



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Tesi sperimentale**

**Herpesvirus linfotropici e infezione da HIV: modificazioni  
del sistema immunitario in corso di terapia antiretrovirale**

Dottorato di Ricerca XXV ciclo

Scienze Infettivologiche e delle Terapie Immunologiche

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Dottorando:

Dott. Marco Iannetta

Relatori:

Prof. Vincenzo Vullo

Prof.ssa Maria Rosa Ciardi

Anno accademico 2011/12

Alla mia famiglia

Ai miei amici

Io e ' compagni eravam vecchi e tardi  
quando venimmo a quella foce stretta  
dov'Ercule segnò li suoi riguardi,

acciò che l'uom più oltre non si metta:  
da la man destra mi lasciai Sibilia,  
da l'altra già m'avea lasciata Setta.

"O frati", dissi "che per cento milia  
perigli siete giunti a l'occidente,  
a questa tanto picciola vigilia

d'i nostri sensi ch'è del rimanente,  
non vogliate negar l'esperienza,  
di retro al sol, del mondo senza gente.

Considerate la vostra semenza:  
fatti non foste a viver come bruti,  
ma per seguir virtute e canoscenza".

Dante, Inferno, XXVI canto

# INDICE

## PARTE INTRODUTTIVA

1. Storia naturale dell'infezione da HIV	pag.	4
2. Immunoattivazione ed Immunosenescenza	pag.	7
2.1 Meccanismi alla base dell'attivazione immunitaria	pag.	7
2.2 Attivazione dei linfociti T	pag.	11
2.3 Immunosenescenza	pag.	12
3. Differenziazione linfocitaria in corso di infezioni virali	pag.	16
3.1 Linfociti T CD8+	pag.	16
3.2 Linfociti T CD4+	pag.	17
4. Gli Herpesvirus umani	pag.	19
4.1 Generalità	pag.	19
4.2 Morfologia	pag.	19
4.3 Replicazione	pag.	20
4.4 Ipotesi su siti di latenza e vie di trasmissione	pag.	21
4.5 Herpesvirus e manifestazioni cliniche	pag.	22
4.6 Herpesvirus e immunoattivazione	pag.	23

## PARTE SPERIMENTALE

5. Introduzione e scopi dello studio	pag.	25
6. Metodi	pag.	27
6.1 Pazienti	pag.	27
6.2 Raccolta e trattamento dei campioni	pag.	28
6.3 Analisi di biologia molecolare	pag.	28
a) Estrazione del DNA virale	pag.	29
b) Nested Multiplex PCR	pag.	29
c) Analisi del prodotto amplificato	pag.	31
d) Real-time PCR con strumento LightCycler 2.0	pag.	31
6.4 Analisi immunofenotipica	pag.	35
6.5 Analsi statistiche	pag.	36
7. Risultati	pag.	40

7.1 Risultati della prima indagine di prevalenza di HHV6, HHV7 ed HHV8	pag. 40
7.2 Risultati della seconda indagine di prevalenza dei virus linfotropici	pag. 41
7.3 Risultati virologici	pag. 47
7.4 Risultati immunologici	pag. 53
a) <i>Immunoattivazione</i>	pag. 53
b) <i>Immunosenescenza</i>	pag. 59
c) <i>Maturazione e differenziazione dei linfociti T</i>	pag. 63
8. Discussione	pag. 73
9. Bibliografia	pag. 80

## PARTE INTRODUTTIVA

### 1. Storia naturale dell'infezione da HIV

Per infezione acuta (o primaria) da virus dell'immunodeficienza umano (HIV) si intende il periodo intercorrente tra il momento in cui l'RNA virale risulta presente a livello plasmatico e la comparsa degli anticorpi anti-HIV specifici. Questo periodo ha una durata di 3-4 settimane circa. Nel caso di trasmissione per via sessuale l'infezione primaria è preceduta da una fase definita "eclissi" in cui il virus replica a livello della mucosa sede del contagio (McMichael AJ et al., 2010)

Un evento primario nell'infezione da HIV è rappresentato dal coinvolgimento dei linfociti T CD4+. Durante l'infezione primaria le cellule più colpite sono i linfociti T CD4+ di memoria attivati che esprimono il co-recettore CCR5 (Salazar-Gonzalez JF et al., 2009; Veazey RS et al., 2003). In questa fase l'immunità specifica contro HIV non è ancora presente, per cui il virus replica abbondantemente e stabilisce i propri "serbatoi". L'unica forma di difesa disponibile in questa fase è rappresentata dal sistema immune innato, mediante granulociti, macrofagi e cellule dendritiche. Queste ultime due popolazioni cellulari sono a loro volta bersaglio per il virus. Il legame del virus alle cellule dendritiche (attraverso il C-type lectin receptor Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin [DC-SIGN]) ed ai linfociti B (attraverso il recettore CD21) favorisce la diffusione del virus dalla sede iniziale di ingresso (ad esempio le mucose genitali o la mucosa rettale per la trasmissione per via sessuale) ai tessuti linfoidi secondari dove avviene l'infezione dei Linfociti T CD4+ CCR5+ (Brenchley JM et al., 2004). In questa fase il virus HIV replica abbondantemente, raggiungendo un picco (zenith) di viremia; successivamente inizia a comparire la risposta immunitaria adattativa specifica, soprattutto ad opera dei linfociti T CD8+ HIV specifici che sono in grado di contenere la replicazione virale determinando una riduzione dei livelli di viremia. A questo punto, però, il repertorio dei linfociti T CD4+ (soprattutto le cellule memoria attivate esprimenti il CCR5) è già stato enormemente compromesso senza possibilità di ricostituzione; tale fenomeno si verifica in maniera particolare a livello delle mucose. In questa fase le cellule T CD4 naïve e le cellule di memoria quiescenti non sono target virali idonei, per cui sono in grado di replicare e contribuire alla parziale ricostituzione del repertorio dei linfociti T CD4+, senza però poter completamente restaurare tale repertorio (Li Q et al., 2005). La massiva deplezione linfocitaria a livello della mucosa intestinale determina un'alterazione della barriera epiteliale con aumento della traslocazione dei batteri della flora intestinale e dei loro prodotti, attraverso la lamina propria fino ai linfonodi

locoregionali ed a quelli sistemici. Questo fenomeno rappresenta una delle cause principali di immunoattivazione dei linfociti e dei monociti.

Il sistema immunitario cerca di controllare l'infezione da HIV, ma la replicazione persistente del virus permette l'emergenza di mutanti in grado di sfuggire alla risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata. Come conseguenza dell'attivazione immunitaria, aumentano anche i livelli delle citochine pro-infiammatorie. Lo stato di attivazione del sistema immunitario favorisce la replicazione del virus HIV che a sua volta alimenta l'infiammazione: ecco stabilito un circolo vizioso che si avvita su se stesso e si autoalimenta. Tutto ciò determina un progressivo esaurimento delle capacità rigenerative del sistema immunitario con un accumulo di cellule con ridotta capacità rigenerativa e differenziate in senso terminale.

Terminata la fase acuta si stabilisce un'infezione cronica in cui inizialmente il numero dei linfociti T CD4+ circolanti ritorna a valori pressoché normali e non vi sono sintomi clinici. Anche in questa fase, però, l'attivazione del sistema immunitario è elevata così come il turnover cellulare. A testimonianza di ciò, durante la fase cronica dell'infezione, si registrano elevati livelli di espressione di CD38, HLA-DR e Ki67 nei linfociti T. Di questi il CD38 rappresenta il migliore marcatore surrogato per l'attivazione immunitaria, la progressione verso la fase AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) e la morte (Ford ES et al., 2009; Ho DD et al., 1995; Liu Z et al., 1997). A livello della mucosa intestinale, la popolazione di linfociti T CD4+ effector memory, enormemente compromessa durante la fase acuta dell'infezione, viene parzialmente ricostituita ad opera di CD4 naïve e CD4 central memory. Queste cellule, però, mostrano un'emivita breve, per cui non sono capaci di ripristinare stabilmente il repertorio di CD4 associati alle mucose (Picker LJ et al., 2006). Inoltre l'attivazione dei linfociti naïve e central memory genera linfociti T CD4 effector CCR5+ che rappresentano nuovi target per il virus HIV, che in questa maniera evita l'esaurimento dei propri bersagli cellulari (Picker LJ et al, 2005). Durante la fase cronica dell'infezione, solo una minoranza dei linfociti T CD4+ sono infettati dal virus o mostrano specificità per HIV, a testimonianza che la deplezione dei CD4 è legata a meccanismi differenti dalla diretta azione citopatica del virus, rintracciabili nell'elevato livello di attivazione immunitaria con presenza di cellule a breve emivita e limitato repertorio rigenerativo. Durante la fase cronica dell'infezione, un altro importante fattore che contribuisce alla progressione verso la fase AIDS è rappresentato dalla capacità di "evoluzione" virale, basata sull'elevato tasso di mutazione e sulla capacità di modificare il proprio tropismo cellulare. Riguardo a quest'ultimo elemento nella fase cronica il virus HIV può passare da un tropismo CCR5 (in cui il bersaglio virale è rappresentato da cellule esprimenti il corecettore CCR5)

ad un tropismo CXCR4 (in cui i bersagli sono rappresentati dalle cellule esprimenti il CXCR4), o mostrare un fenotipo “dual tropic” in grado di avere come bersaglio le cellule CCR5+ e CXCR4+. Questo passaggio è associato ad un aumento della virulenza e dello spettro dei bersagli di HIV (Grossman Z et al., 2006). Nella fase cronica dell’infezione si registra una condizione di disfunzione timica, con produzione di Trasforming Grow Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), responsabile della fibrosi e dell’involuzione timica. Questo aspetto compromette le capacità rigenerative della componente linfoide del sistema immunitario (Doueck DC et al., 1998).

Anche il compartimento dei linfociti B subisce delle profonde modificazioni durante la fase cronica, con attivazione policlonale ed induzione dell’apoptosi e perdita dei centri germinativi a livello del tessuto linfoide (He B et. al, 2006).

Per quanto riguarda la componente innata del sistema immunitario le cellule dendritiche risultano ridotte a livello periferico, soprattutto nella loro componente plasmocitoide, mentre risulta aumentata la popolazione dei monociti non classici definita dai marcatori CD14+CD16++ ed in particolar modo il sottogruppo positivo al marcatore di superficie M-DC8 in grado di produrre elevati livelli di Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Dutertre CA et al., 2012)

## 2. Immunoattivazione ed Immunosenescenza

### 2.1 Meccanismi alla base dell'attivazione immunitaria

Negli ultimi decenni si è andato sempre più delineando il ruolo fondamentale dell'attivazione immunitaria nel contesto dell'infezione da HIV, capace di provocare una disregolazione del sistema immunitario dell'ospite (Kovacs JA et al., 2001; Lempicki RA et al., 2000 ; Hazenberg MD et al., 2000). Gli studi condotti sui modelli d'infezione nei primati hanno aiutato a comprendere il ruolo dell'iperattivazione del sistema immunitario nella patogenesi dell'infezione da HIV.

Nell'infezione sperimentale da SIV condotta sui macacchi asiatici (Rhesus Macaques) si è visto come questi sviluppino una patologia simile ai soggetti HIV+, con progressivo decremento del numero dei linfociti T CD4+ periferici e progressione verso una condizione di immunodeficienza, corrispondente alla fase di AIDS nell'uomo. Come nell'infezione da HIV umana, nei macacchi infettati dal SIV sono stati riscontrati elevati livelli di attivazione del sistema immunitario.

Al contrario l'infezione da SIV dei cercocebi neri (Sooty mangabeys) e dei cercopitechi verdi (African green monkeys), ospiti naturali del virus, è caratterizzata da elevati livelli di replicazione virale ma bassi livelli di attivazione immunitaria delle cellule T. In questi ospiti naturali il virus SIV non mostra patogenicità e non vi è alcuna progressione verso lo stato di immunodeficienza conclamato (Silvestri G et al., 2003)

Un altro modello molto interessante è rappresentato dall'infezione da HIV-2, che costituisce un esempio unico d'infezione naturale nell'uomo da parte di un virus HIV "attenuato", in cui i soggetti infettati presentano una lentissima progressione di malattia con cariche virali contenute ed un'attivazione del sistema immunitario ridotta rispetto ai soggetti con infezione da HIV-1 (Sousa AE et al., 2002)

Le cause dell'attivazione del sistema immunitario in corso di infezione da HIV-1 possono essere classificate come dirette o indirette.

Tra le cause dirette annoveriamo la stimolazione antigenica da parte dei prodotti virali, soprattutto nella fase acuta dell'infezione in cui il virus replica attivamente. Nei soggetti con infezione da HIV-1 non trattati, i linfociti T CD8+ HIV-specifici possono raggiungere il 20% di tutti i linfociti T CD8+ circolanti (Betts MR et al., 2001). Un'altra causa diretta di attivazione immunitaria è rappresentata dal legame del RNA virale ad alcuni recettori cellulari fondamentali per la risposta immunitaria di tipo innato. Tali recettori sono definiti "Pattern Recognition Receptors" (PRR)s di cui fanno parte, ad esempio, i "toll like receptor" (TLR). Si tratta di recettori espressi costitutivamente (ma la cui

espressione può essere anche indotta) nelle cellule del sistema immunitario innato e che sono in grado di riconoscere strutture molecolari altamente conservate e condivise nei patogeni, definite “pathogen-associated molecular patterns” (PAMP)s (Mogensen TH et al., 2010). In particolare i TLR-7/8 (espressi a livello intracellulare dalle cellule dendritiche plasmocitoidi) sono in grado di riconoscere sequenze di RNA a singola elica (ssRNA) provenienti da HIV, ricche in guanidine ed uridine. Tale interazione indurrebbe le cellule dendritiche a produrre interferone di tipo alfa (IFN- $\alpha$ ) ed altre citochine pro-infiammatorie (Heil F. et al., 2004). Ci sono evidenze sulla base delle quali alcune proteine virali (Gp120, Nef) possono interagire con recettori cellulari determinando una attivazione non antigene specifica. Ad esempio Gp120 è in grado di legarsi con il recettore DC-SIGN espresso sulle cellule dendritiche, attivandole e inducendo la produzione di IFN- $\alpha$  (Lee C et al., 2003; Simmons A et al., 2001).

Per quanto riguarda le cause indirette di immunoattivazione dobbiamo ricordare il contributo di altre specie virali come gli herpesvirus CMV ed EBV. Questi possono riattivarsi in corso di infezione da HIV, sfruttando la diminuzione del numero dei linfociti T CD4+ causata dal virus, determinando quindi un’ulteriore stimolazione antigenica del sistema immune (Grossman Z et al. 2002, Douek DC et al. 1998).

Un meccanismo di attivazione immunitaria indiretta è rappresentato dalla distruzione della barriera della mucosa intestinale a seguito della deplezione dei linfociti T CD4+ nella fase acuta dell’infezione da HIV-1. Questo fenomeno determina una successiva traslocazione dei componenti della flora batterica residente a livello del lume del tratto gastrointestinale con successiva disseminazione sistemica (Douek DC et al., 2003). Nei pazienti HIV1+ sono stati dimostrati livelli plasmatici di lipopolisaccaride (LPS) più elevati rispetto ai controlli sani. Il LPS rappresenta un buon indice dei livelli di traslocazione batterica, essendo un costituente della parete dei batteri gram negativi. La traslocazione di LPS, flagellina, DNA e RNA batterici possono stimolare il sistema immune attraverso il legame con i toll-like receptor (TLR), inducendo la produzione di citochine infiammatorie (Brenchley JM et al., 2006).

Infine, tra i meccanismi indiretti che regolano l’immunoattivazione, dobbiamo ricordare il fenomeno dell’omeostasi linfocitaria. Durante le prime fasi dell’infezione da HIV i linfociti T CD8+ vanno incontro ad un’espansione in grado di stabilire un pool di cellule memoria quiescenti. I linfociti T CD4+, invece, dopo un’iniziale espansione, conseguente alla stimolazione immunitaria, vanno incontro ad un meccanismo di apoptosi. L’apoptosi indotta nei linfociti T CD4+ non può essere spiegata esclusivamente dalla presenza del virus HIV, visto che in fase di infezione cronica la

percentuale di linfociti T CD4+ circolanti infettati dal virus è estremamente bassa (0.01-1%) (Haase AT et al., 1996; Lassen K et al., 2004). L'apoptosi dei linfociti T CD4+ è quindi una conseguenza dell'attivazione immunitaria. L'omeostasi linfocitaria è un meccanismo atto a regolare il numero dei linfociti, controbilanciandone la perdita a causa dell'effetto citopatico del virus e soprattutto per la morte apoptotica. Quindi il repertorio di cellule T viene mantenuto nei soggetti immunocompetenti attraverso un processo di replicazione cellulare molto ben bilanciato. Mentre per i linfociti T CD8+ la proliferazione è legata principalmente dalla carica virale di HIV (Catalfamo M et al., 2008), la proliferazione dei linfociti T CD4+ è stimolata principalmente dalla risposta omeostatica alla deplezione cellulare.

L'attivazione del sistema immunitario rappresenta una risposta dell'organismo all'aggressione da parte dei virus: ad esempio la produzione di IFN- $\alpha$  da parte delle cellule del sistema immunitario innato, a seguito dell'attivazione del sistema dei TLRs, induce nelle cellule che entrano a contatto con tale citochina, uno stato antivirale. In altre parole viene indotta la produzione di fattori di resistenza (per il virus HIV sono noti ad esempio il sistema del "apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like" [APOBEC] e delle "tetherins") che inibiscono la replicazione virale; viene aumentata la degradazione del RNA; viene arrestata la progressione nel ciclo cellulare delle cellule infettate e ne viene indotta l'apoptosi (Stetson DB et al., 2006). Quando questo stato di attivazione diviene cronico produce degli effetti deleteri: da un lato fornisce target cellulari per il virus che in questa maniera può continuare a replicare. Dall'altro porta ad un progressivo esaurimento delle risorse del sistema immunitario. L'interferone di tipo I sembra rappresentare la chiave di volta nel meccanismo di iperattivazione del sistema immunitario, essendo la classe di citochine prodotte dalle cellule che fanno parte dell'immunità innata (Herbeuval JP et al., 2007). L'importanza dell'attivazione cronica del sistema immunitario innato è stata dimostrata dagli esperimenti condotti sui topi che hanno evidenziato come una periodica somministrazione di CpG (ligando del TLR9) determini l'insorgenza di una alterazione del sistema immunitario del topo con alterazione dell'architettura linfonodale, riduzione del numero dei linfociti T CD4+ e CD8+ ed induzione di uno stato di immunodeficienza. Tutti questi effetti sono mediati dalla produzione di IFN di tipo I conseguente alla stimolazione con CpG (Heikenwalder M et al., 2004).

Ma qual è l'utilità dello stato di attivazione immunitaria per il virus HIV?

L'immunoattivazione non è altro che una stimolazione delle cellule del sistema immune che vengono indotte a replicare e attivare il proprio apparato metabolico. Le cellule attivate presentano livelli elevati del fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B), che induce la trascrizione del DNA cellulare e

contemporaneamente del DNA virale integrato ed episomale presente nelle cellule. Senza questa attivazione la cellula portatrice del DNA virale rimarrebbe quiescente e non vi sarebbe la trascrizione e la successiva traduzione dei prodotti virali per l'assemblaggio di nuovi virioni.

L'attivazione del sistema immunitario, quindi, si traduce nell'aumentata proliferazione cellulare, nell'incremento dei fenomeni apoptotici, nell'espressione di antigeni di superficie e nella secrezione di citochine e chemochine. Tutti questi aspetti contribuiscono all'insorgenza di uno stato infiammatorio sistemico (Appay V et al., 2008). Le alterazioni, riscontrabili in corso di infezione da HIV, sono caratterizzate da un aumentato tasso di proliferazione dei linfociti T CD4+ e CD8+, dei linfociti B, dei monociti e delle cellule NK (Moir S et al., 2011). In particolare, l'attivazione policlonale dei linfociti B produce l'ipergammaglobulinemia riscontrabile in corso di infezione da HIV (Lane HC et al., 1983). La percentuale di cellule del sistema immunitario che esprimono marker di attivazione ed apoptosi risulta aumentato, così come i livelli di citochine proinfiammatorie, quali TNF- $\alpha$ , interleuchina (IL)-6, IL-1 $\beta$  (Connolly NC et al., 2007) ed i livelli di chemochine circolanti, come le "macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e "regulated on activation, normal T cell expressed and secreted" (RANTES) (Cotter RL et al., 2001).

L'immunoattivazione sembra avere una stretta correlazione con quelle manifestazioni cliniche definite "non-AIDS associate" che insorgono nei pazienti con malattia di lunga durata (osteoporosi, demenza, patologie cardiovascolari, danno renale, tumori, lipodistrofia), essendo facile immaginare, per queste condizioni, un'eziopatogenesi "infiammatoria". In particolare lo studio SMART ha evidenziato che pazienti che interrompevano la HAART avevano non solo un aumentato rischio di eventi AIDS-correlati ma anche di complicazioni non AIDS-correlate, parallelamente a un aumento dei livelli sierici di D-Dimero, IL-6 e Proteina C Reattiva (markers di infiammazione sistemica). L'interruzione del trattamento inoltre era associata ad un aumentato rischio di morte e infezioni opportunistiche, indipendente dal numero dei CD4 (Resino S et al., 2006).

## **2.2 Attivazione dei linfociti T**

La valutazione dell'espressione degli antigeni di superficie HLA-DR e CD38 sulle cellule T è usata come marker di immunoattivazione.

HLA-DR è una proteina eterodimerica facente parte del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. In genere i recettori del tipo MHC svolgono la funzione di presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario adattativo. In particolare i recettori MHC di classe II sono implicati nel processo di presentazione dell'antigene alle cellule T CD4+ helper. Dopo che un

patogeno extracellulare è stato fagocitato e processato negli endosomi o nei lisosomi, piccoli peptidi con funzione di epitopi antigenici vengono associati agli eterodimeri di classe II e trasportati sulla superficie cellulare dove possono essere riconosciuti dai linfociti T CD4+. Tali linfociti vengono definiti come “classe II ristretti”, perchè riconoscono solo antigeni nel contesto di MHC II. La distribuzione tissutale delle proteine MHC di classe II è limitata alle APC (Antigen Presenting Cells), cioè macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B, che sono specializzate nei processi di presentazione dell'antigene ai linfociti T. Tuttavia la loro espressione può essere indotta su altre cellule, per azione, ad esempio, dell'IFN- $\gamma$  (Robbins et al., 2006).

L'espressione aumentata di tale marcatore sulle cellule T è associata ad un recupero subottimale della conta dei Linfociti CD4+ (Nakanjako D et al., 2011). Pazienti cosiddetti discordanti immunologici (bassa conta dei linfociti T CD4+ con viremia stabilmente soppressa) mostrano aumentati livelli di HLA-DR sia nel compartimento CD8+ che CD4+ (Massanella M. et al. 2010). Anche sulle cellule Tregs (regulatory T cells), definite dal fenotipo CD4+CD25+CD127low/-, è stato trovato un aumento dell'espressione di HLA-DR nei soggetti HIV-positivi, quando confrontati con una popolazione di controllo. Tale incremento era associato in maniera diretta alla carica virale e inversa alla conta dei linfociti T CD4+ (Xiao J et al., 2011). Le cellule Tregs sembrano avere una funzione soppressiva sulle risposte specifiche anti-HIV, anche se il loro ruolo rimane dibattuto. Potrebbero da un lato ridurre i livelli di immunoattivazione e dall'altro ridurre la risposta T specifica contro HIV, permettendo al virus di replicare (Hunt PW et al., 2011; Weiss L. et al., 2010). I pazienti con infezione cronica da HIV definiti “elite controllers” sono soggetti in cui, in assenza di terapia, la viremia di HIV risulta non rilevabile o estremamente bassa. E' stato riscontrato che questi soggetti presentano comunque livelli di immunoattivazione più elevati rispetto ai controlli sani. Un'ipotesi è che in tali individui vi sia una scarsa risposta dei linfociti Tregs, dimostrata dal fatto che la frequenza di linfociti T con fenotipo regolatorio (CD4+, CD25+, CD127low/-) in tali individui è ridotta rispetto ai controlli sani (Hunt PW et al., 2011).

CD38 è una proteina di membrana cellulare dei leucociti umani, con funzioni recettoriali ed ectoenzimatiche. Le sue funzioni recettoriali sono principalmente di trasduzione del segnale in vie di attivazione e proliferazione. Il suo legame con la gp120 di HIV provoca invece una modulazione dell'ingresso virale nelle cellule bersaglio. Numerose ricerche hanno rivelato che CD38 è un ectoenzima (enzima associato alla membrana cellulare che catalizza reazioni extracellulari) multifunzionale coinvolto nel catabolismo di NAD+ e NADP+ e generante potenti composti intracellulari Ca<sup>2+</sup> mobilizzanti. L'espansione del sottogruppo di linfociti CD8+CD38+ è un'alterazione

osservata frequentemente nei soggetti HIV-positivi, associata al declino dei linfociti CD4+ e alla comparsa di manifestazioni cliniche (Giorgi JV et al., 1989; Kestens L et al., 1992). CD38 è espresso maggiormente sui linfociti T CD8+ citotossici (CTL) specifici per HIV e la percentuale di CD8+CD38+ è un indice più affidabile di progressione di malattia rispetto alla conta dei CD4+ (Liu Z et al., 1997). L'espressione sui linfociti T CD4+ di CD38 e CCR5 è stata associata ad una popolazione di cellule fortemente attivate con funzione citotossica che compare dopo l'infezione acuta e tende a scomparire rapidamente, essendo suscettibile all'infezione citopatica del virus e mostrando elevati indici di apoptosi. Alcuni studi hanno dimostrato che l'espressione del CD38 nel compartimento CD4 può essere un marcatore di progressione dell'infezione (Kestens L et al., 1994).

L'inizio della terapia antiretrovirale (HAART: highly active antiretroviral treatment) è seguito da un rapido declino dei linfociti CD8+CD38+ parallelamente all'abbattimento della carica virale. L'espressione del CD38 sui linfociti T CD8 nei pazienti con infezione da HIV è fortemente associato alla replicazione virale: è stato proposto che la persistente espressione del CD38 sui CD8 dei pazienti in soppressione virologica possa essere un marcatore di viremia residua, non valutabile mediante le metodiche standard per la determinazione del HIV-RNA. Nei pazienti pediatrici con infezione da HIV in terapia HAART, è stato dimostrato che la presenza di elevati livelli di CD8+ CD38+ è associata ad un rischio aumentato di fallimento virologico durante il trattamento antiretrovirale (Benito JM et al., 2004; Resino S et al., 2004). Recentemente è stato mostrato come il miglior monitoraggio dei pazienti con infezione da HIV-1 in trattamento HAART sia la determinazione dei linfociti T CD4+, T CD8+ e dei livelli di espressione del CD38 sui monociti (Almeida M et al., 2007).

### **2.3 Immunosenescenza**

Durante la vita dell'uomo il sistema immunitario subisce delle profonde modificazioni: da una tollerogenicità del sistema immune fetale si passa ad una reattività immune nel bambino e nell'adulto fino ad una senescenza associata a disfunzionalità nell'anziano.

Durante l'invecchiamento fisiologico dell'essere umano il sistema immunitario, sia nella sua componente innata sia in quella adattativa, subisce delle modificazioni fondamentali. Un aspetto dominante è rappresentato dall'involuzione timica. Il timo è un organo mediastinico in grado di produrre linfociti T naïve; fisiologicamente il timo va incontro ad una involuzione con il passare del tempo, fino a scomparire quasi completamente all'età di 60 anni. Di pari passo la capacità di generare cellule T naïve diminuisce con il passare del tempo (Hakim FT et al., 2005; Aspinall R et al., 2000). Anche a livello del midollo osseo si osserva un progressivo invecchiamento dei precursori ematopoietici, con una modificazione dei fattori prodotti dalle cellule stromali. Tale situazione è

testimoniata dallo scarso successo dei trapianti di midollo condotti in persone anziane (Hakim FT et al., 1997).

L'involuzione timica fa sì che l'omeostasi linfocitaria venga sostenuta dai linfociti T di memoria, determinando una progressiva diminuzione del numero delle cellule naïve a vantaggio di cellule memory, con una concomitante riduzione del repertorio antigenico. Si verifica un accumulo di cellule differenziate in maniera terminale con limitatissime capacità funzionali e proliferative. Tutto l'insieme di questi fenomeni prende il nome di senescenza del sistema immunitario. Nel 1955 Hayflick descrisse il fenomeno che successivamente fu definito come "limite di Hayflick", in base al quale una coltura cellulare primaria di fibroblasti umani poteva andare incontro a 40-60 replicazioni, prima di entrare in una fase di senescenza cellulare. Successivamente è stato dimostrato come vi fosse una correlazione tra la lunghezza dei telomeri (sequenze esameriche ripetute di DNA collocate alle estremità dei cromosomi) e la storia replicativa delle cellule: ad ogni ciclo cellulare la lunghezza dei telomeri diminuisce, causando, dopo ripetuti cicli, instabilità cromosomica, arresto della crescita ed induzione dell'apoptosi. Questo fenomeno è applicabile anche alle cellule del sistema immunitario (Effros RB et al., 1997). Una caratteristica dei linfociti T senescenti è quella di mostrare un fenotipo caratterizzato dalla perdita del marcatore di superficie CD28 e dall'espressione del CD57 (Gamadia LE et al., 2004; Papagno L et al., 2004). Numerosi studi hanno mostrato come l'espressione del CD28 sui linfociti T CD8+ sia frequente nei soggetti giovani e diminuisca con l'invecchiamento (Jennings C et al., 1994, Fagnoni FF et al., 1996).

La popolazione di linfociti T CD28-CD57+ mostra una ridotta capacità di proliferazione e di produzione di IL-2, con accorciamento dei telomeri; tutte queste caratteristiche ci inducono a definire queste cellule come senescenti e differenziate in senso terminale (Papagno L et al., 2004; Brenchley JM et al., 2003). I linfociti T senescenti mostrano inoltre una ridotta capacità di produrre contemporaneamente più citochine (polifunzionalità).

Il sistema immunitario, quindi, è un sistema dinamico, dipendente dalla rigenerazione dei precursori cellulari ematopoietici e continuamente sollecitato da stimoli esterni ed interni, che ne alterano l'omeostasi. Non è strano quindi che con l'età esso vada incontro a profonde modificazioni, in particolare a carico del sistema dell'immunità adattativa, quello più soggetto a riequilibri e cambiamenti. Clinicamente questo fenomeno si manifesta negli anziani con aumentata suscettibilità sia a nuove infezioni che a riesacerbazioni di infezioni latenti o croniche.

In corso di infezione da HIV le modificazioni del sistema immunitario in senso "senescente" sembrano però apparire precocemente. Questo fenomeno di invecchiamento anticipato delle

cellule del sistema immunitario sembra essere in stretta correlazione con il loro stato di attivazione. Infatti l'immunoattivazione delle cellule T determina un aumentato numero di replicazioni cellulari con precoce accorciamento dei telomeri, perdita sulla superficie dei linfociti T dell'espressione del CD28 e presenza dell'antigene di superficie CD57. Inoltre i fenomeni sopra descritti si associano alla perdita del CD100 (proteina necessaria nei processi di riconoscimento dell'antigene presentato dalle APC specializzate e con funzioni co-stimolatorie) e alla secrezione di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  (Coppé JP et al., 2010; Davalos AR et al., 2010). Tutte queste alterazioni, come precedentemente evidenziato, sono caratteristiche di un fenotipo cellulare senescente e differenziato in senso terminale con esaurimento delle capacità replicative. Tali alterazioni nel fenotipo dei linfociti T sono precocemente evidenziabili nei soggetti con infezione cronica da HIV e nei soggetti con sieropositività per CMV. Questo suggerisce che infezioni virali croniche possano contribuire al processo di invecchiamento del sistema immunitario (Dock JN et al., 2011). In particolare sono stati condotti alcuni studi su individui timectomizzati in giovane età, con evidenza che questi ultimi, confrontati alla popolazione generale, presentavano un declino delle conte assolute di cellule T, soprattutto delle cellule naïve, un accumulo di cellule differenziate in senso terminale (definite dall'espressione dei marcatori di superficie CD45RA+, CD8+, CD28-) e cellule T CD8+ con telomeri ridotti di dimensioni. Questo fenotipo immunitario era fortemente associato alla sieropositività per CMV, suggerendo che la sola timectomia non era sufficiente alla destabilizzazione del repertorio delle cellule T. Le cellule specifiche per CMV avevano caratteristicamente il fenotipo CD45RA+, CD8+, CD28- e l'espansione clonale di questo tipo cellulare comportava inversione del rapporto CD4/CD8 (inversione tipicamente osservata negli HIV-positivi), elemento a sua volta correlato a un'aumentata morbilità e mortalità, come osservato in uno studio svedese effettuato su una popolazione di ottuagenari (Ferguson FG et al., 1995). L'ipotesi prevalente del potere "senescente" di CMV è che questo induca una eccessiva produzione di cellule T memoria specifiche, cosa che non si osserva in altre comuni infezioni erpetiche quali quelle da VZV ed EBV. I pazienti HIV-positivi, confrontati con la popolazione generale, presentano una ridotta funzione timica, una perdita di cellule T naïve, un accorciamento della lunghezza dei telomeri, un aumento di cellule effettrici differenziate in senso terminale (caratteristiche tutte presenti in individui sani che hanno superato il 70° anno di età) e tutti questi fenomeni si osservano anche quando si prendono in considerazione pazienti in terapia HAART con buon controllo della replicazione virale (Le Saux S et al., 2012). E' interessante notare che anche in pazienti HIV-positivi una proporzione molto alta di cellule T CD8 senescenti siano specifiche per antigeni del CMV (Dock JN et al., 2011).

Nell'ambito dell'infezione da HIV la stimolazione cronica del sistema immunitario determina un precoce invecchiamento che lo rende più "anziano" di 40 anni (Ferrando-Martinez S. et al, 2011). L'accumulo di cellule senescenti del sistema immunitario è stato correlato ad una serie di condizioni cliniche quali la ridotta risposta ai vaccini negli anziani, alle patologie autoimmuni, alla riduzione del repertorio dei recettori delle cellule T (TCR), alle patologie cardiovascolari e nell'ambito dell'infezione da HIV alla progressione verso la fase di AIDS (Brenchley JM et al., 2003; Kaplan RC et al., 2011; Saurwein-Teissi M et al., 2002).

La terapia HAART sembra ridurre la percentuale dei linfociti T CD28- e sembra migliorarne la funzionalità. In alcuni soggetti, nonostante la terapia risulti efficace nel sopprimere la replicazione virale, persistono delle alterazioni del sistema immunitario, in senso di senescenza, nel compartimento CD4 e CD8, con incremento delle cellule di memoria effettrici esprimenti il CD57 a discapito della popolazione naïve. Tale alterazione sembra essere associata alla morbilità non-AIDS correlata in corso di terapia HAART (Mendez-Lagares G et al., 2012; Tassiopoulos K et al., 2012;).

Quanto detto dimostra come il sistema immune presenti una capacità rigenerativa limitata che viene esaurita dallo stato di attivazione immunitaria cronico presente nell'ambito dell'infezione da HIV. Ciò determina un invecchiamento precoce del sistema immunitario associato al manifestarsi anticipato di condizioni cliniche tipiche dell'età anziana, quali le patologie cardiovascolari e cerebrovascolari, la compromissione della sfera cognitiva, il danno renale, la riduzione del tono calcico a livello osseo.

### 3. Differenziazione linfocitaria in corso di infezioni virali

#### 3.1 Linfociti T CD8+

Durante un'infezione virale acuta i linfociti T CD8+ naïve specifici vanno incontro ad un'iniziale espansione e una successiva differenziazione con l'acquisizione di un fenotipo effetore (secrezione di IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , produzione di perforine e granzimi). E' stato stimato che normalmente esiste  $1/10^5$  CD8 naïve specifico per un determinato complesso antigene/MHC di classe I. Dopo la fase di espansione in risposta alla stimolazione antigenica il numero di questi linfociti T CD8 specifici risulta aumentato di un fattore  $10^5$ . A seguito della fase acuta, i linfociti T CD8+ effettori specifici per il virus che ha causato l'infezione, vanno incontro ad una massiva apoptosi (90-95% delle cellule). Alcuni di questi linfociti effettori, però, persistono nell'organismo acquisendo un fenotipo di cellule di memoria. In particolare possiamo distinguere i linfociti T CD8 di memoria in un gruppo definito "central memory" con sede elettiva a livello dei linfonodi e degli organi linfoidi secondari. Si tratta di cellule a lunga emivita, non attivate, che possono trasformarsi nuovamente in cellule effettrici una volta rientrate a contatto con l'antigene verso cui presentano la propria specificità. L'altro gruppo di cellule memoria è rappresentato dalle "effector memory" che mostrano un fenotipo di cellule effettrici e che sono in grado di rispondere immediatamente ad uno stimolo antigenico specifico successivo all'infezione primaria, in modo da controllare rapidamente le re-infezioni (Wherrey EJ et al., 2004). Il paradigma descritto sopra però risulta fortemente alterato nel caso di infezioni in cui a seguito della fase acuta si genera un'infezione cronica con persistenza della stimolazione antigenica. In questo scenario i linfociti T CD8 sembrano perdere la propria funzionalità: la perdita della capacità di secernere IL-2 sembra essere la funzione perduta più precocemente, seguita dalla incapacità a sintetizzare TNF $\alpha$  mentre la produzione di IFN $\gamma$  sembra essere la funzione meglio conservata (Wherrey EJ et al., 2003). Anche la citotossicità cellulo-mediata e la produzione di perforine rappresentano delle funzioni che vengono perse dai CD8 subito dopo l'incapacità di sintetizzare TNF $\alpha$ . Quando i linfociti T CD8+ non sono più in grado di sintetizzare IFN $\gamma$  la perdita funzionale è pressoché totale con espressione di marcatori di differenziazione terminale quali il CD57. I determinanti di questo fenomeno di perdita progressiva delle funzioni dei linfociti T CD8+, sono rappresentati dal pattern di replicazione dei virus che causano l'infezione cronica, dal tropismo virale, dalla capacità dei singoli epitopi antigenici di stimolare il sistema immune e dalla funzione delle cellule T-helper.

Per quanto concerne la replicazione virale possiamo distinguere le infezioni in acute, acute con periodiche riattivazioni (herpes simplex virus), infezioni con replicazione virale a bassa carica (CMV), infezioni croniche con elevata viremia (HCV, HBV, HIV). Più l'infezione è caratterizzata da un cronico stato di replicazione virale più la disfunzione dei linfociti T CD8 è avanzata. Al contrario infezioni con andamento caratterizzato da fasi di riacutizzazione contribuiscono a mantenere una robusta immunità specifica CD8 mediata con preservazione delle funzioni cellulari. Dobbiamo però considerare che oltre la carica antigenica che stimola i CD8 anche la "qualità" degli epitopi stimolanti riveste un ruolo fondamentale. Alcuni epitopi sono più capaci di altri nello stimolare i linfociti T, e quindi indurre una disfunzione in queste cellule quando lo stimolo persiste elevato per lungo tempo. Il tropismo virale rappresenta un altro fattore che influenza la funzione dei linfociti T CD8 e che ad esempio rende conto della diversità degli effetti sul sistema immune prodotti dai virus epatitici HBV ed HCV, che sono confinati al parenchima epatico, rispetto al virus HIV il cui bersaglio è rappresentato dai linfociti T CD4 e da alcune APC. Infine il ruolo dei CD4 sembra fondamentale nei processi di stimolazione primaria e ri-stimolazione dei linfociti T CD8. Quando l'incontro dell'antigene con un linfocita CD8 naïve avviene in assenza della funzione "helper" dei CD4 la successiva stimolazione secondaria porta ad una ridotta espansione delle cellule CD8 di memoria (Wherrey EJ et al., 2004).

### **3.2 Linfociti T CD4+**

Il compartimento dei linfociti T CD4+ è caratterizzato, come quello dei CD8, da cellule naïve che mostrano un elevato potenziale replicativo e la capacità di riconoscere una vasta gamma di antigeni. Normalmente i linfociti T CD4 naïve circolano nel torrente ematico e negli organi linfoidi secondari. Tali cellule a seguito del contatto con l'antigene specifico presentato dalle APC, sono in grado di differenziare in cellule effettrici con acquisizione di funzioni specifiche. Dalle cellule effettrici originano due gruppi di cellule memoria: le cellule "central memory" che esprimono la chemochina CCR7 e ricircolano a livello degli organi linfoidi secondari. Queste cellule mostrano poche funzioni da cellule effettrici, ma sono pronte a replicare rapidamente e produrre nuove cellule effettrici a seguito del contatto con lo specifico antigene. Giocano, quindi, un ruolo essenziale nelle re-infezioni. Le cellule "effector memory", al contrario, non esprimono il CCR7 per cui possono migrare a livello dei tessuti dove svolgono la propria funzione effettrice. In base a quanto detto possiamo quindi affermare che le cellule naïve e central memory sono principalmente presenti a livello dei linfonodi

e del circolo sanguigno, mentre le cellule effettrici sono localizzate a livello della mucosa intestinale, polmonare e nel fegato (Lanzavecchia A et al., 2005; Mackay CR et al., 1990).

Il pattern di differenziazione delle cellule T CD4 è profondamente influenzato dalla presenza di citochine che “polarizzano” le cellule verso differenti fenotipi di CD4 effettori. L’attivazione del linfocita T CD4 naïve in presenza di IFN- $\gamma$  induce la produzione di cellule di tipo Th1, in grado di sintetizzare a loro volta, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ; queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nelle infezioni ad opera di germi intracellulari e hanno un ruolo patogenetico nelle malattie a genesi autoimmunitaria come le patologie infiammatorie croniche dell’intestino. In presenza di IL-4 i CD4 naïve attivati differenziano verso un fenotipo Th2, con produzione di IL-4, IL-5, IL-10, IL-13; il ruolo di questo fenotipo appare fondamentale nelle infezioni da germi extracellulari e nelle infestazioni da elminti. I linfociti T CD4 Th2 sono implicati nella patogenesi dell’asma atopico e delle allergie. In presenza di IL-6/TGF $\beta$ , IL21/TGF $\beta$  e IL23, i CD4 naïve differenziano in senso Th17, con produzione di IL-17; questo subset di linfociti T CD4 sembra conferire protezione nell’ambito di alcune infezioni da parte di germi intracellulari. Inoltre sembra rivestire un ruolo fondamentale in alcune patologie a genesi autoimmunitaria come le malattie infiammatorie croniche dell’intestino.

In presenza del TGF $\beta$  le cellule CD4 naïve differenziano in senso Treg con azione tollerogena verso i patogeni. Esistono inoltre altri due fenotipi di differenziazione dei linfociti T CD4 naïve definiti Th9 (con un ruolo nelle infezioni elmintiche) e T helper follicolari (Thf) che sembrano risiedere alla periferia della zona B dei centri germinativi follicolari dei linfonodi dove promuovono la produzione di anticorpi altamente specifici da parte dei linfociti B (Schmitt N. Et al, 2009). La descrizione delle modificazioni a cui vanno incontro questi sottotipi cellulari di linfociti T CD4 effettori in corso di infezione da HIV esula dagli scopi di questo manoscritto.

E’ stato dimostrato come i linfociti T CD4 effettori non si limitino soltanto ad una funzione di coordinatori delle risposte da parte di altri tipi cellulari. Nell’ambito dell’infezione da HIV è stato evidenziato come un subset di linfociti fortemente differenziato (con fenotipo CD27-CD57+) sia in grado produrre perforine e granzimi (di tipo A e B) e di svolgere un’azione citotossica diretta (Appay V et al., 2002). La presenza di una funzione citotossica CD4 associata in corso di infezione da HIV sembra correlare con un controllo della replicazione virale nei soggetti non trattati (Soghoian DZ et al., 2012).

## 4. Gli Herpesvirus umani

### 4.1 Generalità

Gli Herpesvirus sono un gruppo di virus a DNA e sono causa di infezioni litiche, persistenti, latenti/ricorrenti e immortalizzanti.

Sono virus ubiquitari, dotati di envelope, la cui infezione primaria si manifesta spesso in maniera subclinica nella prima infanzia e porta ad una persistenza dell'infezione per tutta la vita. Nonostante siano in genere associati a malattie benigne, possono essere responsabili di elevata mortalità e morbilità, specialmente in individui immunodepressi. Sono classificati in Alphaherpesvirinae (simplexvirus: herpes simplex virus [HSV] 1 e 2; varicellovirus: varicella zoster virus [VZV]), Betaherpesvirinae (citomegalovirus [CMV], roseolovirus: herpesvirus umano [HHV] 6 e 7) e Gammaherpesvirinae (Lymphocryptovirus: virus di Epstein-Barr [EBV] e rhadinovirus: herpesvirus umano [HHV]-8 altrimenti detto virus correlato al sarcoma di Kaposi [KSHV]). Gli Alphaherpesvirinae presentano un ampio spettro d'ospite ed un ciclo replicativo breve, con una rapida diffusione dell'infezione ed un'efficiente lisi delle cellule infettate. Nell'ospite naturale, inoltre, sono in grado di instaurare un'infezione latente nei gangli sensoriali. I Betaherpesvirinae presentano uno spettro d'ospite ristretto (specie-specifici) ed un ciclo replicativo prolungato. In vitro replicano quasi esclusivamente in colture di fibroblasti, con una lenta diffusione dell'infezione; in vivo il virus viene mantenuto in forma latente nelle ghiandole secernenti, nelle cellule linfocitarie e nei reni. I Gammaherpesvirinae presentano uno spettro d'ospite molto ristretto con un tropismo spiccato verso cellule della linea linfoblastoide sia in vitro che in vivo: replicano ed instaurano latenza quasi esclusivamente nei linfociti B e T. Sono frequentemente associati a immortalizzazione cellulare. Nel presente lavoro la nostra attenzione si è concentrata sugli herpesvirus umani linfotropici, appartenenti alle famiglie Gammaherpesvirinae e Betaherpesvirinae (EBV e HHV8; CMV, HHV6 e HHV7, rispettivamente) (Murray et al., 2006).

### 4.2 Morfologia

Gli Herpesvirus sono virus di notevoli dimensioni (il virione ha un diametro di circa 150 nm), provvisti di pericapside, con un genoma a DNA lineare a doppio filamento. Il "core" di DNA è circondato da un capsidico icosaedrico costituito da 162 capsomeri, a sua volta racchiuso da un pericapsidico glicoproteico. Il genoma degli Herpesvirus codifica per numerose glicoproteine necessarie per le fasi di adsorbimento, fusione e di evasione della risposta immunitaria. Lo spazio compreso tra il

pericapside ed il capsid è detto tegumento e contiene proteine ed enzimi virali che favoriscono l'inizio della replicazione. Come tutti i virus provvisti di pericapside, gli herpesvirus sono sensibili agli acidi, ai solventi, ai detergenti e all'essiccamento. I genomi degli herpesvirus sono lineari, a doppio filamento, ma differiscono per dimensione e orientamento dei geni. Sequenze ripetute, dirette o invertite, delimitano regioni uniche del genoma (definite regione unica lunga e regione unica breve) e permettono la circolarizzazione del genoma e la sua ricombinazione. La ricombinazione tra sequenze ripetute ed invertite di herpesvirus differenti permette che estese regioni del genoma invertano l'orientamento reciproco dei segmenti genomici formando genomi isomerici (Murray et al., 2006).

### **4.3 Replicazione**

Il ciclo replicativo degli Herpesvirus inizia con l'interazione tra glicoproteine virali e recettori presenti sulla superficie della cellula bersaglio. Il tropismo di alcuni Herpesvirus è ristretto dall'espressione tessuto-specifica dei recettori. Il nucleocapsid viene in seguito liberato nel citoplasma mediante fusione del pericapsid con la membrana citoplasmatica. Gli enzimi e i fattori trascrizionali vengono portati all'interno della cellula con il tegumento del virione. Il nucleocapsid interagisce con la membrana nucleare e rilascia il genoma nel nucleo, dove avviene la sua replicazione. La trascrizione del genoma virale e la sintesi delle proteine virali si realizzano con una modalità coordinata e regolata che prevede tre fasi.

All'inizio vengono sintetizzate le proteine precocissime ( $\alpha$ ), in grado di legarsi al DNA e regolare la trascrizione dei geni cellulari. Successivamente vengono sintetizzate le proteine precoci ( $\beta$ ), che sono ulteriori fattori trascrizionali ed enzimi, compresa la DNA polimerasi. Dopo l'avvio della replicazione virale vengono infine sintetizzate le proteine tardive ( $\gamma$ ) che sono principalmente proteine strutturali.

Il genoma virale viene trascritto da una RNA polimerasi DNA-dipendente cellulare, sotto il controllo di fattori virali e di fattori nucleari cellulari. La replicazione del genoma virale avviene ad opera di una DNA polimerasi di origine virale, che è il bersaglio di alcuni farmaci antivirali. Gli enzimi virali di recupero dei nucleotidi forniscono i substrati deossiribonucleotidici alla polimerasi, facilitando la replicazione del virus in cellule che non si trovano in fase replicativa (es. i neuroni).

I procapsidi vuoti si assemblano nel nucleo, sono riempiti di DNA virale, acquisiscono il pericapsid a livello della membrana nucleare o del Golgi e fuoriescono dalla cellula per esocitosi o per lisi cellulare. La trascrizione, la sintesi proteica, le modificazioni delle glicoproteine e il rilascio del virus

dalla cellula mediante esocitosi avvengono grazie ad apparati cellulari (Murray et al., 2006). Gli Herpesvirus umani (a differenza di altri virus come SV40 e HPV) non richiedono che la cellula sia in fase S per la loro replicazione virale, anzi, se da un lato attivano vie di promozione del ciclo cellulare dall'altro codificano fattori che ne bloccano l'avanzamento (Flemington EH, et al. 2001). L'integrazione del genoma virale nel cromosoma ospite, obbligatoria per diversi virus ai fini del completamento del ciclo cellulare, non è necessaria al ciclo degli Herpesvirus umani. Questi ultimi mantengono infatti i loro genomi come episomi circolari extracromosomiali. Ci sono, però, evidenze dell'integrazione cromosomiale del DNA degli Herpesvirus nel genoma cellulare (Morissette G et al., 2010).

#### **4.4 Ipotesi su siti di latenza e vie di trasmissione**

In seguito all'infezione primaria tutti gli Herpesvirus umani persistono nell'ospite, anche se non è ancora ben definita l'esatta mappa anatomica di tutti i siti di latenza. Ogni herpesvirus induce malattia preferenzialmente in tessuti specifici: per esempio HSV1 e HSV2 nelle mucose orali e genitali, VZV nella cute e nelle mucose, EBV nel tessuto linfoide, HHV6 nella cute e HHV8 nella cute e nel tessuto linfatico. D'altra parte però gli Herpesvirus nella fase di latenza possono essere localizzati in tessuti differenti (ad esempio HSV1, HSV2 e VZV nel tessuto nervoso, EBV e HHV6 nei tessuti linfatici). Uno studio del 2006 effettuato su prelievi autoptici, ha ricercato DNA erpetico con metodiche di "polimerase chain reaction" (PCR) in più di 40 differenti campioni istologici provenienti da 8 individui con anamnesi negativa per infezioni erpetiche. HSV-1 era solitamente limitato al tessuto nervoso mentre HSV2 è stato individuato solo nell'ano di un paziente con AIDS. VZV è stato rinvenuto nelle ghiandole surrenali e nel piccolo intestino, CMV nella mucosa nasale, nella tiroide, nell'intestino e nel fegato. EBV, HHV6 e HHV7 sono stati trovati in tutti i soggetti: EBV soprattutto nella mucosa nasale, nelle tonsille, nella milza, nei linfonodi, nella lingua e nell'intestino; HHV6 nelle ghiandole salivari e nella tiroide, nello stomaco, nell'intestino, nel fegato e nel pancreas; HHV7 nelle ghiandole salivari, nelle tonsille, nei linfonodi e nel midollo osseo. HHV8 è stato rinvenuto solo nei linfonodi (Chen T et al., 2006).

Per quanto riguarda la via di trasmissione, è stato evidenziato che il rilascio (shedding) virale asintomatico a livello salivare è una comune fonte d'infezione per gli herpesvirus linfotropici. Per HHV8 però si ipotizza una prevalente trasmissione per via sessuale, anche se il virus è spesso isolato in campioni di saliva. E' noto che in caso di immunodeficienza lo shedding salivare di EBV e CMV risulta aumentato. Uno studio condotto su campioni di saliva provenienti da soggetti HIV-positivi e

HIV-negativi, mediante ricerca del DNA di herpesvirus con tecnica PCR, ha mostrato come la presenza del CMV nei soggetti HIV positivi fosse associata ad uno stato di immunodeficienza più grave, mentre la positività salivare per HHV6 ed HHV7 fosse “paradossalmente” correlata, nei soggetti con infezione da HIV, ad una condizione di immunodeficienza meno marcata. La spiegazione addotta dagli autori, per quanto riguarda HHV7, è che questo virus, utilizzando il recettore CD4 per infettare le cellule, possa replicare con maggiore difficoltà in soggetti con immunodeficienza più grave, a causa del depauperamento del pool di cellule bersaglio. In questo studio HHV8 è stato identificato soltanto in pazienti con infezione da HIV e con condizioni immunologiche deteriorate, mentre non è stato rinvenuto in nessuno dei controlli sani (Lucht E et al., 1998).

#### **4.5 Herpesvirus e manifestazioni cliniche**

HSV1 è associato più frequentemente a lesioni vescicolari a livello del cavo orale, mentre HSV2 è tipicamente isolato nelle lesioni genitali. Spesso però HSV1 può essere responsabile di lesioni genitali ed HSV2 di lesioni del cavo orale. Il VSV (definito anche HSV3) è l'agente eziologico della varicella durante l'infezione primaria soprattutto nei bambini, mentre le riattivazioni o reinfezioni sono caratterizzate clinicamente dalla comparsa del herpes zoster. EBV (o HSV4) è associato alla mononucleosi infettiva, alla sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X, alla leucoplachia orale villosa, al linfoma di Burkitt, soprattutto nella sua variante africana o endemica, ad alcuni linfomi non Hodgkin ed al carcinoma nasofaringeo. E' dunque evidente la capacità immortalizzante e trasformante di questo virus nei confronti delle cellule bersaglio (dos Santos Pinheiro R et al., 2013; Kapatai G et al., 2007; Niedobitek G., et al. 2000). Il CMV (HSV5) può essere causa di infezioni congenite a trasmissione verticale (malattia da inclusi citomegalici [CMID]) (Leung AK et al. 2003), infezioni perinatali che possono manifestarsi con polmoniti interstiziali, epatiti ed asantemi cutanei. L'infezione primaria da CMV in soggetti immunocompetenti adolescenti e adulti causa una sindrome simil-mononucleosica, o decorre in maniera del tutto asintomatica (Taylor GH, 2003). I soggetti immunocompromessi (trapiantati di organo solido, di midollo allogenico e soggetti con infezione da HIV) possono manifestare gravi forme cliniche quali polmoniti interstiziali, corioretiniti, infezioni del tratto gastroenterico (esofagiti, coliti) ed encefaliti (Moroni M et al., 2008). HHV6 è presente in due varianti definite A e B con una omologia di sequenza nucleotidica del 88%. La variante HHV6B viene riconosciuta come l'agente eziologico dell'*exanthema subitum* (esantema critico o sesta malattia) nei bambini, mentre la variante HHV6A è maggiormente associata ad infezioni nei soggetti

immunocompromessi. Alcuni studi hanno sottolineato un possibile ruolo di HHV6 nella patogenesi della sclerosi multipla (Voumvorakis KI et al., 2010) e di alcune forme di epilessia (Theodore WH et al., 2008).

HHV7 causa manifestazioni cliniche molto simili a quelle ascrivibili ad HHV6. L'infezione primaria nei bambini sembra determinare una manifestazione clinica molto simile all'esantema critico. Non ci sono evidenze definitive sull'associazione di questo virus con la pitiriasi rosea. HHV7 sembra poter riattivare la replicazione di HHV6 e CMV (Caselli E et al., 2007; Razonable R et al. 2002). Il virus HHV8 è stato associato allo sviluppo di alcune neoplasie soprattutto nei soggetti immunocompromessi. Il sarcoma di Kaposi è una neoplasia mesenchimale fortemente associata al virus HHV8 in tutte le sue forme cliniche (sporadica, endemica, associata al trapianto, correlata all'AIDS). La patogenesi sembra essere legata alla produzione di una serie di fattori virali che inducono neoangiogenesi, infiammazione ed infiltrazione dei tessuti limitrofi (interleuchina-6 virale, vIL-6) fino alla trasformazione neoplastica (viral G Protein Coupled Receptor, vGPCR; omologo virale della ciclina cellulare di tipo D, vCyc). Il virus HHV8 da solo non sembra però sufficiente per lo sviluppo di tale neoplasia, essendo indispensabile la concomitanza di una condizione di immunodepressione (Robbins e Cotran, 2006). HHV8 è inoltre strettamente correlato allo sviluppo di disordini linfoproliferativi quali il linfoma primitivo delle sierose (primary effusion lymphoma, PEL) e la malattia di Castleman multicentrica (MCD) in pazienti con forte stato di immunodepressione. La patogenesi di entrambe le forme sembra essere legata alla produzione della vIL-6. (Hassman LM et al., 2011; Sunil M et al., 2010)

#### **4.6 Herpesvirus e immunoattivazione**

La terapia HAART, attualmente, è in grado di abbattere drammaticamente la carica virale plasmatica di HIV nella maggior parte dei pazienti, portando a un aumento duraturo della conta assoluta delle cellule T CD4+ e ad un diminuito rischio di progressione verso AIDS. La maggior parte dei pazienti però, pur con CD4 nei range di normalità, continua ad avere elevati livelli di attivazione delle cellule T (come evidenziato dalla proporzione di cellule T che esprimono CD38 e HLA-DR) e anormali livelli di attivazione delle cellule B (elevati livelli di IgG sieriche). Le ragioni di tale immunoattivazione rimangono sconosciute, anche se si possono avanzare varie ipotesi: 1) persistente replicazione di HIV, a livelli inferiori a quelli rilevabili dai comuni saggi commerciali; 2) persistente replicazione sistemica di virus co-infettanti come gli Herpesvirus o i virus dell'epatite; 3) persistente traslocazione microbica; 4) persistente disregolazione delle cellule B e T in modo antigene indipendente. Partendo

dal presupposto, evidenziato da diversi studi, che la differenziazione e l'attivazione dei linfociti T CD8+ specifici per CMV risulta elevata nei soggetti HIV-positivi, la ricerca sta ponendo l'attenzione sul coinvolgimento anche di altri virus erpetici nell'immunoattivazione. E' noto come la replicazione di CMV, EBV e HHV8 persista in molti pazienti con infezione da HIV in terapia HAART efficace, a un grado superiore rispetto ai soggetti HIV negativi (Jacobson MA et al., 2009). E' stato dimostrato inoltre come la somministrazione di un agente antivirale quale il valganciclovir (efficace contro il CMV,) sia in grado di ridurre i livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD8+ valutati a otto settimane di trattamento, in soggetti con infezione da HIV con presenza di sieropositività per CMV (Hunt PW et al., 2011). Non si può escludere che la riduzione dell'immunoattivazione possa essere dovuto all'effetto di valganciclovir anche su altri virus erpetici e non solo sul CMV, vista la sua dimostrata efficacia contro EBV, HHV6 ed HHV8 (Casper C et al., 2008; Burns WH et al., 1990).

## PARTE SPERIMENTALE

### 5. Introduzione e scopi dello studio

Gli Herpesvirus umani linfotropici (CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8) sono virus ubiquitari che dopo l'infezione primaria persistono nell'ospite in forma latente, causando generalmente manifestazioni cliniche benigne; nei soggetti immunocompromessi, invece, questi virus possono causare gravi forme morbose (Murray et al. 2006). Alcuni herpesvirus hanno la capacità di integrarsi nel genoma dell'ospite (es. EBV, HHV6), altri hanno proprietà trasformanti (es. EBV, HHV8) e pressochè in tutti sono state individuate proteine con effetti immunomodulanti (Caselli E et al., 2007; dos Santos Pinheiro R et al., 2013; Hassman LM et al., 2011; Kapatai G et al., 2007; Niedobitek G., et al. 2000; Sunil M et al., 2010; Razonable R et al. 2002). È ormai noto, grazie ad alcuni studi riportati in letteratura, che l'infezione acuta e cronica da parte di alcuni virus erpetici, come CMV ed EBV, causa una condizione di immunoattivazione che nel caso di CMV ben si correla con la senescenza del sistema immunitario (entrambi fenomeni osservati anche in corso di infezione da HIV) (Dock JN et al., 2011). Sappiamo inoltre che, nonostante la maggior parte dei pazienti HIV-positivi risponda alla terapia antiretrovirale con negativizzazione duratura della carica virale, esiste una particolare categoria di pazienti che presenta elevati livelli di immunoattivazione e uno scarso recupero immunologico (cosiddetti pazienti "discordanti") (Zoufalay A et al., 2011). Le cause di questo fenomeno sono ancora in via di definizione. L'immunoattivazione persistente sembra giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi sia della sindrome AIDS sia dei disordini non AIDS-correlati, quali, ad esempio, l'osteoporosi, l'aumento del rischio cardiovascolare, il decadimento cognitivo, che sempre più vengono osservati in corso di infezione cronica da HIV, in una popolazione che grazie alla HAART ha visto enormemente prolungata la propria aspettativa di vita (Appay V., 2008). I fattori causali dell'immunoattivazione sono molteplici e solo alcuni di essi sono stati ben caratterizzati, come ad esempio la traslocazione batterica dal compartimento gastrointestinale dovuta alla deplezione mucosale delle cellule T CD4+ (evento che avviene precocemente durante l'infezione da HIV) (Brenchley JM et al., 2006), la persistente risposta immunitaria specifica anti-HIV che non riesce a debellare l'infezione, la produzione da parte di HIV di specifiche proteine con funzione immuno-attivatrice (Mogensen TH et al., 2010). Gli Herpesvirus umani linfotropici hanno un tropismo cellulare simile a quello di HIV e le riattivazioni di questi virus sono una delle possibili cause di immunoattivazione persistente nei pazienti discordanti. Pochi studi sono stati condotti sul grado di

immunoattivazione causata da virus erpetici diversi da CMV ed EBV (come ad esempio HHV6, HHV7 ed HHV8) soprattutto nei pazienti HIV-positivi asintomatici per patologie herpes-correlate (Jacobson MA et al., 2009). Diversi studi suggeriscono inoltre che a livello del cavo orale HIV può interagire direttamente o indirettamente con i suddetti virus erpetici e che tali interazioni possono avere un'azione sinergica per la replicazione di entrambi e probabilmente per la trasmissione, considerato che lo shedding salivare è un'importante fonte di infezione per la maggior parte degli herpesvirus linfotropici (Casper C et al., 2006; Griffin E et al., 2008; Yoshikawat T et al., 2005).

Gli scopi del nostro studio sono di:

valutare la prevalenza di positività per la ricerca del DNA degli Herpesvirus umani linfotropici nel plasma e nella saliva di pazienti HIV-positivi in terapia antiretrovirale con soppressione della replicazione virale di HIV ed in un gruppo di controllo formato da donatori sani.

Valutare il grado di immunoattivazione, la senescenza e la distribuzione nelle varie forme maturative (naïve, central memory, effector memory, effettori) delle cellule del compartimento dei linfociti T, confrontando i risultati ottenuti nel gruppo dei soggetti con infezione da HIV con quelli del gruppo di controlli sani.

Correlare le alterazioni immunologiche con la presenza di virus erpetici linfotropici nei campioni di plasma e di saliva.

## 6. Metodi

### 6.1 Pazienti

Lo studio è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki e approvazione da parte del comitato etico. Tutti i soggetti arruolati nello studio hanno firmato un consenso informato.

Sono state effettuate due indagini di prevalenza per la rilevazione della presenza del DNA di herpesvirus (determinazione qualitativa di HHV6-, HHV7- e HHV8-DNA per la prima indagine; determinazione quantitativa di HHV6-, HHV7-, HHV8-, EBV- e CMV-DNA per la seconda indagine) in campioni di plasma e saliva provenienti da soggetti con infezione da HIV. Tutti i pazienti con infezione da HIV arruolati nello studio erano seguiti ambulatorialmente presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive del Policlinico Umberto I di Roma.

I criteri di inclusione per la selezione dei pazienti con infezione da HIV comprendevano:

- assenza di manifestazioni cliniche ascrivibili ad infezioni da herpesvirus al momento dell'arruolamento.
- Assenza di alterazioni degli enzimi di citolisi epatica al momento della raccolta dei campioni e nel corso dell'ultimo anno di follow up.
- Trattamento antiretrovirale con il medesimo regime HAART da almeno 1 anno.
- Soppressione della carica virale di HIV da almeno 1 anno.
- Assenza di manifestazioni cliniche AIDS correlate.

Sono stati esclusi dall'arruolamento i pazienti che assumevano una terapia corticosteroidea o antiinfiammatoria cronica. Per tutti i soggetti che hanno partecipato alla sperimentazione sono stati valutati i parametri demografici, clinici e laboratoristici al momento della raccolta dei campioni; sono stati, inoltre, esaminati il profilo viro-immunologico al nadir e attuale, la variazione dei linfociti T CD4+ nel corso degli ultimi sei mesi di trattamento, la terapia antiretrovirale. La determinazione della carica virale è stata effettuata:

per i pazienti arruolati nella prima rilevazione di prevalenza degli herpesvirus linfotropici con metodica Roche Cobas TaqMan con limite di detezione 50 copie/ml;

per i pazienti arruolati nella seconda rilevazione di prevalenza degli herpesvirus linfotropici con metodica Real Time Versant kPCR su piattaforma Siemens Healthcare Diagnostics con limite di detezione di 37 copie/ml.

Per tutti la conta assoluta e relativa dei linfociti T CD4 è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica a due colori, utilizzando un FACS-Calibur Becton Dickinson con metodica su sangue intero con lisi e reagenti Simul TEST.

Sono stati arruolati nello studio donatori sani come gruppo di controllo (sia per la prima che per la seconda indagine di prevalenza degli herpesvirus linfotropici).

## **6.2 Raccolta e trattamento dei campioni**

Per ogni paziente arruolato sono stati raccolti un campione di sangue in provetta contenete eparina (mediante puntura di un vaso venoso periferico) e un campione di saliva, riversato direttamente dal paziente in apposito contenitore sterile privo di additivi. Entrambi i campioni sono stati raccolti a digiuno per tutti i partecipanti allo studio. 200µl del campione di saliva sono stati processati immediatamente per l'estrazione del DNA virale e l'estratto è stato congelato a -80°C. La restante parte del campione di saliva è stata conservata a -80°C. Dal campione di sangue è stata prelevata un'aliquota di 1 ml per le marcature con gli anticorpi monoclonali coniugati ai fluorocromi per l'analisi citofluorimetrica, mentre la parte restante è stata centrifugata a 1000g per 5 minuti per separare il plasma dalla parte corpuscolata. Anche in questo caso 200 µl di plasma sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA virale ed il prodotto dell'estrazione è stato conservato a -80°C, come la parte restante del plasma.

## **6.3 Analisi di biologia molecolare**

I campioni di saliva e di plasma raccolti sono stati sottoposti ad estrazione del DNA virale ed analizzati come segue:

per i pazienti arruolati nell'ambito della prima indagine di prevalenza di HHV6, HHV7 ed HHV8, la ricerca qualitativa del DNA virale di questi virus è stata condotta con metodica "nested multiplex PCR" seguita da elettroforesi su gel di agarosio al 4% e colorazione del DNA con SYBR® green (Lonza) per la rilevazione delle bande mediante transilluminazione con strumento Gel Doc 2000 BioRAD.

Per i pazienti arruolati nell'ambito della seconda indagine di prevalenza di HHV6, HHV7, HHV8, EBV e CMV la ricerca quantitativa del DNA virale di questi virus è stata condotta con metodica real-time PCR mediante sistema LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics).

a) *Estrazione del DNA virale*

Un'aliquota di 200 µl di campione di saliva o plasma è stato sottoposto ad un processo di estrazione chimica mediante il kit di estrazione High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche vers. 15.0). È stato osservato in maniera rigorosa il protocollo fornito dal produttore. Il materiale estratto (50 µl) è stato congelato alla temperatura di -80°C per un periodo non superiore a 3 mesi, prima dell'analisi di PCR. Per il calcolo della concentrazione finale del DNA degli herpesvirus è stato considerato un fattore di diluizione 0.25 (200 µl di campione per 50µl di estratto)

b) *Nested Multiplex PCR*

La PCR (reazione a catena della polimerasi) permette di amplificare il DNA mediante una reazione divisa in tre stadi, ciascuno condotto ad una temperatura diversa. La prima tappa è la denaturazione che viene effettuata a temperatura di 94°C per separare i due filamenti della molecola stampo. Sono infatti i primer che, nella seconda tappa della PCR (annealing) appaiandosi ai filamenti denaturati, determinano il punto di innesco della sintesi di DNA. La reazione di annealing avviene a temperatura inferiore a quella di denaturazione in modo da consentire ai primer di appaiarsi alle sequenze complementari. La temperatura di annealing è un parametro variabile e nel nostro caso, per i primer utilizzati per HHV6, HHV7 e HHV8, è di 60°C. La tappa successiva (polimerizzazione o estensione) è condotta a 72°C, temperatura ottimale per la DNA polimerasi del batterio termofilo *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasi). Nella variante della PCR definita "nested" (da noi utilizzata per la ricerca di HHV6, HHV7 e HHV8) l'amplificazione viene eseguita in due fasi successive: un primo step di amplificazione con una coppia di primer (outer) seguito da un secondo step di amplificazione con primer (inner) di sequenze interne alla sequenza amplificata nel primo step (da qui il termine nested=annidato). Tale procedura garantisce un'elevata sensibilità e specificità dell'intero processo. Inoltre nel nostro caso abbiamo impiegato contemporaneamente coppie di primer per virus diversi nella stessa miscela di reazione (multiplex), sfruttando il fatto che i primer in questione avessero delle temperature di annealing molto simili e che i prodotti finali di amplificazione fossero di lunghezze (espressa in paia di basi [bp]) e quindi peso molecolare, differenti, così da poter essere distinti agevolmente dopo la separazione elettroforetica. Nel primo step della nested PCR il volume di estratto utilizzato è stato di 10µl, per un volume finale di reazione di 50 µl, con una concentrazione finale di 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 50 mM di KCl, 10 mM di TrisHCl (pH 8.3), 0.2 mM di dNTP (desossirineucleotidi monofosfato), 10 pM di ciascun primer per ogni herpesvirus e 1.25 U di Taq Polimerasi.

Nel secondo step il volume finale di reazione era di 25  $\mu$ l, con una concentrazione finale di 2 mM di  $MgCl_2$ , 50 mM di KCl, 10 mM di TrisHCl (pH 8.3), 0.2 mM di dNTP, 10 pM di ciascun primer per ogni herpesvirus e 0.625 U di Taq Polimerasi. Per ogni virus sono state utilizzate due coppie di primer la cui sequenza nucleotidica, temperatura di ibridazione e prodotto di amplificazione espresso in coppie di basi sono riportati nella tabella 1.

Sono stati eseguiti 35 cicli per il primo step della nested PCR; dopo una fase iniziale di denaturazione per 10 minuti a 94°C, ogni ciclo era costituito da un'incubazione di 2 minuti a 94°C, 2 minuti di annealing a 60°C ed 1 minuto a 72°C per l'estensione del prodotto di amplificazione. Al termine dei 35 cicli vi era una fase di allungamento a 72°C per 7 minuti. Dopo la prima fase di amplificazione 1  $\mu$ l del prodotto amplificato è stato trasferito nella seconda miscela di reazione contenente i primer interni. A questo punto sono stati eseguiti 25 cicli identici a quelli del precedente step, con l'eccezione della temperatura di annealing, pari a 57°C. Tale successione di cicli termici è stata ottenuta utilizzando un termostato con controllo ciclico della temperatura (GeneAmp 9007, Applied Bio System). In ogni seduta di PCR sono stati inclusi almeno un controllo negativo (costituito dal mix di reazione con aggiunta di acqua al posto del DNA) e tre controlli positivi (uno per ciascuno dei virus ricercati). La procedura descritta rappresenta un adattamento del protocollo riportato da Pozo F. et al. (1999). Taq DNA Polymerasi, Deoxy-NTP Set,  $MgCl_2$ , PCR reaction buffer,  $H_2O$  PCR grade, sono stati acquistati da Roche Diagnostic.

VIRUS		SEQUENZA PRIMERS	T ANNEALING	PAIA DI BASI DELL'AMPLIFICATO
HHV6	inner	GCCAAACATATCACAGATCG GGACATAAAATCTTYTCRAACTC	60°C	68 bp
	outer	GAGGTAATYTATGGTGATACGGA TGTCTACCAARTATCTTTTTT	57°C	194 bp
HHV7	Inner	GTTACTTTCAAAAATGTTTGTCCTC GGAAATAGGATCTTTTCAAATTC	60°C	122 bp
	Outer	GAGGTGATTTATGGTGATACTGA AACTTTCCAATGTAACGTTTCTT	57°C	194 bp
HHV8	Inner	GGACAGCGTGCAGACTTCG CTTGAAGATCTTTTCAGCCTC	60°C	97 bp
	Outer	AAGGTCATATACGGCGACTGA AGTACCCACGTATCTTTTT	57°C	194 bp

**tabella 1. Sequenze nucleotidiche, temperature di ibridazione e prodotti di amplificazione dei primer utilizzati.**

Le sequenze dei primers utilizzati per HHV6, HHV7, ed HHV8 sono state ricavate dal già citato lavoro di Pozo F. et al. (1999) e sono stati acquistati da TIB MolBiol.

### *c) Analisi del prodotto amplificato*

Al termine del secondo ciclo della nested PCR, 10 µl del prodotto amplificato sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 4% in TBE (Tris Borato EDTA). Prima del caricamento sul gel, i campioni sono stati miscelati con 1 µl Sybr Green I (Lonza) e con 2µl di Loading Dye 6x (Thermo Scientific). La corsa elettroforetica orizzontale è stata effettuata in tampone TBE per circa 1 h a 100 Volt. E' stato utilizzato un DNA ladder (EURx) in grado di generare una serie di bande da 50bp a 500bp per identificare il peso indicativo delle bande rilevate. A seguito della corsa elettroforetica il gel di agarosio è stato analizzato mediante transilluminazione con strumento Gel Doc 2000 BioRAD e digitalizzazione dell'immagine. Sono stati considerati positivi i campioni in cui era presente una banda corrispondente ad un frammento di DNA di 68 bp per HHV-6, 122 bp per HHV-7 e 97 bp per HHV-8. La quantità minima di DNA erpetico rilevato era compreso tra 10 e 100 molecole di DNA virale per amplificazione (Pozo F et al., 1999). Sono state considerate attendibili tutte le reazioni in cui il controllo negativo non mostrava alcuna banda e i controlli positivi mostravano bande di amplificazione del DNA nella giusta localizzazione rispetto al DNA ladder.

I processi di estrazione del DNA dai campioni, preparazione delle miscele di reazione, amplificazione ed elettroforesi dei prodotti amplificati sono stati condotti in ambienti separati, onde evitare contaminazioni e conseguentemente falsi positivi. Ogni procedura è stata eseguita in condizioni di assoluta accuratezza, con utilizzo e frequente sostituzione di guanti in lattice, puntali sterili con filtro per le pipette, vial sterili. Abbiamo utilizzato set di pipette dedicati a ciascun processo (estrazione, preparazione del mix di amplificazione, elettroforesi) per ridurre ulteriormente il rischio di contaminazione.

### *d) Real-time PCR con strumento LightCycler 2.0*

La real-time PCR è una metodica di PCR che consente l'amplificazione del DNA e la rilevazione in tempo reale del prodotto di amplificazione stesso, che avviene all'interno di capillari in quarzo. Inoltre tale metodica consente anche una valutazione quantitativa del prodotto di amplificazione. In questo studio tutte le real-time PCR sono state effettuate su piattaforma LightCycler 2.0 (Roche). La rilevazione della presenza di un prodotto di amplificazione si basa sulla lettura in tempo reale della fluorescenza emessa attraverso un fenomeno fisico definito "Fluorescence Resonance Energy Transfer" (FRET). Nel mix di reazione, oltre a tutti i reattivi necessari per la sintesi del DNA da parte della polimerasi ed ai primers, sono contenuti due tipi di sonde di DNA, specifiche per la sequenza target dell'amplificazione. Queste sonde sono marcate una in posizione 3' con fluorescina e l'altra in posizione 5' con LC-Red 640 e fosforilata in posizione 3' per evitarne l'estensione. Tali sonde

emettono fluorescenza ad una particolare lunghezza d'onda rilevata dallo strumento soltanto quando sono in prossimità spaziale. Questo fenomeno si verifica quando nel mezzo di reazione è presente la sequenza target che permette alle due sonde di legare il DNA complementare. I due fluorocromi si trovano quindi ad essere spazialmente limitrofi. Un laser eccita il primo fluorocromo (ad esempio la fluorescina) che, perdendo lo stato di eccitazione, emette energia con lunghezza d'onda in grado di stimolare (fenomeno della risonanza) il secondo fluorocromo (ad esempio LC-Red 640) che a sua volta diseccitandosi emette energia in forma rilevabile da un sensore nello strumento, e consente una valutazione dell'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo termico. Questo permette una valutazione in "real time" della positività della reazione di PCR. Affinché si verifichi il fenomeno della risonanza, è fondamentale che il fluorocromo accettore e quello donatore siano molto vicini; che lo spettro di eccitazione dell'accettore sia sovrapposto allo spettro di emissione del donatore. Inoltre l'orientamento dei dipoli di transizione del donatore e dell'accettore devono essere approssimativamente paralleli. Il trasferimento di energia tra i due fluorocromi non avviene attraverso l'emissione di un fotone ma per mezzo dell'interazione dipolo-dipolo. Per questo il segnale viene emesso solo se i due fluorocromi si trovano ad essere spazialmente molto vicini. Tale fenomeno riduce il rumore di fondo e l'aspecificità.

In alternativa alle sonde coniugate con fluorocromi si possono utilizzare molecole con proprietà intercalanti il DNA che sono in grado di emettere fluorescenza solo quando sono legate al DNA stesso. Questa metodica è meno costosa ma più aspecifica, in quanto la molecola intercalante può legare dei primers appaiati restituendo un falso segnale di positività.

All'inizio della reazione di amplificazione la fluorescenza emessa costituisce il rumore di fondo (definito come "treshold"). Quando vi è amplificazione del DNA bersaglio, si registra un aumento esponenziale della fluorescenza. Il primo ciclo in cui il livello di fluorescenza relativo ad un campione è superiore al rumore di fondo viene identificato come Ct (treshold cycle). Attraverso la generazione di una curva standard con campioni a concentrazione nota del DNA bersaglio, è possibile ottenere una quantificazione assoluta del DNA target contenuto nel campione sconosciuto. E' sufficiente valutare il valore di concentrazione del DNA a cui corrisponde il Ct misurato per il campione sconosciuto.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato dei kit commerciali ben standardizzati per la rilevazione del DNA di CMV, EBV, HHV6, HHV7 e HHV8, seguendo le istruzioni del fornitore. In particolare i kit utilizzati sono stati: LightMix CMV, LightMix EBV, LightMix HHV8 (TIB Molbiol); Viroreal HHV6A,B e Viroreal HHV7 (Ingenetix). Tutte le reazioni sono state condotte in capillari per lightcycler in quarzo.

Per ogni seduta è stato utilizzato un controllo negativo (in cui il campione estratto era sostituito da acqua sterile) ed un controllo positivo. Inoltre è stata generata una curva standard per ciascun kit con range dinamico da 10 copie di DNA target per reazione fino a  $10^6$  copie di DNA target per reazione. Ove richiesto dal protocollo, in fase di analisi dei risultati è stato applicato un file di compensazione delle fluorescenze precedentemente generato per mezzo del Color Compensation kit 530/640/690 (TIB MolBiol). I protocolli utilizzati per la ricerca del DNA degli herpesvirus linfotropi, prevedevano alla fine dei cicli di amplificazione un ciclo di “melting”: in questa fase la temperatura dell’amplificato viene progressivamente incrementata da 40°C (in cui i probe sono legati al DNA amplificato, ed emettono un segnale di fluorescenza rilevabile) a 95°C (in cui tutto il DNA è denaturato con riduzione del segnale di fluorescenza emesso, ai livelli del rumore di fondo). Durante questa fase, ad una temperatura ben precisa, dipendente dalla sequenza nucleotidica e dalla lunghezza in bp dei probe, avviene la denaturazione del DNA (melting) con rapido decremento del segnale di fluorescenza. Confrontando la temperatura di melting dei campioni analizzati con quella del controllo positivo è stato possibile verificare la specificità delle reazioni, escludendo falsi positivi.

Tutti i protocolli di real-time PCR, utilizzati nello studio, prevedevano la presenza di un controllo interno, la cui amplificazione costituiva un requisito necessario ma non sufficiente per validare la procedura. Infatti la procedura veniva validata totalmente quando erano rispettati anche i seguenti due criteri: assenza di amplificazione del DNA target nel campione controllo negativo; amplificazione del DNA target nel campione controllo positivo.

Considerando i fattori di diluizione e di conversione da  $\mu\text{l}$  a ml, il range dinamico ottenuto è stato di  $10^2$ - $10^8$  copie/ml con una sensibilità della metodica verificata a 50copie/ml. Il limite inferiore per la quantificazione è stato 100 copie/ml. Risultati compresi tra 50 e 100 copie/ml sono stati riportati come “positivi” essendo superiori al limite inferiore di detezione (LLD) ma non superando il limite inferiore di quantificazione (LLQ)

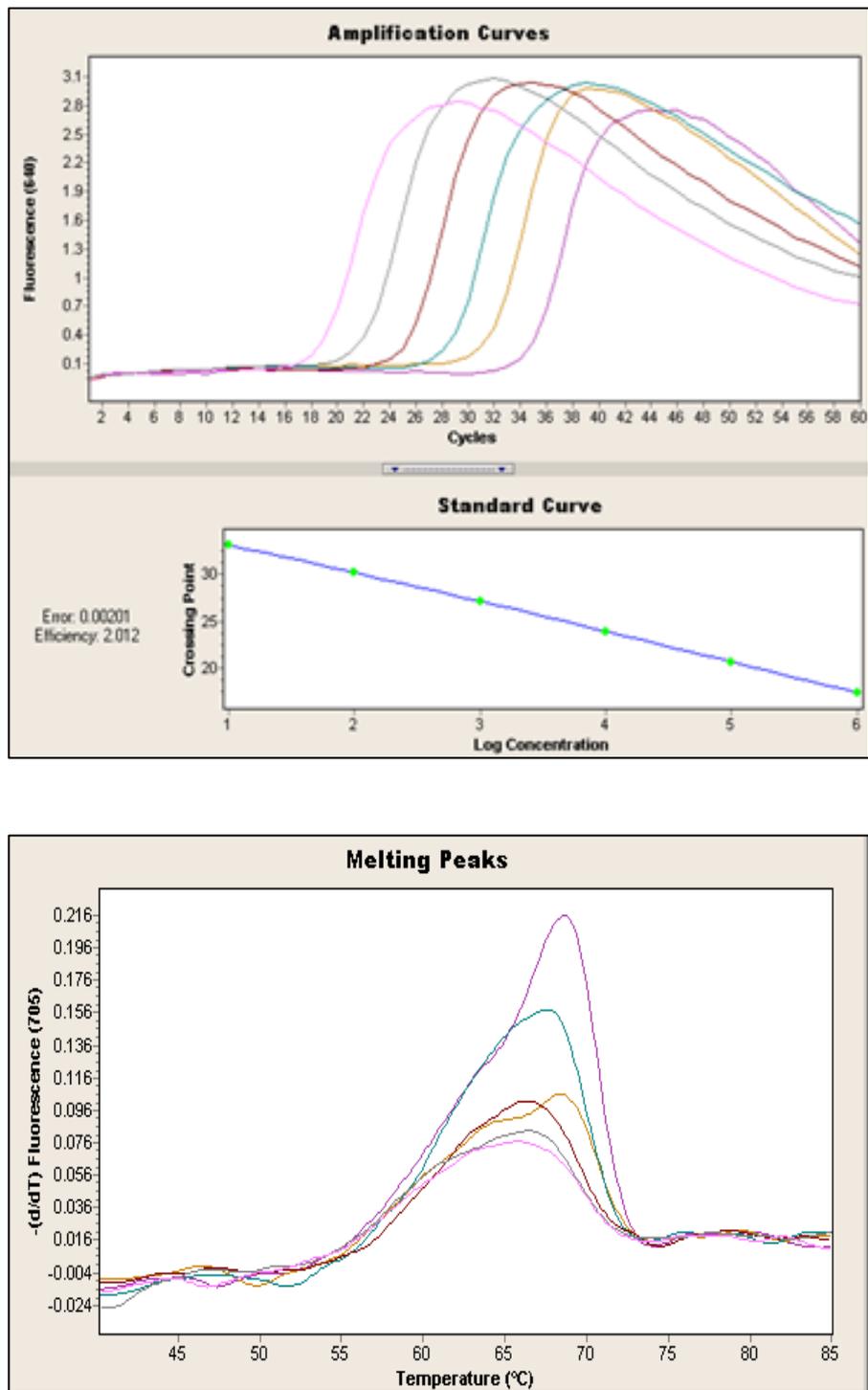


Figura1: esempio di curve di amplificazione, curva standard e curve di melting di una real-time-PCR eseguita con strumento LightCycler 2.0

#### 6.4 Analisi immunofenotipica

Per l'analisi immunofenotipica dei campioni di sangue intero sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi: Pacific blue anti-human-CD3, Pacific blue anti-human-CD45, phycoerythrin (PE) anti-human-CD57, peridinin chlorophyll protein (PerCP)/Cyanine (Cy)5.5 anti-human-HLA-DR, PerCP anti-human-CD3, PE/Cy7 anti-human-CD8, allophycocyanin (APC) anti-human-CD38, APC/Cy7 anti-human-CD4 (Biolegend®), Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-human-CD28, FITC anti-human-CD27, PE anti-human-CD45RO (BD Biosciences®). Tutti gli anticorpi sono stati titolati prima dell'utilizzo. Il protocollo di marcatura prevedeva l'impiego di campioni di sangue intero. Per ciascun paziente sono stati preparati due tubi da citofluorimetria contenenti le seguenti combinazioni di anticorpi monoclonali:

primo tubo: Pacific blue anti-human-CD3, FITC anti-human-CD28, PE anti-human-CD57, PerCP/Cy5.5 anti-human-HLA-DR, PE/Cy7 anti-human-CD8, APC anti-human-CD38, APC/Cy7 anti-human-CD4;

secondo tubo: Pacific blue anti-human-CD45, FITC anti-human-CD27, PE anti-human-CD45RO, PerCP anti-human-CD3, PE/Cy7 anti-human-CD8, APC/Cy7 anti-human-CD4

In ogni tubo sono stati aggiunti 50 µl di sangue intero al mix di anticorpi monoclonali. I tubi sono stati agitati per 10 secondi e successivamente incubati al buio, a 4°C, per 20 minuti. Dopo l'incubazione, in ciascun tubo sono stati aggiunti 450 µl di soluzione lisante (preparata mediante diluizione 1:10 della Lysing Solution 10x [BD] con acqua bidistillata sterile). I tubi sono stati nuovamente agitati per 10 secondi ed incubati per altri 10 minuti al buio, a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 300g, il sovrinatante è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con soluzione di phosphate buffered saline (PBS) contenente 1% bovine serum albumine (BSA), 0.1% azide di sodio (NaN<sub>3</sub>). Dopo una ulteriore centrifugazione a 300g per 5 minuti il campione è stato risospeso in 250µl della soluzione 1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS. A questo punto i campioni marcati sono stati analizzati con un citofluorimetro equipaggiato con tre laser, otto canali di fluorescenza e 10 parametri complessivi (MACSQuant, Miltenyi). Sono stati acquisiti 50.000 eventi per ogni campione analizzato nel gate dei linfomonociti.

Per la definizione del limite tra la positività e la negatività dell'espressione di HLA-DR e CD38 è stata impiegata la metodica della "fluorescence minus one" (FMO). Tale procedura prevede la preparazione, per ciascun soggetto esaminato, di alcuni campioni in cui sono presenti tutti gli anticorpi monoclonali della miscela utilizzata, ad eccezione dell'anticorpo per cui si vuole determinare il gate per la popolazione positiva. Questo permette di definire e localizzare la

popolazione di eventi negativa nel canale del fluorocromo coniugato all'anticorpo mancante nel mix.

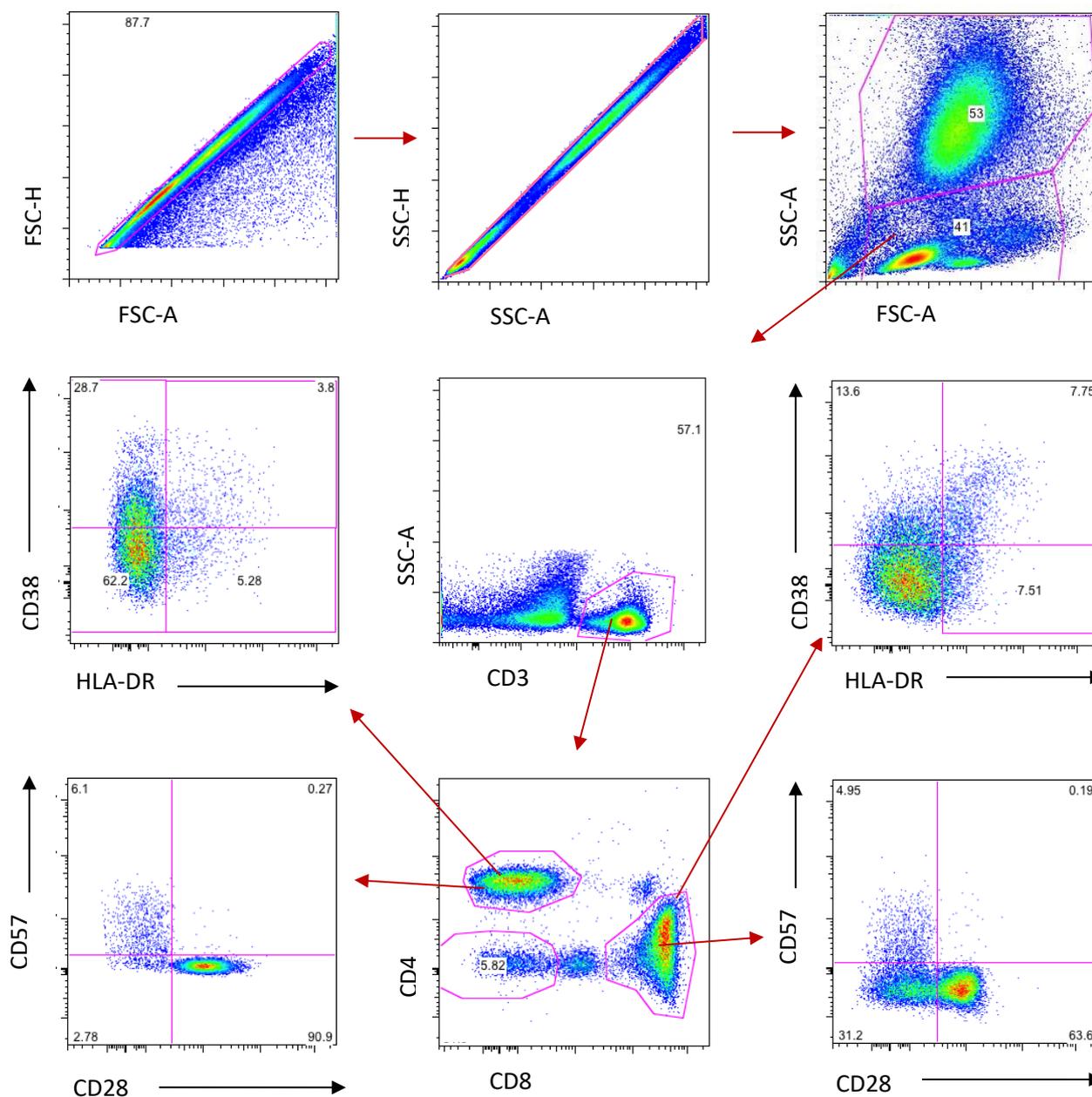
I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante software FlowJo versione 8.7

Nello schema 1 e 2 riportiamo le strategie di gating utilizzata per il nostro studio.

### **6.5 Analisi statistiche**

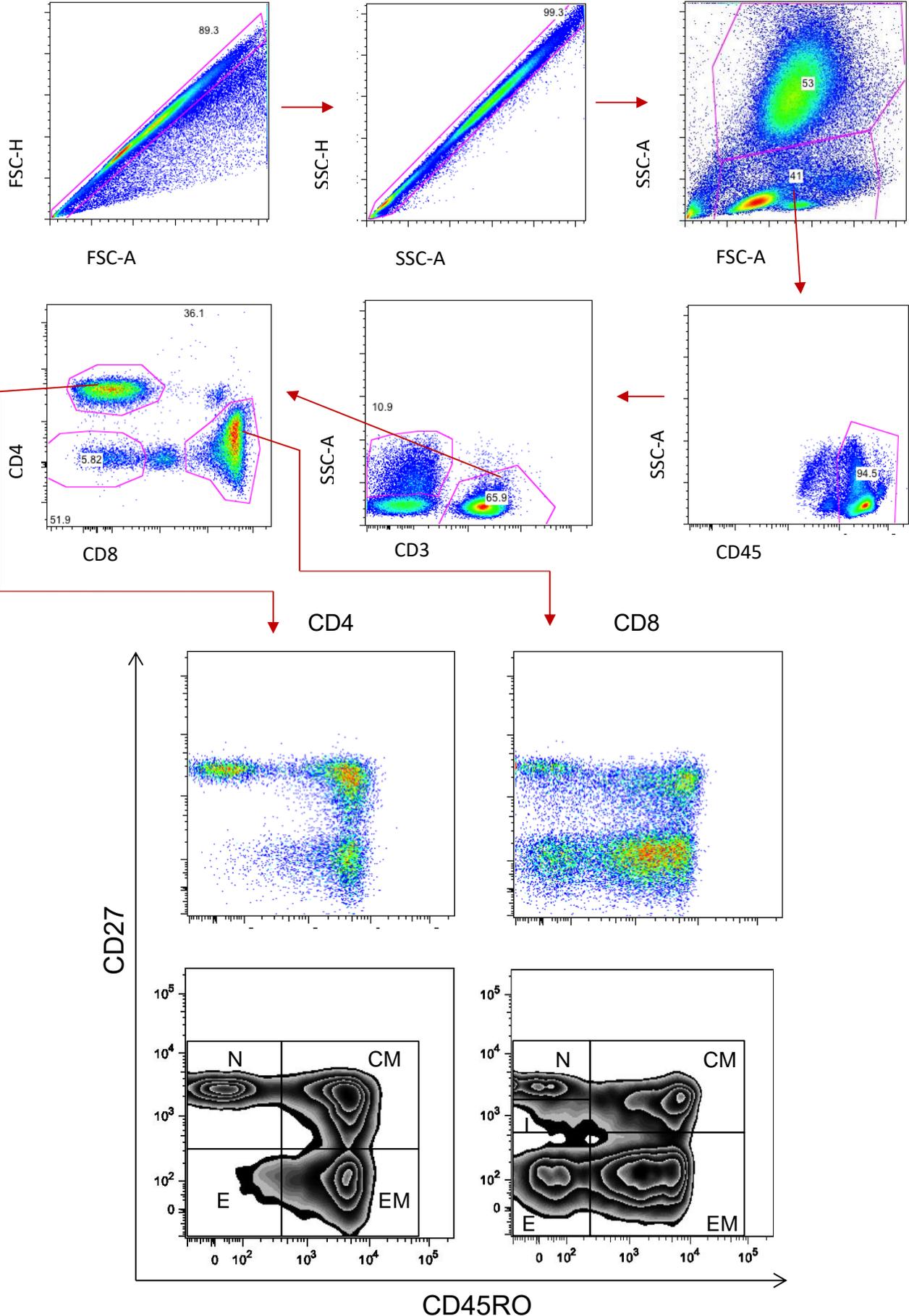
Per l'elaborazione statistica dei dati è stato impiegato il software GraphPad Prism versione 5, utilizzando i seguenti test statistici: test esatto di Fisher e test del  $\chi^2$ , test di Mann-Whitney basato sul rango, correlazione mediante Spearman, calcolo della retta di regressione. Il limite della significatività statistica è stato considerato pari a 0.05.

### Schema1: strategia di gating per la valutazione dell'immunoattivazione dei CD4 e dei CD8



Dopo l'esclusione dei doppietti mediante gate nei plot FSC-A/FSC-H ed SSC-A/SSC-H è stato creato un gate fisico nel plot FSC-A/SSC-A per identificare i linfomonociti. Nel gate dei linfomonociti sono stati identificati i linfociti CD3+ ed in questa popolazione nel plot CD8/CD4 sono stati identificati i linfociti CD3/CD4+ e CD3/CD8+. Per ciascuna di queste sottopopolazioni di linfociti sono stati valutati i marcatori di attivazione HLA-DR e CD38 ed i marcatori di senescenza CD28 e CD57. Per definire i limiti dei gate per le popolazioni CD38+ e HLA-DR+ è stata utilizzata la tecnica della fluorescence minus one (FMO)

Schema2: strategia di gating per la valutazione dei fenotipi differenziativi dei CD4 e dei CD8



Dopo l'esclusione dei doppietti mediante gate nei plot FSC-A/FSC-H ed SSC-A/SSC-H è stato creato un gate fisico nel plot FSC-A/SSC-A per identificare i linfomonociti. Nel gate dei linfomonociti sono considerati gli eventi CD45+. Nel gate dei linfomonociti CD45+ sono stati identificati i linfociti CD3+ ed in questa popolazione nel plot CD8/CD4 sono stati identificati i linfociti CD3/CD4+ e CD3/CD8+. Ciascuna di queste sottopopolazioni di linfociti sono state visualizzate nel plot CD45RO/CD27 che ha permesso l'identificazione delle seguenti sottopopolazioni:

per i linfociti T CD4: naïve (N, CD27+CD45RO-), central memory (CM, CD27+CD45RO+) effector memory (EM, CD27-CD45RO+) ed effector (E, CD27-CD45RO-).

Per i linfociti T CD8: naïve (N, CD27+CD45RO-), intermedio (I, CD27<sup>low</sup>CD45RO-) central memory (CM, CD27+CD45RO+) effector memory (EM, CD27-CD45RO+), effector (E, CD27-CD45RO-).

## 7 Risultati

### 7.1 Risultati della prima indagine di prevalenza di HHV6, HHV7 ed HHV8

La prima indagine sulla prevalenza di HHV6, HHV7 ed HHV8 è stata condotta su un campione costituito da 36 soggetti HIV positivi in terapia HAART (senza manifestazioni cliniche di patologie opportunistiche al momento dell'arruolamento, né di patologie ascrivibili ad infezioni erpetiche) e su 10 controlli sani. Il campione dei soggetti HIV+ era costituito da 35 (97%) uomini e 1 donna (3%), con età media di  $48 \pm 15$  anni; la media dei linfociti T CD4+ al momento dell'arruolamento in valore assoluto è stata di  $538 \pm 312$  cell/mmc ed in percentuale del  $21\% \pm 16\%$ ; ). Il valore medio del nadir dei linfociti T CD4+ era di  $189 \pm 222$  cell/ $\mu$ l (media  $\pm$  deviazione standard). Tutti i pazienti presentavano una viremia di HIV stabilmente soppressa da un anno ( $< 50$  cp/ml), ad eccezione di un paziente che ha mostrato una carica virale di  $5.6 \log_{10}$  copie/ml. Tutti i soggetti erano in trattamento con una "Highly Active Antiretroviral Therapy" (HAART) con lo stesso regime da almeno un anno. Il gruppo di controllo era costituito da 9 (90%) uomini e 1 (10%) donna, con età media di  $40 \pm 9.8$  anni. I due gruppi erano omogenei per composizione e caratteristiche demografiche.

Gruppo	Età (media $\pm$ SD)	M vs F	CD4 (cell/ $\mu$ l)	CD4 %
HIV+	$48 \pm 15$	38 vs 1	$538 \pm 312$	$21 \pm 16$
Controlli	$40 \pm 9.8$	9 vs 1	NA	NA

**Tabella 2: dati demografici dei soggetti HIV+ e dei controlli; conta dei linfociti T CD4+ al momento della raccolta dei campioni dei soggetti HIV+. NA= non applicabile**

Sui campioni di plasma e saliva di ciascun individuo è stato ricercato il DNA virale di HHV-6, HHV-7 e di HHV-8 mediante *nested multiplex* PCR. Nelle tabelle 2 e 3 sono riportati i risultati osservati. Considerando la globalità dei campioni esaminati, nel 78% (28/36) dei soggetti HIV+ abbiamo riscontrato la presenza del DNA di almeno un herpesvirus in almeno uno dei campioni biologici esaminati (plasma e/o saliva), mentre nel gruppo di controllo, il 60% (6/10) dei soggetti è risultato positivo per almeno un herpesvirus. Nei soggetti con infezione da HIV la ricerca del DNA degli herpesvirus è risultata positiva nel 39% dei campioni di plasma (14/36) e nel 62% dei campioni di saliva esaminati (21/34, in due soggetti non è stato possibile ottenere i campioni di saliva). Nei controlli il DNA degli herpesvirus era presente nel 50% dei campioni di plasma (5/10) e nel 60%

Soggetti	Plasma			Saliva		
	HHV6	HHV7	HHV8	HHV6	HHV7	HHV8
Pt1A	N	pos	N	N	N	N
Pt2A	N	N	N	N	N	N
Pt3A	N	N	pos	N	pos	pos
Pt4A	N	N	N	N	pos	N
Pt5A	N	N	N	N	N	N
Pt6A	N	pos	N	N	N	N
Pt7A	N	N	N	N	N	N
Pt8A	N	N	N	N	pos	pos
Pt9A	N	N	N	pos	pos	pos
Pt10A	N	N	pos	NE	NE	NE
Pt11A	N	N	N	N	N	N
Pt12A	N	N	N	N	pos	pos
Pt13A	N	N	N	pos	pos	N
Pt14A	N	pos	N	N	N	N
Pt15A	N	N	N	N	pos	N
Pt16A	N	N	N	pos	pos	N
Pt17A	N	pos	N	N	pos	N
Pt18A	N	N	N	N	pos	N
Pt19A	pos	N	N	pos	pos	N
Pt20A	N	pos	N	N	pos	N
Pt21A	N	pos	N	N	N	N
Pt22A	N	N	N	N	pos	N
Pt23A	N	pos	N	N	N	N
Pt24A	N	N	N	N	pos	N
Pt25A	N	pos	N	pos	pos	N
Pt26A	N	N	N	N	N	N
Pt27A	N	N	N	N	N	pos
Pt28A	N	pos	N	NE	NE	NE
Pt 29A	N	N	N	N	pos	N
Pt 30A	N	N	N	N	N	N
Pt 31A	N	N	N	N	pos	N
Pt 32A	N	pos	N	N	pos	pos
Pt 33A	N	N	N	N	N	N
Pt 34A	N	pos	N	pos	pos	N
Pt 35A	N	N	N	N	pos	N
Pt 36A	N	N	N	N	N	N

Tabella 3: risultati della nested PCR per la ricerca del DNA di HHV6, HHV7 ed HHV8, nei campioni di plasma e saliva dei pazienti del gruppo HIV+; N= negativo; pos=positivo; NE= non eseguito.

Soggetti	Plasma			Saliva		
	HHV6	HHV7	HHV8	HHV6	HHV7	HHV8
Controlli						
C1A	N	N	N	N	N	N
C2A	N	pos	N	pos	pos	N
C3A	N	pos	N	N	pos	N
C4A	N	N	N	N	N	N
C5A	N	N	N	N	pos	N
C6A	N	pos	N	pos	pos	N
C7A	N	pos	N	N	pos	N
C8A	N	N	N	N	N	N
C9A	N	pos	N	N	N	N
C10A	N	N	N	N	pos	N

**Tabella 4: risultati della nested PCR per la ricerca del DNA di HHV6, HHV7 ed HHV8, nei campioni di plasma e saliva dei soggetti del gruppo di controllo; N= negativo; pos=positivo.**

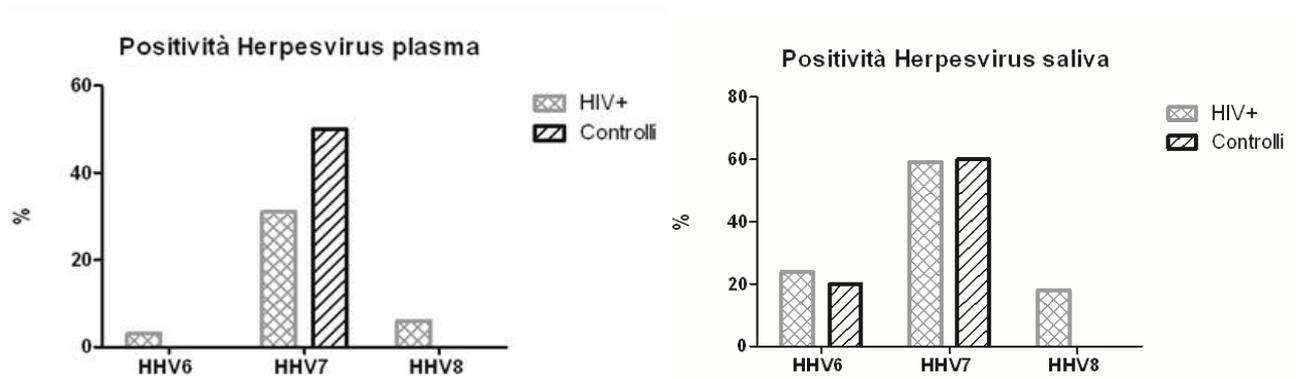
dei campioni di saliva (6/10). Le differenze riscontrate non hanno mostrato significatività statistica. Analizzando i dati per ciascun herpesvirus abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

**HHV6:** la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma del 3% (1/36) dei soggetti HIV+ ed in nessuno dei controlli. Nei campioni di saliva il DNA di HHV6 è stato rilevato nel 24% (8/34) dei soggetti HIV+ e nel 20% (2/10) dei controlli. Tali differenze non mostravano una significatività statistica.

**HHV7:** la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma del 31% (11/36) dei soggetti HIV+ e nel 50% dei controlli (5/10). Nei campioni di saliva il DNA di HHV7 è stato rilevato nel 59% (20/34) dei soggetti HIV+ e nel 60% (6/10) dei controlli. Tali differenze non mostravano una significatività statistica.

**HHV8:** la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma del 6% (2/36) dei soggetti HIV+ e in nessuno dei controlli. Tale differenza non è statisticamente significativa. Nei campioni di saliva il DNA di HHV8 è stato rilevato nel 18% (6/34) dei soggetti HIV+ ed in nessun campione proveniente dal gruppo di controlli. Tale differenza non raggiunge la significatività statistica ma è indicativa di una tendenza ( $p=0.3$ ) che potrebbe assumere un significato aumentando la numerosità del campione (figura 2).

Non sono state riscontrate correlazioni tra la positività per la presenza del DNA di herpesvirus e la conta dei linfociti T CD4+, sia in termini di conta assoluta sia percentuale.



**Figura 2: percentuale di positività di HHV6-, HHV7-, HHV8-DNA dei campioni di plasma e saliva nel gruppo HIV+ e nei controlli**

## 7.2 Risultati della seconda indagine di prevalenza dei virus linfotropici

Il campione analizzato era costituito da 30 soggetti, 25 maschi (83%) e 5 femmine (17%), affetti da infezione da HIV in fase cronica, in terapia HHART, con lo stesso regime farmacologico da almeno un anno. L'età media era di  $49.5 \pm 10.4$  anni (media  $\pm$  deviazione standard). Il valore medio del nadir dei linfociti T CD4+ era di  $337.5 \pm 267$  cell/ $\mu$ l (media  $\pm$  deviazione standard). Il valore medio della conta dei linfociti T CD4+ al momento dell'arruolamento nello studio era di  $711.6 \pm 287$  cell/ $\mu$ l (media  $\pm$  deviazione standard) in valore assoluto e  $31\% \pm 10.7\%$  in valore percentuale (media  $\pm$  deviazione standard). Tutti i pazienti, al controllo della carica virale di HIV, hanno mostrato livelli di HIV-RNA al di sotto dei limiti di detezione della metodica (37 copie/ml), ad eccezione di tre pazienti: Pt 4B, Pt 5B e Pt 9B, in cui sono stati rilevati valori di HIV RNA pari a 3.23 log, 4.52 log e 2.06 log copie/ml, rispettivamente. La via di trasmissione nel 97% dei casi era per via sessuale (50% eterosessuale, 47% omosessuale). Tre pazienti presentavano positività per gli anticorpi anti HCV con anamnesi negativa per storia di epatopatie acute o croniche e per trattamento con interferone e ribavirina. Tre pazienti hanno mostrato positività per gli anticorpi anti HBcIg totali o antiHBs con negatività degli altri marcatori sierologici per HBV. Anche in questi casi l'anamnesi per epatopatie acute o croniche è risultata negativa. Tutti e tre i pazienti, inoltre, erano in trattamento con un regime antiretrovirale che comprendeva l'associazione di tenofovir ed emtricitabina (TDF/FTC) o tenofovir e lamivudina (TDF + 3TC).

Il gruppo di controllo era costituito da 20 soggetti, 13 maschi (65%) e 7 femmine (35%) HIV negativi, di età media  $45.7 \pm 9.2$  anni (media  $\pm$  deviazione standard).

Gruppo	HIV+	Controlli
<b>Età (media ± SD)</b>	49.5 ± 10.4	45.7 ± 9.2
<b>M (%) vs F (%)</b>	25 (83%) vs 5 (17%)	13 (65%) vs 7 (35%)
<b>Anni dalla diagnosi mediana [IQR]</b>	12 [6-15]	NA
<b>Fattore di rischio per la trasmissione (%)</b>	eterosessuale: 15 (50%) omosessuale: 14 (47%) IDU: 1 (3%)	NA
<b>Coinfezioni</b>	HCV: 3 (10%) HBV: 3 (10%) HCV/HBV: 0	HCV: 0 HBV: 0 HCV/HBV: 0
<b>CD4 cell/μl Media ± SD</b>	711.6 ± 287	
<b>CD4 % Media ± SD</b>	31 ± 10.7	58.5 ± 7.8

Tabella 5: Caratteristiche del campione dei soggetti HIV+ e dei controlli sani. SD= deviazione standard. IQR: range interquartile [1°-3° quartile]. NA= non applicabile

Soggetti	Carica virale Plasma (log <sub>10</sub> ) copie/ml					Carica virale saliva (log <sub>10</sub> ) copie/ml				
	HHV6	HHV7	HHV8	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	EBV	CMV
HIV+										

Pt1B	N	N	2,49	N	N	3,53	N	N	N	N
Pt2B	N	N	N	N	N	3,60	3,97	2,64	pos	N
Pt3B	N	N	N	pos	N	N	N	N	N	N
Pt4B	N	N	N	N	N	2,60	2,95	N	7,31	N
Pt5B	N	N	N	pos	N	4,97	5,48	4,01	7,88	N
Pt6B	N	N	N	pos	N	2,49	N	N	N	N
Pt7B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt8B	N	N	N	N	N	4,65	5,30	pos	pos	N
Pt9B	N	N	N	N	N	pos	N	N	N	N
Pt10B	N	N	N	pos	N	N	N	N	N	N
Pt11B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt12B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt13B	N	N	N	n	N	N	N	N	N	N
Pt14B	3,76	N	N	N	N	5,95	N	N	N	N
Pt15B	N	N	N	N	N	N	3,24	N	N	N
Pt16B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt17B	N	N	N	N	N	3,41	4,62	N	pos	N
Pt18B	2,09	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt19B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt20B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt21B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt22B	N	N	N	pos	N	pos	N	N	N	N
Pt23B	N	N	N	N	N	N	3,84	N	pos	N
Pt24B	N	N	N	N	N	3,29	N	N	N	N
Pt25B	N	N	N	N	N	3,47	N	N	N	N
Pt26B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt27B	4,06	N	N	N	N	7,13	4,86	pos	pos	N
Pt28B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pt29B	N	N	N	N	N	N	3,06	3,15	5,17	N
Pt30B	N	N	N	N	N	pos	N	N	N	N

Tabella 6: carica virale di HHV6, HHV7, HHV8, EBV e CMV nei campioni di plasma e saliva dei pazienti del gruppo HIV+; i valori sono espressi in log<sub>10</sub> del valore di copie/ml; N=non rilevabile; pos= DNA rilevabile ma non quantificabile in quanto al di sotto del lower limit of quantification (LLQ) ma al di sopra del lower limit of detection (LLD)

Soggetti	Carica virale Plasma (log <sub>10</sub> ) copie/ml	Carica virale saliva (log <sub>10</sub> ) copie/ml
----------	--	--

controllo	HHV6	HHV7	HHV8	EBV	CMV	HHV6	HHV7	HHV8	EBV	CMV
C1B	N	N	N	N	N	2,65	3,94	N	N	N
C2B	N	N	N	N	N	4,34	4,37	N	2,75	N
C3B	N	N	N	N	N	3,40	4,78	N	N	N
C4B	N	N	N	N	N	N	4,89	N	4,87	N
C5B	N	N	N	N	N	pos	4,05	N	2,81	N
C6B	N	N	N	N	N	2,78	4,90	N	N	N
C7B	pos	N	N	N	N	7,74	4,87	N	2,56	N
C8B	N	N	N	N	N	pos	4,88	N	N	N
C9B	N	N	N	N	pos	2,95	4,83	N	pos	N
C10B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C11B	N	N	N	N	N	pos	4,40	N	pos	N
C12B	N	N	N	N	N	3,02	N	N	N	N
C13B	N	N	N	N	N	3,13	4,82	N	3,09	N
C14B	N	N	N	N	N	3,46	4,98	N	2,67	N
C15B	N	N	N	N	N	3,33	4,64	N	N	N
C16B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C17B	N	N	N	N	N	3,91	5,03	N	2,29	N
C18B	N	N	N	N	N	3,43	4,85	N	3,03	N
C19B	N	N	N	N	N	4,07	5,95	N	2,22	N
C20B	N	N	N	N	N	2,98	4,78	N	N	N

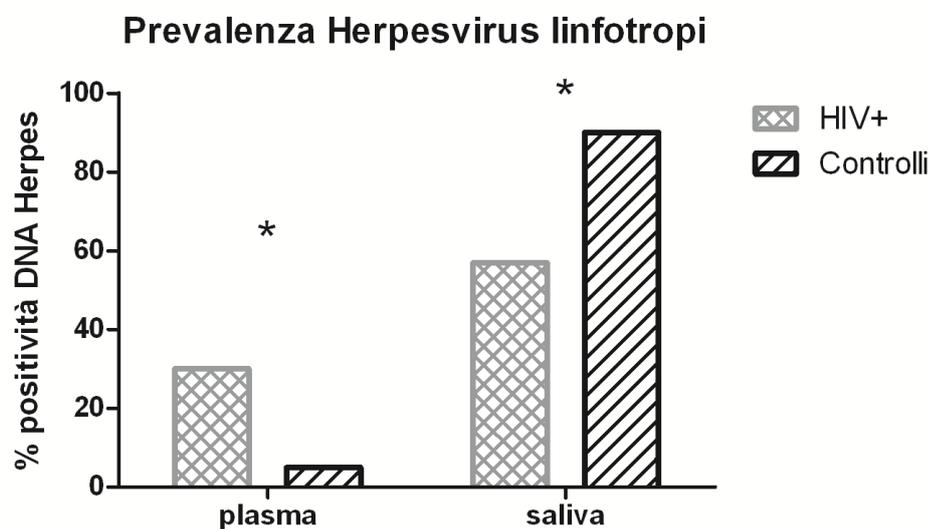
Tabella 7: carica virale di HHV6, HHV7, HHV8, EBV e CMV nei campioni di plasma e saliva dei soggetti del gruppo di controllo; i valori sono espressi in  $\log_{10}$  del valore di copie/ml; N=non rilevabile; pos= DNA rilevabile ma non quantificabile in quanto al di sotto del lower limit of quantification (LLQ) ma al di sopra del lower limit of detection (LLD)

### 7.3 Risultati virlogici

Son stati analizzati i campioni di saliva e di plasma provenienti dal gruppo di soggetti HIV+ in trattamento antiretrovirale e dal gruppo di donatori sani. Il DNA è stato ottenuto dai campioni mediante un processo di estrazione chimica. La ricerca del DNA degli herpesvirus linfotropi (HHV6, HHV7, HHV8, EBV, CMV) è stata effettuata mediante Real Time PCR con strumentazione LightCycler 2.0 (Roche). Nelle tabelle 5 e 6 sono riportati i risultati ottenuti nel gruppo dei pazienti e in quello dei controlli. Complessivamente dei 30 pazienti HIV+ il 67% (20 soggetti) è risultato positivo per la presenza del DNA di almeno uno degli herpesvirus ricercati, in almeno uno dei campioni analizzati. Nel gruppo di controllo di 20 soggetti il 90% (18) è risultato positivo per la ricerca di DNA di herpesvirus linfotropi sui campioni di plasma e/o saliva.

Analizzando i risultati relativi ai campioni di plasma, abbiamo notato che nel gruppo dei pazienti la percentuale di positività per DNA di herpesvirus è stata del 30% (9/30) mentre nel gruppo di controllo è stata del 5% (1/20) con una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ )

Per quanto riguarda i campioni di saliva, abbiamo rilevato la presenza di DNA di herpesvirus nel 57% (17/30) dei soggetti HIV+ e nel 90% (18/20) dei soggetti del gruppo di controllo. Anche questa differenza è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; figura 2).



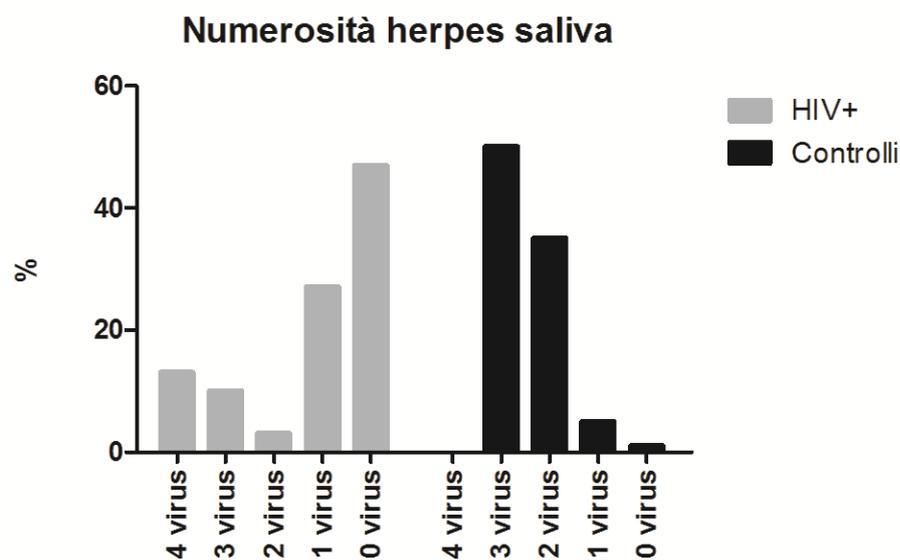
**Figura 3: percentuale di positività per la ricerca del DNA degli herpesvirus linfotropi in campioni di plasma e saliva provenienti dai pazienti HIV+ (in grigio) e dai controlli (in nero)**

Nei campioni di saliva di entrambe i gruppi abbiamo osservato la contemporanea presenza di più herpesvirus. La distribuzione della numerosità delle specie virali rilevate per ciascun campione di saliva differisce significativamente tra il gruppo dei pazienti HIV+ ed i controlli ( $p < 0,0001$ ; figura 4)

Analizzando i dati per ciascun herpesvirus abbiamo evidenziato i seguenti risultati:

**HHV6:** la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma del 10% (3/30) dei soggetti HIV+ e nel 5% (1/20) dei controlli. Tale differenza non è statisticamente significativa. Nei campioni di saliva il DNA di HHV6 è stato rilevato nel 47% (14/30) dei soggetti HIV+ e nel 85% (17/20) dei controlli. Tale differenza mostrava una significatività statistica ( $p=0,008$ ).

**HHV7:** Nessuno dei campioni di plasma analizzati, provenienti sia dai pazienti HIV positivi sia dai controlli, ha mostrato la presenza del DNA di questo virus. Nei campioni di saliva il DNA di HHV7 è stato rilevato nel 30% (9/30) dei soggetti HIV+ e nel 85% (17/20) dei controlli. Tale differenza mostrava una significatività statistica ( $p<0,001$ ).



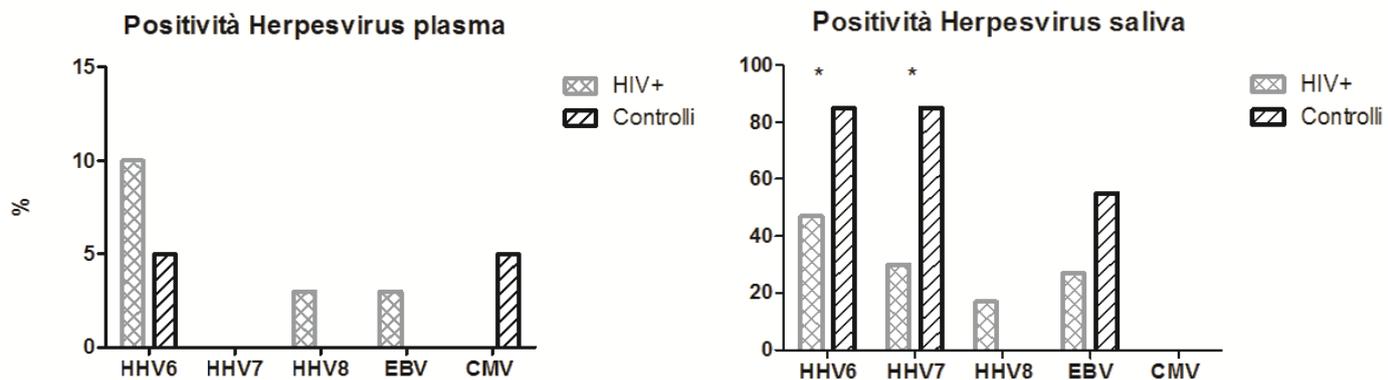
**Figura 4: percentuale di positività contemporanea per il DNA di 0,1,2,3 o 4 herpesvirus linfotropi nei campioni di saliva provenienti dai pazienti HIV+ e dai controlli**

**HHV8:** la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma del 3% (1/30) dei soggetti HIV+ e in nessuno dei controlli. Tale differenza non è statisticamente significativa. Nei campioni di saliva il DNA di HHV8 è stato rilevato nel 17% (5/30) dei soggetti HIV+ ed in nessun campione proveniente dal gruppo di controllo. Tale differenza non raggiunge la significatività statistica ( $p=0,14$ ) ma è evidente una tendenza verso la significatività che potrebbe essere raggiunta ampliando le dimensioni del campione (se viene utilizzato il test F di Fisher ad una coda, assumendo quindi l'ipotesi che la differenza possa andare verso una sola direzione, la  $p$  è uguale a 0.07).

**EBV:** la presenza del DNA di questo herpesvirus è stata dimostrata nel plasma del 17% (5/30) dei soggetti HIV+ ed in nessuno dei controlli. Nei campioni di saliva il DNA di EBV è stato rilevato nel

27% (8/30) dei soggetti HIV+ e nel 55% (11/20) dei controlli. Tali differenze non raggiungono la significatività statistica.

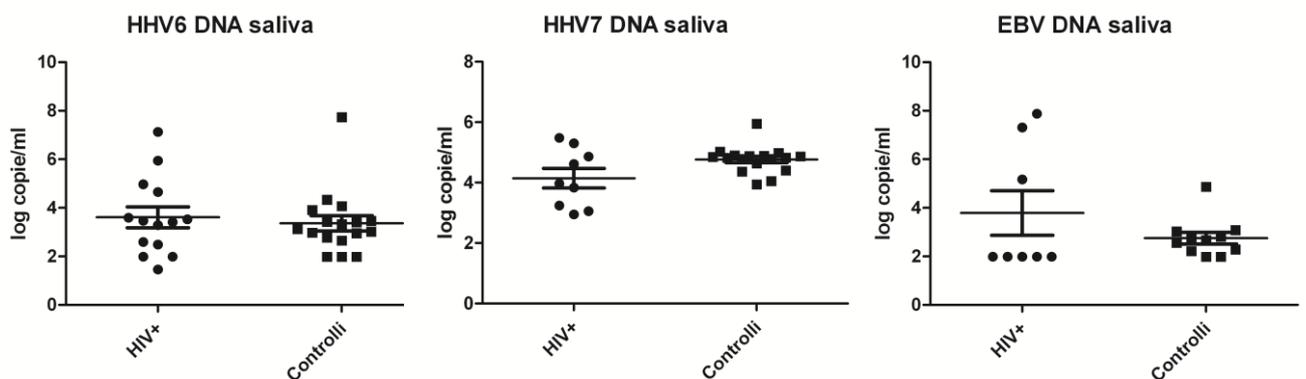
CMV: la presenza del DNA di questo virus è stata dimostrata nel plasma di un solo soggetto appartenente al gruppo dei controlli (5%, 1/20) mentre i campioni di plasma provenienti dal gruppo dei soggetti HIV+ ed i campioni di saliva provenienti dai due gruppi sono risultati tutti negativi (figura 5).



**Figura 5: percentuale di positività di HHV6-, HHV7-, HHV8-, EBV- e CMV-DNA sui campioni di plasma e saliva nel gruppo HIV+ e nei controlli**

In riferimento alle cariche virali osservate, i valori di HHV6-DNA plasmatici rilevati nei 3 pazienti HIV+ sono risultati superiori al corrispondente valore plasmatico dell'unico soggetto del gruppo di controllo risultato HHV6-DNA positivo (3.76 log<sub>10</sub> , 2.09 log<sub>10</sub> e 4.06 log<sub>10</sub> vs 1.99 log<sub>10</sub>, rispettivamente). L'esiguità dei numeri non ci ha permesso di effettuare delle comparazioni statistiche. Per quanto riguarda i campioni di saliva il confronto delle cariche virali nel gruppo dei soggetti HIV+ rispetto al gruppo di controllo non ha evidenziato differenze statisticamente significative (HIV+: 3.6 ± 1.6 log<sub>10</sub>; controlli: 3.4 ± 1.3 log<sub>10</sub>, p=0.6). Dobbiamo precisare comunque che in un sottogruppo dei soggetti HIV+ (4 pazienti) si sono registrati valori di HHV6-DNA superiori a 4.5 log<sub>10</sub> (di cui due associati alla concomitante presenza di positività plasmatica), mentre un solo soggetto del gruppo di controllo ha mostrato valori superiori a 4.5 log<sub>10</sub>. Anche in questo soggetto era contemporaneamente presente una positività plasmatica per HHV6-DNA. Nessuno dei soggetti esaminati, sia HIV+ sia controlli, ha mostrato una carica virale plasmatica rilevabile di HHV7, come precedentemente indicato. Confrontando i livelli di carica di HHV7-DNA nella saliva dei soggetti dei due gruppi non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative nei valori medi (HIV+: 4.14 ± 0.9 log<sub>10</sub>; controlli: 4.8 ± 0.4 log<sub>10</sub>, p=0.1) anche se la distribuzione dei valori di carica virale aveva una varianza maggiore nel gruppo dei soggetti HIV+ rispetto al gruppo di controllo (p<0.01, vedi

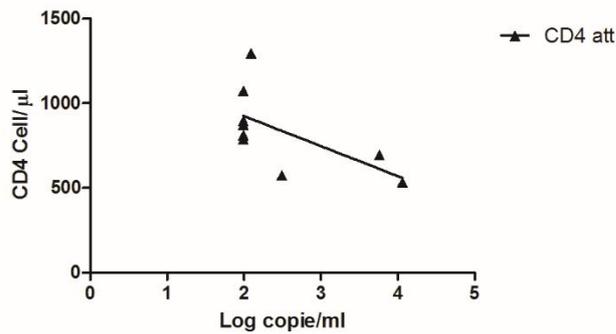
figura 6). Come precedentemente osservato il DNA di HHV8 è stato rilevato nel plasma di un solo soggetto HIV positivo con una carica di  $2.49 \log_{10}$  e nella saliva di 5 soggetti HIV positivi, di cui 2 al di sotto del limite di quantificazione della metodica e tre con valori pari a  $2.64 \log_{10}$ ,  $4.01 \log_{10}$  e  $3.15 \log_{10}$ . Per quanto riguarda EBV nessuno dei controlli ha mostrato la presenza di DNA a livello plasmatico, mentre 5 soggetti HIV+ sono risultati EBV-DNA positivi a livello plasmatico, con cariche virali al di sopra del limite di detezione della metodica utilizzata, ma inferiori al limite di quantificazione. Per i campioni di saliva non si sono osservate differenze statisticamente significative nei due gruppi per quanto riguarda i valori di EBV-DNA (HIV+:  $3.8 \pm 2.6 \log_{10}$ ; controlli:  $2.75 \pm 0.8 \log_{10}$ ,  $p=0.6$ ). Tutti i campioni esaminati sono risultati negativi per la ricerca di CMV ad eccezione del plasma di un soggetto proveniente dal gruppo dei controlli sani, con carica al di sotto del limite di quantificazione della metodica.



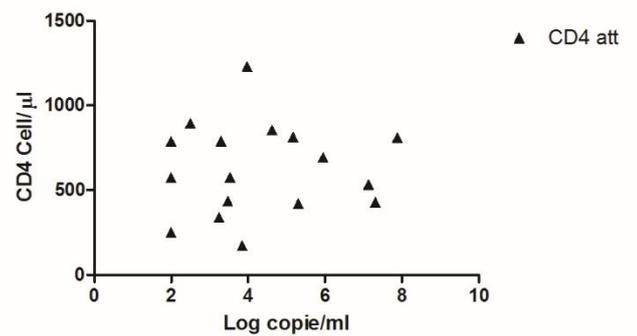
**Figura 6: confronto fra i valori di carica virale di HHV6, HHV7 ed EBV nei campioni di saliva provenienti dal gruppo dei pazienti HIV+ e dei controlli**

Nell'ambito dei soggetti HIV+, correlando i dati della carica virale degli herpesvirus con la conta dei linfociti T CD4+ misurata al nadir ed al momento della raccolta dei campioni, non abbiamo rilevato alcuna differenza statisticamente significativa, anche se abbiamo osservato una tendenza verso l'aumento della carica plasmatica del DNA virale inversamente proporzionale al numero assoluto dei linfociti T CD4+ (Spearman  $r=-0.6$   $p=0,09$ ). Tale tendenza non è stata osservata per le cariche virali registrate nei campioni di saliva (Spearman  $r=0,08$   $p=0,8$ ). (figura 7)

Relazione tra CD4 attuali e HHV-DNA plasma



Relazione tra CD4 attuali e HHV-DNA saliva



**Figura 7: relazione tra i livelli di HHV-DNA e il valore assoluto dei linfociti T CD4+ relativamente ai campioni di plasma e saliva: nel primo caso osserviamo una relazione inversa tra i valori di HHV-DNA e la conta dei linfociti T CD4+ (Spearman, p=0.08)**

Prendendo in esame la variazione assoluta dei linfociti T CD4 (delta CD4 # : differenza tra il valore assoluto dei linfociti T CD4+ al momento della raccolta dei campioni di plasma e saliva meno il valore dei linfociti T CD4+ misurato sei mesi prima) abbiamo osservato come il valore del delta fosse più basso e spesso di segno negativo nei soggetti in cui il DNA degli Herpesvirus linfotropi non era stato rilevato né sui campioni di plasma né su quelli di saliva. (tabella 8)

	HHV+	HHV+ pl	HHV+ sal	HHV 6/7	HHV-
Delta CD4 # cell/µl	55.5 [-45, 108]	74 [-6, 205]	33.5 [-63, 67]	55 [-54, 74]	-44 [-280, 0]
Mediana [IQR]					

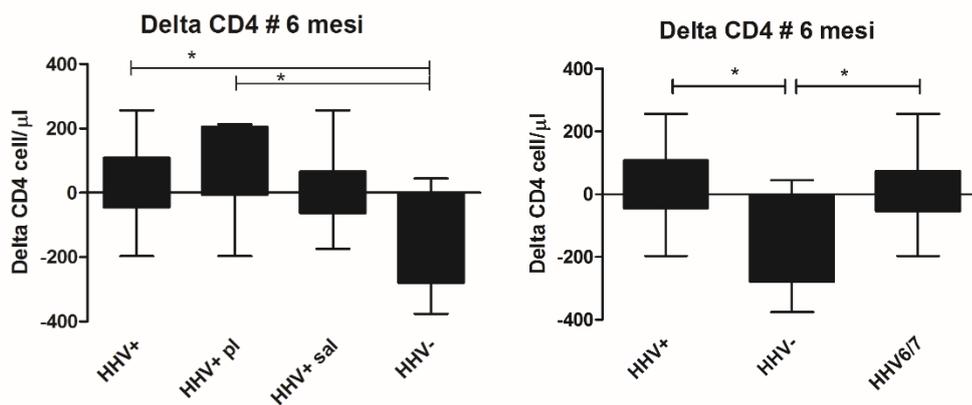
**Tabella 8: valori del delta CD4 nei diversi gruppi di soggetti HIV+. HHV+: soggetti HIV+ risultati positivi per la ricerca del DNA di almeno un Herpesvirus in almeno uno dei due campioni esaminati; HHV+ pl: soggetti HIV+ con presenza del DNA di Herpesvirus in campioni di plasma; HHV+ sal: soggetti HIV+ con presenza di DNA di herpesvirus soltanto su campioni di saliva. HHV6/7: soggetti HIV+ con positività plasmatica e/o salivare per HHV6 e/o HHV7. HHV-: soggetti in cui non è stata evidenziata la presenza di DNA di herpesvirus né su plasma né sulla saliva; IQR: range interquartile [1°-3° quartile]**

Tale differenza è risultata statisticamente significativa quando abbiamo comparato questo gruppo con quello dei soggetti risultati positivi per la ricerca di herpesvirus linfotropi su almeno un campione di plasma o di saliva (HHV+) con una p=0.01 e con i soggetti positivi su campioni di plasma (HHV+ pl), con p=0.01. La differenza non ha raggiunto la significatività statistica nei soggetti con infezione da HIV risultati positivi per herpesvirus soltanto sui campioni di saliva (HHV+ sal), con p=0,07. La differenza rimane statisticamente significativa anche se prendiamo in considerazione i soggetti con positività per HHV6 e/o HHV7 sui campioni di plasma e/o salivale (p=0.02). A questo proposito dobbiamo evidenziare come la maggior parte dei soggetti HHV+ sia in realtà HHV6 e/o

HHV7 positivo, ad eccezione di pochissimi casi (2 soggetti) in cui è stata rilevata la presenza del solo EBV. (figura 8)

Anche in termini percentuali abbiamo riscontrato un ridotto incremento dei linfociti T CD4+ nei soggetti negativi alla ricerca del DNA degli herpesvirus. In questo caso però la differenza con gli altri gruppi non è risultata essere statisticamente significativa. (figura 8)

In tutte le analisi relative al delta dei CD4, abbiamo escluso i tre pazienti con HIV-RNA non soppresso, per limitare la presenza di fattori confondenti che potessero influenzare la conta dei linfociti T CD4+.



**Figura 8: confronto della variazione assoluta dei linfociti T CD4+ (Delta CD4 #) nei soggetti HIV+ HHV-, rispetto ai soggetti HIV+HHV+: p=0,01; ai soggetti HIV+ HHV+ pl: p=0,01; ai soggetti HIV+ HHV+ sal: p=0,07 ed ai soggetti HIV+ HHV6/7 p=0.01**

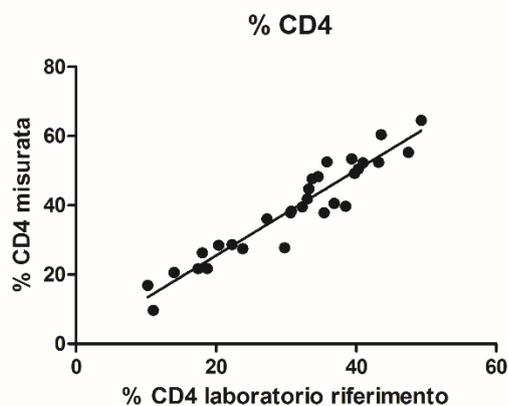
Abbiamo valutato anche il delta dei CD4 calcolato come differenza tra il numero dei CD4 al momento della raccolta dei campioni di plasma e saliva ed il valore dei CD4 al nadir. Non abbiamo individuato alcuna differenza statisticamente significativa tra i vari sottogruppi.

## 7.4 Risultati immunologici

Per ciascun soggetto abbiamo valutato, mediante la metodica di citometria a flusso, lo stato di attivazione (attraverso i marcatori di superficie CD38 e HLA-DR), la senescenza (con i marcatori di superficie CD28 e CD57), e lo stato maturativo (con i marcatori CD27 ed CD45RO) dei linfociti T CD4+ e CD8+. Sono stati esclusi i pazienti con una carica di HIV-RNA rilevabile al momento della raccolta dei campioni per evitare fattori confondenti legati alla replicazione di HIV.

### a) Immunoattivazione

Considerato globalmente, il campione dei soggetti HIV+ ha mostrato valori di conta dei linfociti T CD4+ significativamente inferiori rispetto ai controlli sani (valori percentuali:  $40.4 \pm 13.6$  vs  $58.0 \pm 7.8$ ,  $p < 0.0001$ ) e contemporaneamente valori di linfociti T CD8+ più elevati ( $52.9 \pm 13.9$  vs  $30.2 \pm 6.6$ ,  $p < 0.0001$ ). Abbiamo inoltre confrontato la metodica di analisi dei linfociti T CD4+ utilizzata presso il nostro laboratorio con la numerazione standard effettuata presso il laboratorio di riferimento per la conta delle sottopopolazioni linfocitarie, con un'ottima correlazione ed una retta di regressione lineare con "slope" pari a 1.2 e intercetta sull'asse y pari a 0.9 (Spearman  $r = 0.95$   $p < 0.0001$ ;  $r^2 = 0.9$ ,  $p < 0.0001$ ). (figura 9)



**Figura 9: confronto tra la percentuale dei linfociti T CD4+ misurata nel laboratorio di riferimento con la misurazione effettuata nel nostro laboratorio**

Nel gruppo dei soggetti HIV+ abbiamo rilevato valori di attivazione del sistema immunitario più elevati rispetto al campione di controllo. La differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa sia considerando la percentuale dei linfociti T CD4+ e T CD8+ doppi positivi per HLA-DR e CD38, sia considerando i singoli positivi per HLA-DR (HLA-DR+CD38-) e tutte le cellule positive

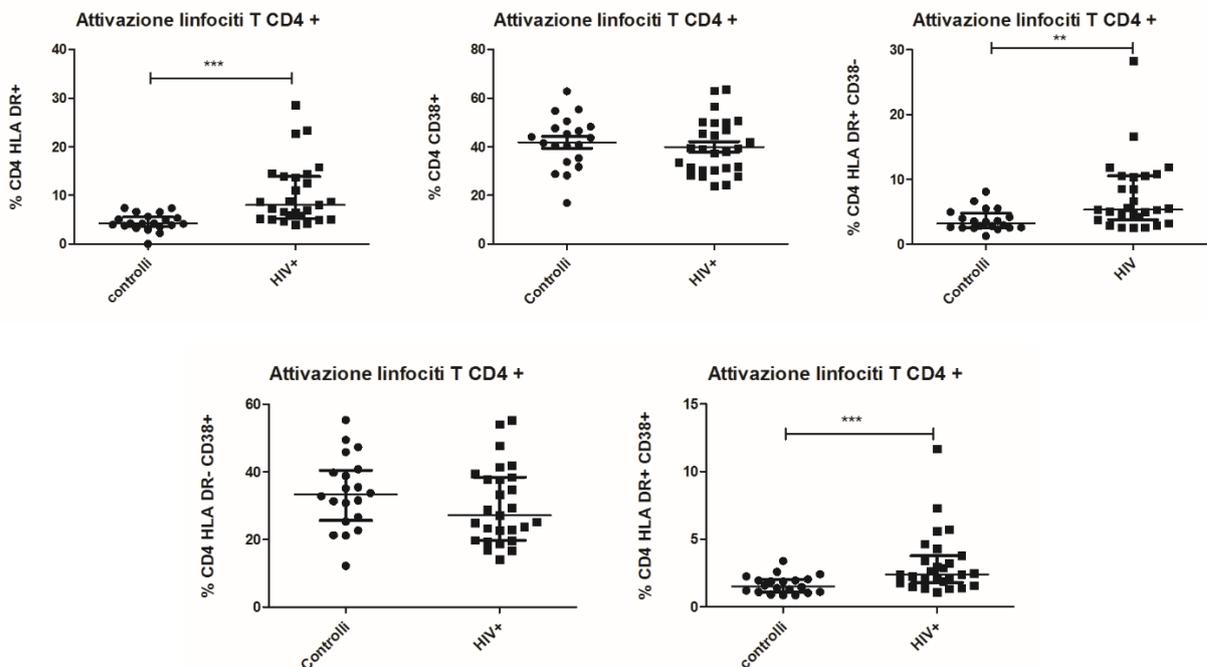
per HLA-DR indipendentemente dall'espressione dell'antigene di superficie CD38 (HLA-DR+).  
(tabelle 9-10, figure 10-11).

Attivazione CD4	HLA-DR+	CD38+	HLA-DR+CD38-	HLA-DR-CD38+	HLA-DR+CD38+
<b>HIV+</b>	8.0 [5.2-13.9]	39.0 [30.4- 49.9]	5.3 [3.8-10.5]	27.1[19.8-38.4]	2.4 [1.8-3.8]
<b>Controlli</b>	4.3 [3.6-5.6]	42.65 [34.1-48.0]	3.2 [2.6-4.8]	33.3 [25.6-40.5]	1.5 [1.1-2.0]
<b>p</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.4	<b>0.001</b>	0.2	<b>&lt;0.001</b>

**Tabella 9: livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD4 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I dati riportati sono espressi in forma di mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]**

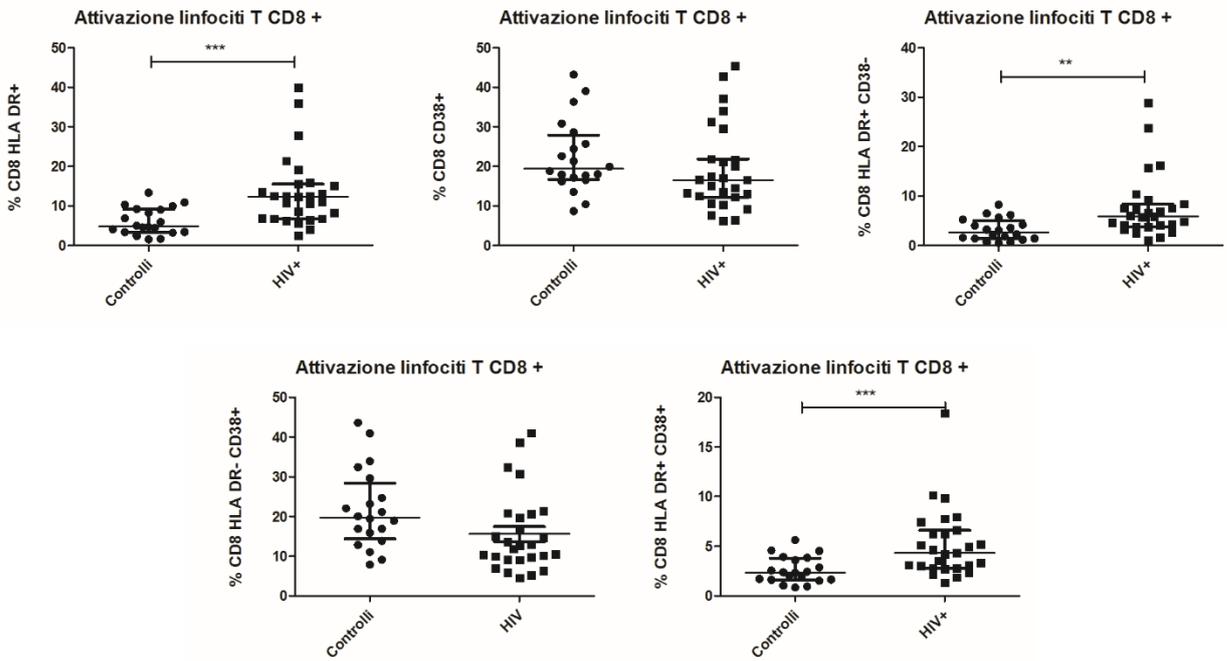
Attivazione CD8	HLA-DR+	CD38+	HLA-DR+CD38-	HLA-DR-CD38+	HLA-DR+CD38+
<b>HIV+</b>	12.3 [6.8-15.5]	16.5 [12.2- 21.9]	5.9 [3.8-8.4]	12.7 [9.1-20.5]	4.3 [2.8-6.6]
<b>Controlli</b>	4.8 [3.4-9.2]	19.35 [16.7-27.9]	2.7 [1.3-5.0]	19.7 [14.5-28.4]	2.4 [1.6-3.8]
<b>p</b>	<b>0.0003</b>	0.1	<b>0.005</b>	0.05	<b>0.0008</b>

**Tabella 10: livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD8 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I dati riportati sono espressi in forma di mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]**



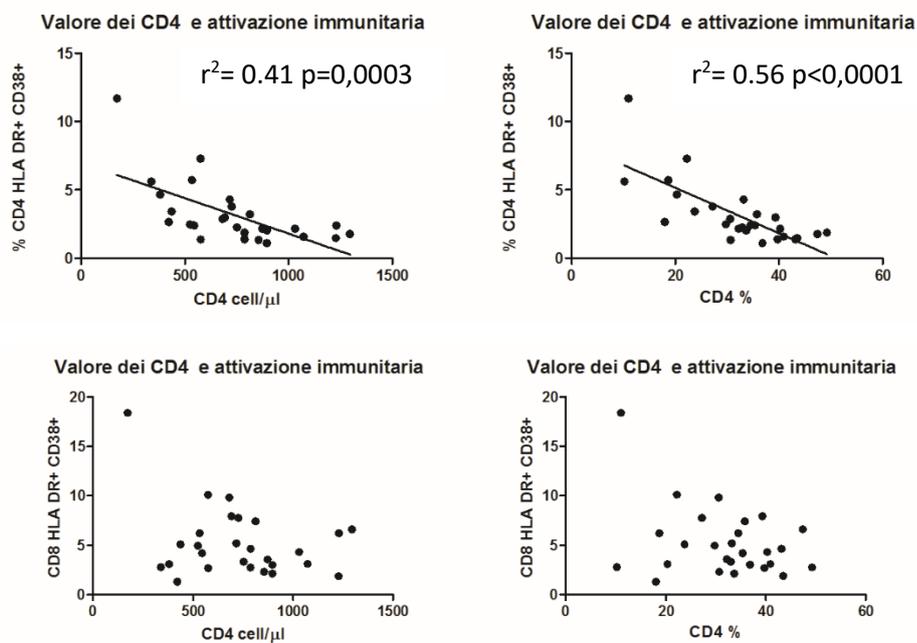
**Figura 10: confronto tra i livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD4 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani**

Abbiamo inoltre riscontrato una correlazione inversa, statisticamente significativa, tra il numero dei linfociti T CD4+ (sia in termini percentuali che assoluti) ed i loro livelli di attivazione (Spearman  $r = -0.7$ ,  $p < 0.0001$  considerando la % dei CD4, Spearman  $r = -0.6$ ,  $p < 0.0003$  considerando il valore



**Figura 11: confronto tra i livelli di immunizzazione dei linfociti T CD8 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani**

assoluto dei CD4). In particolare la percentuale di linfociti T CD4+ HLA-DR+CD38+ è risultata essere il parametro meglio correlato con i livelli percentuali dei linfociti T CD4+ ( $R^2=0.56$ ,  $p<0.0001$ ). Non é stata rilevata alcuna associazione statisticamente significativa tra i livelli di attivazione immunitaria dei linfociti T CD8+ con il numero dei linfociti T CD4+. (figura 12)



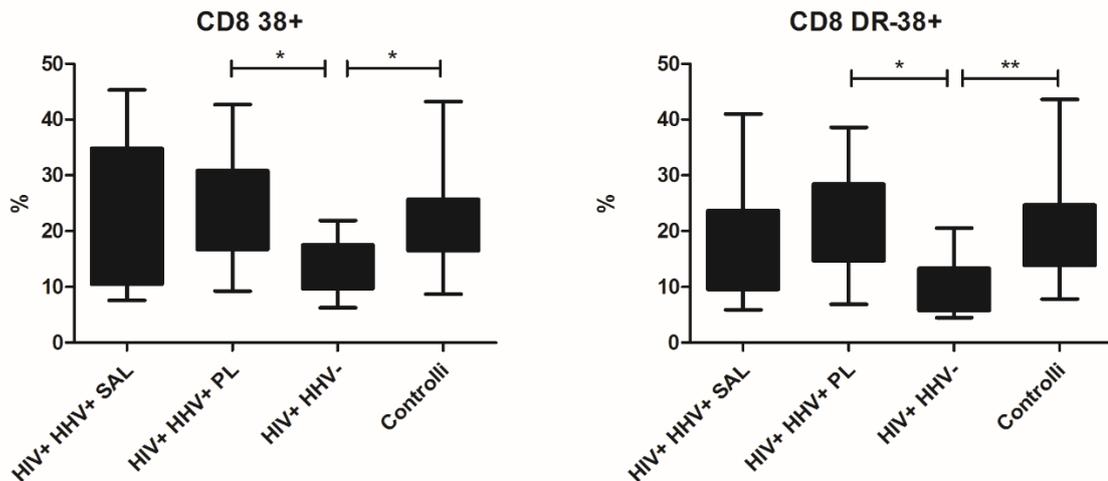
**Figura 12: relazione tra il livello dei CD4 (valore assoluto e percentuale) con l'attivazione dei linfociti T CD4+ e CD8+**

Stratificando i pazienti HIV+ sulla base dell'isolamento del DNA di herpesvirus abbiamo individuato tre gruppi: soggetti HIV+ senza isolamento di DNA di herpesvirus (HIV+ HHV-), soggetti HIV+ con isolamento di herpesvirus nei campioni di plasma (HIV+ HHV+ pl) e soggetti HIV+ con isolamento di herpesvirus su campioni di saliva (HIV+ HHV+ sal). I tre gruppi sono risultati omogenei per quanto riguarda l'età, il numero dei CD4 al momento dell'arruolamento ed il nadir dei CD4. (tabella 11)

	età	CD4 nadir	CD4 attuali #	CD4 attuali %
<b>HIV+ HHV+ pl</b>	57 [39.5-61.3]	365 [38-681]	831 [605-1030]	36.5 [24.8-45.8]
<b>HIV+ HHV+ sal</b>	47.5 [39.3-55.0]	300 [249-553]	576 [381-835]	30.7 [14.5-37.8]
<b>HIV+ HHV-</b>	52.5 [43.8-59.0]	164 [113-402]	722 [540-931]	33.1 [29.2-37.7]

**Tabella 11: confronto dell'età, CD4 nadir ed attuali dei soggetti HIV+ con presenza di DNA virale nei campioni di plasma (HIV+HHV+ pl), nei campioni di saliva (HIV+HHV+ sal) e senza isolamento di DNA di herpes (HIV+HHV-)**

Confrontando questi tre gruppi non abbiamo individuato differenze statisticamente significative per quanto concerne i livelli di attivazione immunitaria nei linfociti T CD4+, qualunque fosse la combinazione dei marcatori di attivazione utilizzata (HLA-DR+CD38+, HLA-DR+CD38-, HLA-DR-CD38+, HLA-DR+, CD38+); per quanto concerne i linfociti T CD8+ abbiamo notato come il marcatore di attivazione CD38 fosse maggiormente espresso nel gruppo di pazienti HIV+ HHV+ pl rispetto ai soggetti HIV+ HHV- (mediana [25°-75° quartile] dei CD8 CD38+: 21.4% [16.6%-30.9%] vs 14.1% [11.3%-17.8], rispettivamente con p=0.03; CD8 HLA-DR-CD38+: 18,1 [12.6%-28.4%] vs 10,1 [6.1%-13.9%] con p=0.02), mentre tale evidenza non è stata riscontrata per i soggetti HIV+ HHV+ sal (mediana [25°-75° quartile] CD8 CD38+: 14.5% [10.5%-34.8%] vs 14.1% [11.3%-17.8], rispettivamente con p=0.7; CD8 HLA-DR-CD38+: 11,2 [9.6%-23.7%] vs 10,1 [6.1%-13.9%], con p=0.4). Inoltre abbiamo notato come la percentuale dei linfociti T CD8+ esprimenti il CD38 fosse ridotta in maniera statisticamente significativa nel gruppo dei soggetti HIV+ HHV- rispetto ai controlli sani (Mediana [25°-75° quartile] CD8 CD38+: vs 14.1% [11.3%-17.8] vs 18.8% [16.5%-25.7%], rispettivamente con p=0.01; Mediana CD8 HLA-DR-CD38+: vs 10,1 [6.1%-13.9%] vs 19,4% [13.8%-24.7%] con p=0.003). (figura 13)



**Figura 13: confronto tra le percentuali di linfociti T CD8+ CD38+ e CD8+ HLA-DR-CD38+ nei soggetti HIV+ con positività per DNA di herpesvirus salivare (HIV+HHV+ sal), plasmatica (HIV+HHV+ pl), HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-) e nei controlli sani (controlli)**

L'analisi condotta considerando la positività plasmatica per singolo virus non ha evidenziato differenze significative tra i vari gruppi; questo è molto probabilmente dovuto al fatto che quando si considera la positività plasmatica per singolo virus il numero degli individui è esiguo. Nonostante ciò abbiamo riscontrato come i soggetti HIV+ con presenza di HHV6-DNA nel plasma mostrassero una percentuale di linfociti T CD8+ CD38+ aumentata rispetto ai soggetti HIV+HHV- (Mediana [25°-75° quartile] CD8 CD38+:21.7% [16.5%-42.7%] vs 14.1 [11.3%-17.8%], p=0.07). L'unico soggetto HIV+ con positività plasmatica per HHV8 ha mostrato una elevata percentuale di linfociti T CD8+ CD38+ (29,5%) ed elevati livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD4+ (CD4 HLA-DR+CD38+: 7.29%).

Abbiamo valutato il contributo di HHV6 ed HHV8 ai livelli di immunoattivazione, quando questi due virus erano presenti a livello plasmatico. Non abbiamo riscontrato variazioni per i livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD4+, mentre per i linfociti T CD8+ abbiamo osservato un aumento della percentuale delle cellule CD38+ rispetto ai soggetti HIV+ HHV-, con differenza statisticamente significativa (Mediana [25°-75° quartile] CD8 HLA-DR+CD38+: 7.2% [6.3%-9.5%] vs 4.2 [3.1%-5.8%], p=0.04; CD8 CD38+:25.6% [17.8%-39.4%] vs 14.1 [11.3%-17.8%], p=0.03). (figura 14)

Per quanto riguarda i campioni di saliva, non abbiamo potuto condurre un'analisi puntuale, per singolo virus, data la contemporanea presenza del DNA di più specie virali.

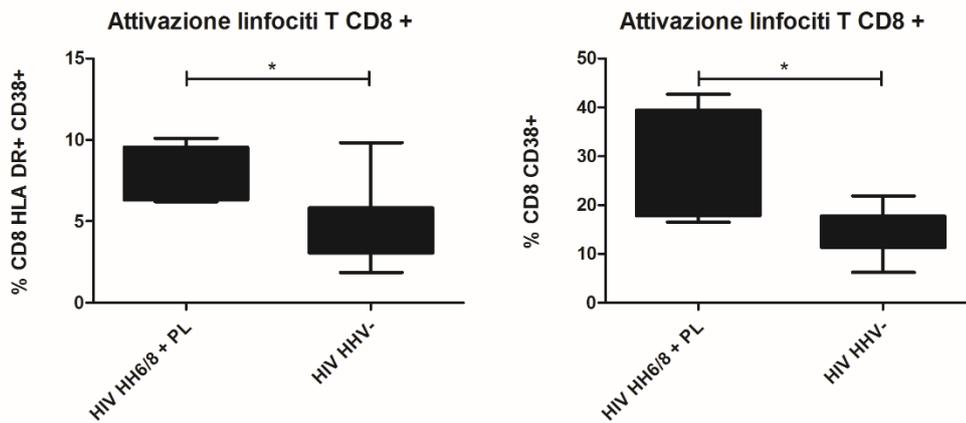


Figura 14: confronto tra le percentuali di linfociti T CD8+ HLA-DR+CD38+ nei soggetti HIV+ con presenza nel plasma di DNA di HHV6 e HHV8 (HIV+HHV6/8 pl) rispetto ai soggetti HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-)

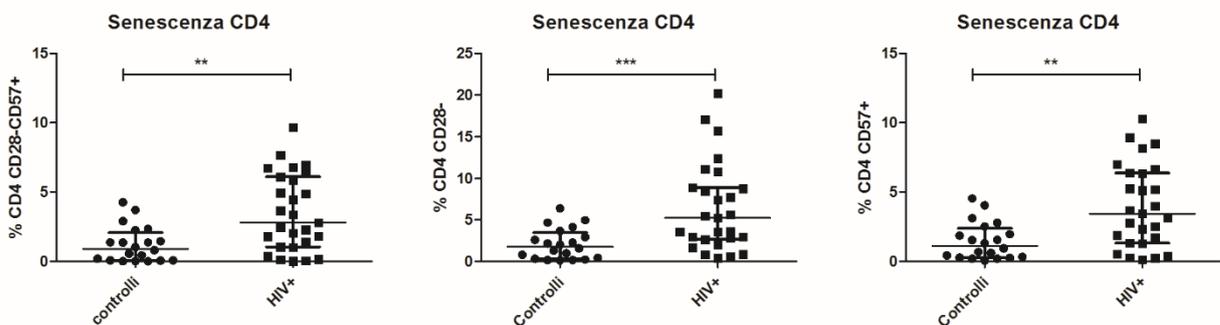
*b) Immunosenescenza*

L'invecchiamento del sistema immunitario è stato valutato attraverso l'espressione sui linfociti T CD4+ e T CD8+ degli antigeni di superficie CD28, la cui presenza è associata ad uno stato maturativo della cellula più precoce, e CD57, la cui presenza è associata ad una differenziazione cellulare in senso terminale.

Nel complesso abbiamo riscontrato valori di senescenza dei linfociti T CD4+ più elevati nei pazienti HIV+ rispetto ai controlli, sia valutando la popolazione CD4 CD28-CD57+, sia considerando l'espressione del CD28 (ridotta nei soggetti HIV+ rispetto ai controlli), sia quella del CD57 (aumentata nei soggetti HIV+ rispetto ai controlli). (tabella 12 e figura15)

Senescenza CD4	CD28-CD57+	CD28-	CD57+
<b>HIV+</b>	2.8 [1.1-6.1]	5.3 [2.7- 8.9]	3.5 [1.3-6.4]
<b>Controlli</b>	0.9 [0.1-2.1]	1.8 [0.4-3.5]	1.1 [0.3-2.4]
<b>P</b>	<b>0.002</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.003</b>

**Tabella 12: : livelli di senescenza dei linfociti T CD4 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I risultati sono riportati come mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]**



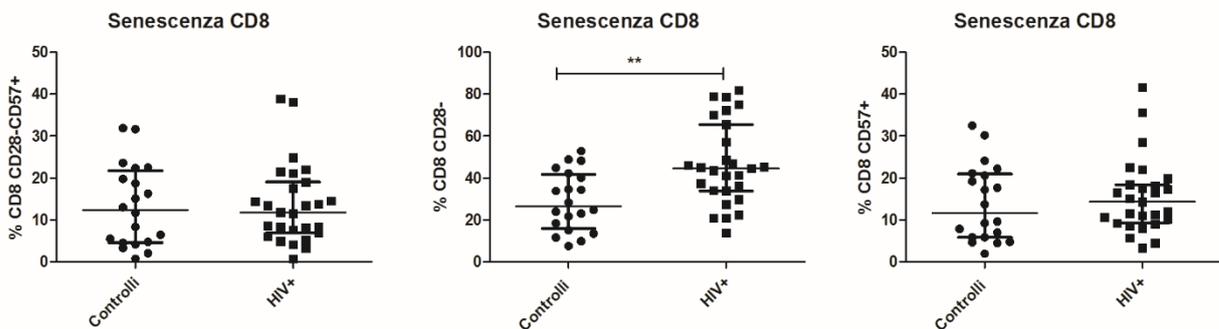
**Figura 15: confronto tra i livelli di senescenza dei linfociti T CD4 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani**

Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra l'età dei soggetti ed i relativi livelli di senescenza dei linfociti T CD4+

Per i linfociti T CD8+ abbiamo riscontrato una ridotta espressione del CD28 nei pazienti HIV+ rispetto ai controlli. Tale differenza è risultata statisticamente significativa. Non abbiamo riscontrato differenze nella percentuale delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ CD28-CD57+, né CD57+. (tabella 13 e figura 16).

Senescenza CD8	CD28-CD57+	CD28-	CD57+
<b>HIV+</b>	11.8 [7.0-19.0]	44.5 [33.9-65.5]	14.3 [9.2-18.4]
<b>Controlli</b>	12.35 [4.6-21.8]	26.6 [15.9- 41.8]	11.7 [5.9-21.0]
<b>p</b>	0.9	<b>0.004</b>	0.5

**Tabella 13 : livelli di senescenza dei linfociti T CD8 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I risultati sono riportati come mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]**

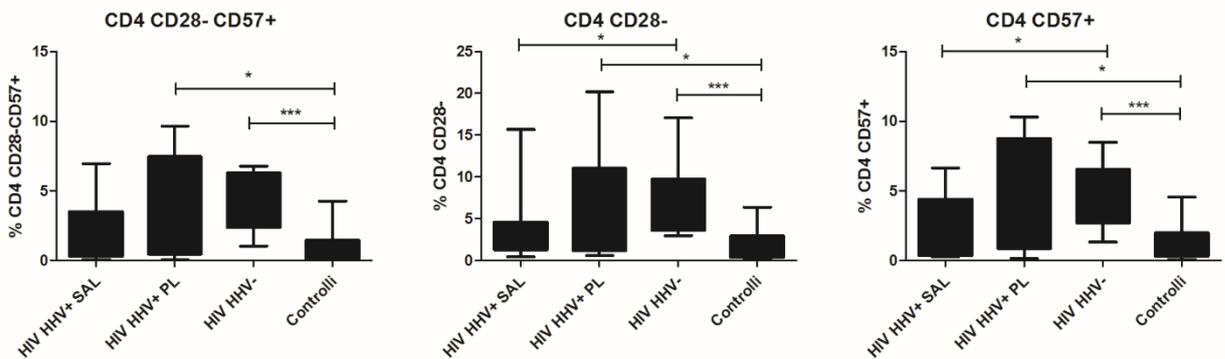


**Figura 16: confronto tra i livelli di senescenza dei linfociti T CD8 nei soggetti HIV+ e nei controlli sani**

Anche in questo caso non abbiamo riscontrato alcuna correlazione tra l'età dei soggetti ed i livelli di senescenza dei linfociti T CD8+.

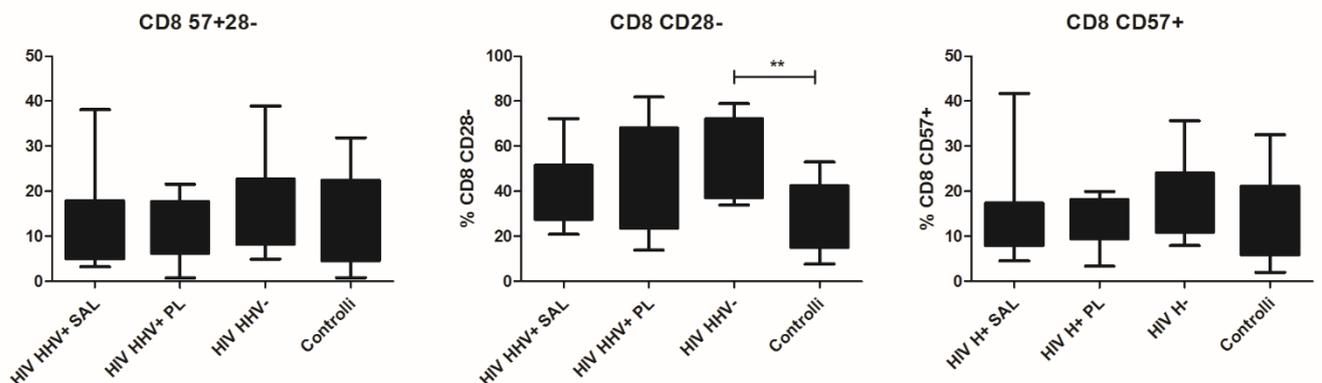
Come già mostrato per i risultati sull'immunoattivazione, abbiamo stratificato i soggetti HIV positivi sulla base dell'assenza del DNA virale di herpesvirus nei campioni esaminati (HIV+ HHV-) o sulla sua presenza nei campioni di plasma (HIV+ HHV+ pl) o saliva (HIV+ HHV+ sal). Considerando i soggetti HIV+HHV+sal abbiamo riscontrato valori di immunosenescenza prossimi a quelli dei controlli sani. Nei gruppi HIV+HHV+ pl e HIV+ HHV- si sono riscontrati livelli di senescenza più elevati rispetto al campione di controllo, in linea con quanto ottenuto nella valutazione globale. Di seguito riportiamo i valori misurati dei linfociti T CD4+ CD28-CD57+, espressi come mediana [25°-75° quartile]: HIV+ HHV+ sal, 1.8% [0.4%-5.4%], p=0.1; HIV+ HHV+ pl 4.1% [0.5%-7.5%], p=0.04; HIV+ HHV-: 3.6% [2.4%-6.3%], p=0.0008; controlli: 0.8% [1.5%-4.3%]; per quanto riguarda i linfociti T CD4+ CD28-: HIV+ HHV+ sal, 2.9% [1.5%-6.9%], p=0.06; HIV+ HHV+ pl 6.5% [1.2%-11.0%], p=0.03; HIV+ HHV-: 7.9% [3.6%-9.8%], p=0.0002; controlli: 1,6% [0.4%-2.9%]; per il linfociti T CD4+ CD57+ abbiamo ottenuto i seguenti risultati: HIV+ HHV+ sal, 1.9% [0.4%-4.4%], p=0.3; HIV+ HHV+ pl 4.4% [0.9%-8.7%], p=0.05; HIV+ HHV-: 4.6% [2.7%-6.5%], p=0.0006; controlli: 1.0% [0.3%-2.0%]

Abbiamo poi riscontrato una percentuale ridotta di linfociti T CD4+CD28- e CD4+CD57+ nel gruppo HIV+ HHV+ sal rispetto al gruppo HIV+ HHV-, con una differenza statisticamente significativa (mediana [25°-75° quartile] dei CD4 CD28-: 2.9% [1.5%-6.9%] vs 7,9% [3.6%-9.8%], p=0.04; mediana [25°-75° quartile] dei CD4 CD57+: 1.9% [0.4%-4.4%] vs 4,6% [2.7%-6.5%], p=0.04 ) (figura 17).



**Figura 17: confronto dei livelli di senescenza dei linfociti T CD4+ nei soggetti HIV+ con riscontro di DNA di herpesvirus a livello salivare (HIV+HHV+ sal), plasmatico (HIV+HHV+ pl), HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-) e nei controlli sani (controlli)**

Per i linfociti T CD8+non abbiamo osservato alcuna differenza tra i vari gruppi ed i controlli, ad eccezione della sola popolazione dei CD8 CD28-, risultata più rappresentata nei soggetti HIV+HHV- rispetto ai controlli, come già evidenziato nella valutazione globale (mediana [25°-75° quartile]dei linfociti T CD8 CD28-: HIV+ HHV-: 47.6% [37.1%-72.1%] vs controlli: 24.7% [15.0%-42.3%], p=0.0017). Considerando il gruppo HIV+ HHV+ sal vediamo come la percentuale dei linfociti T CD8+ CD28- sia vicina a quella dei controlli, con una differenza che non ha più significatività statistica (mediana [25°-75° quartile]dei linfociti T CD8 CD28-: HIV+ HHV+ sal: 42.4% [27.6%-51.5%] vs controlli: 24.7% [15.0%-42.3%], p=0.07). (figura 18)



**Figura 18: confronto dei livelli di senescenza dei linfociti T CD8+ nei soggetti HIV+ con riscontro di DNA di herpesvirus a livello salivare (HIV+HHV+ sal), plasmatico (HIV+HHV+ pl), HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-) e nei controlli sani (controlli)**

Per quanto riguarda l'analisi condotta considerando la positività sui campioni di plasma per singolo virus non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative, anche se i soggetti con positività plasmatica per HHV6 mostravano valori di senescenza dei linfociti T CD8 più elevati rispetto ai soggetti HIV+ HHV-.

c) *Maturazione e differenziazione dei linfociti T*

Abbiamo studiato la distribuzione dei linfociti T CD4+ e CD8+ nelle varie forme fenotipiche di maturazione e differenziazione, attraverso l'espressione dei marcatori di superficie CD28 (proteina co-stimolatoria espressa nelle fasi maturative precoci dei linfociti T) e CD45RO (isoforma del CD45 espressa sui linfociti T memoria). In particolare per i linfociti T CD4 abbiamo individuato le seguenti sottopopolazioni: naïve (N, CD27+CD45RO-), central memory (CM, CD27+CD45RO+) effector memory (EM, CD27-CD45RO+) ed effector (E, CD27-CD45RO-). Per i linfociti T CD8+ oltre alle quattro fasi maturative indicate per i CD4 abbiamo preso in considerazione anche quei linfociti a fenotipo intermedio (I) che esprimevano bassi livelli di CD27 (CD27<sup>low</sup>) ma ancora non presentavano l'antigene di superficie CD45RO, rappresentando quindi una popolazione di linfociti T CD8+ appena entrata in contatto con l'antigene ed in fase di acquisire un fenotipo effettore. Di seguito una esemplificazione della strategia di analisi dei CD4 e dei CD8 adottata. (figura 19)

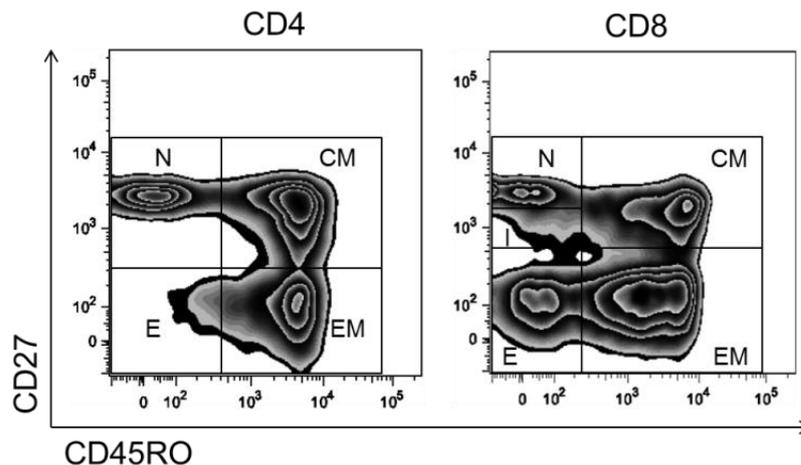


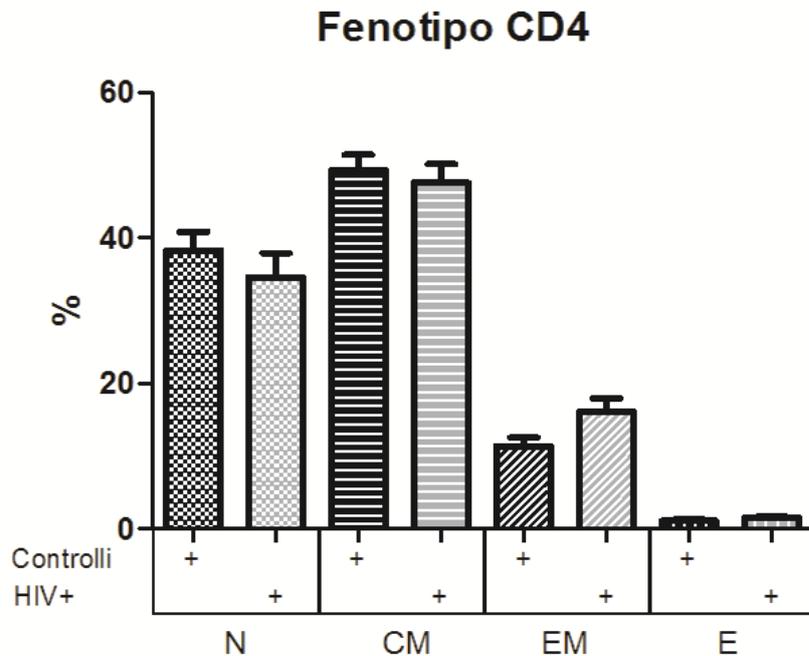
Figura 19: esempio di strategia di gating delle popolazioni naïve (N, CD27+CD45RO-), central memory (CM, CD27+CD45RO+) effector memory (EM, CD27-CD45RO+) ed effector (E, CD27-CD45RO-) ed intermedie (I, CD27<sup>low</sup>CD45RO-) per i linfociti T CD4+ e T CD8+

Riportiamo nella tabella 14, i valori delle percentuali delle sottopopolazioni dei linfociti T CD4+ osservate nei soggetti HIV positivi e nei controlli.

CD4	Naïve	Central memory (CM)	Effector memory (EM)	Effector (E)
<b>HIV+</b>	35,8 [19,3-49,0]	45,7 [37,4-57,8]	16,3 [8,9-19,1]	0,9 [0,3-2,6]
<b>Controlli</b>	36,7 [30,9-45,7]	49,4 [43,5-54,4]	10,1 [7,5-13,5]	0,8 [0,2-1,9]
<b>p</b>	0.4	0.5	0.06	0.5

Tabella 14 : percentuale delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I risultati sono riportati come mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]

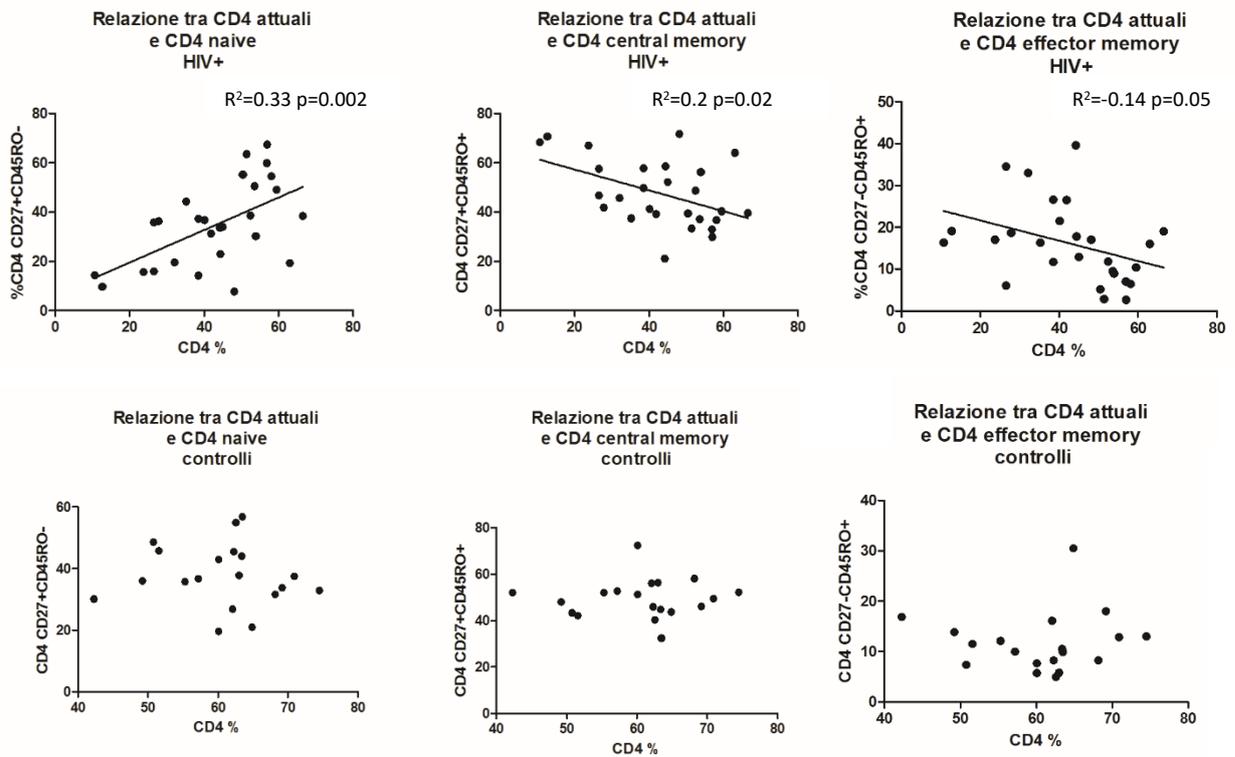
Non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative tra il gruppo dei soggetti HIV+ (considerati nella loro globalità ed escludendo i tre pazienti con HIV RNA rilevabile nel plasma) ed i controlli. Soltanto la percentuale dei linfociti T CD4+ CD28-CD45RO+ definiti effector memory è risultata leggermente più elevata nei soggetti HIV+ rispetto ai controlli, con una p ai limiti della significatività statistica (p=0.06). (figura 20)



**Figura 20: confronto tra soggetti HIV+ (in grigio) e controlli sani (in nero) delle percentuali delle popolazioni naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM) ed effector (E) per i linfociti T CD4+**

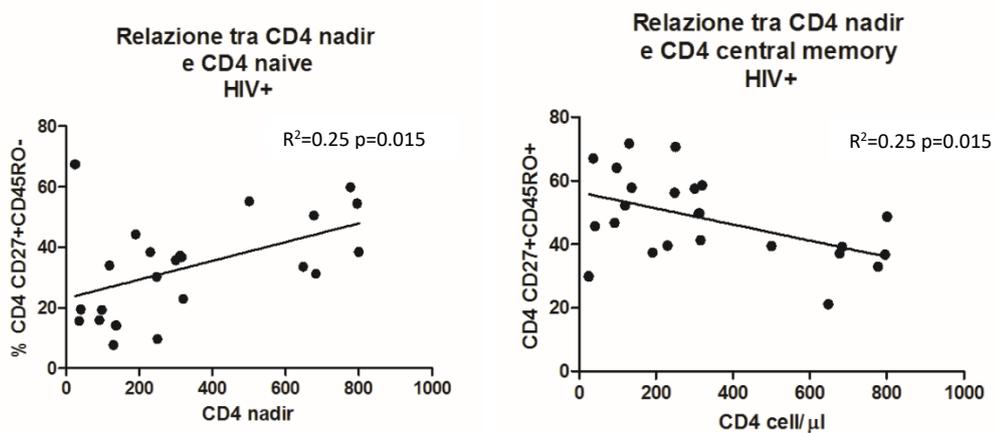
Abbiamo osservato come nei pazienti HIV+ la percentuale dei linfociti T CD4+ totali correlasse direttamente con la percentuale dei CD4 naïve (Spearman  $r=0.56$ ,  $p=0.002$ ; retta di regressione  $R^2=0.33$   $p=0.002$ ) ed inversamente con la percentuale di linfociti T CD4+ central memory (Spearman  $r=-0.44$ ,  $p=0.02$ ; retta di regressione  $R^2=0.2$   $p=0.015$ ) ed effector memory (Spearman  $r=-0.47$ ,  $p=0.012$ ; retta di regressione  $R^2=0.14$   $p=0.05$ ). In altre parole i soggetti con numero di CD4 più elevato presentavano una prevalenza dei linfociti T CD4+ naïve a discapito della popolazione central memory ed effector memory. Tali correlazioni non sono state riscontrate nei controlli sani. (figura 21)

Un altro dato interessante è rappresentato dal fatto che nei soggetti HIV+ abbiamo riscontrato che il nadir dei linfociti T CD4+ correla direttamente con il numero dei CD4 naïve (Spearman  $r=0.46$ ,  $p=0.028$ ; retta di regressione  $R^2=0.25$   $p=0.015$ ) ed inversamente con il numero dei CD4 central memory (Spearman  $r=-0.4$ ,  $p=0.06$ ; retta di regressione  $R^2=0.25$   $p=0.015$ ). (figura 22)



**Figura 21:** relazione tra il valore dei linfociti T CD4+ al momento della raccolta dei campioni (CD4 attuali) e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+ e controlli

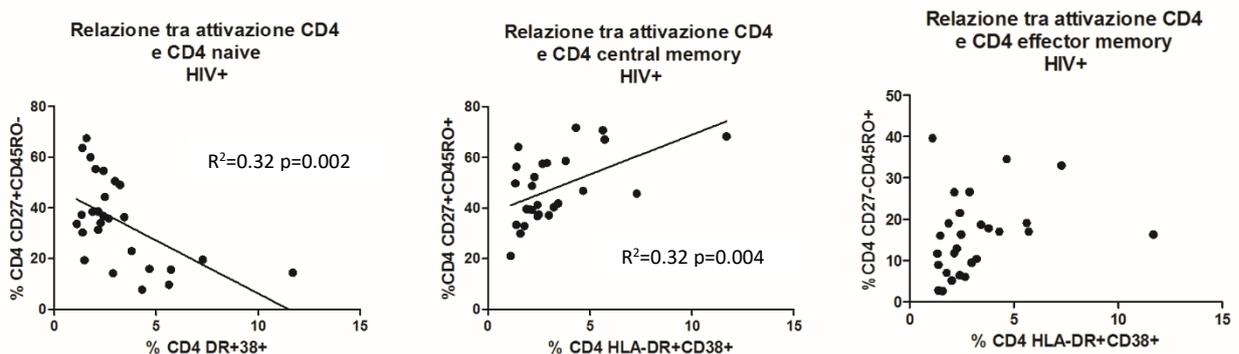
Vale a dire che quei soggetti con valori di nadir dei linfociti CD4 più bassi hanno poi una popolazione naïve più ridotta con una maggiore espansione della componente central memory.



**Figura 22:** relazione tra il valore dei linfociti T CD4+ nadir e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+.

Quindi i soggetti con bassi livelli del nadir e conta dei linfociti T CD4+, mostrano una prevalenza della componente central memory a discapito della componente naïve. Al contrario, soggetti con elevato nadir e buona conta dei CD4, mostrano una prevalenza della componente naïve.

Considerando i valori di attivazione immunitaria dei linfociti T CD4+ e confrontandoli con le sottopopolazioni dei linfociti T CD4 stessi, abbiamo riscontrato una correlazione inversa tra la percentuale di CD4 HLA-DR+CD38+ ed i linfociti T CD4+ naïve (Spearman  $r=-0.54$ ,  $p=0.003$ ; retta di regressione  $R^2=0.32$   $p=0.002$ ). Al contrario i livelli di attivazione correlavano direttamente con la percentuale di CD4 central memory (Spearman  $r=0.53$ ,  $p=0.005$ ; retta di regressione  $R^2=0.32$   $p=0.004$ ) e CD4 effector memory (Spearman  $r=0.4$ ,  $p=0.045$ ; retta di regressione  $R^2=0.07$   $p=0.17$ ). In sintesi i soggetti HIV+ con valori di attivazione dei CD4 più elevati mostrano una prevalenza del fenotipo central memory ed effector memory, a discapito delle cellule naïve. Questo andamento non è stato riscontrato nei controlli sani. (figura 23)



**Figura 23: relazione tra i livelli di attivazione dei linfociti T CD4+ e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+**

Per quanto riguarda la senescenza dei CD4, abbiamo riscontrato una correlazione diretta tra la percentuale di CD4 CD28-CD57+ e la percentuale di cellule con fenotipo effector memory (Spearman  $r=0.57$ ,  $p=0.002$ ; retta di regressione  $R^2=0.32$   $p=0.002$ ) ed effector (Spearman  $r=0.45$ ,  $p=0.018$ ; retta di regressione  $R^2=0.13$   $p=0.06$ ), espressione di una differenziazione terminale della cellula con esaurimento delle capacità replicative. Tale tendenza è stata osservata anche nei soggetti sani. (Spearman  $r=0.57$ ,  $p=0.01$ ; retta di regressione  $R^2=0.4$   $p=0.004$ ; Spearman  $r=0.37$ ,  $p=0.0006$ ; retta di regressione  $R^2=0.46$   $p=0.001$ ; rispettivamente per effector memory ed effector). (figura 24)

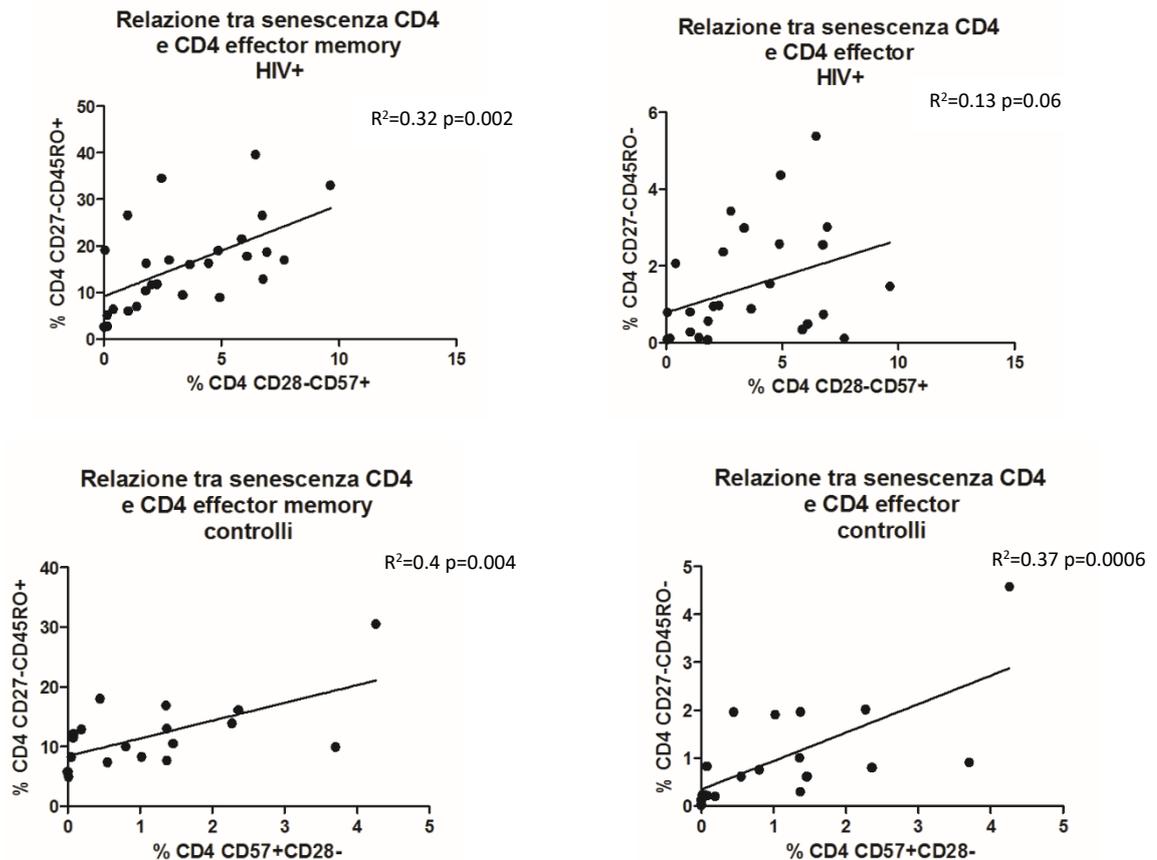


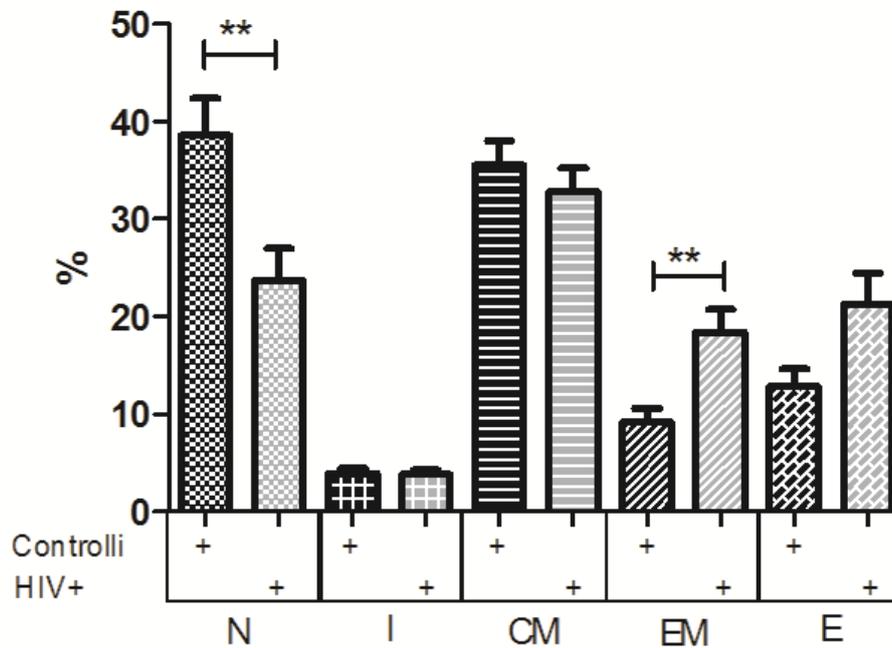
Figura 24: relazione tra i livelli di senescenza dei linfociti T CD4+ e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+ e controlli.

Per quanto riguarda i linfociti T CD8+, riportiamo nella tabella di seguito, i valori delle percentuali delle sottopopolazioni osservate nei soggetti HIV positivi e nei controlli. (tabella 15, figura25).

CD8	Naïve	Intermediate	Central memory (CM)	Effector memory (EM)	Effector (E)
<b>HIV+</b>	18,0 [8,8-34,0]	2,7[2,1-5,3]	31,9 [23,0-40,4]	15,9 [8,2-27,4]	16,0[11,3-27,6]
<b>Controlli</b>	36,1 [22,7-54,3]	3,5[2,1-4,3]	35,3 [27,9-38,5]	8,8 [3,8-11,9]	13,3[5,4-18,9]
<b>p</b>	<b>0.004</b>	0.7	0.3	<b>0.005</b>	0.08

Tabella 15 : percentuale delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ nei soggetti HIV+ e nei controlli sani. I risultati sono riportati come mediana [range interquartile tra 1°-3° quartile]

## Fenotipo CD8



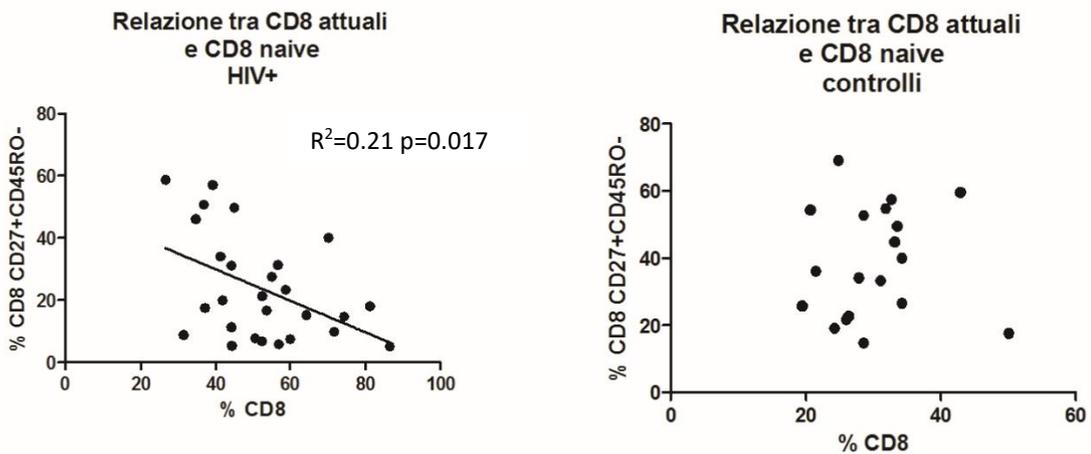
**Figura 25: confronto tra soggetti HIV+ (in grigio) e controlli sani (in nero) delle percentuali delle popolazioni naïve (N), intermediate (I), central memory (CM), effector memory (EM) ed effector (E) per i linfociti T CD8+**

Dai dati sopra riportati è evidente come nei soggetti HIV+ vi sia una espansione delle popolazioni CD8 con fenotipo più differenziato, a discapito delle cellule a fenotipo naïve, che conservano intatto il loro potenziale replicativo.

Abbiamo inoltre constatato che soltanto nei soggetti HIV+ l'aumento del numero dei CD8 correla inversamente con la percentuale delle cellule naïve (Spearman  $r=-0.43$ ,  $p=0.026$ ; retta di regressione  $R^2=0.21$   $p=0.017$ ). Quindi in quei soggetti con un elevato numero di linfociti T CD8+ la componente naïve è ridotta a discapito delle altre popolazioni con fenotipo più differenziato.

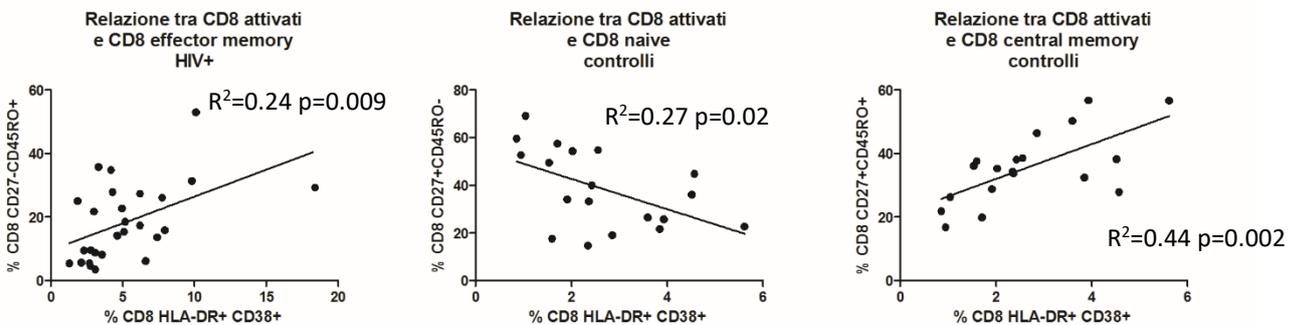
Non abbiamo riscontrato alcuna correlazione tra il valore del nadir dei linfociti T CD4+ e le percentuali delle varie sottopopolazioni di linfociti T CD8+. (figura 26)

Nei soggetti HIV+ abbiamo preso in considerazione i valori di attivazione immunitaria dei linfociti T CD8+ e li abbiamo confrontati con le relative sottopopolazioni: abbiamo riscontrato una correlazione diretta tra la percentuale di CD8 HLA-DR+CD38+ ed i linfociti T CD8+ effector memory (Spearman  $r=0.54$ ,  $p=0.003$ .; retta di regressione  $R^2=0.24$   $p=0.009$ ).



**Figura 26: relazione tra il valore dei linfociti T CD8+ al momento della raccolta dei campioni (CD8 attuali) e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+ e controlli.**

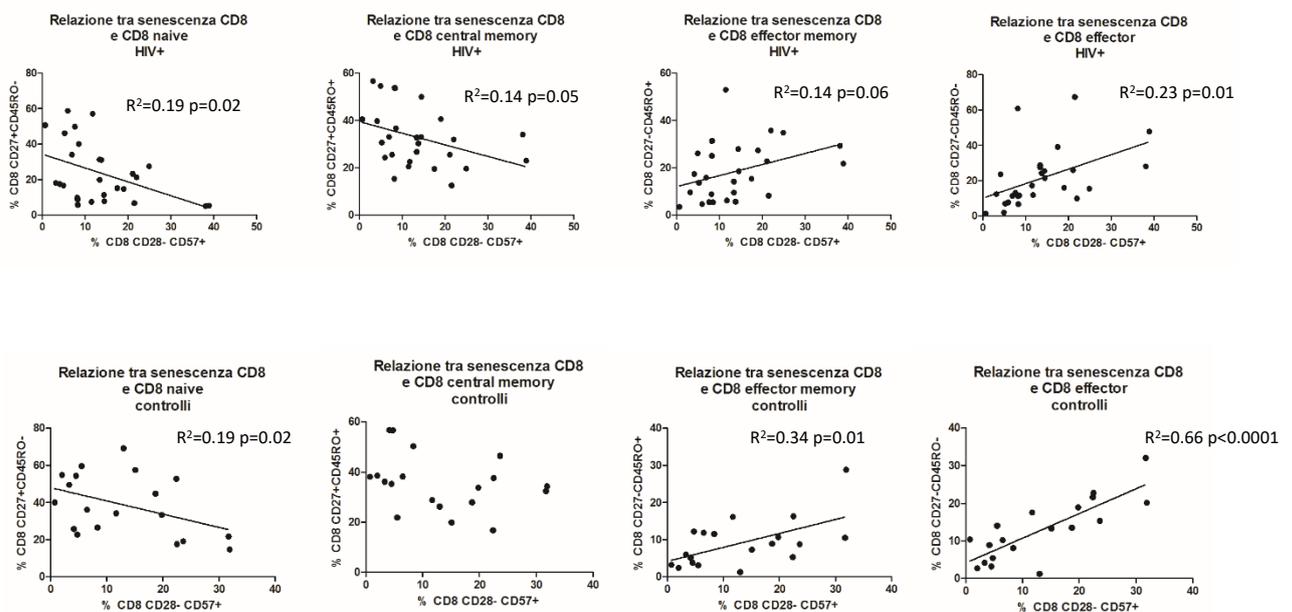
Nei soggetti sani invece abbiamo evidenziato come l'aumento dei livelli di attivazione dei linfociti T CD8 fosse correlato inversamente con la percentuale della popolazione naïve e direttamente con i CD8 central memory (Spearman  $r=-0.48$ ,  $p=0.037$ ; retta di regressione  $R^2=0.27$   $p=0.02$ ; Spearman  $r=0.64$ ,  $p=0.003$ ; retta di regressione  $R^2=0.44$   $p=0.002$ , rispettivamente per CD8 naïve e CD8 central memory). (figura 27)



**Figura 27: relazione tra i livelli di attivazione dei linfociti T CD8+ e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+ e controlli.**

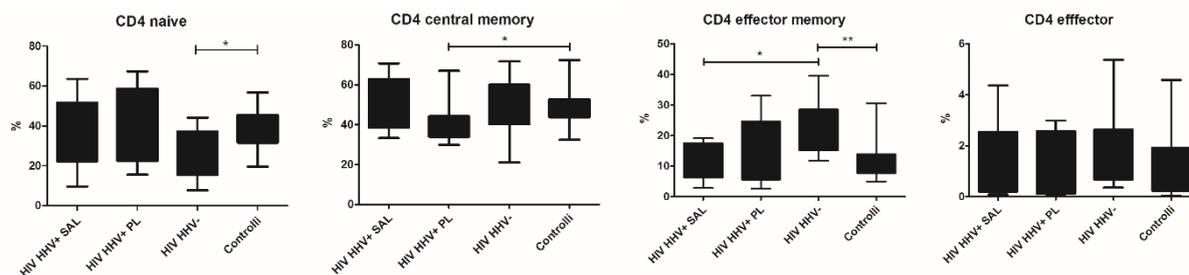
Per quanto riguarda la senescenza dei CD8, abbiamo riscontrato una correlazione inversa tra la percentuale di cellule CD8+CD28-CD57+ e la percentuale di CD8 naïve e central memory (Spearman  $r=-0.44$ ,  $p=0.023$ ; retta di regressione  $R^2=0.19$   $p=0.02$ ; Spearman  $r=-0.40$ ,  $p=0.038$ ; retta di regressione  $R^2=0.14$   $p=0.05$ , rispettivamente) ed al contrario una correlazione diretta con la percentuale di CD8 effector memory ed effector (Spearman  $r=0.44$ ,  $p=0.021$ ; retta di regressione  $R^2=0.14$   $p=0.06$ ; Spearman  $r=0.58$ ,  $p=0.001$ ; retta di regressione  $R^2=0.23$   $p=0.01$ , rispettivamente)

Tale tendenza è stata osservata anche nei soggetti sani ad eccezione della componente central memory che non sembra subire variazioni con l'aumentare della percentuale di cellule CD8 senescenti. (Spearman  $r=-0.56$ ,  $p=0.045$ ; retta di regressione  $R^2=0.19$   $p=0.022$ ; Spearman  $r=-0.39$ ,  $p=0.1$ ; retta di regressione  $R^2=0.14$   $p=0.054$ ; Spearman  $r=0.52$ ,  $p=0.022$ ; retta di regressione  $R^2=0.34$   $p=0.01$ ; Spearman  $r=0.76$ ,  $p=0.0002$ ; retta di regressione  $R^2=0.66$   $p<0.0001$ ; rispettivamente per CD8 naïve, central memory effector memory ed effector). (figura 28)



**Figura 28: relazione tra i livelli di senescenza dei linfociti T CD8+ e le relative sottopopolazioni. Soggetti HIV+ e controlli.**

Stratificando i pazienti sulla base della negatività della PCR per il DNA degli herpesvirus o della sua positività su campione di plasma o saliva (come già precedentemente mostrato), abbiamo osservato come nei soggetti HIV+ HHV- risultassero più elevate le percentuali delle popolazioni dei CD4 con fenotipo effector memory a discapito delle cellule naïve. Tale differenza è risultata statisticamente significativa se confrontata con il campione di controllo (naïve HIV+HHV- vs controlli: 28.3% [15.5%-37.2%] vs 36.7% [31.6%-45.5%],  $p=0.044$ ; effector memory HIV+HHV- vs controlli: 17.4% [15.2%-28.5%] vs 10.5% [7.7%-13.9%],  $p=0.002$ ). Al contrario non abbiamo osservato alcuna differenza nelle percentuali delle sottopopolazioni dei CD4 confrontando i soggetti HIV+ HHV+ sal ed i controlli. Abbiamo riscontrato, inoltre, una riduzione della componente central memory nei pazienti con positività plasmatica al DNA degli herpesvirus rispetto al campione di controllo (39.3% [33.9%-44.2%] vs 49.4% [43.7%-52.7%]  $p=0.014$ ). (figura 29)



**Figura 29: confronto delle percentuali delle sottopopolazioni dei linfociti T CD4+ nei soggetti HIV+ con riscontro di DNA di herpesvirus a livello salivare (HIV+HHV+ sal), plasmatico (HIV+HHV+ pl), HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-) e nei controlli sani (controlli)**

Per quanto riguarda i linfociti T CD8+ abbiamo notato come i soggetti HIV+ HHV- presentassero percentuali di cellule naïve ed intermedie inferiori rispetto al campione di controllo, a discapito di una espansione delle popolazioni con grado di differenziazione maggiore ed in particolare dei CD8 effector memory. Tale differenze sono risultate statisticamente significative (CD8 naïve HIV+HHV- vs controlli: 10.6% [7.3%-21.8%] vs 36.1% [22.7%-54.3%]  $p=0.0003$ ; CD8 intermedie HIV+HHV- vs controlli: 2.3% [1.1%-2.6%] vs 3.5% [2.1%-4.3%]  $p=0.02$ ; CD8 effector memory HIV+HHV- vs controlli: 25.6% [21.0%-32.3%] vs 8.8% [3.8%-11.9%]  $p=0.0003$ ). I soggetti con presenza di DNA di herpesvirus a livello salivare, invece hanno mostrato livelli di CD8 effector memory significativamente inferiori e CD8 a fenotipo intermedio significativamente superiori rispetto ai soggetti del gruppo HIV+HHV- (CD8 effector memory HIV+HHV+ sal vs HIV+HHV-: 13.7% [7.5%-16.4%] vs 25.6% [21.0%-32.3%]  $p=0.008$ ; CD8 intermedie HIV+HHV+sal vs HIV+HHV-: 3.7% [3.1%-6.1%] vs 2.3% [1.1%-2.6%]  $p=0.004$ ). (figura 30)

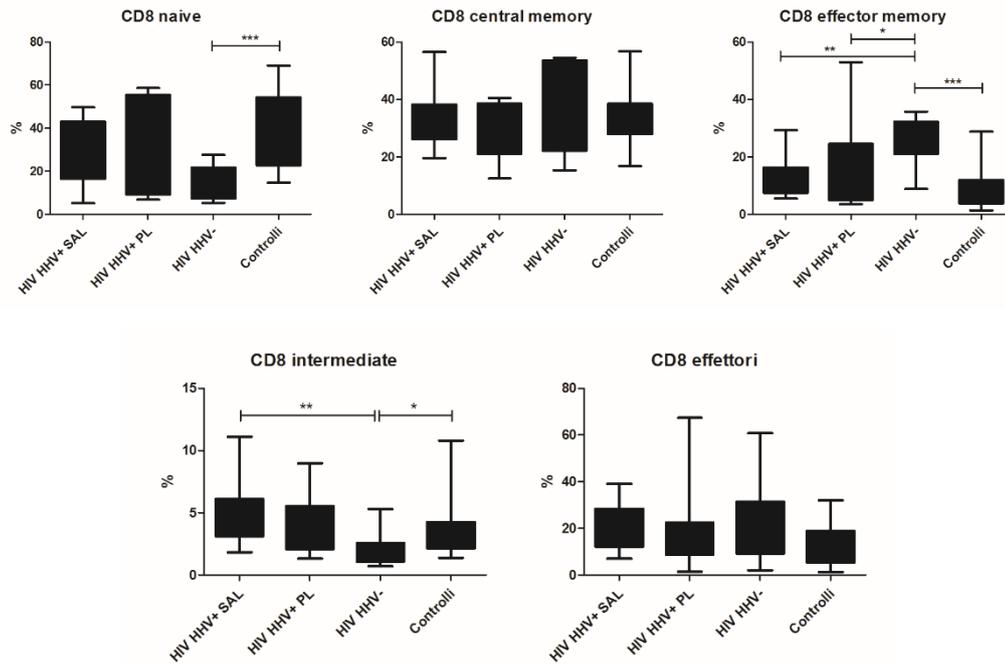


Figura 30: confronto delle percentuali delle sottopopolazioni dei linfociti T CD8+ nei soggetti HIV+ con riscontro di DNA di herpesvirus a livello salivare (HIV+HHV+ sal), plasmatico (HIV+HHV+ pl), HIV+ con negatività per la ricerca del DNA di herpesvirus (HIV+HHV-) e nei controlli sani (controlli)

## 8 Discussione

Gli herpesvirus rappresentano una classe di virus ubiquitari che infettano estesamente la popolazione in età infantile, determinando dei tassi di sieroprevalenza estremamente elevati nella popolazione adulta (90% di sieropositività per EBV e 60-80% di sieropositività per HHV7). Questi virus possono stabilire latenza e andare incontro a periodiche riattivazioni (Tiansheng Chen et al., 2006).

Con il nostro studio abbiamo voluto valutare il ruolo della replicazione dei cosiddetti herpesvirus linfotropici a livello plasmatico e salivare, in soggetti con infezione da HIV in terapia antiretrovirale, valutandone le implicazioni immunologiche.

In questo lavoro abbiamo dimostrato come ci sia una elevata prevalenza dei virus HHV6 ed HHV7 nella saliva di soggetti sani, e di soggetti con infezione da HIV in trattamento antiretrovirale. La presenza di questi virus non è associata a manifestazioni cliniche in entrambi i gruppi e la percentuale di positività salivare è risultata essere maggiore nel gruppo dei controlli rispetto ai soggetti con infezione da HIV, in maniera statisticamente significativa. Al contrario abbiamo dimostrato come il virus HHV8 è fortemente associato alla condizione di immunodepressione, essendo presente esclusivamente nei campioni di plasma e saliva dei soggetti HIV positivi. Risultati analoghi sono stati mostrati da Lucht E. et al., che hanno evidenziato come la prevalenza di HHV6 e HHV7 nei campioni di saliva sia elevata nei soggetti sani e tenda a diminuire nei soggetti con infezione da HIV. La diminuzione della frequenza per la positività salivare di HHV6 ed HHV7 è di entità maggiore nei soggetti collocati nella categoria C secondo la classificazione dei centers for disease control and prevention (CDC) del 1993, rispetto ai soggetti di classe B o A. La prevalenza di CMV e HHV8 in questo studio è risultata più elevata nei soggetti con CDC C (Lucht et al., 1998). Nel nostro lavoro il CMV è stato identificato nel plasma di uno solo dei controlli sani con una carica estremamente bassa ed in nessuno dei pazienti HIV positivi. Questo è probabilmente dovuto al fatto che tutti i soggetti con infezione da HIV assumevano una terapia HAART e mostravano buoni livelli di linfociti T CD4+.

A livello plasmatico la percentuale di positività per DNA erpetico è risultata maggiore nei soggetti HIV positivi rispetto ai controlli, con una differenza statisticamente significativa e con evidenza di cariche più elevate nei soggetti con conta dei linfociti T CD4 inferiori (quest'ultimo risultato però non ha raggiunto la significatività statistica). Per quanto riguarda le cariche del DNA erpetico a livello

salivare abbiamo osservato come non ci fosse sostanziale differenza tra soggetti con infezione da HIV e controlli, per HHV6, HHV7 ed EBV. Non avendo riscontrato controlli sani positivi per HHV8 e soggetti HIV+ con presenza di CMV non abbiamo potuto effettuare confronti per questi virus.

Abbiamo inoltre mostrato come sia frequente rilevare nei campioni di saliva di tutti i soggetti la contemporanea presenza di più virus. Dopo aver stratificato i risultati ottenuti sulla base del numero di virus erpetici presenti contemporaneamente in ciascun campione di saliva, abbiamo osservato come nei soggetti HIV+ sia più frequente identificare individui con 0 o 4 virus presenti nello stesso campione, mentre nei controlli sani prevale la condizione di contemporanea presenza di 2 o 3 virus. L'associazione HHV6 e HHV7 è molto frequente nei soggetti sani. Analoghi risultati sono mostrati nel lavoro di Luch et al., precedentemente citato.

L'elevata presenza di HHV6 e HHV7 nei campioni di saliva di soggetti con infezione da HIV è stata mostrata anche in popolazioni pediatriche, con percentuali molto simili a quelle ottenute nel nostro lavoro (dos Santos Pinheiro et al., 2013).

Studi su campioni autoptici in cui venivano effettuate PCR per la rilevazione del DNA degli herpesvirus su tessuti prelevati da vari organi, hanno mostrato come questi virus siano molto frequenti nella popolazione generale con localizzazione in siti anatomici diversi. E' stata inoltre mostrata l'elevata frequenza di localizzazione di HHV6 ed HHV7 a livello delle ghiandole salivari (parotide e sottomandibolari) (Tiansheng Chen et al., 2006). Tutto questo lascia presupporre una via di trasmissione per questi due virus per via salivare.

Per quanto concerne HHV7, è stato mostrato come la frequenza di identificazione di questo virus mediante PCR nei PBMC di soggetti HIV positivi non in trattamento antiretrovirale, fosse statisticamente inferiore rispetto a soggetti HIV negativi. Inoltre nell'ambito dei soggetti con infezione da HIV gli individui definiti "long term non progressor" (LTNP) hanno mostrato una positività per HHV7 DNA nei PBMC maggiore rispetto ai "progressor". Una spiegazione proposta per queste osservazioni è stata che la deplezione dei CD4 osservata nei soggetti HIV positivi rispetto ai controlli e nei "progressor" rispetto ai LTNP riducesse le opportunità replicative di HHV7, essendo la cellula CD4+ il bersaglio del herpesvirus, in cui ha luogo il suo ciclo replicativo. In alternativa è stato proposto un meccanismo di competizione virale in vivo tra HIV e HHV7 (Boutolleau D. et al, 2003). Nel nostro studio tutti i pazienti osservati assumevano una terapia HAART, per cui mostravano in media valori di CD4 elevati. Inoltre confrontando i valori di CD4 nei pazienti con presenza di HHV7 a livello salivare con soggetti risultati negativi per la ricerca degli herpesvirus su saliva e plasma non abbiamo riscontrato alcuna differenza statisticamente significativa (dati non

mostrati). Entrambi i gruppi di pazienti presentavano valori di CD4 inferiori rispetto ai controlli. Tutti questi elementi ci inducono a considerare poco probabile l'ipotesi che la mancanza di isolamento di HHV7 possa essere dovuto alla deplezione dei linfociti T CD4. A sostegno dell'ipotesi dell'inibizione della replicazione di HIV in vivo da parte di HHV7, possiamo citare gli studi condotti ex vivo su tessuto linfoide umano, che hanno mostrato come HHV7 possa inibire la replicazione di HIV con tropismo CCR5 attraverso una modica riduzione del numero dei linfociti T CD4 e l'inibizione dell'espressione del CD4 sia sui linfociti T infettati sia su quelli non infettati. Gli esperimenti in vitro non hanno, però, mostrato inibizione della replicazione dei ceppi di HIV CXCR4 tropici (Lisco A., et al., 2006). Abbiamo valutato i livelli di "median fluorescence intensity" (MFI) del CD4 sui linfociti T CD4+ senza individuare delle differenze statisticamente significative tra i soggetti con positività salivare per HHV7 e i soggetti HHV7 negativi (dati non mostrati).

Anche il virus HHV6 è in grado di inibire la replicazione di HIV con tropismo CCR5 attraverso la induzione della produzione di RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted): chemochina con motivo C-C che rappresenta il ligando naturale del corecettore CCR5 (Grivel JC et al., 2001).

Sono noti altri meccanismi di immunoregolazione adottati dai virus, appartenenti anche ad altre famiglie rispetto a quella degli herpesvirus, in grado di interferire con l'immunopatogenesi di HIV. Ad esempio il flavivirus GB virus C (GBV-C), molto comune nei soggetti con infezione da HIV, a causa della comune via di trasmissione, induce l'aumento dei linfociti T CD3+ CD4-CD8- che sembrano svolgere una funzione inibitrice nei confronti dell'attivazione immunitaria (Bhattarai N et al., 2012). Sulla scorta di tali osservazioni abbiamo valutato i livelli di CD3+CD4-CD8- nel nostro campione di soggetti HIV+ senza trovare differenze tra i vari sottogruppi, individuati sulla base dell'assenza o della presenza del DNA di herpesvirus nei campioni di saliva o plasma.

Abbiamo mostrato come nei soggetti HIV+ con presenza di DNA di herpesvirus nei campioni di plasma o saliva vi sia una variazione del valore dei linfociti T CD4 (valutata in un arco temporale di sei mesi dal momento della raccolta dei campioni di plasma e saliva) di segno positivo o prossima allo zero, rispetto ai soggetti con infezione da HIV, negativi alla ricerca del DNA erpetico, in cui tale variazione assume segno negativo. Questo dato ci induce a considerare la possibilità che la presenza di herpesvirus (in particolare di HHV6 ed HHV7, che sono le specie più frequentemente rilevate) possa contribuire a regolare il sistema immunitario inibendo i processi apoptotici indotti dal cronico stato infiammatorio causato da HIV.

Nonostante tutti i pazienti fossero in terapia HAART e pur avendo escluso dall'analisi i tre pazienti viremici, abbiamo riscontrato valori di immunoattivazione dei linfociti T CD4+ e T CD8+ generalmente più elevati nei soggetti con infezione da HIV rispetto ai controlli sani. Nella valutazione globale non sono emerse differenze nell'espressione del recettore CD38 da parte dei linfociti T CD4+ e CD8+. E' stato ampiamente dimostrato come l'espressione del CD38 sui linfociti T CD8+ sia strettamente legata alla carica virale di HIV e come questo marcatore sia un potente indice prognostico associato ad una progressione dell'infezione da HIV (Liu Z et al 1997; Almeida M et al., 2007). Recentemente è stato mostrato come, in pazienti con carica virale non rilevabile, la terapia di intensificazione con raltegravir (un inibitore dell'integrasi di HIV) determinasse un decremento dei valori di CD8+CD38+ in maniera reversibile, essendo presente un incremento di tale popolazione di linfociti alla sospensione della fase di intensificazione. Questo dato mostrerebbe un legame tra la percentuale dei CD8+CD38+ e la viremia residua (Massanella M et al., 2013)

Correlando i livelli di immunattivazione dei linfociti T CD4+ con la conta di questi ultimi, sia in valore assoluto che percentuale, abbiamo notato come vi fosse una forte relazione inversa tra i due parametri, a dimostrazione del fatto che i soggetti con livelli più elevati di attivazione dei linfociti T CD4+ mostravano un recupero immunologico più contenuto. Questa osservazione conferma il ruolo dell'immunoattivazione nei soggetti cosiddetti discordanti immunologici (Nakanjako D et al., 2011). Dopo aver stratificato i pazienti sulla base dell'isolamento di DNA virale degli herpes nei campioni di saliva e plasma, abbiamo evidenziato come l'espressione del CD38 fosse diminuita nei soggetti risultati negativi alla ricerca del DNA di herpesvirus rispetto ai soggetti con positività plasmatica. In particolare tale differenza rimaneva statisticamente significativa se consideravamo i soggetti con positività plasmatica per HHV8 e HHV6. In letteratura sono riportate alcune osservazioni che evidenziano il legame tra l'espressione del CD38 sui linfociti T e la presenza di virus herpetici, in particolare per HSV2 (Seth PM et al., 2008; Roxby AC et al., 2013). Sono inoltre noti alcuni dei meccanismi attraverso cui HHV6 e HHV8 possono indurre uno stato infiammatorio (Clark DJ et al., 2013; Unemori PA et al., 2013).

Per quanto riguarda i dati dell'immunosenescenza abbiamo dimostrato un aumento nei linfociti T CD4+ e T CD8+ della quota di cellule CD28-, nei soggetti HIV positivi rispetto ai controlli sani. Questo dato testimonia un'aumentata senescenza del compartimento linfocitario (Dock JN et al., 2011). Esclusivamente per il compartimento dei linfociti T CD4 abbiamo dimostrato, nei soggetti con infezione da HIV, l'aumento dell'espressione del marcatore di differenziazione cellulare terminale CD 57 rispetto ai controlli sani e l'aumento della percentuale dei linfociti CD4+CD28-CD57+. Un

sottogruppo di questa popolazione ha mostrato la capacità di produrre perforine e granzimi di tipo A e B, con capacità citolitiche dirette (Appay v et al., 2002).

Abbiamo dimostrato come i soggetti con presenza di DNA di herpesvirus nella saliva (condizione estremamente comune nei controlli sani, con elevata prevalenza di HHV6 ed HHV7, come precedentemente evidenziato) non mostrassero livelli di senescenza dei CD4 significativamente più elevati rispetto ai controlli sani. Mentre i soggetti HIV+HHV+ pl ed HIV+HHV- continuavano ad avere elevati livelli di CD4 CD28- e CD4 CD28-CD57+. Inoltre abbiamo dimostrato come vi fosse una riduzione della percentuale di cellule CD4+CD57+ e CD4+CD28- nei soggetti del gruppo HIV+HHV+sal rispetto ai soggetti HIV+HHV-. In altre parole i soggetti con presenza del DNA di virus erpetici linfotropici a livello del cavo orale mostravano un assetto dei marcatori di senescenza sui linfociti T CD4+ molto simile a quello dei controlli sani, mentre si registravano delle alterazioni nei soggetti con presenza di herpesvirus nel plasma o assenza totale del DNA di questi virus nei campioni esaminati. E' stato dimostrato come negli "elite controllers" vi sia un aumento della percentuale dei linfociti T CD4+ CD28-CD57+, con associato un basso tasso di proliferazione linfocitaria. Questi linfociti, di cui una parte svolgono un'azione citolitica diretta, potrebbero avere un ruolo nella clearance degli herpesvirus nei soggetti HIV+HHV- (Shogioian DZ et al. 2012), e potrebbero essere indotti dalla replicazione virale a livello plasmatico.

Per quanto riguarda la differenziazione cellulare abbiamo dimostrato come vi sia una riduzione del compartimento naïve ed una espansione del compartimento effettore e central memory nei soggetti con infezione da HIV con elevati livelli di immunoattivazione dei linfociti T CD4+. Inoltre abbiamo dimostrato come un basso nadir della conta dei CD4, influenzi la ricostituzione del sistema immunitario a seguito di una terapia HAART efficace, con una prevalenza di linfociti a fenotipo central memory, a discapito della popolazione naïve. Queste dinamiche sono assenti nei controlli sani. Tali risultati ci inducono a sottolineare il ruolo fondamentale dell'involuzione timica che in corso di infezione da HIV risulta essere accelerata. L'attivazione linfocitaria con successiva differenziazione e apoptosi cellulare non è controbilanciata dalla produzione di cellule naïve determinando quindi la rottura del bilancio omeostatico che regola il numero dei CD4 (Haas A et al., 2011). Oltre alla disfunzione timica è stato recentemente dimostrato come vi sia una riduzione del numero di precursori ematopoietici circolanti nei pazienti HIV+ rispetto ai controlli e nei non progressor rispetto ai pazienti in AIDS. Inoltre i precursori ematopoietici rimanenti CD34+ mostrano una deplezione preferenziale delle cellule con capacità di differenziare in senso linfoide (Sauce D et al., 2011). Sia nei soggetti HIV+ che nei controlli sani la differenziazione dei CD4 da naïve a cellule

effettrici è associata alla perdita del CD28 e alla tendenza ad acquisire il fenotipo CD57+, indice di senescenza cellulare (Papagno L et al., 2004).

Abbiamo già evidenziato nella parte introduttiva di questo lavoro come i meccanismi di attivazione, di maturazione e di senescenza dei linfociti T CD4+ e T CD8+ seguano strade diverse. I nostri risultati hanno evidenziato come nei soggetti HIV+ vi sia un aumento del numero dei CD8. Questo fenomeno è determinato da un'espansione iniziale di questa popolazione che genera cellule di memoria a lunga emivita, che possono essere indotte a produrre cellule effettrici in caso di reinfezioni o permanenza dello stimolo antigenico cronicamente (Wherrey EJ et al., 2004). In quest'ultimo caso i linfociti T CD8 possono evidenziare fenomeni di disfunzionalità, come si verifica in corso di infezione da HIV cronica, in cui tali linfociti perdono la capacità di svolgere contemporaneamente più funzioni (Riou C et al., 2012). Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato come nei soggetti HIV+ oltre ad un aumento del numero dei CD8 vi sia uno sbilanciamento del fenotipo delle cellule che costituiscono tale compartimento, verso la componente effettrice a discapito delle cellule naïve. Tanto più il numero dei linfociti T CD8 è elevato tanto più la componente naïve è ridotta. Mentre nei soggetti sani l'attivazione dei CD8 è associata ad una espansione delle cellule central memory con riduzione relativa delle cellule naïve, nei soggetti HIV positivi un aumentato livello di attivazione dei linfociti T CD8+ corrisponde ad una percentuale più elevata di cellule con fenotipo effector memory. Considerando la senescenza dei CD8, abbiamo osservato come quei soggetti con percentuale maggiore di cellule senescenti mostrasse percentuali inferiori di cellule naïve con incremento di cellule con fenotipo effector memory ed effector. Questo fenomeno è stato rilevato indifferentemente nei controlli sani e nei soggetti HIV+. Valutando però il compartimento delle cellule central memory, abbiamo dimostrato come nei soggetti HIV+ vi è un decremento della percentuale di tale popolazione proporzionale alla percentuale di cellule CD8+CD27-CD57+. Nei controlli sani invece questo pool di linfociti T CD8 non sembra subire evidenti modificazioni in relazione ad un aumentato stato di senescenza del sistema immunitario. Ancora una volta l'immunoattivazione cronica nei soggetti HIV+ può rendere conto di questo fenomeno: la stimolazione antigenica persistente induce la differenziazione in cellule effettrici delle cellule central memory, con progressivo esaurimento di quest'ultimo compartimento cellulare (Wherry EJ et al., 2004)

I soggetti HIV+ con presenza di DNA di herpesvirus nella saliva hanno mostrato un pattern di differenziazione dei linfociti T CD4 e T CD8 molto simile a quello dei controlli sani, con prevalenza di cellule a fenotipo naïve e central memory. Invece il gruppo di individui HIV+HHV- ha mostrato livelli

elevati di cellule effector memory o effector con una riduzione delle cellule naïve e central memory. Un'ipotesi per spiegare questo fenomeno è che l'assenza di herpesvirus nel cavo orale sia dovuto alla presenza di una quota di cellule con attività citotossica sia con fenotipo CD4 che CD8 in grado di inibire fortemente la replicazione virale, non solo nel compartimento plasmatico ma anche a livello delle ghiandole secernenti e delle mucose.

La condizione di positività per herpesvirus nel cavo orale, di per sé, non sembra essere associata ad alterazioni immunitarie a livello sistemico. In assenza di manifestazioni cliniche, i soggetti HIV positivi con presenza di herpesvirus nella saliva mostrano livelli di immunoattivazione, immunosenescenza e un pattern di differenziazione cellulare molto simile a quello dei soggetti senza infezione da HIV.

## Bibliografia

- Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Relationship between CD38 expression on peripheral blood T-cells and monocytes, and response to antiretroviral therapy: a one-year longitudinal study of a cohort of chronically infected ART-naïve HIV-1+ patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007 Jan 15;72(1):22-33. PubMed PMID: 17051525.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):231-41. PubMed PMID: 18161758.
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5954-8. PubMed PMID: 12023402.
- Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol.* 2000 Jul;20(4):250-6. PubMed PMID: 10939712.
- Benito JM, López M, Soriano V. The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev.* 2004 Apr-Jun;6(2):79-88. PubMed PMID: 15332430.
- Betts MR, Casazza JP, Koup RA. Monitoring HIV-specific CD8+ T cell responses by intracellular cytokine production. *Immunol Lett.* 2001 Nov 1;79(1-2):117-25. PubMed PMID: 11595298.
- Bhattarai N, Rydze RT, Chivero ET, Stapleton JT. GB virus C viremia is associated with higher levels of double-negative T cells and lower T-cell activation in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2012 Nov;206(9):1469-72. PubMed PMID: 22927453; PubMed Central PMCID: PMC3466998.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004 Sep 20;200(6):749-59. PubMed PMID: 15365096; PubMed Central PMCID: PMC2211962.
- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2711-20. PubMed PMID: 12433688.

- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71. PubMed PMID: 17115046.
- Burns WH, Sandford GR. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antivirals in vitro. *J Infect Dis*. 1990 Sep;162(3):634-7. PubMed PMID: 2167336.
- Caselli E, Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol*. 2007 Jul;30(3):173-87. PubMed PMID: 17802896.
- Casper C, Krantz E, Selke S, Kuntz SR, Wang J, Huang ML, Pauk JS, Corey L, Wald A. Frequent and asymptomatic oropharyngeal shedding of human herpesvirus 8 among immunocompetent men. *J Infect Dis*. 2007 Jan 1;195(1):30-6. PubMed PMID: 17152006; PubMed Central PMCID: PMC2128060.
- Casper C, Krantz EM, Corey L, Kuntz SR, Wang J, Selke S, Hamilton S, Huang ML, Wald A. Valganciclovir for suppression of human herpesvirus-8 replication: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Infect Dis*. 2008 Jul 1;198(1):23-30. PubMed PMID: 18491970; PubMed Central PMCID: PMC2700177.
- Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, Adelsberger J, Rupert A, Baseler M, Tagaya Y, Roby G, Rehm C, Follmann D, Lane HC. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19851-6. PubMed PMID: 19060209; PubMed Central PMCID: PMC2596741.
- Chen T, Hudnall SD. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol*. 2006 May;19(5):726-37. PubMed PMID: 16528368.
- Clark DJ, Catusse J, Stacey A, Borrow P, Gompels U. Activation of CCR2+ human proinflammatory monocytes by human herpesvirus-6B chemokine N-terminal peptide. *J Gen Virol*. 2013 Mar 27; PubMed PMID: 23535574.
- Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev*. 2005 Jul-Sep;7(3):168-80. PubMed PMID: 16302465.

- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118. PubMed PMID: 20078217.
- Cotter RL, Zheng J, Che M, Niemann D, Liu Y, He J, Thomas E, Gendelman HE. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection, beta-chemokine production, and CCR5 expression in CD40L-stimulated macrophages: immune control of viral entry. *J Virol.* 2001 May;75(9):4308-20. PubMed PMID: 11287580; PubMed Central PMCID: PMC114176.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):273-83. PubMed PMID: 20390322; PubMed Central PMCID: PMC2865636.
- Dock JN, Effros RB. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging Dis.* 2011 Oct;2(5):382-397. PubMed PMID: 22308228; PubMed Central PMCID: PMC3269814.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):690-5. PubMed PMID: 9872319.
- Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304. PubMed PMID: 12524385.
- Dutertre CA, Amraoui S, DeRosa A, Jourdain JP, Vimeux L, Goguet M, Degrelle S, Feuillet V, Liovat AS, Müller-Trutwin M, Decroix N, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Loulergue P, Launay O, Richard Y, Hosmalin A. Pivotal role of M-DC8<sup>+</sup> monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF $\alpha$  overproduction in response to microbial products. *Blood.* 2012 Sep 13;120(11):2259-68. PubMed PMID: 22802339.
- Effros RB, Pawelec G. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion?. *Immunol Today.* 1997 Sep;18(9):450-4. PubMed PMID: 9293162.
- Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of cytotoxic CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology.* 1996 Aug;88(4):501-7. PubMed PMID: 8881749; PubMed Central PMCID: PMC1456634.

- Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, Romero-Sánchez MC, Muñoz-Fernández MÁ, Viciano P, Genebat M, Leal M. HIV infection-related premature immunosenescence: high rates of immune exhaustion after short time of infection. *Curr HIV Res.* 2011 Jul;9(5):289-94. PubMed PMID: 21916840.
- Flemington EK. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol.* 2001 May;75(10):4475-81. PubMed PMID: 11312317; PubMed Central PMCID: PMC114200.
- Ford ES, Puronen CE, Sereti I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009 May;4(3):206-14. PubMed PMID: 19532052; PubMed Central PMCID: PMC2760925.
- Gamadia LE, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Yong SL, Surachno S, Wertheim-van Dillen PM, Ten Berge IJ, Van Lier RA. The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):6107-14. PubMed PMID: 15128796.
- Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989 Jul;52(1):10-8. PubMed PMID: 2656013.
- Griffin E, Krantz E, Selke S, Huang ML, Wald A. Oral mucosal reactivation rates of herpesviruses among HIV-1 seropositive persons. *J Med Virol.* 2008 Jul;80(7):1153-9. PubMed PMID: 18461621.
- Grivel JC, Ito Y, Fagà G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, Fitzgerald W, Lusso P, Margolis L. Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1232-5. PubMed PMID: 11689888.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):289-95. PubMed PMID: 16520776.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?. *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):319-23. PubMed PMID: 11927927.

- Haas A, Zimmermann K, Oxenius A. Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J Virol.* 2011 Dec;85(23):12102-13. PubMed PMID: 21849433; PubMed Central PMCID: PMC3209369.
- Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, Cavert W, Gebhard K, Staskus K, Zhang ZQ, Dailey PJ, Balfour HH Jr, Erice A, Perelson AS. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science.* 1996 Nov 8;274(5289):985-9. PubMed PMID: 8875941.
- Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, Cowan K, Gress RE. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3789-98. PubMed PMID: 9345067.
- Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, Odom J, Vance BA, Christensen BL, Mackall CL, Gress RE. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):930-9. PubMed PMID: 15776111; PubMed Central PMCID: PMC1064981.
- Hassman LM, Ellison TJ, Kedes DH. KSHV infects a subset of human tonsillar B cells, driving proliferation and plasmablast differentiation. *J Clin Invest.* 2011 Feb;121(2):752-68. PubMed PMID: 21245574; PubMed Central PMCID: PMC3026728.
- Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):249-55. PubMed PMID: 10607709.
- He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, Moore JP, Cerutti A. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):3931-41. PubMed PMID: 16547227.
- Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R, Aguzzi A. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med.* 2004 Feb;10(2):187-92. PubMed PMID: 14745443.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1526-9. PubMed PMID: 14976262.

- Herbeuval JP, Shearer GM. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol*. 2007 May;123(2):121-8. PubMed PMID: 17112786; PubMed Central PMCID: PMC1930161.
- Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1995 Jul-Sep;9(3):76-7. PubMed PMID: 8782010.
- Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, Norris PJ, Busch MP, Martin JN, Brooks C, McCune JM, Deeks SG. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS One*. 2011 Jan 31;6(1):e15924. PubMed PMID: 21305005; PubMed Central PMCID: PMC3031543.
- Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, Tracy RP, Corey L, Deeks SG. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011 May 15;203(10):1474-83. PubMed PMID: 21502083; PubMed Central PMCID: PMC3080892.
- Jacobson MA, Ditmer DP, Sinclair E, Martin JN, Deeks SG, Hunt P, Mocarski ES, Shiboski C. Human herpesvirus replication and abnormal CD8+ T cell activation and low CD4+ T cell counts in antiretroviral-suppressed HIV-infected patients. *PLoS One*. 2009;4(4):e5277. PubMed PMID: 19381272; PubMed Central PMCID: PMC2667217.
- Jennings C, Rich K, Siegel JN, Landay A. A phenotypic study of CD8+ lymphocyte subsets in infants using three-color flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Apr;71(1):8-13. PubMed PMID: 8137561.
- Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007 Dec;60(12):1342-9. PubMed PMID: 18042690; PubMed Central PMCID: PMC2095570.
- Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, Xue X, Parrinello CM, Hunt P, Deeks SG, Hodis HN. T cell activation predicts carotid artery stiffness among HIV-infected women. *Atherosclerosis*. 2011 Jul;217(1):207-13. PubMed PMID: 21492857; PubMed Central PMCID: PMC3139014.

- Kestens L, Vanham G, Gigase P, Young G, Hannel I, Vanlangendonck F, Hulstaert F, Bach BA. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS*. 1992 Aug;6(8):793-7. PubMed PMID: 1418775.
- Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, Gigase PL. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1994 Mar;95(3):436-41. PubMed PMID: 7907956; PubMed Central PMCID: PMC1535073.
- Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Herpin B, Metcalf JA, Sereti I, Polis MA, Davey RT, Tavel J, Falloon J, Stevens R, Lambert L, Dewar R, Schwartzentruber DJ, Anver MR, Baseler MW, Masur H, Dimitrov DS, Lane HC. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1731-41. PubMed PMID: 11748275; PubMed Central PMCID: PMC2193579.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie, Settima Edizione (2006), Casa Editrice Elsevier Masson, Volume 1 pag 193-264. ISBN 978-88-85675-53-7
- Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1983 Aug 25;309(8):453-8. PubMed PMID: 6224088.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun;17(3):326-32. PubMed PMID: 15886125.
- Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med*. 2004 Nov;10(11):525-31. PubMed PMID: 15519278.
- Le Saux S, Weyand CM, Goronzy JJ. Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jan;1247:69-82. PubMed PMID: 22224726.
- Lee C, Liu QH, Tomkowicz B, Yi Y, Freedman BD, Collman RG. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol*. 2003 Nov;74(5):676-82. PubMed PMID: 12960231.
- Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, Bosche MC, Metcalf JA, Stevens RA, Lambert LA, Alvord WG, Polis MA, Davey RT, Dimitrov DS, Lane HC. Impact of HIV-1

infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13778-83. PubMed PMID: 11095734; PubMed Central PMCID: PMC17652.

- Leung AK, Sauve RS, Davies HD. Congenital cytomegalovirus infection. *J Natl Med Assoc*. 2003 Mar;95(3):213-8. PubMed PMID: 12749681; PubMed Central PMCID: PMC2594406.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1148-52. PubMed PMID: 15793562.
- Lisco A, Barbierato M, Fiore JR, Gasperini P, Favia A, Volpe A, Chironna M, Pastore G, Chieco-Bianchi L, Calabrò ML. Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov;44(11):3863-71. PubMed PMID: 16943357; PubMed Central PMCID: PMC1698349.
- Lisco A, Grivel JC, Biancotto A, Vanpouille C, Origgi F, Malnati MS, Schols D, Lusso P, Margolis LB. Viral interactions in human lymphoid tissue: Human herpesvirus 7 suppresses the replication of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 via CD4 modulation. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):708-17. PubMed PMID: 17065205; PubMed Central PMCID: PMC1797468.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997 Oct 1;16(2):83-92. PubMed PMID: 9358102.
- Lucht E, Brytting M, Bjerregaard L, Julander I, Linde A. Shedding of cytomegalovirus and herpesviruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls. *Clin Infect Dis*. 1998 Jul;27(1):137-41. PubMed PMID: 9675467.
- Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naïve and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*. 1990 Mar 1;171(3):801-17. PubMed PMID: 2307933; PubMed Central PMCID: PMC2187792.
- Margolis DM, Rabson AB, Straus SE, Ostrove JM. Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes. *Virology*. 1992 Feb;186(2):788-91. PubMed PMID: 1310199.

- Massanella M, Negrodo E, Pérez-Alvarez N, Puig J, Ruiz-Hernández R, Bofill M, Clotet B, Blanco J. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. *AIDS*. 2010 Apr 24;24(7):959-68. PubMed PMID: 20177358.
- Massanella M, Esteve A, Buzón MJ, Llibre JM, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Stevenson M, Clotet B, Martínez-Picado J, Blanco J, the IntegRal Collaborative Group. Dynamics of CD8 T-Cell Activation After Discontinuation of HIV Treatment Intensification. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Jun 1;63(2):152-160. PubMed PMID: 23392458.
- McMichael AJ, Jones EY. Genetics First-class control of HIV-1. *Science*. 2010 Dec 10;330(6010):1488-90. PubMed PMID: 21148380.
- Méndez-Lagares G, García-Pergañeda A, del Mar del Pozo-Balado M, Genebat M, Ruiz-Mateos E, García García M, Muñoz-Fernández MÁ, Pacheco YM, Leal M. Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low CD4 T cell restoration. *J Antimicrob Chemother*. 2012 May;67(5):1228-37. PubMed PMID: 22287235.
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Jun 22;7:54. PubMed PMID: 20569472; PubMed Central PMCID: PMC2904714.
- Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:223-48. PubMed PMID: 21034222.
- Morissette G, Flamand L. Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol*. 2010 Dec;84(23):12100-9. PubMed PMID: 20844040; PubMed Central PMCID: PMC2976420.
- Murray R, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Medica*, Quinta Edizione (2006), Casa Editrice EMSI, pag 551-576, ISBN 978-88-86669-56-6
- Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, Nabatanzi R, Kanya MR, Cao H. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. *BMC Infect Dis*. 2011 Feb 8;11:43. PubMed PMID: 21299909; PubMed Central PMCID: PMC3065409.

- Niedobitek G, Baumann I, Brabletz T, Lisner R, Winkelmann C, Helm G, Kirchner T. Hodgkin's disease and peripheral T-cell lymphoma: composite lymphoma with evidence of Epstein-Barr virus infection. *J Pathol*. 2000 Aug;191(4):394-9. PubMed PMID: 10918214.
- Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*. 2004 Feb;2(2):E20. PubMed PMID: 14966528; PubMed Central PMCID: PMC340937.
- Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*. 2005 May;6(5):430-2. PubMed PMID: 15843796.
- Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):399-405. PubMed PMID: 16753288.
- Pinheiro Rdos S, Ferreira Dde C, Nóbrega F, Santos NS, de Souza IP, Castro GF. Current status of herpesvirus identification in the oral cavity of HIV-infected children. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Jan-Feb;46(1):15-9. PubMed PMID: 23563819.
- Pozo F, Tenorio A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1999 Apr;79(1):9-19. PubMed PMID: 10328531.
- Razonable RR, Paya CV. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002 Aug;8(8):651-8. PubMed PMID: 12149755.
- Resino S, Seoane E, Gutiérrez MD, León JA, Muñoz-Fernández MA. CD4(+) T-cell immunodeficiency is more dependent on immune activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Jul;42(3):269-76. PubMed PMID: 16810122.
- Resino S, Bellón JM, Pérez A, Gurbindo Gutiérrez MD, Muñoz-Fernández MA. [Subsets of CD8+ T cells in longterm asymptomatic vertically HIV-1 infected children]. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jan 17;122(1):6-11. PubMed PMID: 14733867.
- Riou C, Treurnicht F, Abrahams MR, Mlisana K, Liu MK, Goonetilleke N, Koup R, Roederer M, Abdool Karim S, de Bruyn G, Williamson C, Gray CM, Burgers WA, CAPRISA 002 Study Team. Increased

memory differentiation is associated with decreased polyfunctionality for HIV but not for cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2012 Oct 15;189(8):3838-47. PubMed PMID: 22966086; PubMed Central PMCID: PMC3466366.

- Roxby AC, Liu AY, Drake AL, Kiarie JN, Richardson B, Lohman-Payne BL, John-Stewart GC, Wald A, De Rosa S, Farquhar C. Short communication: T cell activation in HIV-1/herpes simplex virus-2-coinfected Kenyan women receiving valacyclovir. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 Jan;29(1):94-8. PubMed PMID: 22852760; PubMed Central PMCID: PMC3537320.
- Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, Decker JM, Wang S, Baalwa J, Kraus MH, Parrish NF, Shaw KS, Guffey MB, Bar KJ, Davis KL, Ochsenbauer-Jambor C, Kappes JC, Saag MS, Cohen MS, Mulenga J, Derdeyn CA, Allen S, Hunter E, Markowitz M, Hraber P, Perelson AS, Bhattacharya T, Haynes BF, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009 Jun 8;206(6):1273-89. PubMed PMID: 19487424; PubMed Central PMCID: PMC2715054.
- Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, Ait-Mohand H, Schneider L, Guihot A, Boufassa F, Zaunders J, Iguertsira M, Bailey M, Gorochov G, Duvivier C, Carcelain G, Kelleher AD, Simon A, Meyer L, Costagliola D, Deeks SG, Lambotte O, Autran B, Hunt PW, Katlama C, Appay V. HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood.* 2011 May 12;117(19):5142-51. PubMed PMID: 21436070; PubMed Central PMCID: PMC3109539.
- Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Böck G, Schönitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstien B. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5893-9. PubMed PMID: 12023394.
- Schmitt N, Ueno H. Human T follicular helper cells: development and subsets. *Adv Exp Med Biol.* 2013;785:87-94. PubMed PMID: 23456841.
- Sheth PM, Sunderji S, Shin LY, Rebbapragada A, Huibner S, Kimani J, Macdonald KS, Ngugi E, Bwayo JJ, Moses S, Kovacs C, Loutfy M, Kaul R. Coinfection with herpes simplex virus type 2 is associated with reduced HIV-specific T cell responses and systemic immune activation. *J Infect Dis.* 2008 May 15;197(10):1394-401. PubMed PMID: 18444797.

- Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003 Mar;18(3):441-52. PubMed PMID: 12648460.
- Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*. 2001 Jun;14(6):763-77. PubMed PMID: 11420046.
- Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, Ranasinghe S, Lindqvist M, Davis I, Lane K, Rychert J, Rosenberg ES, Piechocka-Trocha A, Brass AL, Brenchley JM, Walker BD, Streeck H. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med*. 2012 Feb 29;4(123):123ra25. PubMed PMID: 22378925.
- Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):3400-6. PubMed PMID: 12218162.
- Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):373-81. PubMed PMID: 16979569.
- Sunil M, Reid E, Lechowicz MJ. Update on HHV-8-Associated Malignancies. *Curr Infect Dis Rep*. 2010 Mar;12(2):147-54. PubMed PMID: 20461118; PubMed Central PMCID: PMC2860558.
- Tassiopoulos K, Landay A, Collier AC, Connick E, Deeks SG, Hunt P, Lewis DE, Wilson C, Bosch R. CD28-negative CD4+ and CD8+ T cells in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected adults enrolled in adult clinical trials group studies. *J Infect Dis*. 2012 Jun;205(11):1730-8. PubMed PMID: 22448010; PubMed Central PMCID: PMC3415854.
- Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 2003 Feb 1;67(3):519-24. PubMed PMID: 12588074.
- Theodore WH, Epstein L, Gaillard WD, Shinnar S, Wainwright MS, Jacobson S. Human herpes virus 6B: a possible role in epilepsy?. *Epilepsia*. 2008 Nov;49(11):1828-37. PubMed PMID: 18627418; PubMed Central PMCID: PMC2694582.

- Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2003 Mar 1;187(5):769-76. PubMed PMID: 12599050.
- Voumvourakis KI, Kitsos DK, Tsiodras S, Petrikos G, Stamboulis E. Human herpesvirus 6 infection as a trigger of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 2010 Nov;85(11):1023-30. PubMed PMID: 20926836; PubMed Central PMCID: PMC2966366.
- Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R, Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2011 May 15;117(10):2163-9. PubMed PMID: 21523729.
- Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5535-45. PubMed PMID: 15140950; PubMed Central PMCID: PMC415833.
- Xiao J, Qian KL, Cao QH, Qiu CL, Qiu C, Xue YL, Zhang XY, Zhong P, Xu JQ, Li MY, Wang Y. HLA-DR expression on regulatory T cells is closely associated with the global immune activation in HIV-1 infected subjects naïve to antiretroviral therapy. *Chin Med J (Engl).* 2011 Aug;124(15):2340-6. PubMed PMID: 21933566.
- Yoshikawa T, Ihira M, Taguchi H, Yoshida S, Asano Y. Analysis of shedding of 3 beta-herpesviruses in saliva from patients with connective tissue diseases. *J Infect Dis.* 2005 Nov 1;192(9):1530-6. PubMed PMID: 16206067.
- Zhang RD, Guan M, Park Y, Tawadros R, Yang JY, Gold B, Wu B, Henderson EE. Synergy between human immunodeficiency virus type 1 and Epstein-Barr virus in T lymphoblastoid cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 Jan 20;13(2):161-71. PubMed PMID: 9007201.
- Zoufaly A, an der Heiden M, Kollan C, Bogner JR, Fätkenheuer G, Wasmuth JC, Stoll M, Hamouda O, van Lunzen J, ClinSurv Study Group. Clinical outcome of HIV-infected patients with discordant virological and immunological response to antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2011 Feb 1;203(3):364-71. PubMed PMID: 21208929; PubMed Central PMCID: PMC3130441.