl 0,9%, TWEEN-20, H₂O_d) per 1h a RT in agitazione.

Incubazione con anticorpo primario:

- la membrana è stata immersa in una soluzione che contiene l'anticorpo contro la proteina di interesse. Gli anticorpi in studio sono stati utilizzati alla seguente concentrazione: 1:1000 per α -Phospho-NF- κ B p65 (Cell Signaling Technology), 1:100 per α - β -tubulina (Sigma-Aldrich);
- le membrane sono state incubate a 4°C per una notte;
- successivi lavaggi hanno permesso di eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non aveva aderito all'antigene. La membrana è stata lavata, agitando energicamente su basculante con una soluzione contenente detergente.

Incubazione con anticorpo secondario:

- la membrana è stata immersa in una soluzione contenente un anticorpo in grado di reagire con qualunque anticorpo della stessa fonte biologica del primario. Gli anticorpi secondari fosfatasi alcalina α -rabbit e α -mouse IgG (Sigma-Aldrich) sono stati utilizzati alla concentrazione 1:1000, per 2h a 200 RPM al buio;
- Sono stati effettuati lavaggi per eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non aderito alle immunoglobuline dell'anticorpo primario.

Rivelazione della proteina (sviluppo colorimetrico):

- La membrana è stata incubata con il substrato BCIP/NBT (Sigma-Aldrich);
- la reazione è stata stoppata in H₂O_d quando è stato possibile vedere le bande.

3.2 Sottostudio 2

3.2.1 Monitoraggio virologico, parassitologico e immunologico di pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV

Presso l'U.O Microbiologia dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, sono stati seguiti tre pazienti con coinfezione *Leishmania*/HIV, dei quali sono stati monitorati alcuni parametri clinici da marzo 2015 a ottobre 2017.

Tutti e tre i pazienti A, B, C (Tabella 1) erano maschi, di età compresa tra 52 e 59 anni, residenti in Emilia-Romagna. I tre pazienti riportavano segni clinici evidenti di leishmaniosi cronica, per cui erano in profilassi con Ambisome.

Nei tre casi, sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- viremia (HIV-RNA *viral load*, espressa in copie/ml di sangue);
- parassitemia (genomi equivalenti di *Leishmania*/ml di sangue);
- conta dei linfociti T CD4+/ μ l di sangue.

Questi pazienti erano seguiti in follow-up presso l'U.O. Malattie Infettive dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna e presso l'U.O. Malattie Infettive dell'Ospedale Morgagni-Pierantoni di Forlì.

Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna (prot. n° 3729/2017).

Tabella 1.

<i>Paziente</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>Residenza</i>	<i>Quadro clinico</i>
A	55	M	Forlì-Cesena	Leishmaniosi cronica attiva, con frequenti ricadute di VL e leishmaniosi cutanea disseminata. Pancitopenia severa.
B	57	M	Forlì-Cesena	Leishmaniosi cronica attiva, con frequenti ricadute di VL e segni atipici di interessamento del tratto gastro-enterico da <i>Leishmania</i> . Leishmaniosi cutanea disseminata.
C	52	M	Bologna	Leishmaniosi cronica attiva, con insufficienza renale cronica causata da <i>Leishmania</i> .

3.2.1.1 Monitoraggio della parassitemia (Leishmania)

I campioni ottenuti dai pazienti sono stati testati per il DNA del parassita (utilizzando la PCR descritta in dettaglio al paragrafo 3.2.2.3) e quelli risutati positivi sono stati quantificati mediante real time PCR amplificando il gene a singola copia della polimerasi (pol) di *Leishmania* (1 parasite/reaction) (165).

3.2.1.2 Monitoraggio della viremia da HIV

La quantificazione dell'HIV-RNA è stata valutata mediante l'utilizzo del test Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0, che viene eseguito nella routine diagnostica sulla piattaforma automatizzata COBAS® Ampliprep/Taqman Analyzer (Roche Molecular Systems, Inc.). I campioni di plasma (1 ml), ottenuti dopo centrifugazione a 1500 RPM per 20 minuti, sono stati adeguatamente caricati sullo strumento, che estrae ed amplifica i geni LTR e gag di HIV-1. Questo saggio ha una sensibilità molto alta, con un limite più basso di quantificazione (LLOQ) di 20 copie/mL e un limite più alto di quantificazione (ULQ) di 10000000 copie/ml.

3.2.2 Studio di prevalenza dell'infezione asintomatica da *Leishmania*

La ricerca è stata svolta presso il Centro di Riferimento Regionale per l'Emergenza Microbiologica (CRREM), presso l'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi, Università di Bologna.

3.2.2.1 Disegno dello studio

Per la valutazione della prevalenza di infezione asintomatica da *Leishmania* nei portatori asintomatici, sono stati analizzati 260 campioni di sangue provenienti da donatori residenti in Valsamoggia, un comune italiano di 30.071 abitanti della provincia di Bologna, in Emilia Romagna. Presso il laboratorio CRREM, sono stati raccolti 260 campioni di sangue dei donatori sani a partire dal 1° aprile 2014 al 31 marzo 2015; nessuno dei donatori aveva mostrato precedenti manifestazioni cliniche di leishmaniosi.

La prevalenza di infezione asintomatica è stata valutata mediante test sierologici e test molecolari. I campioni sono stati centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti. 500 µl di siero e 300 µl di buffy coat sono stati raccolti per ogni campione di sangue e conservati a -20°C.

3.2.2.2 Test sierologici

Le prove sierologiche sono state effettuate utilizzando il kit Western Blot commerciale *Leishmania* WESTERN BLOT IgG – LDBio Diagnostics® (Lyon, France). Questa metodica permette di rilevare la presenza di anticorpi anti-*Leishmania* nel siero dei pazienti.

Le proteine specifiche di *L. infantum* p14 e p16, rispettivamente da 14 kDa e da 16 kDa, elettrotrasferite su una membrana di nitrocellulosa, sono messe a contatto con il siero del paziente. La presenza sulla striscia di nitrocellulosa delle bande è indicativa dell'evidenza di specifiche IgG anti-*Leishmania* nel siero.

3.2.2.3 Test molecolari

Nei campioni di buffy coat è stata ricercata la presenza del DNA di *Leishmania* avvalendosi di metodiche molecolari, effettuando saggi di real-time PCR home-made.

Gli acidi nucleici sono stati estratti a partire da 300 µl di buffy coat mediante lo strumento QIASymphony SP/AS, Qiagen® (Hilden, Germany). Il DNA è stato eluito in 200 µl di buffer di eluizione ed, in seguito, amplificato mediante un saggio di real-time PCR, in cui si amplifica il DNA del cinetoplasto di *Leishmania* (kDNA) [165].

Per la PCR kDNA, sono stati utilizzati 15 pmol dei primers RV1 e RV2 (Tabella 2), sintetizzati da PrimmBiotech (Milan, Italy).

Tabella 2. Sequenze dei primers RV1 e RV2 utilizzati nella real-time PCR home made.

Primers	Sequenza
<i>RV1 (F)</i>	5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3'
<i>RV2 (R)</i>	5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'

Inoltre, sono stati utilizzati 50 pmol della sonda TaqManprobes, sintetizzata da IDT-DNA (Leuven, Belgium):

FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA

Il saggio di real-time PCR è stato eseguito sullo strumento CFX Real Time PCR detection System (Bio-Rad, California, USA), utilizzando il kit di amplificazione Taqman UNIVERSAL PCR MasterMix (Roche). La β2-microglobulina è stata utilizzata come controllo di amplificazione del DNA estratto.

La quantificazione è stata condotta mediante l'utilizzo di una curva standard a concentrazione nota (da 10⁶ a 10⁰ genomi equivalenti).

È stato utilizzato il seguente profilo termico:

50°C per 2 minuti

95°C per 10 minuti

95°C per 15 secondi

60°C per 1 minuto

} X 45 cicli

Il limite di rilevazione della real-time PCR per kDNA è stato di 0.00005 parasite/reaction [165].

4. Risultati

4.1 Sottostudio 1

4.1.1 Attivazione dei linfociti B

Le varie sottopopolazioni di linfociti B (*naïve*, *memory* e GCs) sono state isolate, a partire dai PBMCs del sangue periferico e dalla frazione di cellule mononucleate di tonsilla, ed ottenute mediante separazione immunomagnetica.

La purezza delle cellule B isolate è stata valutata mediante citometria a flusso analizzando i markers antigenici presenti sulla membrana cellulare di ogni sottotipo purificato: CD19 per le cellule B *naïve*, CD27 per le *memory*, CD10 per le GCs.

Le tre popolazioni di cellule B hanno mostrato un alto grado di purezza per i markers analizzati, con valori compresi tra 90-95%, dimostrando una buona riuscita della metodica di isolamento utilizzata.

In seguito, sono state allestite le colture delle diverse sottopopolazioni di linfociti B, che sono state trattate con varie combinazioni di citochine a concentrazioni scalari per la determinazione della loro attivazione.

La percentuale di cellule attivate, è stata valutata in citometria a flusso mediante l'analisi del marker CD80, espresso dai linfociti B attivati. L'arricchimento delle cellule CD80+ con questa procedura, ha permesso di ottenere una popolazione cellulare esprime il marker CD80 pari al 95% delle cellule totali isolate soltanto nel caso delle colture cellulari trattate con α CD40 mAb e IL-4 (protocollo di attivazione 3), mentre gli altri protocolli (1, 2, 4) non sono risultati efficaci (Figure 8-11).

1) 5 $\mu\text{g/ml}$ αIgM Ab + 5 ng/ml IL-4:

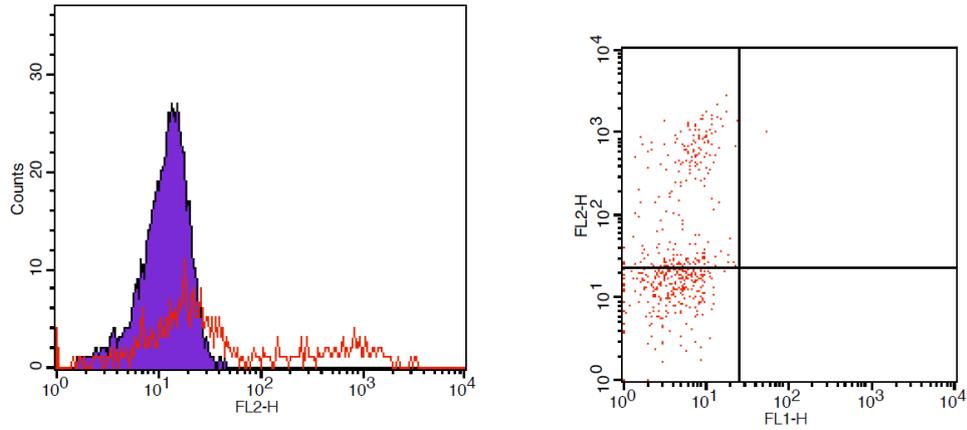


Figura 8. Istogramma e rispettivo dot plot ottenuti dall'analisi in citometria a flusso delle cellule trattate con il protocollo 1 negative alla marcatura con anti-CD80.

2) 5 $\mu\text{g/ml}$ αIgM Ab + 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD40 mAb:

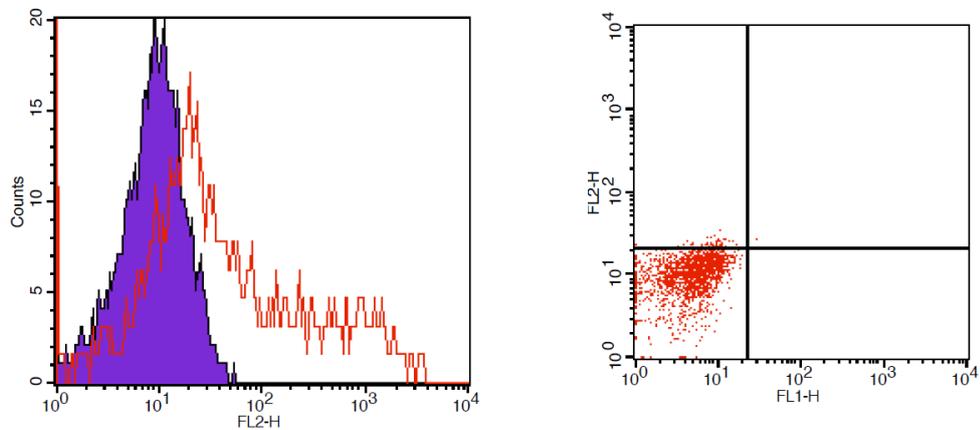


Figura 9. Istogramma e rispettivo dot plot ottenuti dall'analisi in citometria a flusso delle cellule trattate con il protocollo 2 negative alla marcatura con anti-CD80.

3) 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD40 mAb + 5 ng/ml IL-4:

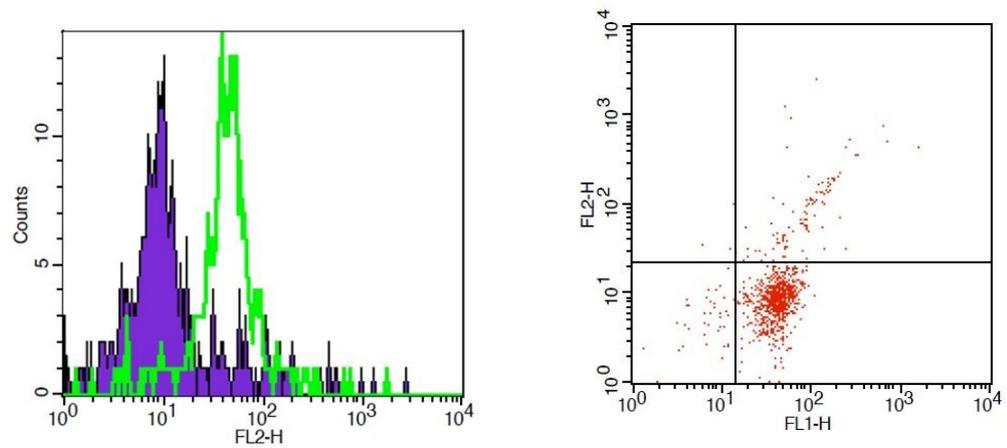


Figura 10. Istogramma e rispettivo dot plot ottenuti dall'analisi in citometria a flusso delle cellule trattate con il protocollo 3 positive alla marcatura con anti-CD80. In verde, il picco relativo alle cellule attivate CD80 positive.

4) 1 $\mu\text{g/ml}$ αCD40 mAb + 20 ng/ml IL-2 + 50 ng/ml IL-10:

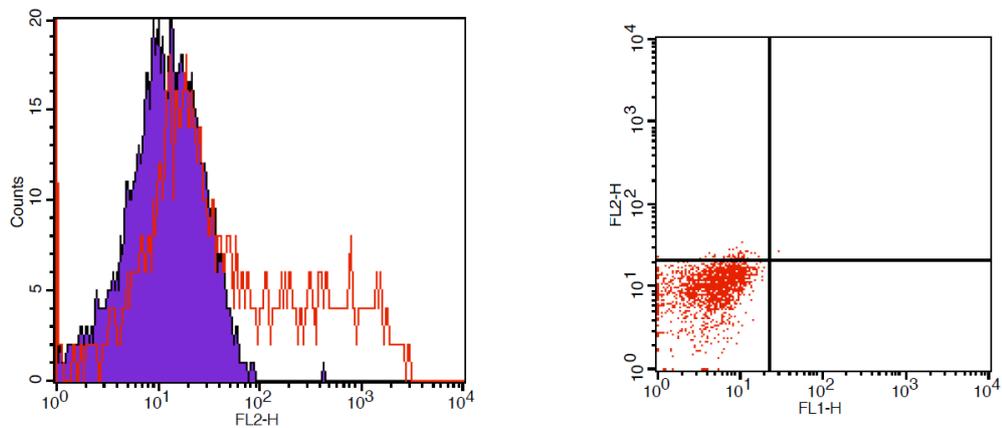


Figura 11. Istogramma e rispettivo dot plot ottenuti dall'analisi in citometria a flusso delle cellule trattate con il protocollo 4 negative alla marcatura con anti-CD80.

4.1.2 Valutazione dell'espressione di NF-kB

Le colture primarie di GCs, precedentemente separate e purificate, sono state stimolate quindi con il protocollo di attivazione 3 (1 µg/ml αCD40 mAb + 5 ng/ml IL-4) e/o trattate con la proteina HIV-1 Tat ricombinante. Dopo la stimolazione, sono state effettuate delle raccolte a vari tempi: 0, 15, 30, 60 minuti (rispettivamente T0, T15, T30 e T60).

Mediante western blot è stata messa in evidenza l'espressione della proteina NF-kB nelle GCs (Figura 12). La proteina ha un peso molecolare di 65 kDa; come controllo positivo è stata utilizzata la β-tubulina (55 kDa).

Nelle cellule GCs al basale (T0), non è stata osservata l'espressione di NF-kB, sia in presenza sia in assenza dello stimolo virale dato dalla proteina HIV-1 Tat.

È stato possibile, invece, apprezzare la banda dovuta alla presenza della proteina NF-kB dopo 15 e 30 minuti (T15 e T30) nelle cellule attivate e trattate con Tat, evidenza del fatto che l'espressione di NF-kB inizia dopo 15 minuti di coltura ed è massima a 30 minuti.

Dopo 1 ora di coltura (T60), si è potuto osservare l'assenza della banda, dovuta ad una netta diminuzione dell'espressione proteica di NF-kB già a partire da mezz'ora di coltura delle cellule. I risultati del western blot si possono osservare in Figura 12.

Nel complesso, queste osservazioni indicano che l'espressione di NF-kB nelle cellule GCs è finemente regolata nel tempo e la sua modulazione è connessa alla presenza della proteina virale Tat di HIV-1.

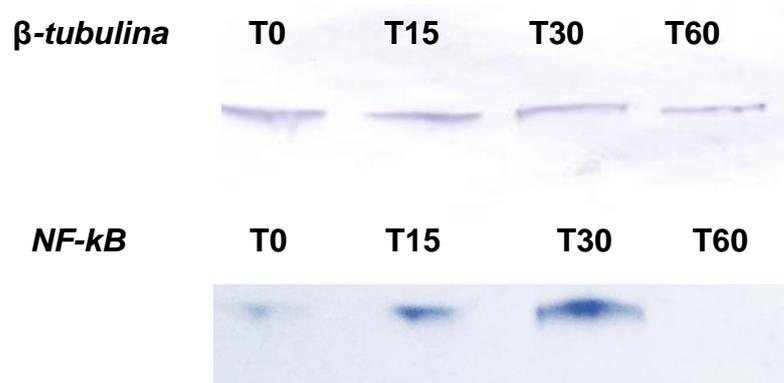


Figura 12. Analisi proteica di NF-kB mediante western blot in GCs estratte da tonsilla: è stata messa in evidenza l'espressione della proteina nelle colture trattate con Tat di HIV-1 raccolte a vari time points (T0, T15, T30, T60).

4.2 Sottostudio 2

4.2.1 Analisi dei pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV

Nei tre pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV analizzati (A, B, C) sono stati presi in considerazione i parametri laboratoristici relativi a carica virale (HIV RNA/ml di plasma), parassitemia (genomi equivalenti di *Leishmania*/ml di sangue) e linfociti T CD4+ (per μ l di sangue).

L'andamento complessivo nel tempo è illustrato nei seguenti grafici:

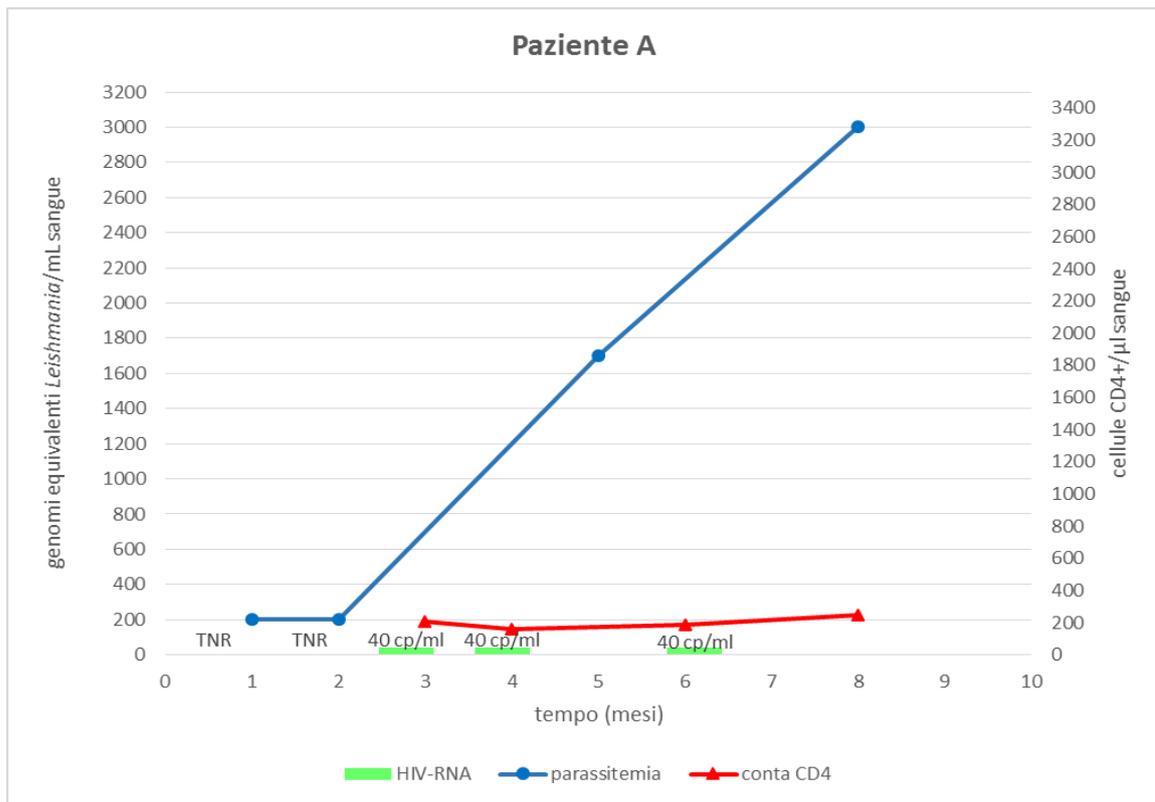


Figura 13. Grafico del paziente A, che mette in relazione i parametri clinici di HIV RNA (copie/ml), parassitemia (genomi equivalenti di *Leishmania*/ml) e linfociti CD4+ (cellule/ μ l di sangue) nel tempo (0-8 mesi). I numeri sopra gli istogrammi rappresentano la carica virale (cp/ml: copie/ml).

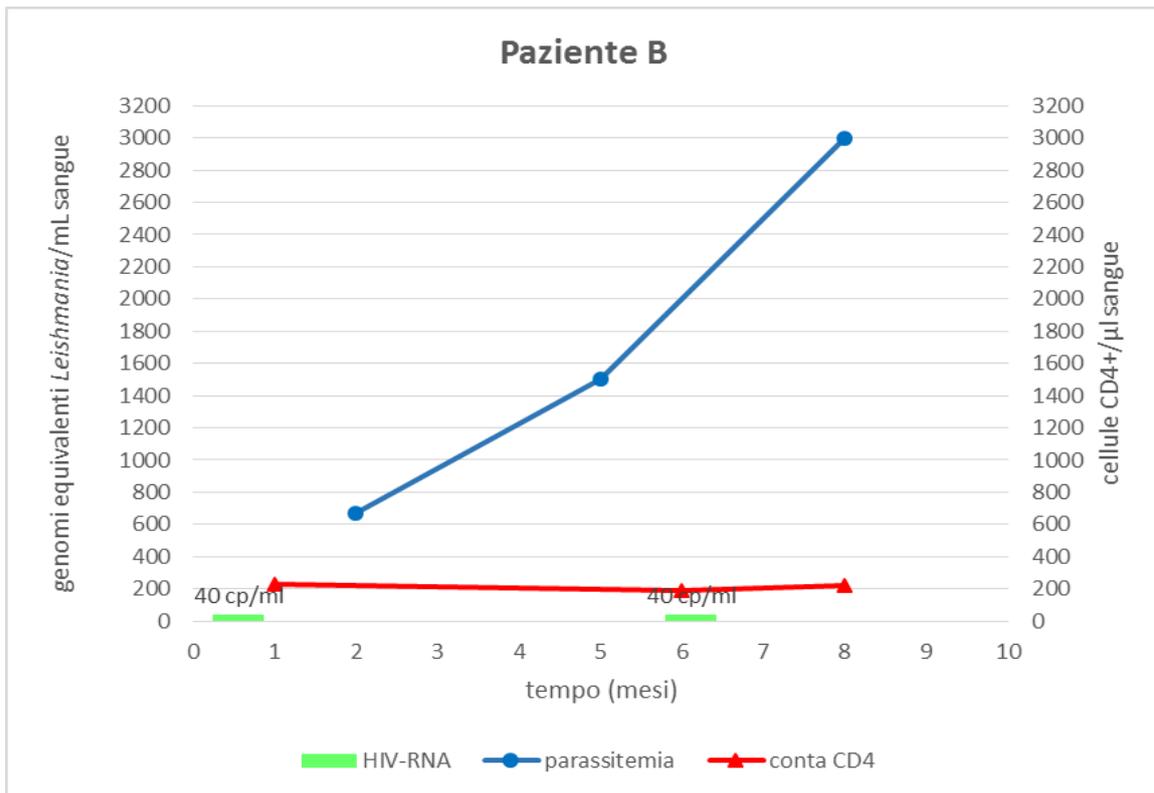


Figura 14. Grafico del paziente B, che mette in relazione i parametri clinici di HIV RNA (copie/ml), parassitemia (genomi equivalenti di *Leishmania*/ml) e linfociti CD4+ (cellule/μl di sangue) nel tempo (0-9 mesi). I numeri sopra gli istogrammi rappresentano la carica virale (cp/ml; copie/ml).

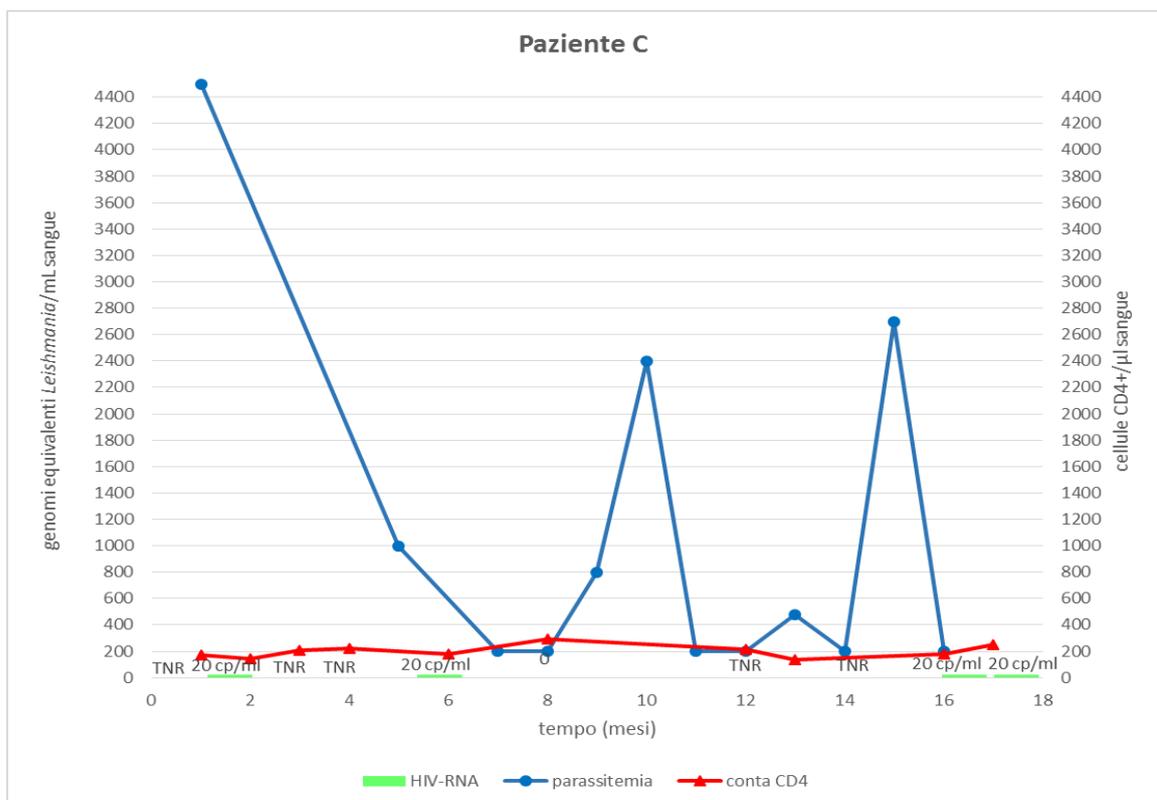


Figura 15. Grafico del paziente C, che mette in relazione i parametri clinici di HIV RNA (copie/ml), parassitemia (genomi equivalenti di *Leishmania*/ml di sangue) e linfociti CD4+ (cellule/μl di sangue) nel tempo (0-18 mesi). I numeri sopra gli istogrammi rappresentano la carica virale (cp/ml; copie/ml).

Nei tre pazienti (Figure 13-15) è stato possibile osservare bassi valori di HIV RNA, contenuti sotto i livelli di rilevabilità del metodo (<20 copie/ml), ma parassitemia in aumento, soprattutto nei pazienti A e B, nonostante i pazienti fossero sottoposti ad una profilassi cronica con amfotericina B liposomiale.

La parassitemia è risultata in aumento anche per quanto riguarda il paziente C, che è stato seguito per un tempo maggiore. In questo caso di leishmaniosi cronica attiva, è stato possibile osservare un andamento ondulante della carica parassitaria, come evidenziato dalle *spike* in Figura 15.

Inoltre, in tutti e tre i pazienti sono stati evidenziati valori costantemente modesti (<250 cell/ μ l) di linfociti T CD4+.

Pertanto, possiamo dedurre che nonostante una bassa carica virale e la profilassi cronica con amfotericina B liposomiale, i pazienti coinfectati in esame mostravano la costante presenza di parassiti nel sangue, accompagnata da una bassa conta di linfociti T CD4+.

4.2.2 Determinazione della prevalenza dell'infezione asintomatica da *Leishmania*

Sono stati analizzati 260 campioni di sangue di donatori sani residenti in Valsamoggia.

La prevalenza di infezione asintomatica è stata valutata mediante test sierologici e molecolari: 260 sieri sono stati analizzati con Western Blot per la presenza di due proteine specifiche per *L.infantum*, e 260 buffy coat sono stati analizzati mediante real-time PCR home-made per la ricerca del DNA di *Leishmania*.

La presenza di anticorpi anti-*Leishmania* è stata osservata nel siero di 27 dei 260 campioni, con una sieroprevalenza del 10,4% (Figura 16).

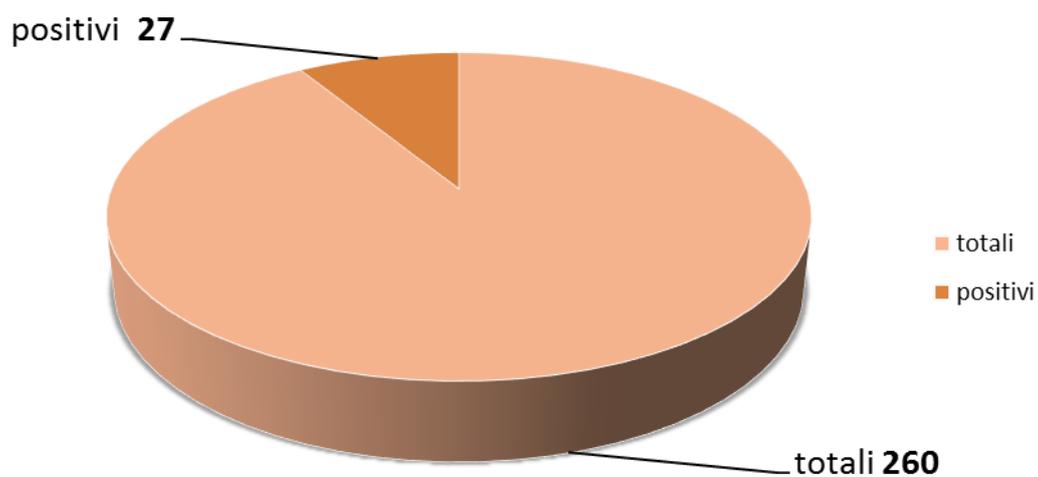


Figura 16. Grafico a torta rappresentante i donatori di sangue positivi testati mediante Western Blot per la presenza di anticorpi anti-*Leishmania*.

Tra i 27 campioni positivi, 15 sono risultati positivi per l'antigene di 16 kDa (banda P16), 10 sieri invece sono risultati positivi per l'antigene di 14 kDa (banda P14) e 2 dei 27 campioni hanno presentato positività nei confronti di entrambe le bande (P14 e P16) (Figura 17).

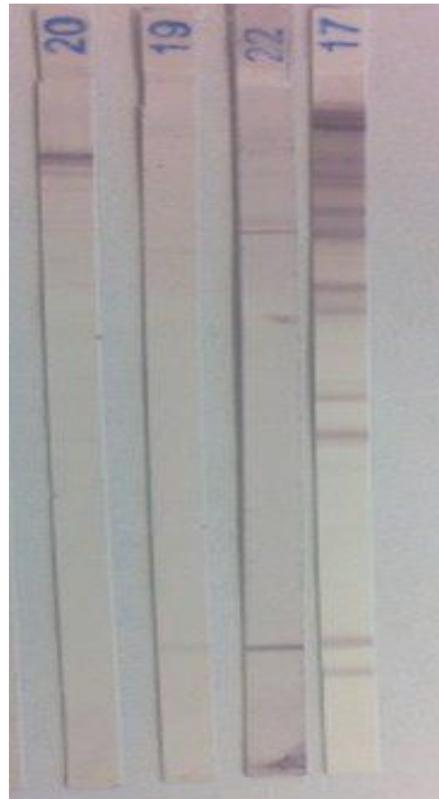


Figura 17. Risultati rappresentativi del western blot: n° 20 campione negativo; n° 19 bassa positività per la banda P14; n° 22 campione positivo per la banda P14; n° 17 campione positivo per le bande P14 e P16. Considerando le istruzioni del kit di Western Blot utilizzato, i campioni possono considerarsi positivi se una o entrambe le bande sono evidenziabili.

Il DNA di *Leishmania* è stato ritrovato mediante real-time PCR in 4 dei 260 campioni analizzati (Figura 18), quindi nell'1,5% dei soggetti testati. Nell'analisi, sono stati considerati positivi i campioni con un valore di ciclo soglia (C_T) non più alto di 38 cicli (Figura 19).

Tra i campioni positivi per il kDNA di *Leishmania*, soltanto 1 dei 4 evidenziati è risultato positivo per gli anticorpi anti-*Leishmania* in Western Blot nei confronti della banda p14. Negli altri tre casi, non sono stati evidenziati anticorpi specifici.

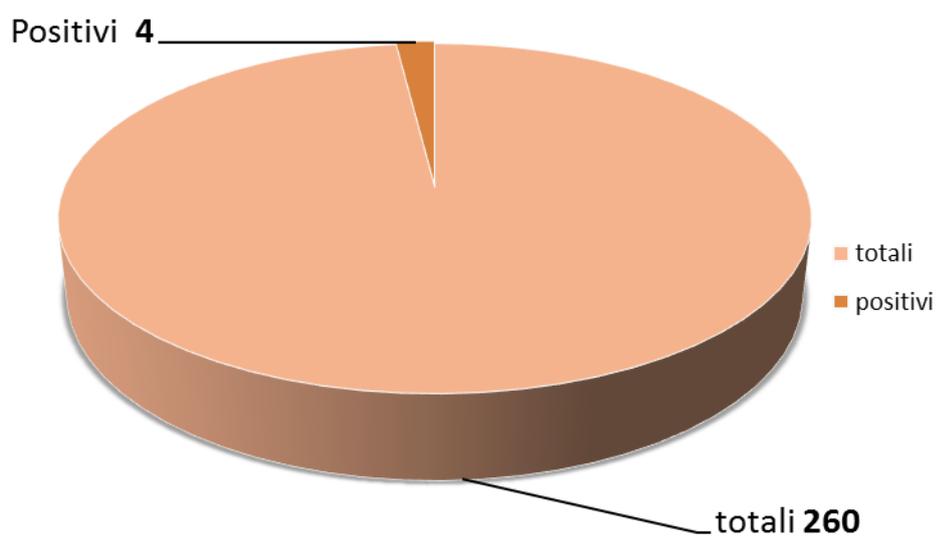


Figura 18. Grafico a torta rappresentante i campioni positivi dei donatori di sangue testati mediante real-time PCR per il DNA di *Leishmania*.

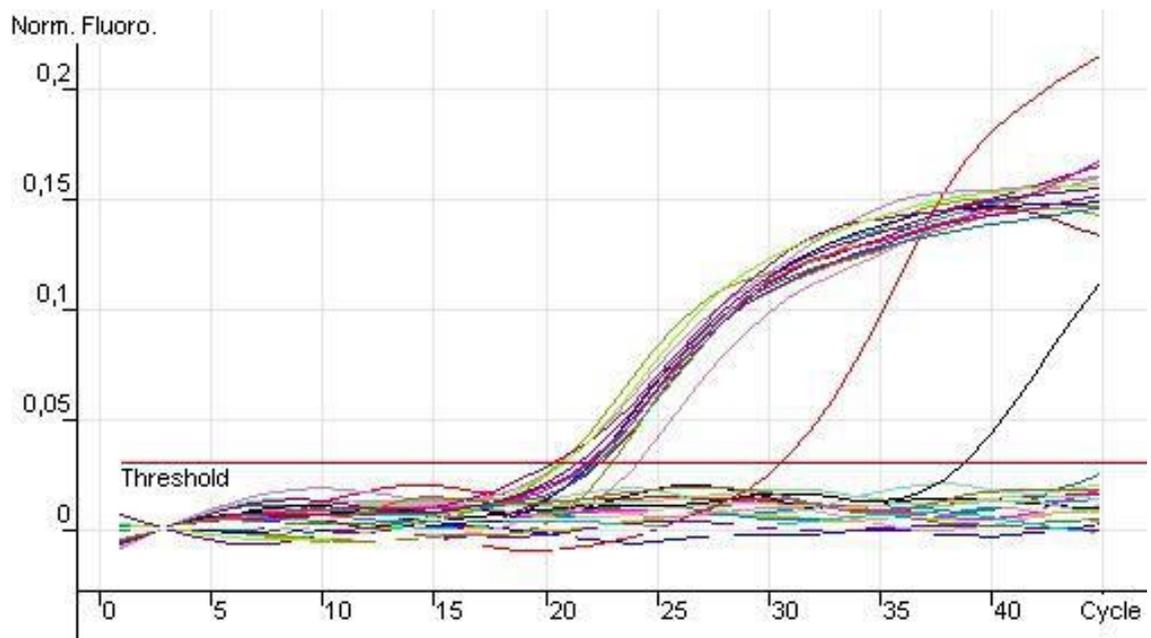


Figura 19. Real-time PCR per l'amplificazione del DNA di *Leishmania*.

5. Discussione e conclusioni

L'aspettativa di vita dei pazienti con infezione da HIV è migliorata radicalmente dopo l'introduzione della terapia antiretrovirale nella pratica clinica. Nonostante questi progressi registrati in campo terapeutico, alcuni eventi che scaturiscono dalle interazioni tra il virus e l'ospite, come l'attivazione cronica del sistema immunitario e l'infiammazione persistente, possono provocare un aumento dell'incidenza di varie comorbidità e infezioni opportunistiche.

Nell'ambito di questa tesi di dottorato, è stato possibile approfondire alcuni degli aspetti che si possono verificare nel tempo nei pazienti HIV positivi. Nello specifico, sono stati studiati, in una prima parte, i meccanismi alla base della linfomagenesi HIV-associata, mentre nella seconda parte è stata analizzata la coinfezione *Leishmania*/HIV.

Negli ultimi anni, molti studi di ricerca sono stati condotti principalmente per analizzare i meccanismi patogenetici alla base della progressione verso la malattia HIV-correlata.

Inizialmente, si pensava che HIV fosse un retrovirus con capacità trasformanti direttamente responsabile dello sviluppo dei linfomi. In realtà, HIV non infetta direttamente le cellule tumorali, come nel caso dei virus oncogenici EBV e HHV-8. Evidenze recenti suggeriscono che HIV potrebbe contribuire alla linfomagenesi agendo come importante fattore microambientale [188]. Infatti, HIV, come anche diverse proteine che codifica esso stesso, potrebbe promuovere e sostenere l'iperattivazione delle cellule B che caratterizza i pazienti HIV-infetti. Questa condizione fa parte di una stimolazione antigenica generale cronica, che è anche favorita da altre coinfezioni virali scarsamente controllate. In queste condizioni, lo stato infiammatorio cronico risultante potrebbe essere alla base dell'espansione poli- o oligo-clonale dei linfociti B, favorita anche dalla produzione anormale di citochine promuoventi la crescita delle cellule B, come IL-6 e IL-10 [189].

Gli eventi coinvolti nella linfomagenesi HIV correlata sono complessi e poco chiari. Un grande numero di fattori chiave contribuisce allo sviluppo del linfoma nei pazienti HIV positivi, tra cui la deregolazione del sistema immunitario, le alterazioni genetiche e il possibile sbilanciamento della sorveglianza immunitaria cellulo-

mediata. Il profilo infiammatorio dei pazienti non trattati con la cART è accompagnato spesso da stimolazione cronica dei linfociti B, che predispone all'accumulo di instabilità genetica in queste cellule.

La stimolazione cronica dei linfociti B potrebbe favorire la proliferazione monoclonale delle cellule B, che potrebbe evolvere, infine, in linfoma dopo l'acquisizione di alterazioni genetiche critiche.

Una molecola co-stimolatoria espressa dai linfociti T attivati, il ligando CD40 (CD40L), può attivare potentemente i linfociti B, riproducendo le conseguenze funzionali dell'attivazione fisiologica del CD40L espresso dalle cellule B [190].

Le proteine di HIV e le citochine stimolatorie delle cellule B sono overesprese nei linfomi, sebbene il loro ruolo non sia stato del tutto elucidato. Nello specifico, molti studi sostengono un ruolo oncogenico della proteina HIV-1 Tat, che è essenziale per l'espressione genica delle proteine virali e la produzione del virus. La forma solubile biologicamente attiva della proteina è rilasciata dalle cellule HIV-infette e trasloca nel nucleo delle cellule vicine, dove aumenta i livelli di trascrizione di HIV e gioca un ruolo chiave nel processo di patogenesi. Negli organi linfoidi, Tat viene rilasciata dalle cellule HIV-infette e potrebbe agire da fattore microambientale capace di interagire funzionalmente ed entrare nei linfociti B dando luogo alla deregolazione degli oncosoppressori pRb2/p130 [191].

Molte cellule B trasformate non contengono il virus, pertanto altri meccanismi e/o fattori virali contribuiscono alla trasformazione. In individui HIV-infetti con linfoma a cellule B, è stata dimostrata la presenza di anticorpi anti-Tat [191].

L'ipotesi che Tat rilasciata dalle cellule infette abbia un'attività pleiotropica nelle cellule B non infette è sostenuta anche da studi che hanno riportato come la proteina moduli l'espressione di geni cellulari, inclusi citochine e loro recettori [192-194]. Pertanto, è possibile che Tat prodotta localmente negli organi linfoidi dei pazienti HIV positivi possa agire direttamente sulle cellule B e partecipare all'insorgenza delle anomalie osservate in vivo. Di particolare rilevanza patogena è l'abilità di Tat di accelerare la produzione delle citochine IL-6 e IL-10, promuoventi la proliferazione, oltre all'upregolazione dei livelli di espressione della DNA polimerasi e alla promozione dell'angiogenesi.

L'effetto diretto di Tat è stato dimostrato in cellule B primarie isolate da pazienti HIV-negativi, in cui la proteina virale modula differenzialmente la proliferazione delle varie sottopopolazioni di linfociti B (*naïve*, *memory* e GCs). Da questo studio è

risultato che Tat agisce nelle prime fasi di attivazione delle cellule B, probabilmente tra la fase G1 ed S del ciclo cellulare [195].

L'ipotesi di base di questo progetto di dottorato è che Tat potrebbe rappresentare un effettore cruciale delle alterazioni delle cellule B, poiché molti studi hanno dimostrato che modula le disfunzioni nella proliferazione cellulare, vitalità e replicazione in differenti target cellulari, specialmente nelle linee cellulari attivate.

La proteina Tat è associata all'aumento della sintesi della proteina NF- κ B, un fattore di trascrizione cellulare che attiva promotori virali e cellulari. Il fattore NF- κ B presenta siti di legame nei promotori di varie citochine infiammatorie, da cui è anche upregolato. Nella sua forma prototipica, un eterodimero di subunità proteiche di circa 50 e 65 kDa, è sequestrato nel citoplasma in associazione al suo inibitore I κ Ba. In seguito a stimoli appropriati, tuttavia, I κ Ba viene fosforilato e degradato. Questo passaggio rappresenta l'innescò di un segnale che permette la traslocazione nucleare di NF- κ B.

La proteina virale Tat potrebbe favorire l'attivazione dell'attività trascrizionale di NF- κ B, che a sua volta potrebbe attivare i *pathways* implicati nella linfomagenesi [196].

Durante questo progetto di ricerca, si è cercato di indagare la correlazione della proteina Tat con l'attivazione del fattore NF- κ B in colture primarie di cellule GCs, che sono particolarmente suscettibili nel paziente HIV infetto e possono dare origine a una serie di alterazioni geniche implicate nell'insorgenza dei linfomi a cellule B.

In particolare, come primo obiettivo, è stato messo a punto uno schema sperimentale che permettesse l'attivazione delle cellule GCs, isolate da organi linfoidi (tonsille e/o adenoidi). Nelle condizioni sperimentali utilizzate, i risultati ottenuti hanno mostrato che le GCs si attivano quando trattate con le citochine α CD40 mAb e IL-4. Il trattamento con gli altri protocolli di attivazione, che prevedevano l'utilizzo di combinazioni a varie concentrazioni scalari di α IgM Ab, IL-4, α CD40 mAb, IL-2 e IL-10, non è risultato efficace per l'attivazione delle GCs. È importante ricordare che gli stimoli attivanti di α CD40 mAb e IL-4 potrebbero di per sé favorire gli eventi legati all'origine della linfomagenesi. Infatti, le cellule B iperattivate esprimono la "citidina deaminasi indotta dall'attivazione" (activation-induced cytidine deaminase, AICD), un enzima che media la ricombinazione delle immunoglobuline e l'ipermutazione somatica [197]. Questo enzima può introdurre mutazioni nei geni delle immunoglobuline e non (ad esempio BCL-6) e inoltre può indurre traslocazioni

cromosomiche in oncogeni, che contribuiscono allo sviluppo dei linfomi. In particolare, l'espressione aberrante di AICD è responsabile della ricombinazione di c-MYC/IgH osservata nei linfomi derivati dal centro germinale, come il linfoma di Burkitt. Durante il processo di differenziamento, i linfomi HIV-associati potrebbero derivare da cellule B trasformate a differenti stadi: pre-germinale, follicolare o post-germinale. Ad ogni stadio, corrisponde lo sviluppo di un diverso tipo di linfoma, relativo anche all'espressione dei geni BCL-6, MUM1 e CD138. Inoltre, possono insorgere eventi molecolari (per esempio l'attivazione di MYC e l'inattivazione di p53), ipermutazione somatica aberrante in uno o più proto-oncogeni (c-MYC, PAX-5, PIM1, RhoH/TTF), e coinfezioni con EBV e HHV-8 [198].

Per la valutazione dell'espressione di NF- κ B nelle cellule in studio, sono stati allestiti vari esperimenti a partire da colture primarie di GCs trattate con le citochine attivanti IL-4 e α CD40 mAb, a cui è stato aggiunto lo stimolo virale dato dalla proteina Tat. Dai risultati ottenuti mediante western blot, è stato possibile apprezzare delle differenze nell'espressione del fattore di trascrizione, evidenti nel caso di trattamento con Tat. Analizzando le bande ottenute in western blot, nelle cellule GCs al basale (T0) non è stata osservata l'espressione di NF- κ B, sia in presenza sia in assenza di HIV-1 Tat. È stato possibile, invece, apprezzare la banda dovuta alla presenza della proteina NF- κ B dopo 15 e 30 minuti (T15 e T30) nelle cellule attivate e trattate con Tat, evidenza del fatto che l'espressione di NF- κ B inizia dopo 15 minuti di coltura ed è massima a 30 minuti. Dopo 1 ora di coltura (T60), si è potuto osservare nuovamente l'assenza della banda, dovuta ad una netta diminuzione dell'espressione proteica di NF- κ B già a partire da mezz'ora di coltura delle cellule.

Nel complesso, queste osservazioni indicano che l'espressione di NF- κ B nelle cellule GCs è finemente regolata nel tempo e la sua modulazione è connessa alla presenza della proteina virale Tat di HIV-1. Inoltre, i risultati ottenuti suggeriscono il ruolo negativo della proteina virale nella sopravvivenza delle GCs.

I risultati ottenuti nel corso di questo progetto di ricerca rappresentano dei dati preliminari che dovrebbero essere ulteriormente approfonditi per indagare i meccanismi innescati dall'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B nella genesi dei linfomi.

In futuro, l'analisi micro-array dei differenti profili di espressione genica in presenza e in assenza di Tat è necessaria per determinare i *pathways* di trasduzione del segnale e i fattori di trascrizione coinvolti. In questa analisi, considerando che anche gp120,

Nef e gp41 di HIV-1 potrebbero avere un ruolo patogeno nell'insorgenza dei linfomi, il trascrittoma ottenuto dalle cellule GCs trattate con le proteine virali dovrebbe essere comparato a quello delle cellule non trattate. Lo studio dell'espressione dell'mRNA in questi campioni dovrebbe permettere l'identificazione dei geni, delle citochine e dei *pathways* di segnalazione cellulare specificamente influenzati dalle proteine di HIV.

Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta anche alla valutazione degli specifici geni implicati nel differenziamento e nella proliferazione delle cellule GCs, come ad esempio BCL-6, BLIMP-1 e c-MYC, che potrebbero essere soggetti al controllo di HIV-1 nei vari stadi della linfomagenesi.

Nel corso dell'infezione da HIV si assiste ad una marcata perdita dei linfociti T CD4+: questo evento rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio responsabili dell'aumentata vulnerabilità del paziente ad altri patogeni. L'immonodepressione che si osserva nel paziente HIV positivo, infatti, potrebbe favorire l'instaurarsi di coinfezioni, tra le quali di particolare importanza è l'infezione primaria da *Leishmania* o, più frequentemente, la riattivazione di un'infezione da *Leishmania* latente.

Nel mondo, la leishmaniosi viscerale è una delle cause più significative di mortalità e morbilità, nei pazienti HIV-positivi [106]. In Europa meridionale, la leishmaniosi è endemica e sono presenti numerosi casi di coinfezione *Leishmania*/HIV-1. Studi recenti indicano che un'elevata percentuale di pazienti HIV positivi sono portatori asintomatici di infezione da *L. infantum* [158,159]. La diagnosi precoce di infezione da *Leishmania* in questi soggetti è cruciale per poter introdurre una terapia mirata prima dell'instaurarsi di una leishmaniosi cronica attiva.

Alla luce di questi dati, la seconda parte del progetto di dottorato è stata incentrata sullo studio della infezione *Leishmania*/HIV, considerando che le infezioni causate da *Leishmania* vengono raramente considerate negli algoritmi diagnostici con conseguente sotto-diagnosi di tali infezioni.

Tra il 2013 e il 2014, in Emilia Romagna si è verificato un focolaio epidemico di VL umana [199]. Tuttavia, è noto che i pazienti che sviluppano VL sono solo la punta di un iceberg e che la maggior parte degli individui infettati da *Leishmania* non progredisce verso una forma clinicamente conclamata, ma sviluppa una risposta immunitaria in grado di controllare l'infezione, ma non di eradicarla. Pertanto, in

condizioni di immunosoppressione, come nel caso dell'infezione da HIV, i portatori asintomatici di *Leishmania* possono sviluppare VL a causa della riattivazione della forma latente di questa infezione protozoaria. In questo studio, è stata condotta un'analisi su donatori sani della provincia di Bologna (comune di Valsamoggia) per dimostrare la reale prevalenza delle infezioni asintomatiche da *Leishmania* nella popolazione sana.

Lo studio epidemiologico è stato condotto analizzando 260 campioni di sangue di donatori sani residenti in Valsamoggia, in cui la prevalenza di infezione asintomatica è stata valutata mediante test sierologici e molecolari. La presenza di anticorpi anti-*Leishmania* è stata osservata nel 10,4% dei casi, mentre il DNA di *Leishmania* è stato ritrovato nell'1,5% dei donatori testati. Uno dei 4 soggetti risultati positivi per il DNA del parassita ha mostrato anche positività sierologica. Complessivamente, la prevalenza totale di infezioni asintomatiche da *Leishmania* in donatori di sangue rilevata da questo studio è risultata quindi dell'11.5%.

La metodica Western Blot utilizzata presenta un'eccellente sensibilità e specificità, sebbene nei test sierologici per la determinazione di *Leishmania* non possano essere esclusi risultati falsi positivi e falsi negativi. Dalla nostra esperienza, è raro trovarsi di fronte a risultati falsi negativi. Tuttavia, è noto che nei portatori asintomatici il titolo degli anticorpi anti-leishmania nel siero è basso e gli anticorpi potrebbero essere assenti [181]. In linea con questo, nello studio di prevalenza condotto durante questo progetto, i risultati del test molecolare hanno permesso di evidenziare la presenza del DNA del parassita nei campioni di sangue di tre donatori risultati negativi al test sierologico.

Per quanto riguarda i test molecolari, la real-time PCR kDNA risulta una metodica altamente sensibile e specifica per la rilevazione del DNA di *Leishmania*, come riportato in letteratura [165,200]. Dai risultati ottenuti, 26/27 dei campioni sierologicamente positivi per *Leishmania* sono risultati negativi per il kDNA, ma questo potrebbe essere spiegato dalla presenza di una bassa densità di parassiti e dal fatto che la parassitemia probabilmente sia episodica nel corso di infezione asintomatica/latente.

Da questo studio è emerso che la Valsamoggia è una zona ad alta prevalenza di infezioni asintomatiche, con un'elevata circolazione del protozoo. La presenza dell'infezione latente nella popolazione sana è un dato di particolare rilevanza. Attualmente, in Italia viene eseguita la leucodeplezione in tutti i campioni di sangue,

ma non ci sono evidenze che confermino che questa procedura sia sufficiente per prevenire la trasmissione di *Leishmania* mediante trasfusione. Nella routine, la determinazione del parassita nel sangue nel soggetto donatore non è obbligatoria, ma i campioni positivi per la sierologia devono essere eliminati [201]. Pertanto, sarebbe necessario implementare le strategie di screening per *Leishmania* nei donatori di sangue e quantificare il rischio di trasmissione da trasfusione o trapianto.

Inoltre, l'alta percentuale di infezione da *Leishmania* nei donatori della nostra provincia, rappresenta un importate campanello d'allarme considerando il rischio di riattivazione di tale infezione protozoaria in soggetti immunocompromessi, come i pazienti HIV positivi. Il nostro studio suggerisce pertanto che sarebbe necessario implementare uno screening per *Leishmania* di tutti i pazienti HIV-positivi della provincia di Bologna, screening che permetterebbe di rilevare precocemente i soggetti *Leishmania*-positivi a rischio di riattivazione e di sviluppo di leishmaniosi clinicamente conclamata.

La gestione dei pazienti coinfecti *Leishmania*/HIV è in genere complessa a causa di diversi fattori, tra i quali alto tasso di ricadute, il fallimento terapeutico e la tossicità dei farmaci antiprotozoari in questa categoria di pazienti.

Per descrivere l'attuale situazione nei pazienti coinfecti, presso l'U.O Microbiologia dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, sono stati seguiti tre casi significativi di coinfezione *Leishmania*/HIV presentanti una leishmaniosi cronica attiva; di tali pazienti sono stati monitorati alcuni parametri clinici e laboratoristici. Nei tre casi è stato possibile osservare un controllo della viremia di HIV-1 contenuta sotto i livelli di rilevanza, ma una parassitemia in aumento nei pazienti A e B, nonostante profilassi cronica con amfotericina B liposomiale, e in aumento ma con andamento ondulante per quanto riguarda il paziente C. Inoltre, i valori costantemente modesti di linfociti T CD4+ nei tre pazienti, suggeriscono che il parassita agisca a livello immunologico causando una mancata immunoricostituzione, come già riportato in letteratura [52]. Dal punto di vista clinico, due dei tre pazienti esaminati presentavano segni e sintomi evidenti di VL e di leishmaniosi cutanea disseminata, mentre il terzo paziente presentava un'insufficienza renale cronica causata proprio dall'infezione da *Leishmania*. Il quadro clinico e laboratoristico complesso e di difficile trattamento di questi pazienti mostra come sarebbe necessario identificare precocemente la presenza di infezione da *Leishmania* in pazienti HIV positivi, prima dello sviluppo di leishmaniosi cronica attiva. Lo screening sistematico e la profilassi

primaria per VL in pazienti HIV non sono raccomandati dalle linee guida internazionali. Tuttavia, riteniamo che queste misure preventive andrebbero prese in considerazione in aree endemiche per leishmaniosi come è risultata essere la provincia di Bologna.

Nell'ottica di una ricerca futura, sarebbe infine importante implementare nuovi approcci terapeutici in grado di contenere entrambe le infezioni, sapendo da letteratura che farmaci anti-proteasici utilizzati verso HIV hanno dimostrato una buona azione contro *Leishmania* [178].

6. Bibliografia

1. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 1981. 30: 250–252.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C et al., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983. 220: 868–871
3. UNAIDS, Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2016. UN Joint Programme on HIV/AIDS.
4. Michele La Placa, Principi di Microbiologia Medica – XIV edizione, 2014.
5. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD and Osmanov S, Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS 2011. 25: 679–689.
6. Levy JA, HIV and The Pathogenesis of AIDS, (3rd Edn), ASM Press, Washington, D.C. 2007.
7. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, Mandaliya K, Jaoko W and Overbaugh J, HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of smaller plasma HIV-1 loads. J. Infect. Dis. 2007. 195: 1177–1180.
8. Carr JK, Foley B, Leitner T, Salminen M, Korber BT, McCutchan FE. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic. In : Human Retrovirus and AIDS. Edited by Los Alamos National Laboratory, Los Alamos NM, 1998 Part III.
9. Kasper DL, Fauci AS. Harrison's Infectious Diseases. McGraw Hill, 2010
10. Sükösd Z, Andersen ES, Seemann SE, Jensen MK, Hansen M, Gorodkin J, Kjems J, Full-length RNA structure prediction of the HIV-1 genome reveals a conserved core domain. Nucleic Acids Res. 2015 Dec 2;43(21):10168-79.
11. Damgaard CK, Andersen ES, Knudsen B, Gorodkin J and Kjems J, RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. J. Mol. Biol., 2004. 336, 369–379.
12. Russell RS, Hu J, Laughrea M, Wainberg MA and Liang C, Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type RNA caused by mutations of the ψ RNA sequences. Virology, 2002, 303, 152–163.
13. Fernandes J, Jayaraman B and Frankel A, The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. RNA Biol. 2012, 9, 6–11.
14. Li G, Piampongsant S, Rodrigues Faria N, Voet A, Pineda-Peña AC, Khouri R, Lemey P, Vandamme AM, Theys K, An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. Retrovirology. 2015; 12: 18.
15. Frankel AD, Young JA, HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem. 1998; 67:1-25.

16. Steckbeck JD, Kuhlmann AS, and Montelaro RC, C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic. *J Gen Virol.* 2013 Jan; 94(Pt 1): 1–19.
17. Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol.* 2010; 18:388–396.
18. Huthoff H, Towers GJ. Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5 alpha. *Trends Microbiol.* 2008; 16:612–619.
19. Zhu P, et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 2006; 441:847–852.
20. Zanetti G, Briggs JA, Grunewald K, Sattentau QJ, Fuller SD. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog.* 2006; 2:e83.
21. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature.* 2008; 455:109–113.
22. Huang, Chin-Chin, Ming, Tang, Mei-Yun Zhang, Shahzad Majeed, Elisabeth Montabana, Robyn L. Stanfield, Dimiter S. Dimitrov, et al. “Structures of a V3-containing HIV-1 gp120 core” *Science (New York J Virol)* 74 (2000):548-554.
23. Kwong PD, et al. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998; 393:648–659.
24. Engelman A, Cherepanov P, The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Mar 16;10(4):279-90
25. Nekhai S, Jeang KT. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future microbio* 2006;1:417-26.
26. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, Cullen BR. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J.* 1998;17:7056–7065.
27. Fujinaga K, et al. The ability of positive transcription elongation factor b to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat. *J Virol.* 1998; 72:7154–7159.
28. Bayer P, et al. Structural studies of HIV -1 Tat protein. *J Mol Biol.* 1995; 247:529–535.
29. Anand K, Schulte A, Vogel-Bachmayr K, Scheffzek K, Geyer M. Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15:1287–1292.
30. Zhou M, et al. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:5077–5086.
31. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al, and the Rakai Project Study Group. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 2000; 342: 921–29.

32. Parrish NF, Gao F, Li H, et al. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 6626–33.
33. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, et al, and the CHAVI Clinical Core B. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2009; 206: 1253–72.
34. Bailey J, et al. 2004. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol* 16:470-476.
35. Levy JA, HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* 2009; 23:147-160.
36. Miserocchi A, Musumeci G, Bon I, Morini S, Longo S, Borderi M, Gibellini D, Carla Re M. Effects of Antiretroviral Molecules on Survival and Gene Expression of An Osteoblast-like Cell Line. *Curr HIV Res.* 2016;14(6):497-505.
37. Bertoldi A, De Crignis E, Miserocchi A, Bon I, Musumeci G, Longo S, D'Urbano V, La Manna G, Calza L, Re MC. HIV and kidney: a dangerous liaison. *New Microbiol.* 2017 Jan;40(1):1-10.
38. Morini S, Musumeci G, Bon I, Miserocchi A, Alviano F, Longo S, Bertoldi A, Velati CV, Gibellini D, Re MC. HIV-1 gp120 impairs the differentiation and survival of cord blood CD34+ HPCs induced to the erythroid lineage. *New Microbiol.* 2016 Jan;39(1):13-23.
39. Gibellini D, Borderi M, Clò A, Morini S, Miserocchi A, Bon I, Ponti C, Re MC. HIV-related mechanisms in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*.2013 Nov;14(11):780-90.
40. Borderi M, Gibellini D, Vescini F, De Crignis E, Cimatti L, Biagetti C, Tampellini L, Re MC. Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS* 2009; 23:1297-1310.
41. Kaul M, Lipton SA. Mechanisms of neuronal injury and death in HIV-1 associated dementia. *Curr HIV Res* 2006; 4:307-318.
42. Steven G. Deeks, Sharon R. Lewin and Diane V. Havlir. The End of AIDS: HIV Infection as a Chronic Disease. *Lancet.* 2013 November 2; 382(9903): 1525–1533.
43. Ryom L, Weber R, Morlat P et al., Trends in underlying causes of death in people with HIV from 1999 to 2011 (D:A:D): a multicohort collaboration, *The Lancet*, 1999. vol. 384, no. 9939, pp. 241–248.
44. Hasse B, Ledergerber B, Furrer H et al., Morbidity and aging in HIV-infected persons: the swiss HIV cohort study, *Clinical Infectious Diseases*, 2011. vol. 53, no. 11, pp. 1130–1139.
45. Shiels MS, Pfeiffer RM, Gail MH et al., Cancer burden in the HIV-infected population in the United States, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2011, vol. 103, no. 9, pp. 753–762.
46. Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M et al., Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population, *AIDS*, 2013, vol. 27, no. 6, pp. 973–979.

47. Dubrow R, Silverberg MJ, Park LS, Crothers K, and Justice AC, HIV infection, aging, and immune function: implications for cancer risk and prevention, *Current Opinion in Oncology*, vol. 24, no. 5, pp. 506–516, 2012.
48. Tyerman Z and Aboulafia DM, Review of screening guidelines for non-AIDS-defining malignancies: evoking issues in the era of highly active antiretroviral therapy, *AIDS Reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 3–16, 2012.
49. Shepherd L, Borges A, Ledergerber B et al., Infection-related and -unrelated malignancies, HIV and the aging population, *HIV Medications*, vol. 17, no. 8, pp. 590–600, 2016.
50. Riedel DJ, Tang LS, and Rositch AF, The role of viral coinfection in HIV-associated non-AIDS-related cancers, *Current HIV/AIDS Reports*, vol. 12, no. 3, pp. 362–372, 2015.
51. Carbone A, Gloghini A, and Dotti G, EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment, *Oncologist*, vol. 13, no. 5, pp. 577–585, 2008.
52. Bentwich Z. Concurrent infections that rise the HIV viral load. *J HIV Ther.* 2003; 8:72–75.
53. Stein DS. Herpes virus infections, HIV, and disease progression. *AIDS Clin Care.* 1995; 7:11–14
54. Webster A. Cytomegalovirus as a possible cofactor in HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991; 4 suppl 1:S47–S52.
55. Goletti D, Weissman D, Jackson RW, et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol.* 1996; 157:1271–1278.
56. Lawn SD, Karanja DM, Mwinzia P, et al. The effect of treatment of schistosomiasis on blood plasma HIV-1 RNA concentration in coinfecting individuals. *AIDS.* 2000; 14:2437–2443.
57. Whalen CC, Nsubuga P, Okwera A, et al. Impact of pulmonary tuberculosis on survival of HIV-infected adults: a prospective epidemiologic study in Uganda. *AIDS.* 2000; 14:1219–1228.
58. Xiao L, Owen SM, Rudolph DL, Lal RB, Lal AA. *Plasmodium falciparum* antigen-induced human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated through induction of tumor necrosis factor- α . *J Infect Dis.* 1998; 177:437–445.
59. Borkow G, Leng Q, Weisman Z, et al. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest.* 2000; 106:1053–1060.
60. Kalinkovich A, Weisman Z, Bentwich Z. Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunol Lett.* 1999; 68:281–287.
61. Messele T, Abdulkadir M, Fontanet AL, et al. Reduced naive and increased activated CD4 and CD8 cells in healthy adult Ethiopians compared with their Dutch counterparts. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115:443–450.

62. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2001; 357:1149–1153.
63. Grosskurth H, Mosha F, Todd J, et al. Impact of improved treatment of sexually transmitted diseases on HIV infection in rural Tanzania: randomised controlled trial. *Lancet*. 1995; 346:530–536.
64. Rotchford K, Strum AW, Wilkinson D. Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis. *Sex Transm Dis*. 2000; 27:243–248.
65. Sabin CA, Telfer P, Phillips AN, Bhagani S, Lee CA. The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men. *J Infect Dis*. 1997; 175:164–168.
66. Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)*. 2001; 80:54–73.
67. Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, et al. Immunological findings in HIV-*Leishmania* coinfection. *Intervirology*. 1996; 39:285–288.
68. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol*. 2004; 113:81–88.
69. Grogg et al, HIV infection and lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007 Dec;60(12):1365-72.
70. Raphael M, Borisch B, Jaffe E. Lymphomas associated with infection by the human immune deficiency virus (HIV). In: Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J, eds. World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001:260–3.
71. Grulich et al, Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007 Jul 7;370(9581):59-67.
72. Abbas AK, Litchman A. Fondamenti di immunologia. Funzioni e alterazioni del sistema immunitario. Piccin, 2001.
73. Herzog S1, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):195-205.
74. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. Garland Science, 2007
75. Roessler S, Grosscheld R. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin. Immunol*. 18 (2006), 12-19.
76. Basso K, Klein U, Niu H, Stolovitzky GA, Tu Y, Califano A, Cattoretti G, Dalla-Favera R. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):4088-96. Epub 2004 Aug 26.
77. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J Jr, Miljkovic V, Cattoretti G, Califano A, Dalla-Favera R. Transcriptional analysis of the B cell germinal

- center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2639-44. Epub 2003 Feb 25.
78. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol*. 126 (2010), 898-907.
 79. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol*. 12(2009), 845-57.
 80. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):22-33.
 81. Lin KI, Tunyaplin C, Calame K. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev*. 2003 Aug;194:19-28.
 82. Yoshida T, Mei H, Dörner T, Hiepe F, Radbruch A, Fillatreau S, Hoyer BF. Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev*. 2010 Sep;237(1):117-39.
 83. Macintyre E, Willerford D, Morris SW. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000:180-204.
 84. Biggar R, Curtis R, Cote T, et al. Risk of other cancers following Kaposi's relation to acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Epidemiol* 1994;139:362-8.
 85. Rabkin C. Epidemiology of AIDS-related malignancies. *Curr Opin Oncol* 1994;6:492-6.
 86. Berel V, Peterman T, Berkelman R, et al. AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1991;337:805-9
 87. Wilde J, Lee C, Darby S, et al. The incidence of lymphoma in the UK haemophilia population between 1978 and 1999. *AIDS* 2002;16:1803-7.
 88. Diamond C, Taylor T, Aboumrad T, et al. Changes in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Cancer* 2006;106:128-35.
 89. Besson C, Goubar A, Gabarre J, et al. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2001;98:2339-44.
 90. Laurence J, Astrin S. Human immunodeficiency virus induction of malignant transformation in human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:7635-9.
 91. Kundu R, Sangiorgi F, Wu LY, et al. Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood* 1999;94:275-82.
 92. Bellan C, Lazzi S, DeFalco G, et al. Burkitt's lymphoma: new insights into molecular pathogenesis. *J Clin Pathol* 2003;56:188-93.
 93. Knowles D. Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 2003;17:785-820.
 94. Piriou E, van Dort K, Nanlohy N, et al. Loss of EBNA1-specific memory CD4+ and CD8+ T cells in HIV-infected patients progressing to AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2005;106:3166-74.
 95. Spina M, Tirelli U, Zagonel V, et al. Burkitt's lymphoma in adults with and without human immunodeficiency virus infection. *Cancer* 1998;82:766-74.

96. Rosenwald A, Wright G, Chan W, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937–47.
97. Chang C, McClintock S, Cleveland R, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:464–70.
98. Alizadeh A, Eisen M, Davis R, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503–11.
99. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275–82.
100. Cote T, Biggar R, Rosenberg P, et al. Non-Hodgkin's lymphoma among people with AIDS: incidence, presentation, and public health burden. *Int J Cancer* 1997;73:645–50.
101. Ziegler J, Beckstead J, Volberding P, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men: relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984;311:565–70.
102. Levine A, Sadeghi S, Espina B, et al. Characteristics of indolent non-Hodgkin lymphoma in patients with type 1 human immunodeficiency virus infection. *Cancer* 2002;94:1500–6.
103. Lowenthal D, Straus D, Campbell S, et al. AIDS-related lymphoid neoplasia: the Memorial Hospital experience. *Cancer* 1988;61:2325–37.
104. World Health Organization (WHO) (2010) Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, 22-26 march 2010 Geneva. WHO technical report series, no.949. Available: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Accessed 10 June 2014.
105. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al., WHO Leishmaniasis Control Team: Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* (2012) 7: e35671.
106. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, et al., The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* (2008) 21: 334–359
107. European Centre for Diseases Control, WHO Regional Office for Europe (2012) Surveillance Report. HIV/AIDS Surveillance in Europe 2012. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0018/235440/e96953.pdf Accessed 10 June 2014
108. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, et al., Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis* (2007) 44: 1602–1610
109. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, et al., 'Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by

- biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med* (2010) 11: 670–673
110. Molina I, Fisa R, Riera C, Falco V, Elizalde A, et al., Ultrasensitive Real-Time PCR for the Clinical Management of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients. *Am J Trop Med Hyg* (2013) 89: 105–110
 111. Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, de Miguel AG, Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). *Am J Trop Med Hyg* (2011) 85: 820–825
 112. Lopez-Velez R, The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann Trop Med Parasitol* 97Suppl (2003) 1: 143–147
 113. Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, Salas A, Torre-Cisneros J, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-*Leishmania* Study Group. *AIDS* (1999)13: 1063–1069
 114. Cruz I, et al. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):357–88.
 115. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97(Suppl 1):3–15.
 116. WHO. *Leishmania*/HIV co-infection in south-western Europe 1990–1998: a retrospective analysis of 965 cases. Geneva: World Health Organization; 2000. p. 14.
 117. Alvar J, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2): 298–319.
 118. Alvar J, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):334–59.
 119. Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Orsini S, Fiorentino E, et al. (2013) The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Euro Surveill* 18: 20535.
 120. Chicharro C, Jimenez MI, Alvar J (2003) Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol* 97Suppl 1: : 57–64
 121. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P (2013) The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill* 18: 20540.
 122. Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martin-Martin I, et al. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 190: 268–271
 123. Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. (1999) Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 60: 51–53
 124. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J (2002) *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359: 1124–1125

125. Colomba C, Saporito L, Vitale F, Reale S, Vitale G, et al. (2009) Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. BMC Infect Dis 9: 199.
126. Gouzelou E, Haralambous C, Amro A, Mentis A, Pratlong F, et al. (2012) Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani* sensu lato group. PLoS Negl Trop Dis 6: e1507.
127. World Health Organization (2007) Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Co-infection; 20–22 March 2007; Addis Ababa, Ethiopia. WHO/CDS/NTD/IDM/2007.5. Available: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf Accessed 18 July 2014.
128. World Health Organization (2009) Leishmaniasis in the European Region, a WHO consultative intercountry meeting; 17–19 November 2009; Istanbul, Turkey.
129. WHO Regional Office for Europe (2013) Outlining a strategic framework on Leishmaniasis control—Report of a WHO meeting, Tbilisi, Georgia; 16–18 April 2013. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/239426/OUTLINING-A-STRATEGIC-FRAMEWORK-ON-LEISHMANIASIS-CONTROL.pdf Accessed 18 July 2014.
130. Campino L, Maia C (2010) Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. Acta Med Port 23: 859–864.
131. Neghina R, Neghina AM (2010) Leishmaniasis, a global concern for travel medicine. Scand J Infect Dis 42: 563–570.
132. Herremans T, Pinelli E, Casparie M, Nozari N, Roelfsema J, et al. (2010) Increase of imported Leishmaniasis in the Netherlands: a twelve year overview (1996–2007). Int Health 2: 42–46.
133. Eehalt U, Schunk M, Jensenius M, van Genderen PJ, Gkrania-Klotsas E, et al. (2013) Leishmaniasis acquired by travellers to endemic regions in Europe - A EuroTravNet multi-centre study. Travel Med Infect Dis 12: 167–172.
134. Bernier R, et al. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. J Virol. 1995;69(11):7282–5.
135. Santos-Oliveira JR, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. BMC Infect Dis. 2010;10:358.
136. Stebbing J, Gazzard B, Douek DC. Where does HIV live? N Engl J Med. 2004;350(18):1872–80.
137. Murray HW, et al. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366(9496):1561–77.
138. Kedzierska K, Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. Curr Med Chem. 2002;9(21):1893–903

139. Azzam R, et al. Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(7):619–29.
140. Kedzierska K, et al. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol*. 2003;26(2):247–63.
141. Barreto-de-Souza V, et al. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis*. 2006;194(6):846–54.
142. Turco SJ. Adversarial relationship between the leishmanial lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol*. 1999;21(12):597–600.
143. Garg R, et al. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(5):e441.
144. Wolday D, et al. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4⁺ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun*. 1999;67(10): 5258–64.
145. Wolday D, et al. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand J Infect Dis*. 1998;30(1): 29–34.
146. Zhao C, et al. In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake? *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 5):1295–302.
147. Lopez-Velez R, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(4):436–43.
148. Bossolasco S, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5080–4.
149. Couppie P, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol*. 2004;151(6):1165–71.
150. Cacopardo B, Nigro L, Preiser W, Fama A, Satariano MI, et al. (1996) Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-*Leishmania* co-infected patients despite treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 434–435.
151. Mondain-Miton V, Toussaint-Gari M, Hofman P, Marty P, Carles M, et al. (1995) Atypical leishmaniasis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 21: 663–665
152. Romeu J, Milla F, Batlle M, Sirera G, Ferrandiz C, et al. (1991) Visceral leishmaniasis involving lung and a cutaneous Kaposi's sarcoma lesion. *AIDS* 5: 1272.

153. de Valliere S, Mary C, Joneberg JE, Rotman S, Bullani R, et al. (2009) AA-amyloidosis caused by visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Am J Trop Med Hyg* 81: 209–212.
154. Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, et al. (2003) Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)* 82: 147–158.
155. Garcia-Rio I, Dauden E, Ballesterro-Diez M, Fraga J, Garcia-Diez A (2010) Leishmaniasis and rheumatoid nodulosis in a patient with HIV infection. *Actas Dermosifiliogr* 101: 164–167.
156. Calza L, D'Antuono A, Marinacci G, Manfredi R, Colangeli V, et al. (2004) Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS. *J Am Acad Dermatol* 50: 461–465.
157. Ramos A, Cruz I, Munez E, Salas C, Fernandez A, et al. (2008) Post-kala-azar dermal Leishmaniasis and uveitis in an HIV-positive patient. *Infection* 36: 184–186.
158. Kubar J, Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Staccini P, et al. (1998) Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS* 12: 2147–2153.
159. Alvar J, Gutierrez-Solar B, Molina R, Lopez-Velez R, Garcia-Camacho A, et al. (1992) Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet* 339: 1427.
160. Garcia-Garcia JA, Martin-Sanchez J, Gallego M, Rivero-Roman A, Camacho A, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* (2006) 44: 4455–4458.
161. ter Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, et al., Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* (2009) 80: 929–934.
162. Monno R, Giannelli G, Rizzo C, De Vito D, Fumarola L Recombinant K39 immunochromatographic test for diagnosis of human leishmaniasis. *Future Microbiol*(2009) 4: 159–170.
163. World Health Organization (2011) Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. Diagnostic Evaluation Series No. 4. Geneva: World Health Organization. Available: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/vl-rdt-evaluation.pdf> Accessed 18 July 2014.
164. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6: e1665.
165. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H, Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* (2004) 42: 5249–5255.

166. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A, Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5: e1153.
167. Moreno J, Canavate C, Chamizo C, Laguna F, Alvar J, HIV–*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2000) 94: 328–332.
168. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, et al. (2008) Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 13–19
169. Costa SR, D'Oliveira AJr, Bacellar O, Carvalho EM (1999) T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant leishmania antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 367–370
170. Turgay N, Balcioglu IC, Toz SO, Ozbel Y, Jones SL (2010) Quantiferon-*Leishmania* as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *Am J Trop Med Hyg* 83: 822–824
171. Gidwani K, Jones S, Kumar R, Boelaert M, Sundar S (2011) Interferon-gamma release assay (modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1042.
172. Alimohammadian MH, Jones SL, Darabi H, Riazirad F, Ajdary S, et al., Assessment of interferon-gamma levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* (2012) 87: 70–75.
173. Singh OP, Gidwani K, Kumar R, Nylén S, Jones SL, et al., Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. *Clin Vaccine Immunol* (2012) 19: 961–966.
174. Pintado V, Lopez-Velez R HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* (2001) 7: 291–300.
175. van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J (2014) Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect* 20: 286–299.
176. Russo R, Nigro LC, Minniti S, Montineri A, Gradoni L, et al. (1996) Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J Infect* 32: 133–137
177. Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, et al. (1990) Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 21: 261–270
178. van Griensven J, Diro E, Lopez-Velez R, Boelaert M, Lynen L, et al. (2013) HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals. *Lancet Infect Dis* 13: 251–259
179. Ridolfo AL, Gervasoni C, Antinori S, Pizzuto M, Santambrogio S, et al. (2000) Post-kala-azar dermal leishmaniasis during highly active antiretroviral therapy in an AIDS patient infected with *Leishmania infantum*. *J Infect* 40: 199–202

180. Antinori S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Acquaviva V, et al. (2007) Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Br J Dermatol* 157: 1032–1036
181. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S (2014) Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis*;58: 1424-9.
182. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P (2011) Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop*;119: 69-75.
183. Alvar J, Yactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*;22: 552-7.
184. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglio E (2010) Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol*;48: 131-6.
185. Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):248–257.
186. Silva LA, Romero HD, Nogueira Nascentes GA, Costa RT, Rodrigues V, Prata A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:261–6.
187. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007;9:1307–15.
188. Liron Pantanowitz, Antonino Carbone, Riccardo Dolcetti, Microenvironment and HIV-related lymphomagenesis, *Seminars in Cancer Biology* 34 (2015) 52–57.
189. Vendrame E, Hussain SK, Breen EC, Magpantay LI, Widney DP, Jacobson LP, et al. Serum levels of cytokines and biomarkers for inflammation and immuneactivation, and HIV-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma risk. *CancerEpidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:343–9.
190. Martin G, Roy J, Barat C, Ouellet M, Gilbert C, Tremblay MJ. Humanimmunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates Blymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells. *J Virol* 2007;81:5872–81.
191. Lazzi S, Bellan C, De Falco G, Cinti C, Ferrari F, Nyongo A, Claudio PP, Tosi GM, Vatti R, Gloghini A, Carbone A, Giordano A, Leoncini L, Tosi P: Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol* 2002, 33:723–731.
192. Sharma V, Knoblock TJ, Benjamin D: Differential expression of cytokine genes in HIV-1 tat transfected T and B cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 1995, 208:704–713.
193. de Paulis A, De Palma R, Di Gioia L, Carfora M, Prevete N, Tosi G, Accolla RS, Marone G: Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that

- promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. *J Immunol* 2000, 165:7171–7179.
194. McManus CM, Weidenheim K, Woodman SE, Nunez J, Hesselgesser J, Nath A, Berman JW: Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol* 2000, 156:1441–1453.
 195. Lefevre et al, Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells. *J Immunol*. 1999 Aug 1;163(3):1119-22.
 196. Conant et al., Extracellular Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Is Associated with an Increase in both NF-kB Binding and Protein Kinase C Activity in Primary Human Astrocytes, *Journal of Virology*, Mar. 1996, p. 1384–1389
 197. Gu X, Shivarov V, Strout MP, The role of activation-induced cytidinedeaminase in lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol* 2012;19:292–8.
 198. Epeldegui M, Vendrame E, Martinez-Maza O, HIV-associated immunedysfunction and viral infection: role in the pathogenesis of AIDS-related lymphoma. *Immunol Res* 2010;48:72–83.
 199. Varani S, Cagarelli R, Melchionda F, Attard L, Salvadori C, Finarelli AC, et al., Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(29):20530.
 200. de Godoy NS, Andrino ML, de Souza RM, Gakiya E, Amato VS, Lindoso JÂ, et al., Could kDNA-PCR in Peripheral Blood Replace the Examination of Bone Marrow for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis? *J Parasitol Res*. 2016:1084353.
 201. Di Minno G, Perno CF, Tiede A, Navarro D, Canaro M, Güertler L, et al (2016) Current concepts in the prevention of pathogen transmission via blood/plasma-derived products for bleeding disorders. *Blood Rev*. 30(1):35-48.