



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

ANALISI CITOFUORIMETRICA
DEL MARCATORE DI
SENESCENZA β -GALATTOSIDASI
(SA- β gal) SU LINFOCITI E
MONOCITI DI PAZIENTI AFFETTI
DA MALATTIA DA HIV.

Relatore:

Prof. Andrea Costantini

Tesi di Laurea di:

Arianna Lolli

Correlatore:

Dott.ssa Nadia Viola

A.A. 2019/2020

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	<i>Il virus HIV</i>	1
1.2	<i>Eziologia ed epidemiologia</i>	1
1.3	<i>Struttura del virus HIV</i>	2
1.4	<i>Patofisiologia</i>	3
1.5	<i>Meccanismi dell'immunodeficienza causata dall'HIV</i>	7
1.6	<i>Diagnosi e terapia</i>	10
1.7	<i>Prognosi e complicanze</i>	11
1.8	<i>Senescenza cellulare, immunosenescenza e HIV</i>	11
1.9	<i>Senescence associated β-galactosidase</i>	14
2	SCOPO DELLA TESI	16
3	MATERIALI E METODI	17
3.1	<i>Separazione di cellule mononucleate leucocitarie su gradiente di densità</i>	17
3.2	<i>Marcatura con anticorpi monoclonali</i>	18
3.3	<i>Saggio della β-galattosidasi</i>	19
3.4	<i>Acquisizione al citofluorimetro</i>	20
3.5	<i>Analisi statistica</i>	22

4	RISULTATI	23
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	30
	BIBLIOGRAFIA	34
	RINGRAZIAMENTI	37

1 INTRODUZIONE

1.1 Il virus HIV

L'HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) è un retrovirus appartenente alla famiglia dei Lentivirus. Le principali vie di trasmissione del virus sono quella sessuale, che rappresenta la modalità di contagio prevalente a livello mondiale, le trasfusioni di sangue, la via parenterale (principalmente attraverso scambi di siringhe), la trasmissione perinatale ^[1].

L'HIV è un retrovirus che infetta principalmente i linfociti T CD4 causandone la morte ed inducendo uno stato di progressiva immunodeficienza: quando il numero di CD4 diventa troppo basso, le difese immunitarie dell'ospite diventano inefficaci contro infezioni opportunistiche e tumori maligni (fase di AIDS) ^[2].

Il trattamento dell'infezione da HIV ha come obiettivi il controllo della replicazione virale, l'immunoricostruzione del compartimento T CD4, la riduzione del rischio di sviluppo di patologie AIDS-correlate, l'aumento della sopravvivenza. Se l'infezione non viene diagnosticata ed adeguatamente trattata, la maggior parte dei pazienti sviluppa l'AIDS entro dieci anni dal contagio e muore entro i due anni successivi.

1.2 Eziologia ed epidemiologia

L'infezione da HIV è ormai da tempo considerata una pandemia ^[3]. Dall'epoca dell'identificazione, si stima siano morte 39 milioni di persone a causa dell'infezione da HIV e che attualmente siano più di 35 milioni le persone che convivono con la malattia. La prevalenza dell'HIV/AIDS è aumentata negli anni, in seguito all'evoluzione ed alla diffusione della terapia, che consente ai pazienti di vivere e convivere più a lungo con l'infezione. L'incidenza e la prevalenza dell'infezione da HIV e dell'AIDS restano comunque profondamente diverse nelle

varie zone del Mondo: ad esempio, nella sola Africa sub-Sahariana ci sono circa 25 milioni di persone affette ^[4].

1.3 Struttura del virus HIV

L'HIV ha una forma sferica con un diametro di 110 nm, ed è essenzialmente costituito, dall'esterno verso l'interno, da un doppio strato fosfolipidico/matrice proteica, un'envelope ed un capsid a forma di tronco di cono che contiene il materiale genetico. Sull'envelope sono ancorate proteine virus-specifiche come la gp120, una proteina con funzione di antirecettore, e la gp41, una proteina trans-membrana con attività fusogena. Associata alla faccia interna del doppio strato fosfolipidico vi è una matrice proteica costituita dalla proteina p17: questa proteina è disposta in modo regolare a formare un guscio interno al doppio strato fosfolipidico. Il capsid ha una struttura a tronco di cono, è costituito dalla proteina p24, che rappresenta il principale antigene virale. All'interno del capsid si trovano due copie identiche di RNA a singola catena a polarità positiva (RNA⁺), molecole di RNA transfer (tRNA), che svolgono la funzione di innesco (primer) per la trascrittasi inversa e gli enzimi trascrittasi inversa (RT), integrasi (IN), proteasi (PR), che servono rispettivamente alla replicazione del genoma virale, all'integrazione nel DNA della cellula ospite e alla maturazione dei virioni ^{[1][5]}.

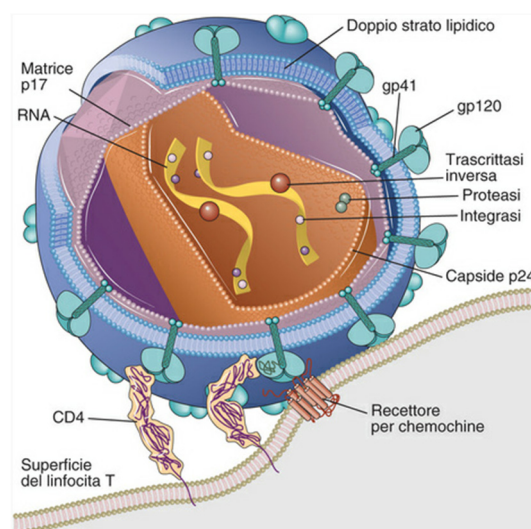


Figura 1: Struttura dell'HIV-1 che prende contatto con la superficie di un linfocita T CD4+ ^[6].

1.4 Patofisiologia

Il ciclo di replicazione del virus inizia con il riconoscimento delle cellule target da parte del virione maturo. I target principali per l'infezione da HIV sono le cellule che presentano sulla loro superficie il recettore CD4: queste includono i linfociti T helper, le cellule dendritiche, le cellule della linea monocito-macrofagica e le cellule della microglia del sistema nervoso. L'adesione del virus avviene tramite il recettore CD4 presente sulle cellule dell'ospite che lega ad alta affinità la proteina gp120; segue poi la penetrazione, che è possibile grazie a corecettori, CCR5 (*C-C Motif Chemokine Receptor 5*) e CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), che determinano la fusione tra l'envelope e la membrana cellulare della cellula ospite [1].

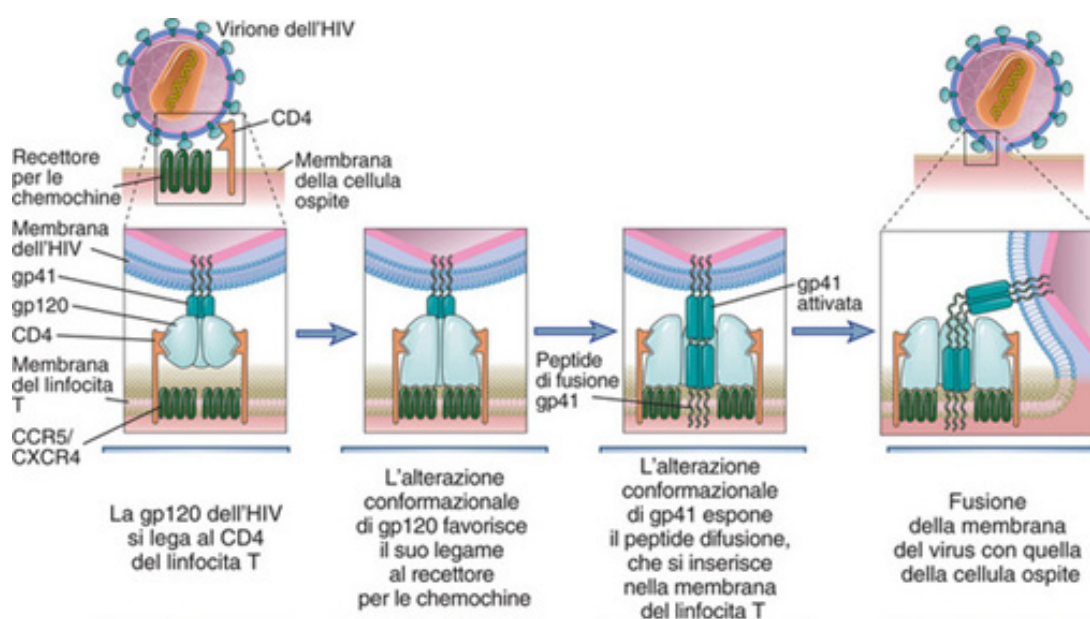


Figura 2: Meccanismo di penetrazione dell'HIV nella cellula bersaglio. Nel modello presentato si nota come il legame a CD4 induca modificazioni sequenziali della conformazione delle proteine gp120 e gp41. Tali modificazioni promuovono il legame del virus al corecettore CCR5. Parallelamente, l'attivazione del peptide di fusione della gp41 smaschera i residui aminoacidici idrofobici che vanno a inserirsi nella membrana plasmatica della cellula ospite. Tutto ciò favorisce la fusione della membrana dell'HIV-1 con quella della cellula bersaglio [6].

Nel citoplasma della cellula, l'RNA virale viene liberato e retro-trascritto in una doppia catena di DNA a opera della DNA polimerasi-RNA dipendente: una molecola di tRNA specifica funziona da innesco per la DNA polimerasi-RNA dipendente, che determina la formazione di una molecola bicatenaria ibrida costituita dalla catena di RNA virale e dalla catena complementare di DNA. A questo punto la DNA polimerasi-RNA dipendente permette la

degradazione della molecola dell'RNA presente nell'ibrido e trascrive la seconda catena di DNA. La molecola di DNA bicatenario lineare forma il complesso di pre-integrazione (in cui l'acido nucleico è strettamente associato ad alcuni enzimi virali tra cui l'integrasi) che migra all'interno del nucleo. Qui avviene la fase di integrazione fra DNA virale e genoma della cellula ospite; segue la trascrizione dei prodotti virali ad opera dall'RNA polimerasi della cellula ospite stessa [1].

Durante la trascrizione verranno trascritte ed in seguito sintetizzate prima le proteine precoci, (che hanno funzione regolatrice del ciclo cellulare), poi le proteine tardive: dopo la sintesi, genoma e proteine strutturali migrano verso la periferia della cellula per l'assemblaggio. Infine si ha la fase di maturazione che prevede il rilascio delle particelle virali per gemmazione dalla membrana cellulare [5].

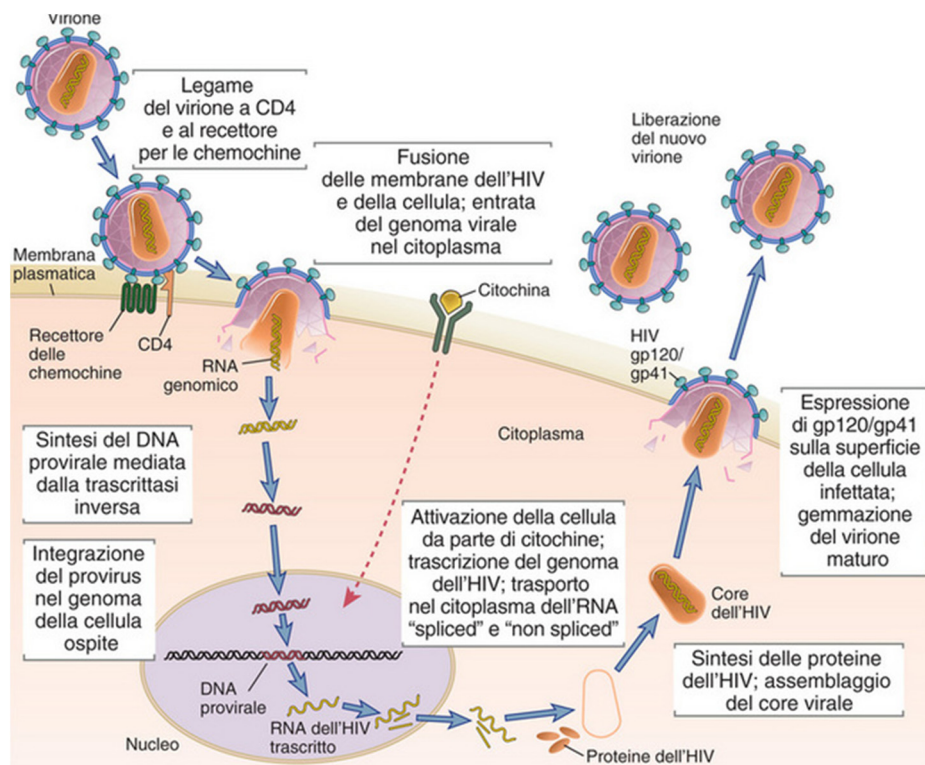


Figura 3: Ciclo biologico dell'HIV. La Figura illustra le tappe del ciclo vitale dell'HIV, partendo dall'infezione della cellula ospite, passando per la replicazione del virus, fino al rilascio di nuovi virioni [6].

Nella malattia da HIV si possono distinguere tre fasi: infezione primaria (fase acuta), fase asintomatica (di latenza clinica), fase di sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), associata a sviluppo di infezioni opportunistiche, tumori e disordini neurologici ^[1].

L'infezione primaria acuta ha un'incubazione di tre-sei settimane, può essere asintomatica, ma generalmente si manifesta con una sintomatologia acuta ad evoluzione rapida che si esaurisce spontaneamente. La malattia acuta è associata a sindromi simil-mononucleosiche o simil-influenzali, caratterizzate da febbre, artralgie, anoressia, nausea, letargia, diarrea, mal di gola, rash cutaneo; sono possibili sintomi neurologici inclusi mal di testa, neuriti e irritabilità.

Nell'infezione primaria è frequente la linfadenopatia e l'inversione nel rapporto dei linfociti T CD4+ e CD8+, dovuto sia ad un calo numerico dei CD4+, principali bersagli dell'infezione, sia ad un aumento reattivo delle cellule CD8+ ^[7].

Durante l'infezione primaria si riscontrano elevati livelli di virus nel sangue con un picco di viremia tra 10^6 e 10^7 copie per ml di plasma ^[1]. Questa fase, in cui il virus si dissemina rapidamente nell'organismo, termina con lo sviluppo di immunità anti-HIV, di tipo cellulomediato ed anticorpale (siero conversione); ciò segna l'inizio della fase di latenza clinica, tipicamente asintomatica e della durata media di alcuni anni, in cui si osserva la notevole riduzione della viremia plasmatica ed un parziale recupero di linfociti T CD4. La latenza clinica non corrisponde tuttavia ad una latenza virologica: infatti il virus viene sequestrato negli organi linfoidi, soprattutto all'interno delle cellule dendritiche follicolari, dove rimane attivo e continua a replicare, liberando particelle virali ^[8].

Ciò induce la progressiva deplezione dei linfociti T CD4+ ed il progressivo incremento della viremia, fino alla fase di AIDS ^[9].

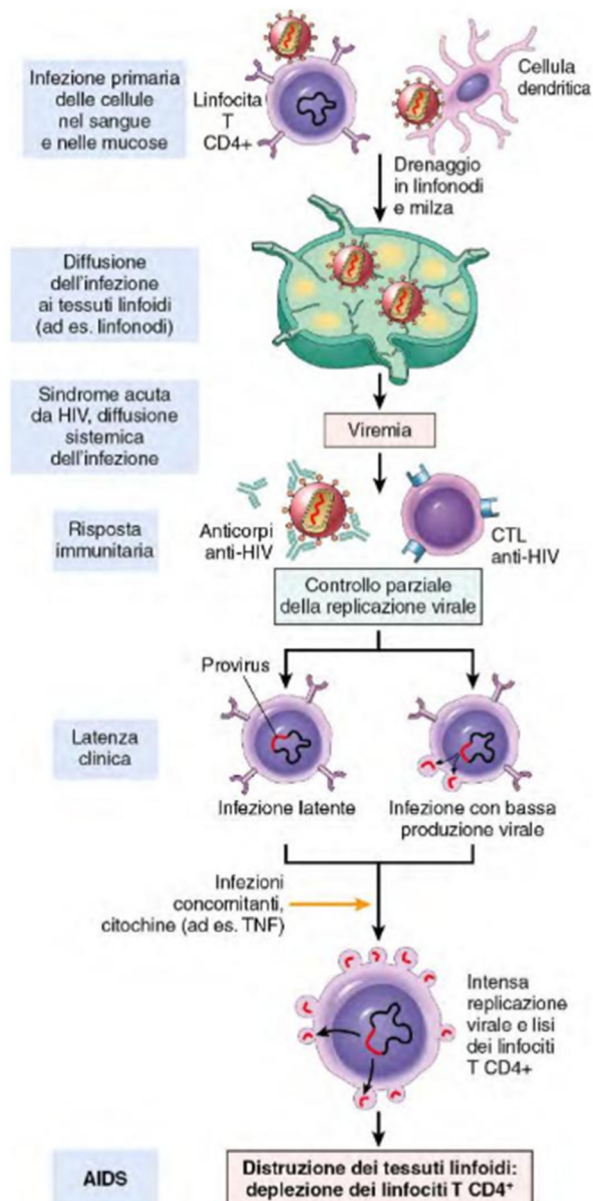


Figura 4: Patogenesi dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) [8].

La conta normale delle cellule CD4+ nel sangue è compreso tra 500 e 1500 cellule / mm³.

Questo parametro è il miglior indicatore della progressione della malattia e viene utilizzato per diagnosticare la malattia e valutare l'efficacia del trattamento antiretrovirale [10].

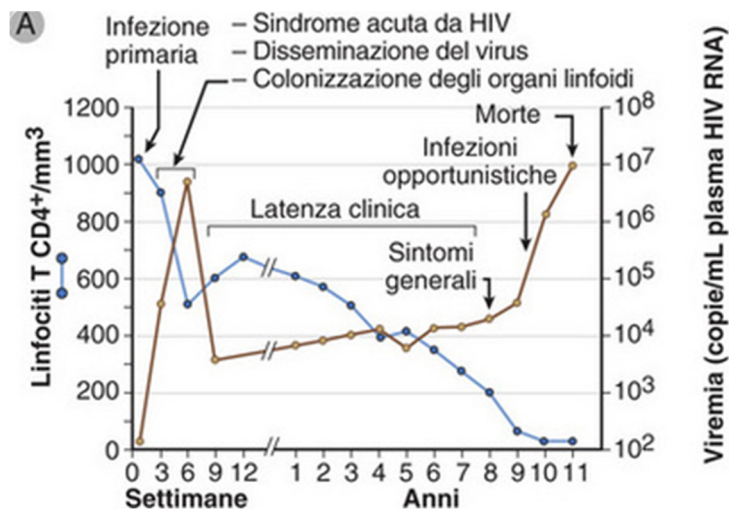


Figura 5:Decorso clinico dell'infezione da HIV. Livelli di viremia plasmatica, numero di linfociti T CD4+ circolanti e stadi clinici della malattia. Dopo circa 12 settimane dal contagio, la viremia plasmatica si riduce a livelli molto bassi (rilevabili solo mediante saggio PCR per la trascrittasi inversa) e può rimanere stabile per molti anni. Ciononostante, il numero di linfociti T CD4+ si riduce costantemente durante questa fase di latenza clinica, a causa dell'attiva replicazione virale e della continua infezione di nuovi linfociti T nei linfonodi. Quando il numero di queste cellule nel sangue scende al di sotto di una soglia critica (circa 200/mm³), aumenta vertiginosamente il rischio di infezione da parte di altri microrganismi e dell'insorgenza di altre patologie associate all'AIDS.

1.5 Meccanismi dell'immunodeficienza causata dall'HIV

Nei pazienti con infezione da HIV, l'immunosoppressione è dovuta sia ad una riduzione delle cellule T CD4+, sia ad un loro difetto funzionale: infatti se da un lato il virus entra nella cellula, si replica ed alla fine ne causa la morte, dall'altro le restanti cellule infette non sono più in grado di funzionare correttamente, ma rilasceranno virioni, che infettano altre cellule, portando alla progressione della malattia ^[10].

Esistono inoltre, altri meccanismi accessori che causano la diminuzione delle cellule CD4+:

- la deplezione di precursori immaturi dei linfociti T CD4+, per infezione diretta dei progenitori timici oppure per l'infezione delle cellule accessorie che producono citochine essenziali per la maturazione dei linfociti T;

- l'attivazione cronica di cellule non infettate, causata dagli antigeni di HIV o da altri microrganismi, porta alla produzione di grandi quantità di citochine, che possono determinare l'apoptosi dei linfociti T;
- la formazione di sincizi (cellule giganti) legata all'interazione della proteina gp120, espressa da cellule con infezione produttiva, con molecole CD4, presenti su cellule non infette;
- la risposta immunitaria da parte dei CD8+ attivati contro i linfociti CD4+ infetti.

La deplezione dei linfociti T CD4+ causa l'inversione del rapporto CD4+/CD8+ nel sangue periferico. Quindi, mentre nei soggetti sani il rapporto CD4+/CD8+ è di 1:2, nei pazienti infetti da HIV il rapporto è \leq a 0,5.

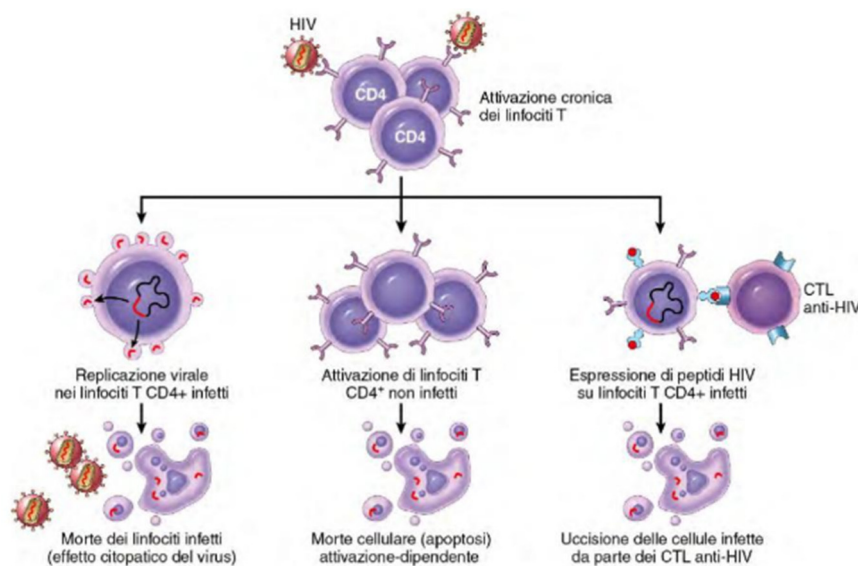


Figura 6: Meccanismi della perdita di linfociti T CD4+ nell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Sono mostrati alcuni dei principali meccanismi, noti e ipotizzati, della deplezione di linfociti T nell'infezione da HIV [8].

Oltre all'infezione dei linfociti T CD4+, anche l'infezione di monociti e macrofagi è importante nella patogenesi della malattia da HIV [6].

Al contrario dei linfociti T CD4+, i macrofagi sono piuttosto resistenti all'effetto citopatico dell'HIV e quindi possono ospitare il virus per lunghi periodi: i macrofagi infetti producono per

gemmazione quantità relativamente piccole di virus, ma contengono un gran numero di particelle virali in vescicole intracellulari, e rappresentano così un importante serbatoio di infezione.

Inoltre, i monociti circolanti rappresentano un veicolo di trasporto per l'HIV in altri distretti dell'organismo, soprattutto nel sistema nervoso [8].

A seguito dell'infezione da HIV, si attivano sia la risposta umorale sia la risposta cellulo-mediata. Nelle fasi precoci, la risposta immunitaria è molto simile alle risposte verso altri virus ed è efficace nell'eliminare la maggior parte dei virioni, senza però riuscire ad eradicare completamente il virus.

La risposta immunitaria specifica contro l'HIV è caratterizzata da un'imponente espansione dei linfociti T CD8+ specifici: queste cellule eliminano i linfociti CD4+ esprimenti gli antigeni virali, ma così facendo liberano anche virioni che possono essere fagocitati da altre cellule, infettandole.

Nella fase acuta i CD8+ riescono a controllare l'infezione, ma in definitiva si dimostrano inefficaci soprattutto a causa dell'insorgere di ceppi mutanti del virus che sfuggono alla risposta immunitaria.

Il virus HIV infatti è caratterizzato da un elevato tasso di mutazione a causa della scarsa precisione della trascrizione inversa: in questo modo riesce a sfuggire al riconoscimento da parte degli anticorpi o dei linfociti T generati contro le proteine virali prima che queste subiscano la mutazione, evadendo tutte le difese dell'ospite e distruggendo il sistema immunitario [6].

1.6 Diagnosi e terapia

L'infezione da HIV può rimanere nascosta per anni. Tuttavia, sono diversi i test per diagnosticarla:^{[12][13]}

- Test di quarta generazione diagnostico di screening: rileva gli anticorpi specifici contro l'HIV-1 e HIV-2 e gli antigeni p24 del virus.
- Test rapido di screening: utilizza il sangue o la saliva per rilevare un'infezione da HIV in poche ore.
- Western blot: utilizzato come test di conferma nei casi positivi al test di screening.
- PCR per HIV-RNA: può essere utilizzato come test diagnostico/di conferma e può fornire informazioni sulla quantità di virus presente in un fluido biologico (ad esempio plasma).

Dopo la conferma della diagnosi e prima dell'inizio del trattamento, tutti i pazienti devono eseguire una conta delle cellule CD4+, una determinazione dell'HIV RNA nonché un test di resistenza genotipica per il virus^[14].

Per trattare la malattia da HIV si utilizza in genere una combinazione di due o più molecole appartenenti a diverse classi di antiretrovirali:

- farmaci che impediscono la trascrizione dell'RNA virale in DNA, chiamati inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI);
- farmaci che inibiscono l'integrazione del DNA virale trascritto nel DNA dell'ospite, chiamati inibitori dell'integrasi (INI);
- farmaci che impediscono la scissione delle proteine per formare il virione, chiamati inibitori della proteasi (PI);
- farmaci che impediscono l'ingresso del virus nella cellula inibendo CCR5, chiamati inibitori di fusione o di ingresso (EI).

Le attuali linee guida nazionali ed internazionali indicano che la terapia antiretrovirale dovrebbe essere iniziata il più precocemente possibile ed indipendentemente dalla conta delle cellule CD4 o dai livelli di replicazione virale (HIV-RNA plasmatico) ^[15] ^[16].

Attualmente, i regimi di terapia più spesso impiegati per il trattamento iniziale dell'infezione da HIV associano uno o due NRTI con un NNRTI o un INI ^[17].

Con i regimi attuali, la ART (terapia anti-retrovirale) va proseguita per tutta la vita; in questo modo si ottiene il controllo a lungo termine della replicazione virale, il recupero immunologico, la riduzione di morbilità e mortalità, la riduzione del rischio di trasmissione ^[18].

1.7 Prognosi e complicanze

Un paziente con infezione da HIV ed una conta di linfociti CD4+ superiore a 500 cellule/mm³ ha una aspettativa di vita sostanzialmente sovrapponibile a quella di un soggetto di pari età non infetto ^[17].

La principale complicanza della malattia da HIV è la sua progressione verso l'AIDS, la cui insorgenza diviene particolarmente probabile quando la conta delle cellule T CD4 scende al di sotto di 200/mm³ ^[10]. In questa condizione possono insorgere patologie come tubercolosi, infezioni da citomegalovirus, candidosi, meningite criptococcica, criptosporidiosi, toxoplasmosi, sarcoma di Kaposi, linfoma, nefropatia o complicazioni neurologiche (complesso di demenza dell'AIDS).

1.8 Senescenza cellulare, immunosenescenza e HIV

L'invecchiamento è un processo biologico complesso che determina diversi cambiamenti fisiologici, tra cui quelli che coinvolgono il sistema immunitario innato ed adattivo: questi

cambiamenti sono associati ad un'inflammatione di basso grado chiamata "*inflamm-aging*", che scaturisce dall'insieme dei diversi stimoli antigenici a cui è sottoposto un individuo durante tutta la vita. L'immunosenescenza, in concomitanza con l'*inflamm-aging*, è considerata come principale causa di malattie legate all'età come quelle cardiovascolari, neurodegenerative, malattie metaboliche e cancro ^[19] ^[20].

L'infezione da HIV, una volta considerata malattia infettiva mortale, ora è diventata una malattia cronica grazie all'efficacia ed alla maneggevolezza dei moderni regimi ART; ciò implica che il trattamento trasforma l'infezione da HIV in una malattia infiammatoria cronica. Negli ultimi anni sta destando un crescente interesse lo studio delle relazioni fra HIV ed immunosenescenza/*inflamm-aging* ^[21].

L'invecchiamento determina alterazioni di tutti i sistemi dell'organismo, compreso il sistema immunitario; è ormai dimostrato che le funzioni delle cellule responsabili della risposta immunitaria innata diminuiscono con l'invecchiamento ^[22].

La funzione più importante del sistema immunitario innato, composto da neutrofili, monociti/macrofagi, cellule dendritiche e cellule natural killer è di essere la prima linea di protezione per l'organismo. La risposta immunitaria innata influenza fortemente la successiva risposta adattativa, tramite la presentazione dell'antigene e la produzione di citochine e chemochine. Le prime cellule ad arrivare al sito di infezione sono i neutrofili; con l'invecchiamento, la maggior parte delle funzioni dei neutrofili sono diminuite, fra cui produzione di radicali liberi, chemiotassi, apoptosi e killing intracellulare. La produzione di citochine proinfiammatorie è aumentata e contribuisce all'inflammatione ^[23].

Per quanto riguarda la risposta immunitaria adattativa, l'esposizione cronica ad agenti patogeni porta da una parte alla diminuzione di linfociti T naïve ed all'involutione timica, dall'altra all'accumulo cellule T effettrici e della memoria. Le cellule T vanno inoltre incontro a fenomeni di esaurimento funzionale, con conseguente accumulo di cellule poco efficienti nel produrre

risposte immuni. Le cellule della memoria, nell'invecchiamento, subiscono a loro volta alterazioni delle loro funzioni specifiche, che includono sovrapproduzione di interleuchina 2 (IL-2) e di interferone γ (IFN γ) [24] [25].

Tutte queste alterazioni del sistema immunitario creano uno stato di *inflamm-aging*, che porta allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche in relazione ai processi di invecchiamento.

L'*inflamm-aging* comprende anche l'aumento della morte cellulare, dello stress ossidativo, dello stato nutrizionale, cambiamenti del microbioma intestinale, disregolazione ormonale e sviluppo di comorbidità, fra cui aterosclerosi e neurodegenerazione. Durante questo processo si verifica una costante attivazione di basso grado delle cellule del sistema immunitario innato, soprattutto dei macrofagi residenti nei tessuti: questi vanno incontro a senescenza replicativa ed acquisiscono il fenotipo proinfiammatorio secretorio, portando alla disregolata produzione di citochine e chemochine [26].

L'infezione da HIV causa l'attivazione della risposta immunitaria sistemica, che provoca un maggiore differenziamento di linfociti T della memoria (CD4+ CD45RO+) e di sottotipi di linfociti T attivati (CD4+ CD57+ e CD8+ CD57+). Questi linfociti T, oltre a non essere in grado di eliminare l'infezione, acquisiscono un fenotipo senescente, caratterizzato dalla perdita del recettore CD28, dall'accorciamento dei telomeri e dalla produzione di grandi quantità di *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α).

L'infezione da HIV, per il suo livello di infiammazione cronica sistemica di basso grado, è simile al processo di invecchiamento ed è associata allo sviluppo prematuro di malattie cardiovascolari, malattie trombotiche, diabete di tipo 2, cancro e malattie neurodegenerative [21].

Dati sperimentali dimostrano che malattie cardiovascolari che si verificano con l'aumentare dell'età nella popolazione generale, si verificano ad un'età più precoce nei soggetti con infezione da HIV. Questo apparente invecchiamento precoce sembra essere causato

dall'attivazione immunitaria e dall'immunosenescenza, con una diminuzione dei linfociti T naïve, un aumento delle cellule T della memoria CD4+CD28- e l'aumentato delle citochine proinfiammatorie, anche nei soggetti HIV positivi virologicamente soppressi [27].

L'invecchiamento nel contesto dell'infezione da HIV è un'area di ricerca complessa e in continua espansione; non ci sono dati certi che l'infezione da HIV possa indurre un invecchiamento prematuro causato dall'*inflamm-aging*: questa infatti, a causa della disregolazione immunologica, può portare alla comparsa di fenotipi di invecchiamento precoce e malattie croniche, ma gli effetti dell'età sull'infezione e sui marcatori di progressione della malattia rimangono sconosciuti [28].

1.9 Senescence associated β -galactosidase

La β -galattosidasi è un enzima appartenente alla famiglia delle idrolasi acide ed è contenuto nelle cellule a livello dei lisosomi, gli organuli cellulari deputati alla degradazione di macromolecole di varia natura attraverso il processo di endocitosi e l'azione di enzimi litici (idrolasi e proteasi). Questo enzima catalizza la scissione dei residui terminali di β -D-galattosio in zuccheri denominati β -galattosidi, fra i quali il più noto è il lattosio che viene scisso nei due monosaccaridi glucosio e galattosio.

La proteina è codificata da un gene posto sul braccio corto del cromosoma 3 (3p22.3) chiamato gene GLB1, ed esprime la sua massima attività in un range di pH tra 4 e 4,5 [29].

In condizioni di senescenza cellulare, si verifica un aumento del pH lisosomiale, del numero e dell'attività dei lisosomi: questo particolare fenotipo viene chiamato *senescence associated β -galactosidase (SA- β gal)*, ed è un marcatore molecolare dello stato di senescenza cellulare [15].

La SA- β -galattosidasi viene utilizzata come marcatore dello stato di senescenza cellulare, tuttavia non è indispensabile per lo sviluppo del fenotipo senescente [30].

Le metodiche di rivelazione della attività enzimatica senescenza-associata della β -galattosidasi trovano potenziali applicazioni in ambito biologico come strumento per effettuare ricerche sul fenomeno dell'invecchiamento, in particolare nello studio di condizioni o composti in grado di indurre o inibire la comparsa di un fenotipo senescente in differenti popolazioni cellulari.

I principali metodi per l'identificazione della SA- β -gal in popolazioni cellulari sono tre: il *metodo cito/istochimico*, il *metodo fluorimetrico* ed il *metodo cromogenico* ^[31].

In particolare, il metodo fluorimetrico viene utilizzato per valutare l'attività della β -galattosidasi su cellule *in vivo*. L'attività *senescence-associated* viene stimolata utilizzando degli inibitori dell'acidificazione dei lisosomi, così che il pH all'interno degli organuli salga da 4,5 a pH 6. In queste condizioni, l'attività enzimatica viene espressa solo da quelle cellule che hanno una quantità elevata di lisosomi, tale da riuscire a lavorare anche in un ambiente a pH non ottimale, ovvero le cellule senescenti.

Il metodo fluorimetrico è applicabile a tre tecnologie per la conta delle cellule o l'analisi qualitativa delle stesse: l'analisi microfluidica, l'analisi al microscopio a fluorescenza e l'analisi al citofluorimetro. In particolare, nel nostro studio, abbiamo effettuato l'analisi della β -galattosidasi mediante citofluorimetria.

2 SCOPO DELLA TESI

Il saggio della β -galattosidasi viene abitualmente utilizzato a scopo di ricerca per studiare la senescenza cellulare. Grande interesse ha destato negli ultimi anni lo studio delle relazioni fra infezione da HIV ed immunosenescenza e *inflamm-aging*. Nessun marcatore si è finora dimostrato da solo sufficiente a misurare tali fenomeni.

Lo scopo del presente lavoro è stato innanzitutto quello di ottimizzare la tecnica di studio dell'espressione della β -galattosidasi per studiare la senescenza cellulare nelle diverse popolazioni linfocitarie in citofluorimetria.

Una volta messo a punto il saggio nelle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica, si è proceduto alla sua applicazione per lo studio dei fenomeni di senescenza cellulare a carico di linfociti B, T, cellule NK e monociti di pazienti affetti da malattia da HIV in terapia antiretrovirale; a tal scopo, per ogni sottopopolazione (individuata attraverso l'espressione di markers specifici) è stata valutata l'attività enzimatica della β -galattosidasi.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Separazione di cellule mononucleate leucocitarie su gradiente di densità

I campioni di sangue periferico (8 ml in 2 provette contenenti anticoagulante EDTA) sono stati ottenuti da 26 pazienti e da 3 soggetti sani.

Le cellule leucocitarie mononucleate sono isolate a partire dal sangue periferico tramite la tecnica della separazione su gradiente di densità: il separatore utilizzato è il *Ficoll Lymphosep – Lymphocyte Separation Medium* (MP), un co-polimero sintetico ad alto peso molecolare di saccarosio ed epicloridina, selettivo per l'isolamento in provetta delle *PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)*.

Dopo aver agitato la provetta di sangue periferico per inversione, tutto il contenuto viene trasferito in un *Greiner Bio-One* da 15ml precedentemente nominata con l'identificativo del soggetto da cui proviene il campione. Il campione viene diluito 1:3 con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e si mescola accuratamente con l'ausilio di un aspiratore elettrico *Pipette-Plus*. Il sangue diluito si stratifica lentamente su un'altra provetta *Greiner Bio-One* da 15 ml contenente 4 ml di *Ficoll* avendo cura di non mescolare le due fasi. Infine, si centrifuga il tubo ad una velocità di 1800 rpm per 15 minuti con il freno inserito. In questo modo si crea un gradiente di densità nella provetta: il plasma stratifica in alto, subito sotto si forma l'anello bianco lattiginoso dei leucociti sopra il *Ficoll*, ed infine sul fondo della provetta sedimentano gli eritrociti. Il plasma diluito con PBS dello strato più in alto viene scartato, mentre l'anello di cellule mononucleate intermedio viene raccolto in un nuovo tubo di *Greiner Bio-One* e lavato con 10 ml di PBS tramite centrifugazione 1800 rpm per 10 minuti. Al termine della centrifuga le cellule sedimentano sul fondo della provetta formando il pellet, il surnatante viene eliminato per inversione, il pellet viene risospeso con 1 ml di PBS+1% FBS (Siero Bovino Fetale) e le cellule vengono infine contate al contaglobuli *Beckman Coulter*.

3.2 Marcatura con anticorpi monoclonali

In un tubo di citofluorimetria si dispensano $1 \cdot 10^6$ cellule. L'aliquota da prelevare dal campione risospeso viene calcolata con la seguente proporzione:

$$\text{Numero cellule PBMC raccolte: } 1000 \mu\text{l} = 1 \cdot 10^6 \text{ PBMC} : x \mu\text{l}$$

Segue la marcatura cellulare con anticorpi monoclonali rivolti contro antigeni presenti sulla superficie delle cellule che, grazie alla loro specificità, caratterizzano fenotipicamente la popolazione cellulare oggetto di studio, in questo caso sottopopolazioni linfocitarie. Ogni anticorpo monoclonale è diretto verso uno specifico antigene presente sulla membrana cellulare definito CD (*Cluster of Differentiation*) ed è coniugato con un fluorocromo che gli permette di essere detectato dal citofluorimetro. Il pannello utilizzato per l'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie e dell'espressione della β -galattosidasi è il seguente:

β- GALATTOSIDASI LINFOCITI					
FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
B-Gal	CD56	CD3	CD4	CD8	CD19

Tabella 1: Pannello T-B-NK di anticorpi monoclonali per l'analisi linfocitaria e lo studio dell'espressione della SA- β gal.

In particolare:

- CD56 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea per i linfociti NK;
- CD3 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea linfocitaria T;
- CD4 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea linfocitaria T che identifica i Linfociti T Helper;
- CD8 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea linfocitaria T che identifica i Linfociti T Citotossici;

- CD19 (*BD Bioscience*) è un antigene di linea linfocitaria B.

Gli anticorpi monoclonali vengono aggiunti alla sospensione di cellule nel tubo nella quantità consigliata dalla casa produttrice e lasciati in incubazione per 15 minuti al buio, perché fotolabili.

Al termine dell'incubazione si esegue un lavaggio con 1 ml della soluzione di PBS+ 1% FBS, si centrifuga a 1800 rpm per 5 minuti e si elimina il surnatante per inversione; alla fine avremo il tubo da citofluorimetria con il pellet di cellule marcate.

3.3 Saggio della β -galattosidasi

Per poter studiare l'attività SA- β gal, viene utilizzato *The invitrogen™ CellEvent™ Senescence Green flow Cytometry Assay Kit*, costituito da una sonda (*Senescence Green Probe*) ed un Buffer (*Senescence Buffer*). Entrambi devono essere mantenuti a freddo in frigorifero a una temperatura di 2-8°C. Prima di iniziare bisogna preparare la *Working Solution*: si diluisce la sonda *Senescence Green Probe* 1 a 500 nel *Senescence Buffer* e poi si mantiene la mix appena costituita a temperatura ambiente al buio, prima di aggiungerla alle cellule.

Il pellet contenuto nel tubo da citofluorimetria viene risospeso con 100 μ l di *Working Solution*, viene chiuso ermeticamente con il tappo e viene incubato in un termostato a 37°C, al buio, per 2 ore.

Al termine dell'incubazione si esegue un altro lavaggio, sempre con 1 ml di PBS + 1% FBS, centrifugando a 1800 rpm per 5 minuti, si elimina di nuovo il surnatante per inversione ed infine si risospende con 100 μ l sempre della soluzione PBS+1%FBS.

3.4 Acquisizione al citofluorimetro

Al termine dei lavaggi il campione viene letto con un citofluorimetro a flusso *BD FACSCanto™*, in grado di analizzare due parametri fisici e sei segnali di fluorescenza.

Lo strumento contiene tre sorgenti luminose laser: il primo, solido, emette nello spettro del blu a 488 nm, il secondo di tipo Elio-Neon che emette nel rosso a 635 nm ed il terzo che emette nel violetto a 405 nm. Il citofluorimetro viene calibrato una volta al giorno con una soluzione contenente delle *microbeads* in sospensione, in grado di emettere un segnale di fluorescenza ad intensità crescente e nota, in uno spettro di lunghezze d'onda analogo a quello dei fluorocromi utilizzati. L'analisi dei picchi prodotti dalle *microbeads* permette di mantenere lo strumento in condizioni di riproducibilità intra ed interserie e di valutarne le caratteristiche di sensibilità e linearità.

Di ogni campione vengono acquisiti 500.000 eventi ed i citogrammi vengono analizzati mediante il software DIVA, versione 5.



Figura 7: Citofluorimetro FACSCanto™ II.

La strategia di *gating* è la seguente:

- A. Studio delle caratteristiche fisiche SSC/FSC e *gating* sulle popolazioni dei linfociti e monociti;
- B. Studio dei marker CD3+ e CD4+, che permettono di distinguere i Linfociti T Helper dai Linfociti T Citotossici;
- C. Studio dell'espressione dei marker CD56+/CD3+, per distinguere le popolazioni dei linfociti T NK e le cellule NK;
- D. Studio dell'espressione del CD19+/CD3-, per identificare la popolazione dei Linfociti B.
- E. Mediana dell'intensità di fluorescenza della β -gal.

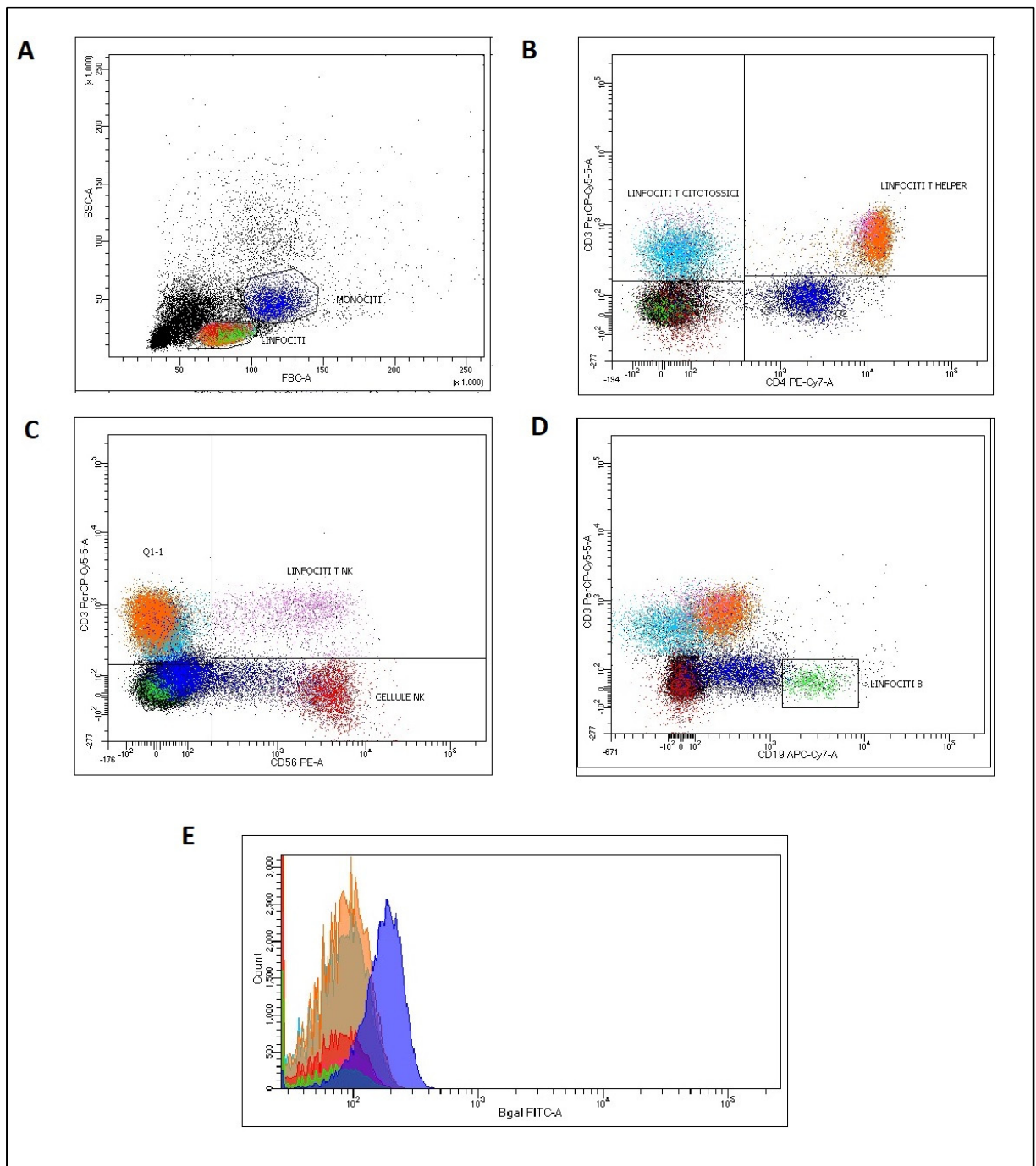


Figura 8: Strategia di gating per l'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie e la rivelazione dell'attività SA-βgal.

3.5 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono elaborati attraverso Microsoft Office Excel: i dati, presentati come media \pm deviazione standard (SD), sono stati analizzati attraverso lo Student's t-test. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

4 RISULTATI

Sono stati studiati 26 soggetti affetti da malattia da HIV (22 uomini e 4 donne), tutti tranne uno sottoposti a terapia antiretrovirale e con livelli di HIV-RNA plasmatico al di sotto del limite di rilevabilità (20 copie/ml) da almeno sei mesi; 3 donatori sani sono stati arruolati come controlli.

	Pazienti con HIV	Donatori sani
Età media (range)	47 (28/70)	56 (52/61)
Sesso		
M	21	0
F	5	3
Diagnosi di HIV	11 (1-27)	
≤ 5 anni	6	
6-10 anni	9	
≥ 11 anni	11	
Nadir T CD4 (cellule/mmc)	266 (27-531)	
HIV-RNA alla diagnosi (copie/ml)	168794 (930-996721)	
Tipo di terapia		
INI	7	
NNRTI	16	
INI/NNRTI	1	
EI	1	
Nessuna terapia	1	

Tabella 2: caratteristiche dei pazienti oggetto di studio. (INI: inibitori dell'integrasi; NNRTI: inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa; EI: inibitori di fusione.)

La tabella 2 mostra le caratteristiche dei pazienti con infezione da HIV; l'età media è risultata pari a 47 anni ed inferiore a quella dei tre controlli (56 anni). Il tempo medio trascorso dalla diagnosi di malattia all'arruolamento era di 11 anni (range 1-27), distribuito come segue: ≤ a 5 anni in sei pazienti, 6-10 anni in nove pazienti, 11 anni o più nei rimanenti undici. La media del nadir dei T CD4 è risultata pari a 266±126 cellule/mmc (range 27-531); in nove casi il nadir è

apparso inferiore a 200/mmc. Il picco medio di HIV-RNA plasmatico al momento dell'arruolamento è risultato pari a 168.794 ± 247.787 copie/ml (range 930-996.721); in dieci casi tale picco superava le 100.000 copie/ml. Le tipologie dei regimi di terapia antiretrovirale, comprendenti due o tre farmaci, risultavano distribuite come segue: INI-based in sette casi, NNRTI-based in 16 casi, INI/NNRTI-based in un caso, EI-based in un caso.

Le cellule mononucleate ottenute da sangue periferico sono state marcate per studiare l'attività SA- β gal sulle sottopopolazioni T, B, NK e monociti. I citogrammi ottenuti in seguito ad acquisizione al citofluorimetro sono stati letti ed analizzati mediante il software *FacsDiva* (BD Bioscience).

Come si osserva nella *figura 9*, è stata inizialmente analizzata l'espressione dei marcatori di superficie CD3 e CD4, che hanno permesso di distinguere i linfociti T helper (CD3+CD4+) e T citotossici (CD3+CD4-). È stata inoltre studiata la co-espressione dei marcatori CD56 e CD3, per distinguere i linfociti NK/T (CD3+CD56+) dalle cellule NK (CD3-CD56+); è stata infine analizzata l'espressione del marcatore CD19, attraverso il quale è possibile identificare i linfociti B (CD19+CD3-). L'identificazione dei monociti è avvenuta mediante lo studio dei parametri fisici (*forward scatter*, FSC e *side scatter*, SSC).

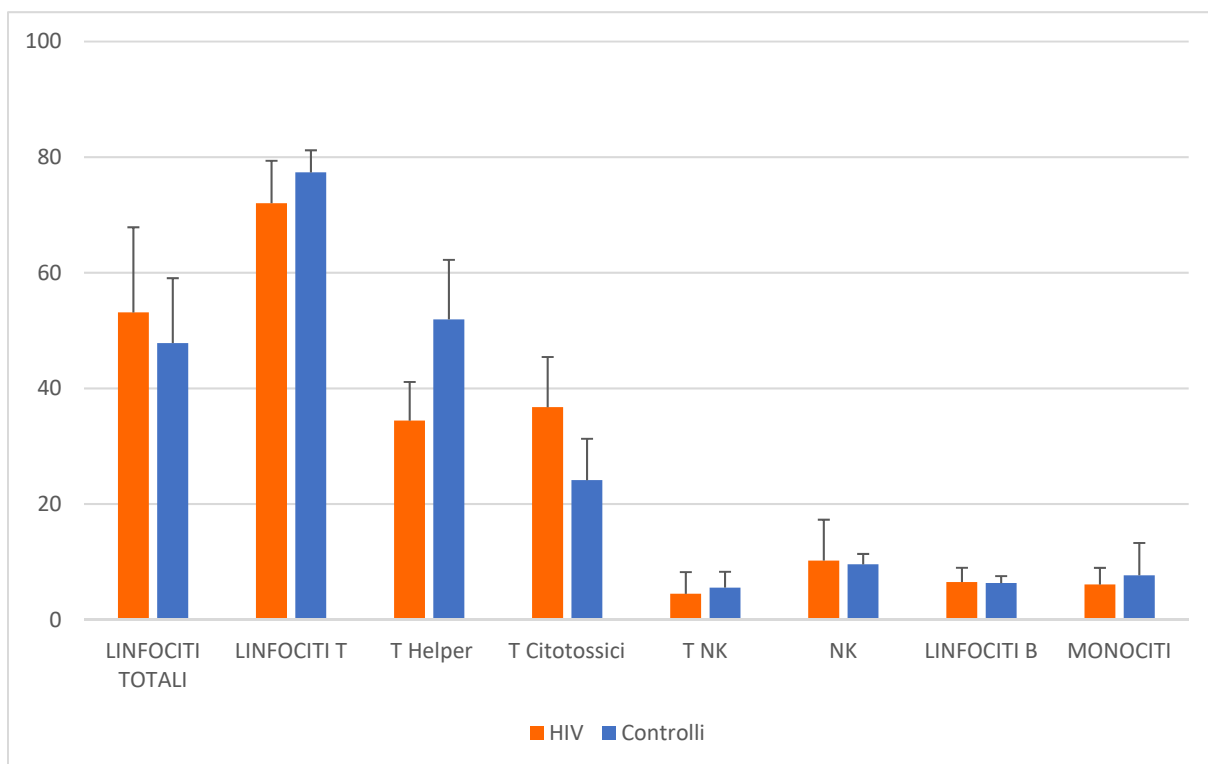


Figura 9: Analisi percentuale delle popolazioni linfocitarie presenti nei campioni di sangue periferico dei 26 pazienti e dei 3 donatori sani.

Nessuna differenza di rilievo fra casi e controlli è stata osservata per quanto riguarda la percentuale dei linfociti totali. Come atteso, nei soggetti con infezione da HIV la quota dei linfociti T helper risultava inferiore e la quota dei T citotossici superiore rispetto ai controlli; di conseguenza, nei pazienti con infezione da HIV, il rapporto CD4/CD8 appariva invertito. Del tutto sovrapponibili nei due gruppi le percentuali di linfociti B, cellule NK, cellule NK/T e monociti.

Per ciascuna delle sottopopolazioni analizzate è stata studiata la mediana dell'intensità di fluorescenza della β -galattosidasi per definirne lo stato di senescenza (*Figura 10*).

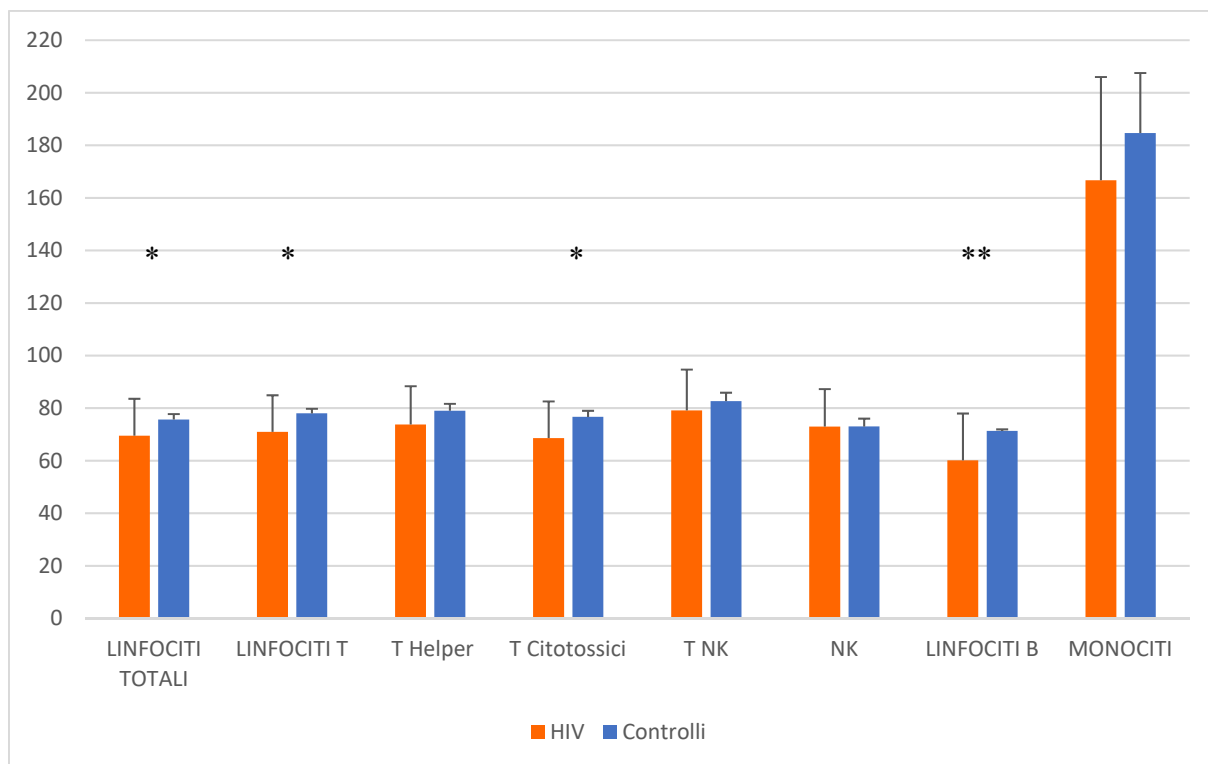


Figura 10: Analisi della mediana di intensità di fluorescenza della β -galattosidasi nelle popolazioni linfocitarie presenti nei campioni di sangue periferico dei 26 pazienti e dei 3 donatori sani.

Differenze significative fra soggetti con infezione da HIV e controlli si sono osservate a carico dei linfociti totali ($p < 0.05$) e di diverse sottopopolazioni linfocitarie: T, T citotossici ($p < 0.05$) e B ($p < 0.01$). Nessuna differenza di rilievo è stata invece rilevata per quanto riguarda l'espressione della β -galattosidasi da parte dei monociti.

Per cercare di comprendere se la tipologia di regime terapeutico utilizzato potesse avere un impatto sui fenomeni di senescenza cellulare, i soggetti con malattia da HIV sono stati suddivisi in base all'utilizzo di schemi comprendenti NNRTI o INI: non è emersa nessuna differenza di espressione della β -galattosidasi in nessuna delle popolazioni cellulari analizzate (dati non mostrati).

Confrontando i pazienti trattati da meno di tre anni (3 soggetti) con quelli trattati da oltre tre anni (22 soggetti), non sono emerse variazioni statisticamente significative nella distribuzione percentuale delle diverse sottopopolazioni linfocitarie, inclusi T helper e T citotossici (*Figura 11*).

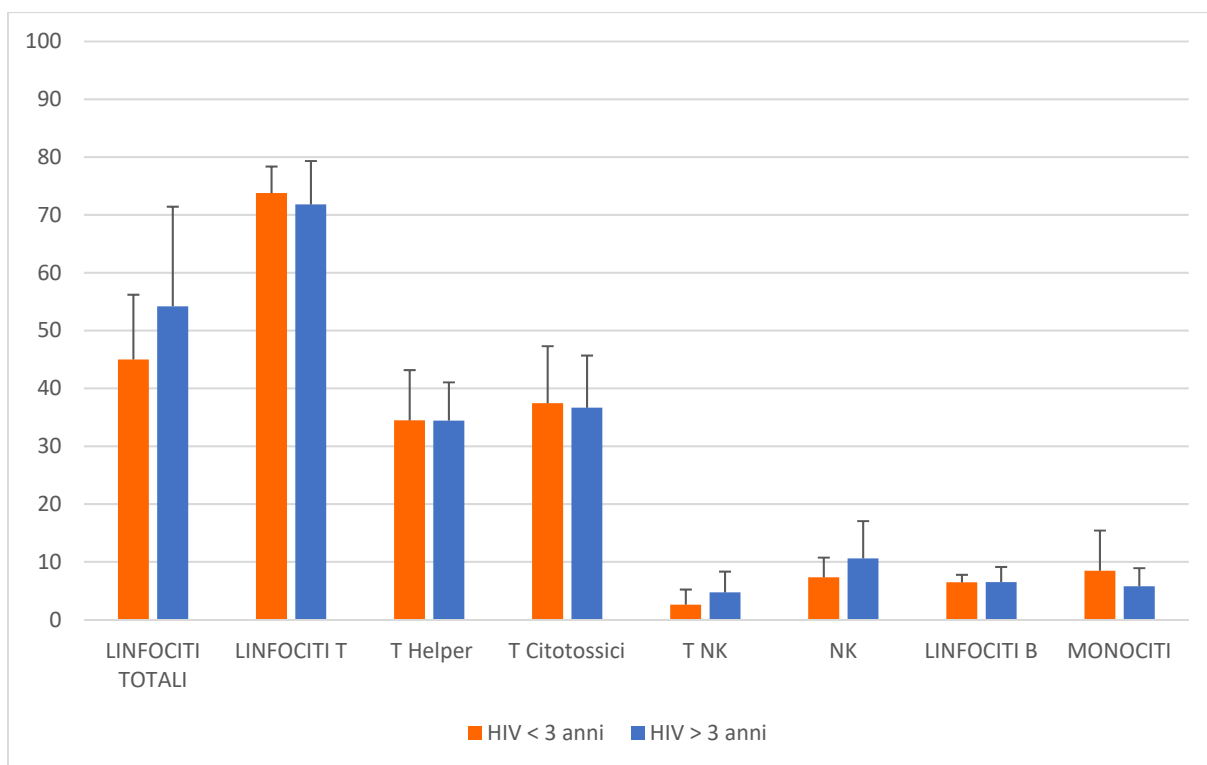


Figura 11: Analisi percentuale delle popolazioni linfocitarie presenti nei campioni di sangue periferico dei 26 pazienti suddivisi per durata della terapia.

La mediana di intensità di fluorescenza della β galattosidasi sulle diverse sottopopolazioni è a sua volta risultata simile nei due gruppi (*figura 12*); nei soggetti trattati da meno di tre anni si è evidenziata la tendenza ad una più bassa espressione di β galattosidasi da parte di diverse sottopopolazioni linfocitarie (B, NK, NK/T), e la tendenza ad una più elevata espressione da parte dei monociti.

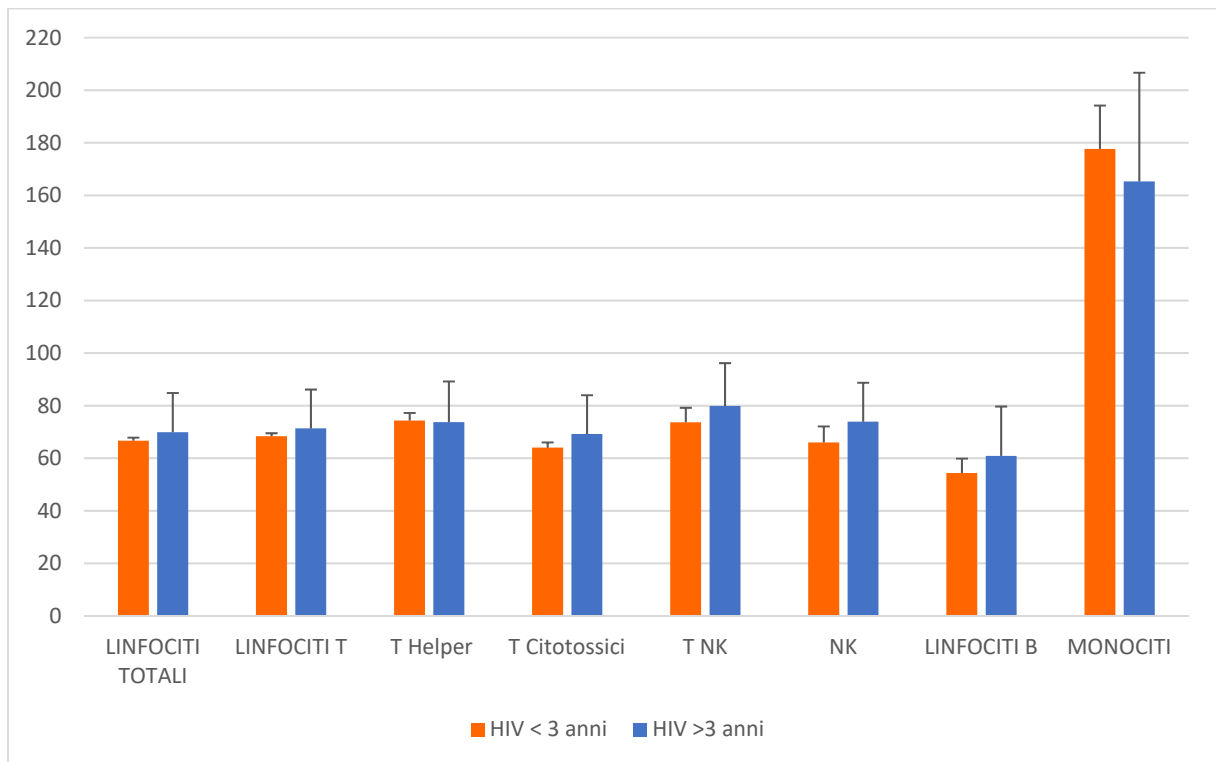


Figura 12: Analisi della mediana di intensità di fluorescenza della β -galattosidasi nelle popolazioni linfocitarie presenti nei campioni di sangue periferico dei 26 pazienti suddivisi per durata della terapia.

Confrontando l'intensità di fluorescenza della β galattosidasi dei pazienti senza complicanze metaboliche (22 soggetti) con quella dei pazienti dismetabolici (quattro soggetti, di cui due con complicanze cardiache, uno con pregresso sarcoma di Kaposi e uno con sindrome metabolica) non sono emerse variazioni statisticamente significative (figura 13). I pazienti dismetabolici presentano tuttavia livelli di β galattosidasi tendenzialmente superiori rispetto agli altri; tale tendenza è osservabile in tutte le sottopopolazioni analizzate, particolarmente a livello di monociti.

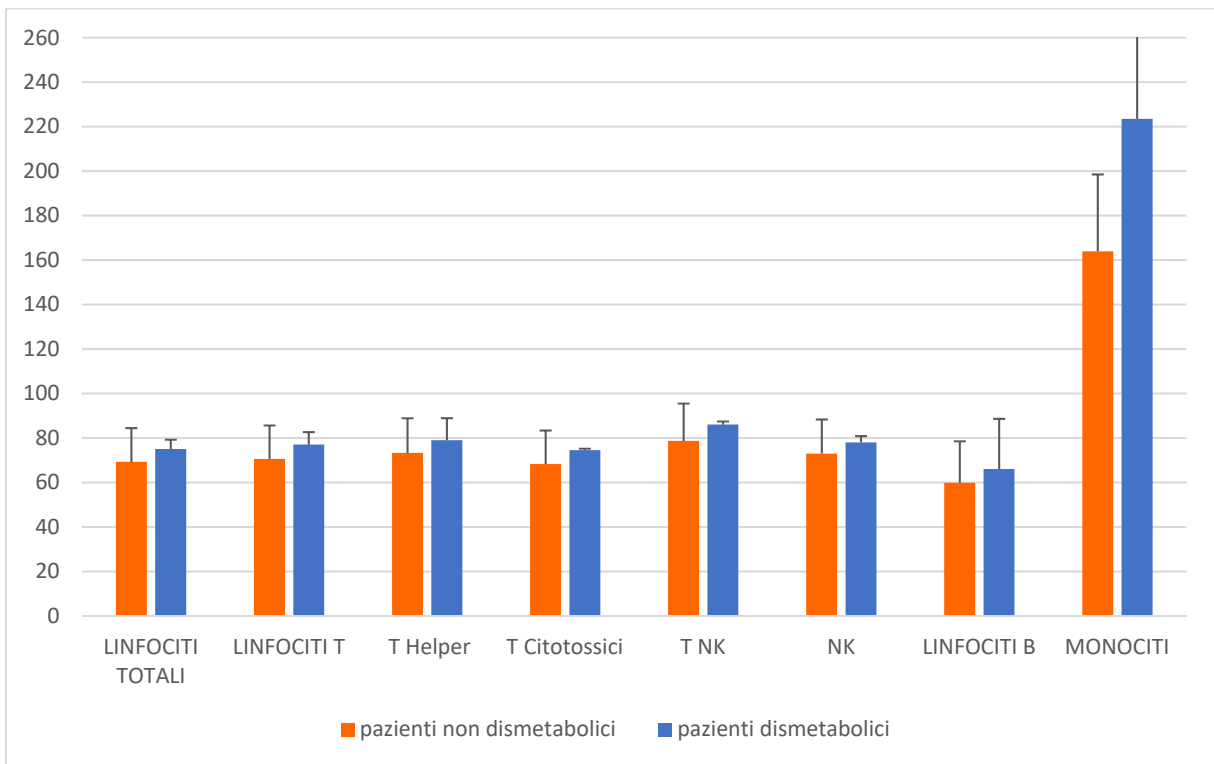


Figura 13: Analisi della mediana di intensità di fluorescenza della β -galattosidasi nelle popolazioni linfocitarie presenti nei campioni di sangue periferico dei 26 pazienti suddivisi per complicanze metaboliche.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Da quando sono disponibili regimi di terapia antiretrovirale (ART) che combinano più farmaci/classi di farmaci, la malattia da HIV, in passato progressiva e molto spesso mortale, è divenuta una patologia cronica in cui l'aspettativa di vita appare sempre più sovrapponibile a quella della popolazione generale [32]. A questo aumento di longevità consegue il progressivo aumento del numero di pazienti che raggiungono la senescenza; si stima che al momento vi siano oltre 4 milioni di persone con infezione da HIV e più di 50 anni d'età, quota che appare peraltro in continuo incremento [33]. Nonostante il controllo della replicazione virale sia divenuto estremamente efficace, fra le persone con malattia da HIV vi è ancora un eccesso di morbilità e mortalità rispetto alla popolazione generale. Le patologie correlate all'età, fra cui quelle cardiovascolari, i tumori, l'osteoporosi e i disturbi cognitivi si verificano con maggior frequenza nelle persone con malattia da HIV [34]. Dati della letteratura dimostrano inoltre che le malattie che si verificano con l'aumentare dell'età nella popolazione generale, si verificano più precocemente nei soggetti con infezione da HIV [27]. La presenza di uno stato di infiammazione cronica gioca probabilmente un ruolo fondamentale nello sviluppo delle patologie non-AIDS; nelle persone con malattia da HIV, diversi marcatori infiammatori e di coagulazione (in particolare PCR ad alta sensibilità, IL-6 e D-dimeri) sono stati associati con la mortalità complessiva e lo sviluppo di patologie non-AIDS correlate [35] [36]. Le cause della persistenza dell'immonoattivazione non sono del tutto note ma potrebbero essere correlate a persistenza di bassi livelli di replicazione virale (non rilevabile con le metodiche comunemente impiegate nella pratica clinica), ad infezioni croniche (ad esempio CMV) e a fenomeni di traslocazione microbica a livello intestinale; la perdita di integrità della barriera mucosa intestinale avviene infatti molto precocemente in corso di infezione da HIV con conseguente aumento del passaggio di prodotti metabolici e microbici nel torrente circolatorio [37].

Sulla base di tali premesse, si comprende come lo studio dei fenomeni di immunosenescenza e *inflamm-aging* in relazione alla malattia da HIV abbia destato negli ultimi anni un grande

interesse ^[21]. La β -galattosidasi è un enzima lisosomiale la cui attività aumenta in condizioni di senescenza cellulare (*senescence associated β -galactosidase*, SA- β gal); rappresenta quindi un potenziale strumento per indagare i fenomeni legati all'invecchiamento in differenti popolazioni cellulari ^[30]. Poiché lo stato di infiammazione cronica che accompagna l'infezione da HIV può essere considerato simile ad un processo di invecchiamento ^[21], il presente lavoro è stato condotto con lo scopo di studiare l'espressione della β -galattosidasi come marcatore di senescenza cellulare espresso da popolazioni di cellule circolanti provenienti da pazienti affetti da malattia da HIV sottoposti a terapia antiretrovirale. La prima fase ha riguardato la messa a punto di un saggio citofluorimetrico adatto allo scopo; successivamente sono stati studiati linfociti B, linfociti T, cellule NK, cellule NK/T e monociti, analizzando e quantificando all'interno di ogni popolazione (individuata attraverso l'espressione di caratteristici marcatori di superficie) l'attività enzimatica associata a senescenza della β -galattosidasi. Per quanto di nostra conoscenza, non vi sono precedenti studi che abbiano valutato l'espressione della β -galattosidasi in soggetti affetti da malattia da HIV.

L'analisi è stata condotta su 26 pazienti e 3 donatori sani; la metodica è apparsa tecnicamente affidabile, riproducibile ed in grado di dare risultati di tipo quantitativo. La possibilità di utilizzare un kit commerciale ha reso il test più facile da eseguire e standardizzare. L'impiego del citofluorimetro consente inoltre di studiare l'attività della β -galattosidasi a livello di singola popolazione (o sottopopolazione) cellulare, virtualmente in ogni tipo di fluido biologico; ciò offre ampi spazi per la valutazione dei fenomeni di senescenza cellulare in molti ambiti patologici ed in numerosi compartimenti biologici.

Le differenze osservate nei soggetti con infezione da HIV a carico dei linfociti T helper e T citotossici, rispettivamente ridotti ed aumentati rispetto ai controlli, erano largamente attese; degno di nota il fatto che tali differenze non erano comunque tali da raggiungere una significatività statistica, il che è con tutta probabilità dovuto all'immunoricostruzione indotta

dalla terapia antiretrovirale, che tende a riequilibrare nel tempo il rapporto fra le due popolazioni cellulari.

Differenze significative sono invece emerse studiando l'espressione della β -galattosidasi: nei controlli, sia i linfociti totali che la maggior parte delle sottopopolazioni linfocitarie dei donatori sani sono apparsi più senescenti nei controlli rispetto a quanto osservato nei soggetti con malattia da HIV. Questo dato può apparire sorprendente, soprattutto considerando che l'infezione da HIV, per l'infiammazione cronica sistemica che la accompagna, è considerata patologia in grado di indurre un invecchiamento precoce [28]. Due aspetti vanno tuttavia tenuti in considerazione. Il primo è il fatto che tutti i pazienti inclusi nello studio (ad eccezione di uno) assumevano stabilmente farmaci antiretrovirali ed avevano livelli di replicazione virale non rilevabili in molti casi da anni; è noto infatti che ciò contribuisce a ridurre l'infiammazione e l'immunoattivazione *HIV-correlate* [38]. Analogamente, il prolungato ed efficiente controllo della replicazione virale garantito dalla terapia potrebbe riflettersi anche sull'espressione di marcatori di senescenza cellulare, inducendone la diminuzione. Un limite del presente studio è la mancanza di un gruppo di pazienti non sottoposti a terapia antiretrovirale, più difficile da ottenere anche in considerazione che le attuali linee guida raccomandano l'inizio immediato della terapia in tutti i soggetti con nuova diagnosi di infezione da HIV. Il secondo aspetto degno di nota è che l'età media del gruppo di controllo (peraltro numericamente limitato) era sensibilmente più elevata rispetto a quella dei soggetti con infezione da HIV; in tal senso, si potrebbe ipotizzare che l'espressione della β -galattosidasi sia maggiormente sensibile ai processi di invecchiamento legati all'aumentare dell'età piuttosto che allo stato di infiammazione/immunoattivazione residua causato da patologie come la malattia da HIV. Degno di nota appare anche il fatto che, nei pochi pazienti con infezione da HIV e malattie cardiovascolari e/o dismetaboliche, l'espressione della β -galattosidasi è tendenzialmente aumentata sia a livello di linfociti che, in modo più evidente, a livello di monociti. L'ampliamento di questi sottogruppi di pazienti potrebbe consentire di apprezzare meglio un

eventuale impatto sull'espressione della β -galattosidasi dovuto alla presenza di co-morbilità tipiche della senescenza.

In passato è stata indagata la potenziale superiorità di alcuni farmaci antiretrovirali rispetto ad altri, in termini di riduzione dell'infiammazione e dell'immunoattivazione *HIV-correlate* [39]; suddividendo i pazienti in studio per tipo di terapia non sono emerse differenze statisticamente significative nell'espressione della β -galattosidasi. A tal riguardo, va comunque sottolineato il fatto che i farmaci ed i regimi terapeutici utilizzati nel trattamento dell'infezione da HIV sono divenuti progressivamente sia più efficaci che più tollerabili, anche sotto il profilo metabolico.

Nessuna differenza significativa è stata infine osservata neppure in relazione alla durata della terapia (≤ 3 anni versus > 3 anni). Anche questo dato potrebbe apparire in qualche modo inatteso, ma va a sua volta letto in relazione alla scarsa numerosità dei pazienti con terapie di breve durata (tre in tutto), cosa che rende i due gruppi difficilmente confrontabili a livello statistico.

Al di là dei limiti imposti dalla casistica, la metodica di analisi dell'espressione della β -galattosidasi in citofluorimetria è apparsa di facile esecuzione ed interpretazione; la sua applicazione su casistiche più numerose, che comprendano situazioni immuno-virologiche e cliniche distinte potrà in futuro aiutarci a comprendere se la β -galattosidasi possa costituire un affidabile marcatore di senescenza cellulare in soggetti affetti da malattia da HIV, nonché di stabilire se possano esistere fenomeni di correlazione con la capacità del paziente di ottenere una buona immunoricostituzione in seguito a terapia antiretrovirale o con il rischio di sviluppare nel tempo patologie opportunistiche e/o patologie non-AIDS correlate. L'obiettivo in un più lungo termine è quello di testare l'espressione della β -galattosidasi come potenziale marcatore prognostico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Antonelli G., Clementi M., *Principi di Virologia Medica*, Casa Editrice Ambrosiana, 2018, III edizione.
- [2] Waymack JR, Sundareshan V. *Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*. StatPearls Publishing; 2020 Jan.
- [3] Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. *Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic*. Microbial Cell. 2016 Sep 05;3(9):451-475.
- [4] Kagaayi J, Serwadda D. *The History of the HIV/AIDS Epidemic in Africa*. Curr HIV/AIDS Rep. 2016 Aug;13(4):187-93.
- [5] Chen B. *HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure*. Biochemistry. 2016 May 10;55(18):2539-52.
- [6] Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., Sozzani S., *Immunologia cellulare e molecolare*. Elsevier Health Science Italy, 2012, VII edizione.
- [7] Vogler IH, Alfieri DF, Gianjacomo HDB, Almeida ERD, Reiche EMV. *Safety of monitoring antiretroviral therapy response in HIV-1 infection using CD4+ T cell count at long-term intervals*. Cad Saude Publica. 2018 Oct 22;34(10): e00009618.
- [8] Abbas A. K., Aster J.C., Kumar V., Robbins. *Fondamenti di patologia e fisiologia*. Edra, 2013, IX edizione.
- [9] Justiz Vaillant AA, Naik R *HIV- Associated Opportunistic Infection*. StatPearls July 2020.
- [10] Battistini Garcia SA, Guzman N *Acquired immune deficiency syndrome(AIDS) CD4+ Count*. StatPearls August 2020.
- [11] Pantaleo G, C Graziosi, e A Fauci. *New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. New England Journal of Medicine 328:327–335, 1993.
- [12] Xu HF, Zhou HZ, Jiang LX, Zhang N, Zhang X, Guan XR. *Trends in HIV infection in the First Affiliated Hospital of Harbin, China*. BMC Infect. Dis. 2014 Nov 25;14:605 6
- [13] Rayne F, Debaisieux S, Tu A, Chopard C, Tryoen-Toth P, Beaumelle B. *Detecting HIV-1 Tat in Cell Culture Supernatants by ELISA or Western Blot*. Methods Mol. Biol. 2016;1354:329-42.
- [14] Monteiro S, Brigeiro M, Mora C, Vilella W, Parker R. *A review of HIV testing strategies among MSM (2005-2015): Changes and continuities due to the biomedicalization of responses to AIDS*. Glob Public Health. 2019 May;14(5):764-776.
- [15] Pintye J, Singa B, Wanyonyi K, Itindi J, Kinuthia J, Langat A, Nganga L, Katana A, Baeten JM, McGrath CJ, John-Stewart G. *Preexposure Prophylaxis for Human Immunodeficiency Virus (HIV) Prevention Among HIV-uninfected Pregnant Women: Estimated Coverage Using Risk-based Versus Regional Prevalence Approaches*. Sex Transm Dis. 2018 Dec;45(12): e98-e100.)
- [16] Fernando D. *HIV Preexposure Prophylaxis*. Am J Public Health. 2018 Dec;108(12):e27.

- [17] Mora Carpio AL and Adil A. *Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Antiretroviral Therapy*, July 14, 2020.
- [18] Justiz Vaillant AA and Gulick PG. *HIV Disease*. July 21, 2020.
- [19] Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, Kotb R, Hirokawa K, Pawelec G: *Immunosenescence and cancer*. *Crit Rev Oncog* 2013; 18: 489–513.
- [20] Franceschi C, Campisi J: *Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(suppl 1):S4–S9.
- [21] Decrion AZ, Dichamp I, Varin A, Herbein G: *HIV and inflammation*. *Curr HIV Res* 2005; 3: 243–259.
- [22] Lipsky MS, King M: *Biological theories of aging*. *Dis Mon* 2015; 61: 460–466.
- [23] Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T: *Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans*. *Semin Immunol* 2012; 24: 331–341.
- [24] Fülöp T, Larbi A, Pawelec G: *Human T cell aging and the impact of persistent viral infections*. *Front Immunol* 2013; 4: 271.
- [25] Fulop T, Le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A: *Cellular signaling in the aging immune system*. *Curr Opin Immunol* 2014; 29: 105–111.
- [26] Castellani GC, Menichetti G, Garagnani P, Giulia Bacalini M, Pirazzini C, Franceschi C, Collino S, Sala C, Remondini D, Giampieri E, Mosca E, Bersanelli M, Vitali S, Valle IF, Liò P, Milanese L: *Systems medicine of inflammaging*. *Brief Bioinform* 2016; 17: 527–540.
- [27] Bhatia R, Ryscavage P, Taiwo B: *Accelerated aging and human immunodeficiency virus infection: emerging challenges of growing older in the era of successful antiretroviral therapy*. *J Neurovirol* 2012; 18: 247–255.
- [28] *Cellular Senescence, Immunosenescence and HIV*. Fülöp T.d Herbein G.a Cossarizza A.b Witkowski J.M.c Frost E.e Dupuis G.f Pawelec G.g Larbi A.h *Interdiscip Top Gerontol Geriatr* 2017;42:28-46)
- [29] D.J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, J.D. Erusalimsky, *Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 3613–3622.
- [30] Bo YL, Jung AH, Jun SI et al. *Senescence associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase*. *Aging Cell* 2005; 5: 187-195.
- [31] Debacq-Chainiaux F, D Erusalimsky J, Campisi J, Toussaint O. *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*.
- [32] Trickey AMM, Vehreschild JJ, Obel N, et al. *Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013. A collaborative analysis of cohort studies*. *Lancet HIV* 2017, 4:e349-e356

- [33] Mahy M, Autenrieth CS, Stanecki K, et al. *Increasing trends in HIV prevalence among people aged 50 years old and older: evidence from estimates and survey data*. AIDS 2014, 28 (Suppl. 4):S453-S459
- [34] Guaraldi G, Orlando G, Zona S et al. *Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population*. Clin Infect Dis 2011, 53:1120-1126
- [35] Kuller LH, Tracy R, Belloso W, et al. *Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection*. Plos Med 2008, 5:e203
- [36] Bahram H, Budoff M, Haberlen SA, et al. *Inflammatory markers associated with subclinical coronary artery disease: the multicenter AIDS cohort study*. J Am Heart Assoc 2016, 5
- [37] Aron-Wisnewsky J, Clement K. *The gut microbiome, diet and link to cardiometabolic and chronic disorders*. Nat Rev Nephrol 2016, 12:169-181
- [38] Kalesidis T, Tran TT, Stein JH, et al. *Changes in inflammation and immune activation with atazanavir-, raltegravir-, darunavir-based initial antiretroviral therapy: ACTG 5260s*. Clin Infect Dis 2015, 63:651-660).
- [39] Zhang X, Cao R, Liu R, et al. *Reduction of the HIV-protease inhibitor-induced ER stress and inflammatory response by raltegravir in macrophages*. Plos One, 2014,

RINGRAZIAMENTI

Nel concludere la stesura della mia tesi non potevo che porgere dei calorosi ringraziamenti alle persone che più mi sono state vicine nel mio percorso universitario in questi anni e a tutti coloro che hanno collaborato alla realizzazione di questo lavoro.

Partendo dal professor Andrea Costantini e alla professoressa Nadia Viola che si sono sempre dimostrati disponibili e professionali nei miei confronti e mi hanno consentito di poter svolgere il tirocinio nel laboratorio di Immunologia Clinica, dandomi la possibilità di ampliare la mia formazione tecnica.

Porgo i miei ringraziamenti alla dott.ssa Elena Marinelli Busilacchi che mi ha seguito meticolosamente dai primi campioni analizzati, nel perfezionamento della metodica fino alla conclusione della tesi dandomi suggerimenti preziosi, e con essa ci tenevo a ringraziare tutti i collaboratori del laboratorio di Immunologia Clinica in particolare i Tslb Simona e Stefano.

Ringrazio i miei compagni di corso sempre pronti a collaborare per affrontare le difficoltà che si sono presentate lungo il nostro percorso.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, in particolare mia madre Stefania e mio padre Claudio che hanno sempre creduto in me anche nei momenti di difficoltà dimostrandomi fiducia e vicinanza che mi hanno spronato a migliorarmi. Vanno inoltre ringraziati per avermi concesso la possibilità di realizzare questo percorso.

Per ultimo ma non per importanza ringrazio il mio fidanzato Manuele che mi è sempre stato vicino, mi ha incoraggiato e supportato nella quotidianità e durante tutto il percorso universitario.