RETROVIRUS

Grande famiglia, dalle proprietà patogenetiche estremamente varie:

- **tumori rapidi ed aggressivi**
- **tumori con lunga latenza**
- **malattie neurologiche**
- **immunodeficienze**
- **infez. asintomatiche**

Scoperti agli inizi del'900, come agenti filtrabili in grado di provocare anemie in cavalli, leucemie e sarcomi nei polli, adenocarcinomi mammari nei topi.

Nel 1975 individuati geni trasformanti v-onc (oncogeni) nonché le sequenze cellulari c-onc (proto-oncogeni) da cui tali geni derivano.

4 Retrovirus che infettano l'uomo:

* **2 causano patologie leucemiche e neurologiche: HTLV 1 e HTLV2 (Human T Lymphotropic Virus);**
* **2 sono causa dell'AIDS: HIV-1 e HIV-2.**

Retrovirus

Morfologia:

Particelle sferiche di 80-150 nm, con inviluppo pericapsidico. 2 copie di (+) RNA a singola elica, di circa 9 kb.

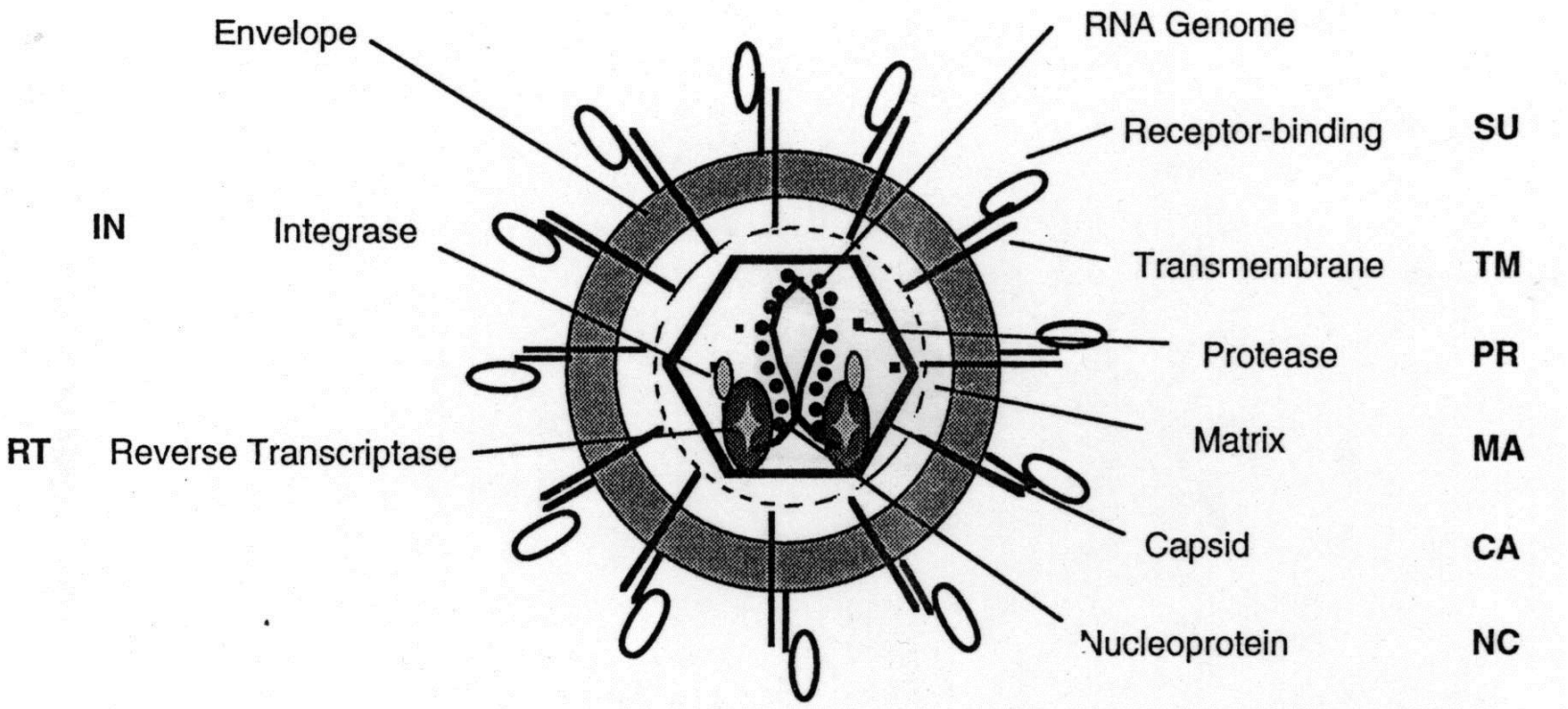


FIG. 2. The retrovirus virion. This highly schematic figure shows the relative locations of the various structures and proteins. It is not intended to be an accurate depiction of their organization.

Geni dei Retrovirus

Tutti i retrovirus hanno i geni in 1. Quelli complessi hanno anche i geni in 2

	Gene	Proteina	Funzione
1	**gag**	matrice Capside Nucleocapside	Antigene di gruppo, codifica una poliproteina che è processata per formare le proteine strutturali interne all'inviluppo
		Proteasi	Taglio proteolitico della proteine Gag/Pol
	pol	Trascrittasi inversa Integrasi	Trascrive l'RNA virale in DNA a doppia elica. Ha bassa fedeltà ⇒alto tasso di mutazioni del virus. Ha attività di Rnasi ⇒ distrugge l'RNA stampo Integrazione del DNA virale nel genoma cellulare
	env	Superficie (HIV gp120) transmembrana (HIV gp41)	Si lega al recettore cellulare Consente la fusione con la membrana cellulare
2	**tat (HIV)** **tax (HTLV)**	TAT TAX	Transattivatori. Attivano la trascrizione del DNA virale ed anche di geni cellulari
	rev **rex**	REV REX	Facilitano il trasporto dell'mRNA virale non spliced fuori dal nucleo per essere tradotto. Gli mRNA non spliced codificano proteine strutturali ma hanno difficoltà a lasciare il nucleo

Replicazione dei Retrovirus

[Schema generale, con differenze fra i diversi virus]

1. **Fusione dell'inviluppo con la membrana cellulare (recettori).**
2. **Penetrazione e Uncoating (spoliazione) parziale**
3. **RNA virale trascritto in DNA dalla trascrittasi inversa ⇒ DNA a doppia elica con LTR alle estremità**
4. **DNA entra nel nucleo e si integra, per azione dell'integrasi (gene pol)**
5. **Il DNA viene trascritto dalla RNA pol cellulare.**

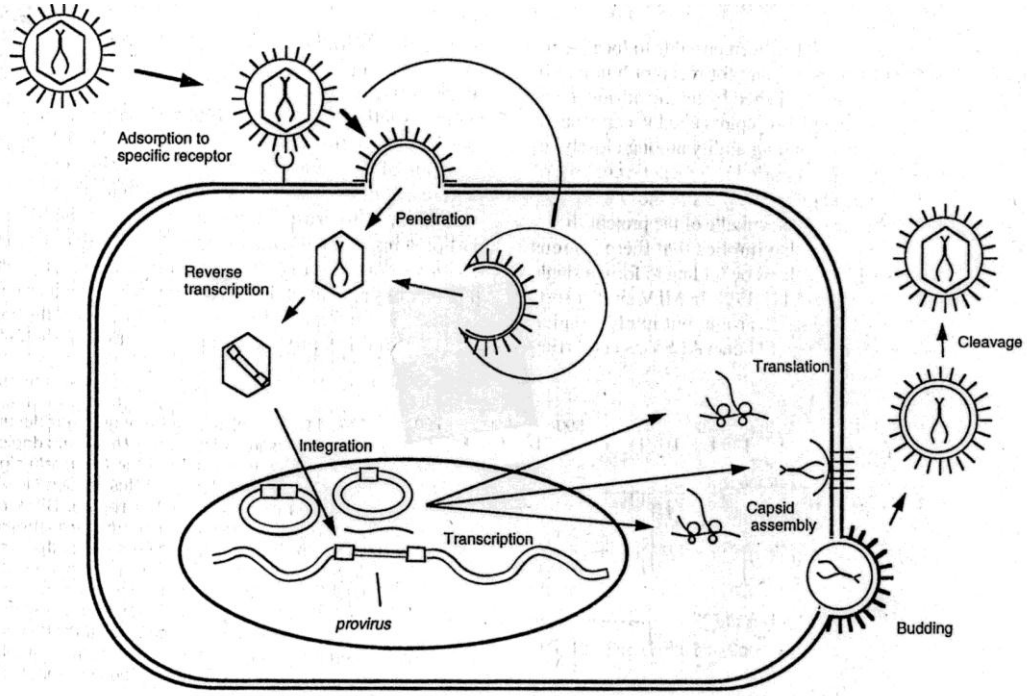


FIG. 12. Overview of retrovirus replication.

Replicazione dei Retrovirus

6. 2 specie di RNA: spliced (codifica env e geni regolatori) e intero (o nuovo genoma o poliproteina Gag/Pol)
7. Due proteine di membrana, codificate da env, attraverso RE e Golgi si inseriscono nella membrana cellulare. Una riconosce il recettore, una responsabile della fusione.
8. Taglio proteolitico delle proteine capsidiche.
9. Le proteine capsidiche, codificate da gag, si assemblano attorno a genoma, RT e integrasi
10. Gemmazione attraverso la membrana, senza lisi o con lisi (soprattutto lentivirus)

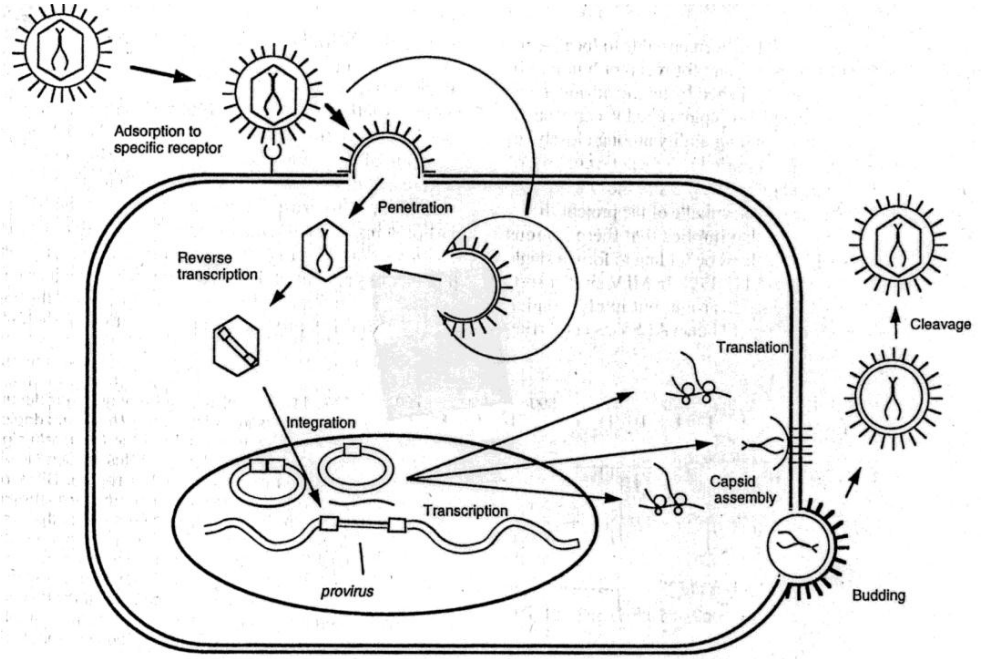


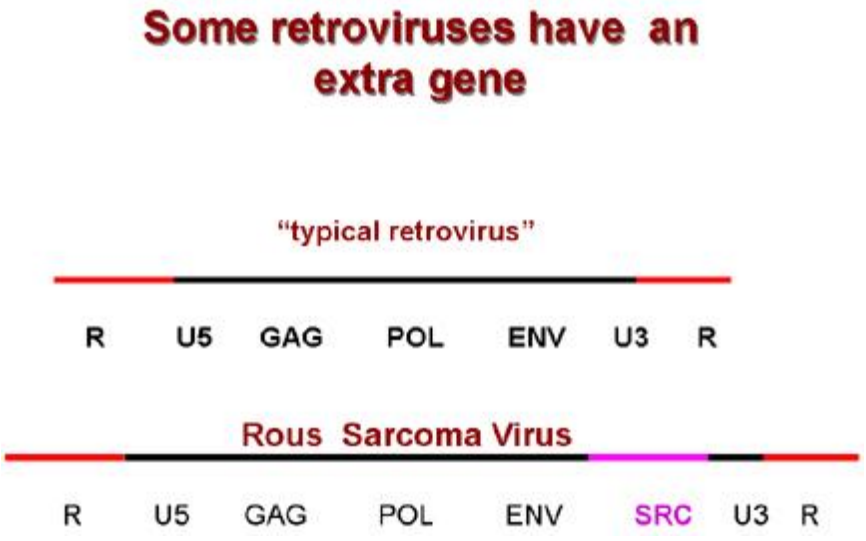
FIG. 12. Overview of retrovirus replication.

Retrovirus Oncogeni

Retrovirus oncogeni sono stati isolati e studiati in numerose specie animali, in cui possono provocare sia patologie neoplastiche (leucemie, linfomi, sarcomi, ecc) che non neoplastiche (glomerulonefriti, immunodepressioni, ecc.).

Negli animali:

Alcuni di loro danno patologie neoplastiche acute (con breve latenza); la loro azione oncogena è fatta risalire alla presenza nel loro genoma dei v-onc, mutati rispetto ai c-onc (geni che regolano lo sviluppo embrionale ed il differenziamento) → introduzione nella cellula di oncogeni sotto il controllo virale → maggiore attività. Nella cellula normale molti c-onc sono controllati da geni oncosoppressori (es p53 e Rb).



Retrovirus Oncogeni

1. **Tutte le cellule dei vertebrati hanno dei geni c-onc.**
2. **I c-onc hanno la funzione di promuovere la moltiplicazione ed il differenziamento cellulari durante lo sviluppo. Hanno una attività bassa o assente nei tessuti già differenziati.**
3. **Alcuni retrovirus hanno acquisto (per trasduzione?) un onc e possono passarlo in uno stato di "attivazione" (sotto LTR) ad altre cellule, trasformandole.**
4. **Altri non hanno onc, ma possono attivare quelli cellulari.**

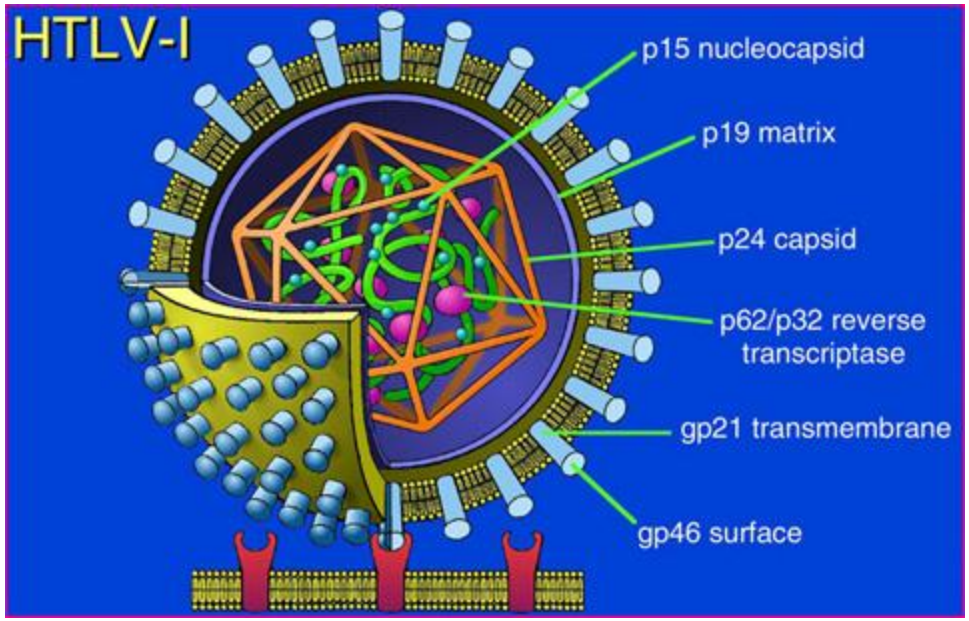
Prodotti di oncogeni:

Fattori di crescita
Recettori per fattori di crescita
Protein chinasi di membrana
Fattori nucleari per l'espressione di proteine
Inibitori dell'apoptosi
Recettori ormonali

Retrovirus umani

Negli ultimi anni scoperti retrovirus che infettano l'uomo: 2 causano patologie leucemiche e neurologiche: HTLV-1 e HTLV-2 (Human T Lymphotropic Virus) e 2 (HIV-1, HIV-2) sono causa dell'AIDS.

HTLV-2 = forse associato a tricoleucemia (leucemia "a cellule capellute"). Meno frequente di HTLV-1. Ruolo in patologia umana ancora da definire completamente. Immortalizza linfociti umani "in vitro".



HTLV-1

Il virus ha distribuzione geografica (sud del Giappone, Caraibi, Africa, America centrale; sporadicamente anche in Italia meridionale e USA; abbastanza frequente in tossicodipendenti).

Associato a leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATL), malattia abbastanza rara ed aggressiva. In Giappone l'incidenza della leucemia è di 1 caso ogni 1500 adulti infettati.
Probabilmente associato anche a encefalomielopatie croniche (paraparesi spastica tropicale).

Il virus isolato è scarsamente infettante; per l'infezione è necessario il contatto fra un linfocita infetto ed un linfocita attivato → difficile trasmissione interumana (sangue, rapporti sessuali, allattamento).
Negli USA obbligatorio screening di sangue/organi per anticorpi contro HTLVI/II (difficile distinguerli sierologicamente).

HTLV-1 e Oncogenesi

Associazione fra HTLV-1 e leucemia linfoide T dell'adulto:

I pazienti hanno anticorpi contro il virus
Il DNA provirale è integrato nel genoma delle cellule leucemiche
HTLV-1 "in vitro" immortalizza linfociti T umani

HTLV-1 *NON* ha oncogeni

Supposto meccanismo oncogeno:

Il virus codifica tax (proteina transattivante) ⇒ attivazione anche di geni cellulari, fra cui Interleuchina 2 (fattore di crescita dei linfociti), il suo recettore ed alcuni oncogeni cellulari ⇒ si stabilisce un circuito autocrino che porta a crescita incontrollata dei linfociti (produzione sia di IL-2 che del recettore)

I Lentivirus sono comuni in natura:

Virus:	Ospite:	Malattia:
SIVcpz	Scimpanzè	nessuna
SIVagm	Cercopiteco	nessuna
SIVmnd	Mandrillo	nessuna
Visna-Maedi	Pecora	encefalite, respiratoria, artrite
BIV	Bovini	nessuna
FIV	Felini	immunodeficienza, cachessia, enc.
CAEV	Capre	anemia, cachessia
EIAV	Cavalli	anemia, encefalite
HIV-1, HIV-2	Uomo	immunodeficienza

Caratteristiche biologiche dei Lentivirus:

Oltre a gag, pol e env, i Lentivirus codificano proteine transattivatrici (simil-TAT) e che controllano il trasporto dell'RNA (simil-REV)

Persistono per tutta la vita dell'ospite: si integrano nei cromosomi, evadono la risposta immune

Hanno elevata frequenza di mutazione

Replicano in macrofagi

Tutti quelli finora caratterizzati utilizzano come recettori (o co-r.) quelli per le chemiochine

L’infezione si sviluppa in 3 stadi:

1) l’infezione iniziale è associata a rapida replicazione virale e disseminazione, spesso associata a malattia passeggera

2) Segue un periodo di latenza clinica, in cui il virus è controllato dal sistema immunitario e non c’è malattia

3) dopo un periodo di alcuni anni, i livelli replicativi aumentano, e si verifica la malattia

L’insorgenza della malattia è influenzata da diversi cofattori, fra cui:

background genetico dell’ospite (a seconda del ceppo, resistenti o più o meno sensibili)

età (individui giovani più suscettibili a malattie rapide)

stress (animali che super-lavorano hanno malattie più gravi)

fattori virali (ceppi virali con diversa virulenza)

HIV è la causa dell'AIDS

(Rispetta i postulati di Koch)

Associazione Epidemiologica:

- **HIV è presente in tutti i pazienti con AIDS**
- **I livelli virali predicono sviluppo ed andamento della malattia**
- **Farmaci che inibiscono HIV migliorano la malattia**

Isolamento del Virus:

- **Il virus può essere isolato da tutti i pazienti**
- **In vitro infetta e lisa le cellule bersaglio**

Trasmissione e patogenesi:

- **Personale di laboratorio e medico che si è infettato accidentalmente con HIV ha sviluppato AIDS**
- **HIV e SIV possono causare AIDS nelle scimmie**

Nonostante le fortissime evidenze disponibili, ci sono gruppi di pazienti e anche qualche scienziato che affermano che la causa dell'AIDS deve ancora essere identificata

HIV-2

Isolato da un paziente del Senegal affetto da AIDS.

Retrovirus simile a HIV, ma sufficientemente diverso da essere considerato un sierotipo diverso.

HIV-2 è in realtà più simile a SIV_{sm} e a SIV_{mac} (Simian Immunodeficiency Virus), dal quale probabilmente deriva.

SIV_{sm} infetta il cercocebo senza causare malattia, anche se in circolo ci sono elevati livelli di virus è più importante il controllo dell'infezione che le proprietà del virus

Sia HIV-1 che HIV-2 provocano l'AIDS, ma mentre HIV-1 è diffuso in tutto il mondo, HIV-2 è localizzato soprattutto in Africa.
La malattia da HIV-1 è più veloce; le forme sostenute da HIV-2 hanno un decorso più lungo, anche se l'esito è lo stesso.

Circa 7400 nuove infezioni da HIV al giorno nel 2008

Il 97% in Paesi in via di sviluppo

1200 casi/giorno in bambini con meno di 15 anni

6200 casi/giorno in persone fra 15 e 49 anni, di cui il 40% con meno di 24 anni, ed il 48% in donne

Considerando una popolazione mondiale di 6 miliardi,

~1 persona ogni 180 è infettata da HIV

HIV e le cellule

HIV infetta PREFERENZIALMENTE le cellule che hanno il CD4, ma può infettare anche altri tipi cellulari, utilizzando diversi recettori (CCR2b, CCR3, APJ, ecc.). Es: le cellule dendritiche* CD4- vengono infettate tramite il recettore DC-SIGN, e possono mantenere il virus e trasferirlo alle cellule T.

HIV può comunque infettare anche mediante meccanismi indiretti:

1) gp41 è un forte agente sinciziogeno: la cellula infettata "matura" presente gp41 sulla membrana plasmatica in questa fase si può fondere con una cellula vicina questa si infetta, anche se è CD4 negativa.

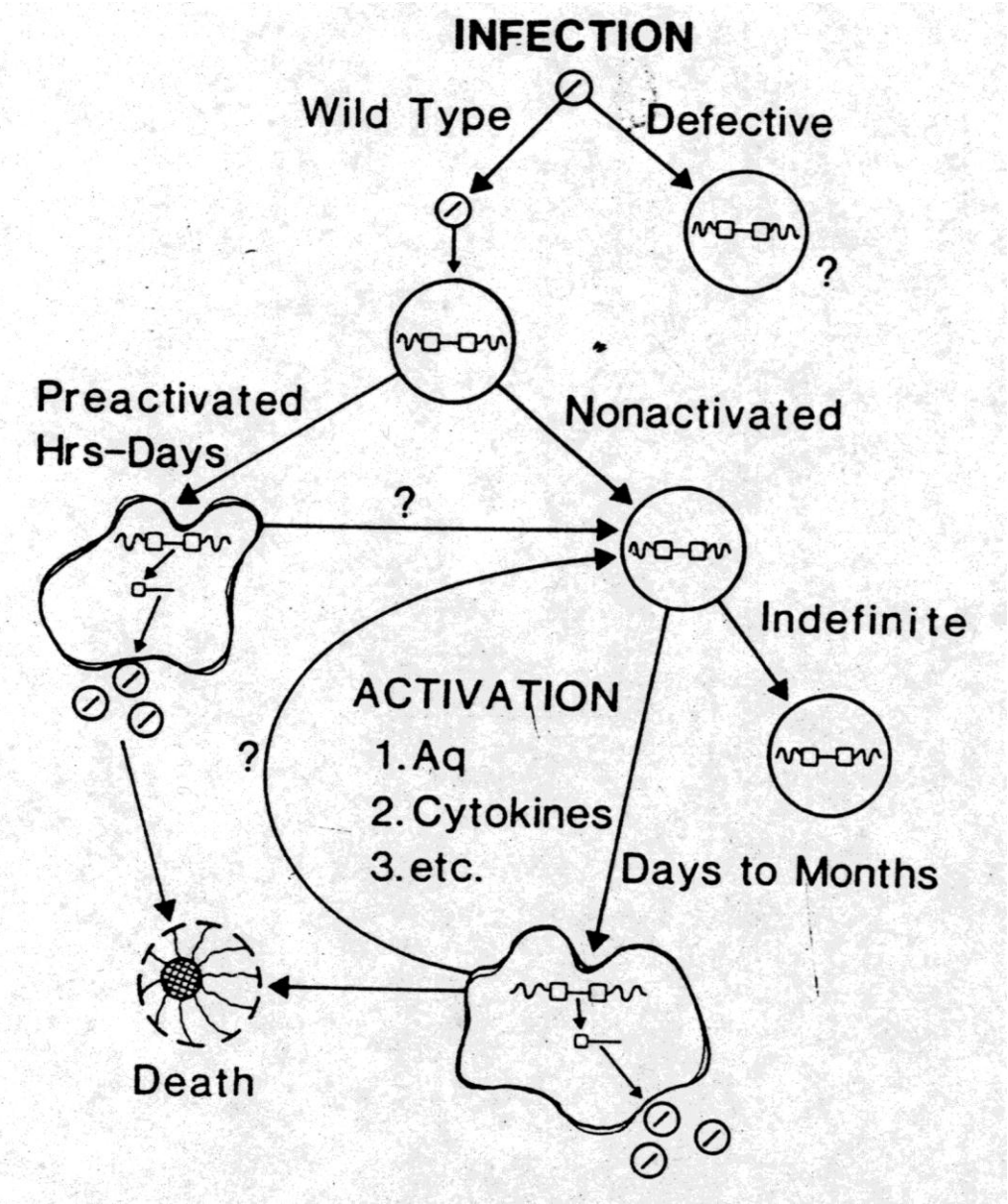
2) HIV può adsorbirsi "indirettamente" a tutte le cellule che hanno il recettore per il frammento Fc delle immunoglobuline (es macrofagi, monociti) legano il complesso HIV-ATC specifico un meccanismo di difesa risulta in una ulteriore infezione.

Scimpanzè inoculati prima con IgG umane anti-HIV, poi con HIV sviluppano alti livelli di replicazione virale PRIMA dei controlli infettati ma non immunizzati.

* cell dendritiche = cellule presentanti l'antigene (APC) che attivano i linfociti T

Attivazione di HIV

L'infezione di HIV dei linfociti T può procedere in almeno due diversi modi. Se la cellula è attivata, l'infezione acuta da HIV procede rapidamente e causa la lisi. Se HIV infetta una cellula resting, il provirus può rimanere inattivo, o scarsamente attivo, finchè l'attivazione cellulare attiva anche il ciclo virale.



La condizione di AIDS si sviluppa quando il n° di linfociti T CD4 scende a ~ 200/□l.

Dal momento dell'infezione primaria allo sviluppo di AIDS non c'è una vera latenza virale, perchè il paziente è sempre infettante, HIV si replica a bassi livelli ed il n° di linfociti CD4 diminuisce progressivamente.

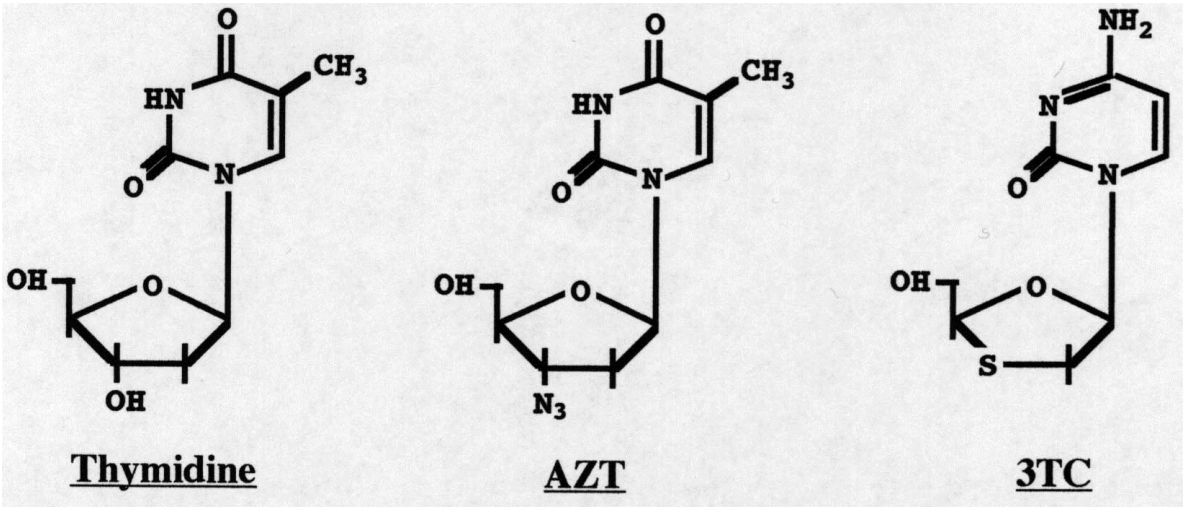
***In media l'AIDS si sviluppa dopo 10-12 anni*.**

Farmaci anti- retrovirali

AZT (Zidovudina). Analogo della timidina, incorporato nel DNA virale dalla trascrittasi inversa. Manca il gruppo OH in 3' □ mancato allungamento della catena □ inibizione della replicazione. Ma effetti non stabili (compaiono mutanti virali resistenti; si sviluppano reazioni di tossicità ed intolleranza). Importante per prevenire l'infezione neonatale: dal 25% (senza) all'8% (+AZT).

Disponibili diversi analoghi di nucleosidi che, come AZT, prevengono l'allungamento del DNA.

Efficacia simile, ma in combinazione sono più efficaci, e diminuiscono la frequenza di mutazioni responsabili della resistenza.



Ci sono anche inibitori non nucleosidici, di RT, che si legano all'enzima e lo inattivano (Nevirapine, Loviride, ecc.)

Farmaci Anti-Proteasi

La proteasi codificata dal gene pol ha la funzione di tagliare i precursori di gag e pol nelle proteine "finali". E' essenziale per il processing della poliproteina (l'inattivazione origina virioni immaturi non infettanti).

Viene tradotta una poliproteina gag-pol, poi la proteasi taglia sia se stessa che altri siti specifici, originando le forme finali. Il processo avviene durante la gemmazione dei virioni dalla cellula e causa il passaggio da forme virioniche immature a forme infettanti.

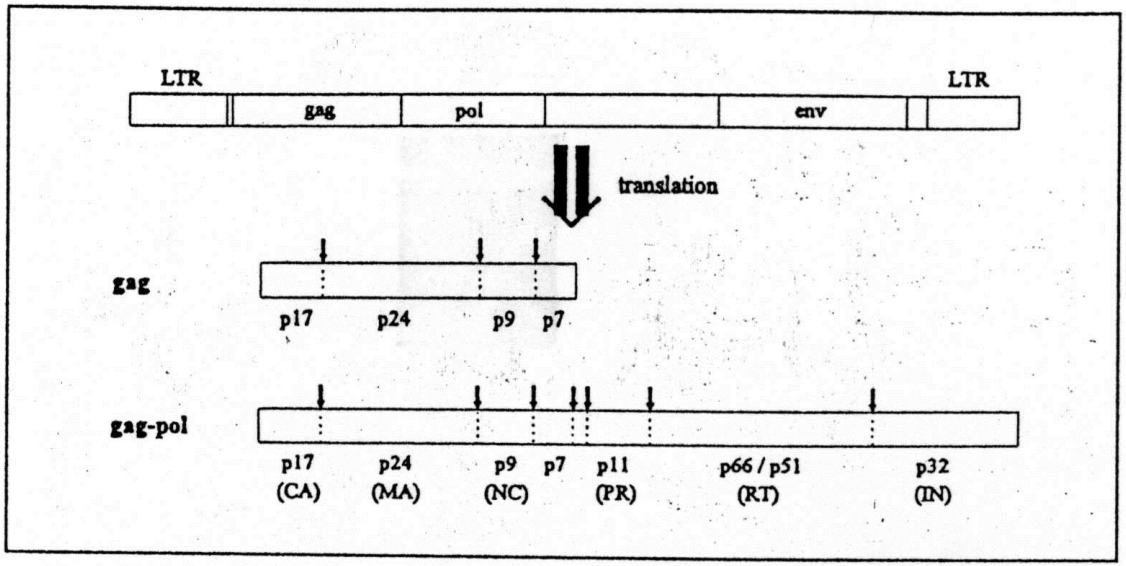
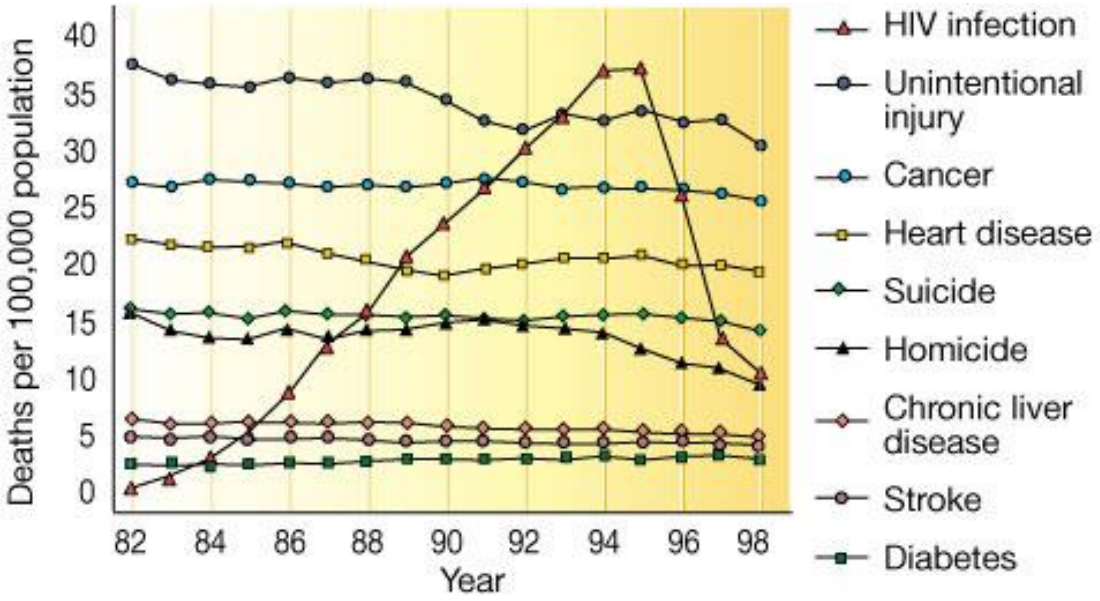


Figure 1. *Gag* and *gag-pol* processing during HIV-1 replication. Small arrows indicate sites of viral protease cleavage of $pr55^{gag}$ and $pr160^{gag\text{-}pol}$ to yield mature virion proteins.

Effetto di HAART sulla mortalità di adulti USA 25-44 anni

HAART = Highly Active Anti Retroviral Therapy, combinazione di antiproteasici ed inibitori di RT



Problemi della HAART

Tossicità = spesso effetti collaterali, nefrotossicità, disordini metabolici, ecc.

Dosaggio complicato = diverse somministrazioni giornaliere, in momenti specifici della giornata

Costosa

Non blocca completamente la replicazione virale.

Non ha effetto sulle cellule latentemente infettate, in cui il virus non replica.

Trasmissione e rischio

HIV Viene trasmesso mediante contatto fra fluidi corporei (sangue, liquido seminale e vaginale, latte, fluido amniotico). Il virus è presente anche in liquor, fluidi delle articolazioni, ecc. che raramente diffondono l'infezione (difficile il contatto – attenzione però in ambiente ospedaliero)

Trasmissione attraverso il sangue.

Si stima meno di 1 probabilità di contagio su 100.000 trasfusioni di sangue (periodo finestra).

Nelle siringhe usate rimangono ~ 34 □l di sangue, □ Infezione molto probabile in caso di riutilizzo (tossicodipendenti). La quantità di sangue sulla punta di un ago è 100 volte minore □ minore probabilità di contagio per puntura accidentale.

Fino al 2006, negli USA circa 196 casi di contagio in personale sanitario (ultimo caso accertato nel 2000):
infermieri (30%), tecn lab (17%), medici di reparto (9%), chirurghi (5%), pronto soccorso (6%)
(da: http://www.cdc.gov/HAI/organisms/hiv/Surveillance-Occupationally-Acquired-HIV-AIDS.html)

Trasmissione sessuale.

Trasmissione durante rapporti sessuali (anali, vaginali, orogenitali, in ordine decrescente di rischio). Il rischio di contagio per un singolo rapporto vaginale con una persona infetta è ~ 1:100 / 1:500. Il rischio aumenta se sono presenti lesioni genitali ulcerative (es. Herpes, sifilide) o malattie infiammatorie.

Trasmissione verticale

Tutti i bambini nati da madri sieropositive hanno anticorpi anti HIV (trasferimento passivo). La trasmissione da madre a figlio si verifica effettivamente nel 20% dei casi (scende all'8% in caso di adeguate terapie).
Possibile anche la trasmissione col latte materno.

* Le donne infettate con HIV hanno un ridotto tasso di fertilità rispetto alle donne non infette (sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, ad es. Uganda = riduzione del 50%).

* Non è chiaro se HIV riduca per se la fertilità o se si tratti di un epifenomeno determinato da cause correlate (decesso del partner, diminuita attività sessuale per malattia, coinfezioni).

* La gravidanza comporta fisiologicamente un declino nel numero dei linfociti CD4+ che tornano ai valori normali nel terzo trimestre di gravidanza e dopo l'espletamento del parto.

* Non è stato confermato, impatto negativo della gravidanza sul decorso clinico dell'infezione da HIV.

- Il virus può essere trasmesso durante la gravidanza e il parto (70-80% dei casi).
- L'allattamento al seno costituisce la principale modalità di trasmissione nei paesi in via di sviluppo (25-40%) rispetto ai paesi industrializzati (15-25%).
- Il fatto che i trofoblasti siano resistenti all'infezione da HIV suggerisce che la placenta possa costituire una barriera naturale all'infezione del feto in utero.
- Nelle madri prevale la presenza di "quasi-specie" virali, mentre nel neonato infetto la popolazione virale è altamente omogenea e correlabile più alle varianti materne presenti nel terzo trimestre che non a quelle presenti all'inizio della gravidanza.

Fattori che influenzano la trasmissione verticale di HIV:

- VIREMIA MATERNA = n. di copie di HIV-RNA nel plasma
  Per ogni aumento di 1 log della viremia materna, il rischio di trasmissione aumenta di 2-3.5 volte
- STATO CLINICO E IMMUNOLOGICO DELLA MADRE
  progressione clinica e carica virale aumentano insieme
- COINFEZIONI GENITALI
  aumento di virus nel comparto genitale

Trattamento e profilassi della trasmissione verticale

Il trattamento antiretrovirale può anche ridurre il tasso di trasmissione verticale

- Esempi:
- ZDV (durante la gravidanza, intra-parto, post-parto nel neonato per le prime 6 sett di vita) riduce il rischio di trasmissione del 67%
- Parto cesare + profilassi con ZDV lo riduce dell'85%
- Una dose di NEV alla madre all'inizio del travaglio ed al bambino entro le 72h dalla nascita riduce il rischio del 47% rispetto alla prima opzione
- Inizio del trattamento con ZDV solo al neonato entro le 48 ore dalla nascita

Problema diagnostico

- Nessuno di questi test permette di diagnosticare il 100% degli infetti alla nascita poiché la maggior parte delle infezioni avviene nel periodo perinatale e sono necessari più cicli di replicazione virale per ottenere livelli dimostrabili di virus.
- Un risultato negativo nei primi giorni di vita non è probante di assenza di infezione e la diagnosi deve essere ripetuta dopo 1 e 3 mesi.

Problema globale

- La trasmissione verticale di HIV è la causa di più del 90% delle infezioni pediatriche.
- Interventi di profilassi e cura, così come tests per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione, hanno drasticamente ridotto il tasso di trasmissione verticale nei paesi industrializzati MA NON NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO.
- Questo rimane un grosso problema a livello mondiale.

Altre modalità di trasmissione:
Non Dimostrate

HIV *non* si trasmette con sudore, saliva, lacrime, urine.

raramente si isola HIV da questi fluidi, ma non si è MAI verificato un caso **certo** di contagio. Respirazione bocca a bocca su pazienti con AIDS = nessuna infezione

Non esistono rischi di infezione nell'ambiente:

scolastico, lavorativo, familiare (uso comune di stoviglie, asciugamani, gabinetti, rasoi, spazzolini da denti, pettini, baci, ecc.).

Non si trasmette per puntura di insetti.

Quando un insetto punge inietta la propria saliva, non il sangue della vittima precedente

HIV sopravvive pochissimo tempo nel corpo di un insetto

HIV non replica negli insetti

Es. Febbre gialla, malaria sono trasmesse tramite la saliva di particolari specie di zanzare