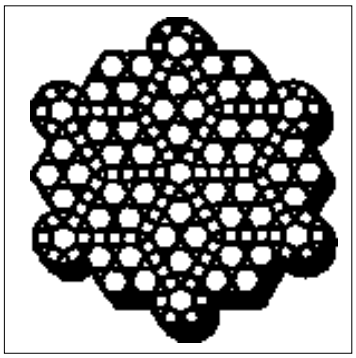
# Caleidoscopio



**Diego Michele Franciotta**
**Gianvico Melzi d'Eril**
**Gianvito Martino***

# HTLV-I

Servizio Analisi Chimico-Cliniche e Neurochimica
IRCCS-Istituto Neurologico "Fondazione C. Mondino
Università di Pavia e
* Clinica Neurologica IV
IRCCS-Ospedale "S. Raffaele"
Università di Milano

43

Direttore Responsabile
**Sergio Rassu**

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83.401
Ristampato a Genova 1991.

# Editoriale

La comparsa della sindrome da immunodeficienza acquisita, la sua diffusione e l'importanza sociale ha determinato un crescente interesse intorno ai virus denominati retrovirus. Tutto questo è testimoniato anche dalla enorme mole di letteratura scientifica che continua ad essere pubblicata e che impone degli sforzi ciclopici di aggiornamento.

Il virus HTLV-I, un retrovirus come l'HIV, è senza dubbio di estremo interesse, come sottolineato in questa monografia, per numerose ragioni.

Gli Autori di questa monografia si occupano da anni di questi problemi ed hanno la competenza e la conoscenza per fare il punto della situazione attuale sull'argomento.

Il Professor GianVico Melzi d'Eril, laureato prima in Chimica e quindi in Medicina e Chirurgia, specializzato in Analisi Cliniche, e Professore associato di Analisi Chimico-Cliniche ha maturato numerose esperienze lavorando, tra l'altro, presso il Department of Biochemistry dell'Università di Oxford sotto la guida del dottor Keith Dalziel. A Pavia, dopo aver lavorato presso la Cattedra di Biochimica Applicata dell'Università, passa al Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche del Policlinico San Matteo, diventa consulente presso la Clinica Neurologica e quindi Primario del Servizio di Analisi Chimico Cliniche e Neurochimica della Fondazione C. Mondino (Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico). E' stato organizzatore di tanti congressi ed Autore di numerose pubblicazioni a livello nazionale ed internazionale.

Il dottor Diego Michele Franciotta, ricercatore specializzando in Neurologia, si occupa da oltre sei anni di diagnostica liquorale lavorando presso il laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Neurochimica della Fondazione C. Mondino con particolare riferimento alla sclerosi multipla ed alle infezioni virali del sistema nervoso.

Il dottor Gianvito Martino anch'esso specializzando in Neurologia, medico interno, lavora con il neuroimmunologo dottor Luigi Grimaldi presso la Divisione Neurologica IV dell'Ospedale San Raffaele dell'Università di Milano. Il dottor Martino si occupa di tecniche di separazione e di identificazione delle proteine, applicate allo studio delle malattie neurologiche.

Come al solito, la competenza specifica degli Autori è la migliore garanzia perchè anche questo volume, molto chiaro ed allo stesso tempo aggiornatissimo, raccolga uguali consensi a quelli che sinora lo hanno preceduto.

**Sergio Rassu**

# I retrovirus

I virus del tipo che oggi sono denominati retrovirus furono scoperti per la prima volta soltanto 80 anni fa come agenti filtrabili che causavano una particolare forma di cancro nel pollo (sarcoma di Rous).

Fra il 1960 e il 1970 venne confutato uno dei dogmi fondamentali della biologia molecolare secondo il quale l'informazione genetica passava esclusivamente dal DNA all'RNA: la scoperta da parte di Temin e Baltimore dell'enzima transcriptasi inversa, che consente la trascrizione da RNA a DNA, segnò la nascita di una nuova disciplina: la retrovirologia.

I retrovirus rappresentano la famiglia di virus che si serve di questo enzima per la duplicazione del genoma e la perpetuazione della specie. Le nuove acquisizioni aprirono stimolanti prospettive per la ricerca non solo nel campo della virologia, ma anche, in generale, in quello della biologia molecolare.

L'interesse di molti ricercatori è oggi focalizzato su malattie come la sindrome di immunodeficienza acquisita (AIDS) e, in misura minore, sulla adult T-cell leukemia/lymphoma e sulle sindromi neurologiche causate da retrovirus umani. Molto promettenti si stanno dimostrando gli studi sulla identificazione di oncogeni umani, correlati a oncogeni di origine retrovirale, attivi nella patogenesi di alcune forme tumorali nell'uomo.

I retrovirus si distinguono tra le varie famiglie di virus per alcune caratteristiche inusuali, soprattutto per quanto concerne l'interazione con la cellula ospite: oltre alle già citate conversioni dei loro geni da RNA a DNA, sono in grado di incorporare il neoformato DNA virale nei cromosomi dell'ospite, causando mutazioni geniche che, a loro volta, danneggiano o, spesso, potenziano la crescita delle cellule infettate. In ogni caso, i meccanismi dell'espressione genica dell'ospite si trovano a essere dipendenti dalle direttive imposte dai segnali virali.

Nel complesso, i meccanismi che regolano la formazione di nuovo virus completo a RNA, sia quelli appartenenti al virus, sia quelli della cellula ospite, sono molto complessi e interdipendenti. Ne deriva una speccata specificità d'ospite per ciascun retrovirus. Ad esempio, un retrovirus che è in grado di infettare il pollame non infetterà i mammiferi, quello che infetta il gatto non

infetterà i primati e così via. Contemporaneamente, tuttavia, i retrovirus sono inclini a mutare con facilità e frequentemente, diventando patogeni per specie che fino a quel momento non potevano essere attaccate. E' proprio quello che si suppone sia accaduto al retrovirus HIV responsabile dell'AIDS. Infatti questo virus sembra che inizialmente fosse patogeno per le scimmie e che solo in un secondo momento, in seguito a mutazioni casuali, sia diventato patogeno per l'uomo.

La famiglia dei retrovirus può essere considerata interessante, in sintesi, sotto tre punti di vista:

1- come modello di studio per importanti problemi di biologia molecolare, che includono il trasferimento dell'informazione genetica, la ricombinazione del DNA, la regolazione dell'espressione genica e il controllo della crescita cellulare;

2- come banco di prova per la manipolazione dei geni, compresi i riflessi terapeutici che essa comporta;

3- infine, per i problemi che pone il potenziale patogenetico dell'HTLV-III, senza dubbio il retrovirus emergente, data la sua attuale vasta diffusione nel mondo e la gravità delle conseguenze dell'infezione. Ma anche l'HTLV-I e l'HTLV-II, che sono stati scoperti prima dell'HTLV-III e che hanno modalità di trasmissione del tutto simili a quelle dell'HTLV-III, stanno conquistando prevalenze anche maggiori in alcune popolazioni. Si può ragionevolmente prevedere che le patologie legate alla loro infezione aumenteranno nel prossimo futuro.

I retrovirus si suddividono in tre sottofamiglie:

1. Oncovirinae, che comprende oncovirus differenziabili a loro volta in base alla morfologia ultrastrutturale. Si riconoscono particelle virali di tipo A (presenti nelle cellule infettate e prive di pericapside), di tipo B (con nucleoide eccentrico) e di tipo C (con nucleoide centrale e comprendenti HTLV-I e II). I tipi B e C rappresentano particelle virali mature. Il virus HTLV-II è stato isolato in casi di leucemia a "cellule capellute" (hairy cell leukemia) e in certi tipi di linfomi cronici a cellule T con fenotipo CD4+ (linfociti T-helper).

Il virus HTLV-I è ritenuto responsabile della adult T-cell leukemia/lymphoma, di certe paraparesi spastiche diffuse nelle zone tropicali e di mielopatie ad esso associate (HAM: HTLV-I associated myelopathy). Primariamente, l'HTLV-I sembra che infetti i linfociti T-helper; in vitro ha la capacità di rendere immortali le colture cellulari linfocitarie, al contrario dell'HTLV-III che ha un effetto citopatico. L'HTLV-I e l'HTLV-III sono in grado di riconoscere e di utilizzare per l'ingresso nella cellula ospite antigeni comuni alle cellule del sistema nervoso centrale e del sistema immunitario.

2. Lentivirinae, che comprende i virus "lenti", così denominati perchè causano malattie a periodo di incubazione molto lungo. Vi fanno parte virus patogeni per gli animali, come il virus "visna" dell'encefalite nelle pecore e il virus HTLV-III

più recentemente ribattezzato HIV (Human Immunodeficiency Virus), agente eziologico dell'AIDS. Correlato all'HIV, ma ancora più strettamente allo simian T-cell lymphotropic virus type III, è l'HTLV-IV, che è stato isolato in individui sani residenti nelle regioni occidentali del continente africano e che infetta i T-linfociti umani CD4 + senza effetto citopatico.

3. Spumavirinae, comprendente virus che infettano varie specie animali e che producono un effetto citopatico, rappresentato da sincizi ricchi di vacuoli ad aspetto "schiumoso" in colture cellulari.

# HTLV-I (Human T-cell lymphotropic virus type I).

Il virus HTLV-I è costituito da due identici filamenti di RNA che, insieme agli enzimi virali (transcriptasi inversa, integrasi e proteasi), sono racchiusi nel "core" (nucleo) virale di forma icosaedrica.

Il "core" costituito dalla "proteina strutturale maggiore" e da una "proteina esterna", è a sua volta circondato da un involucro che deriva dalla membrana citoplasmatica della cellula infettata, arricchita con glicoproteine virali, denominate proteine "transmembrana" ed "extracellulari" (fig. 1).

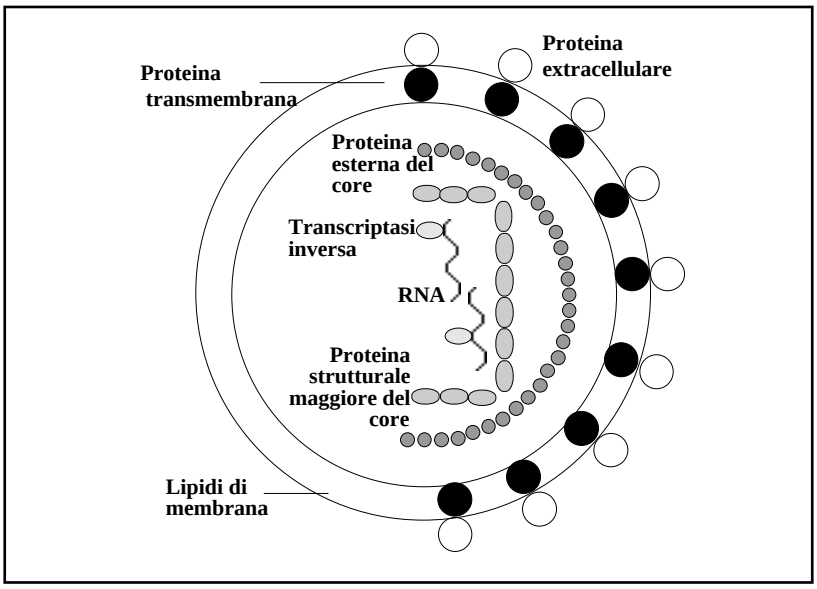



***Figura 1. Struttura generale dei retrovirus. Visione schematica parziale.***

I genomi di tutti i retrovirus conosciuti sono organizzati per la maggior parte nella stessa maniera. Ciononostante è interessante notare che, a dispetto di tale similarità, l'omologia tra le rispettive sequenze di nulceotidi è limitata (fig.2).

Nel provirus, costituito da DNA complementare all'RNA virale, le proteine del "core", dell"envelope" e l'enzima "transcriptasi inversa" sono codificate, rispettivamente, dai geni "gag" ,"env" e "pol".

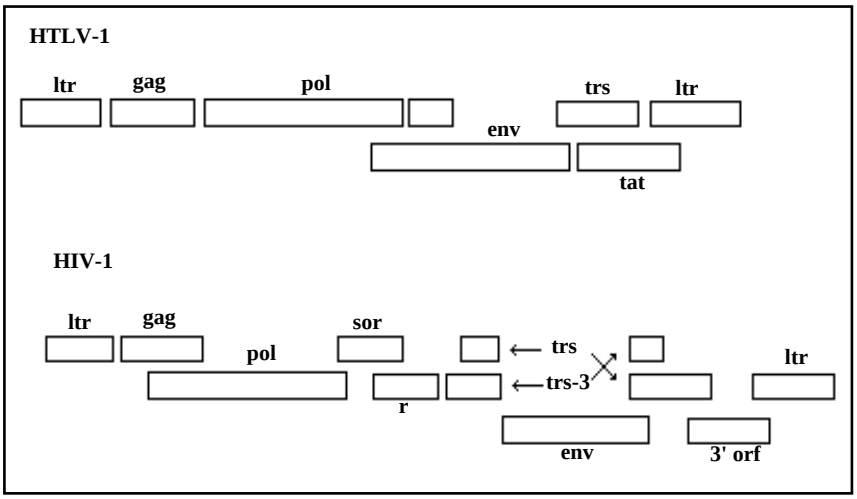



***Figura 2. Sequenze geniche dei retrovirus HTLV-I e HIV. La spiegazione delle sigle è nel testo.***

I prodotti genici che regolano l'espressione virale sono codificati dalle sequenze "tat", "trs" ,"sor" e "3'orf". La sequenza "ltr" (long terminal redundancie) è presente all'inizio e alla fine di ciascun genoma del provirus e svolge un ruolo importante sia nell'espressione genica, sia nell'integrazione del provirus nel DNA dell'ospite.

Dal punto di vista dell'accertamento diagnostico gli antigeni del virus HTLV-I p24, gp21 e p19 hanno grande importanza e mostrano minima cross-reattività nei confronti degli antigeni omologhi dell'HIV-1. L'antigene p24 costituisce la "proteina strutturale maggiore" del "core" ed è codificato dal gene "gag". Contro

di esso è rivolta la maggior parte degli anticorpi anti-HTLV-I prodotti dall'organismo infettato. La presenza nel siero e nel liquor di anticorpi specifici per la p24 è associata a replicazione virale attiva. E' stato dimostrato che sieri provenienti da pazienti infettati dall'HIV cross-reagiscono debolmente con la p24 dell'HTLV-I.

L'antigene gp21 rappresenta la "proteina transmembrana" dell'involucro virale; è codificata dal gene "env". Gli epitopi più attivi dal punto di vista antigenico contenuti nella gp21 sono stati identificati e usati come base per l'allestimento del test ELISA.

La p19 "proteina esterna" del "core" deriva dalla sequenza genica "gag". A differenza della p24, la p19 mostra nessuna o minima cross-reattività con l'HIV-1. La tabella 1 mostra le proteine di importanza sierodiagnostica dei più comuni retrovirus.

| Virus | Proteina | Sito | Gene |
|---|---|---|---|
| HIV-1 | p24 | Core (proteina strutturale maggiore) | gag |
| | gp41 | Envelope (prot. transmembrana) | env |
| | gp160/120 | Envelope (prot. esterna) | env |
| HIV-2 | p26 | Core | gag |
| | gp34 | Envelope (prot. transmembrana) | env |
| | gp140 | Envelope (prot. esterna) | env |
| HTLV-I | p19 | Core (prot. esterna) | gag |
| | gp21 | Envelope (prot. transmembrana) | env |
| | p24 | Core (proteina strutturale maggiore) | gag |

***Tabella 1. Retrovirus HIV-I, HIV-2 e HTLV-I: proteine strutturali dei rispettivi virioni e sequenze geniche che le codificano.***

Il ciclo vitale dell'HTLV-I non è diverso da quello degli altri retrovirus. Esso si serve delle proprie glicoproteine di membrana, che riconoscono proteine presenti sulla superficie della cellula ospite, per attaccarsi ad essa. Il riconoscimento è altamente specifico e, d'altronde, le glicoproteine virali derivano dalla

membrana della cellula precedentemente infettata, a conclusione del ciclo vitale. L'entrata attraverso la membrana cellulare si avvale di un meccanismo di endocitosi, recettore-mediato, usato di norma dalle cellule per introitare sostanze extracellulari benefiche come i fattori di crescita. La presenza del virus all'interno della cellula segna il passaggio dalla fase di quiescenza alla fase di attivazione enzimatica, durante la quale la trascrizione e l'integrazione virale hanno inizio e procedono senza o con minima collaborazione da parte dell'ospite.

Mediante l'enzima transcriptasi inversa, dall'RNA originario si forma DNA che a sua volta, grazie all'enzima integrasi viene incorporato nel DNA della cellula infettata.

Una volta incorporato nel cromosoma, a questo stadio il provirus diventa strettamente dipendente dai meccanismi di replicazione dell'ospite. La replicazione del provirus diventa parte della replicazione del cromosoma nel quale è integrato; la trascrizione sfrutta l'enzima RNA polimerasi II e la traslazione dell'RNA messaggero che ne risulta avviene sui poliribosomi dell'ospite.

Tutte queste funzioni sono regolate da segnali virali precisi che determinano l'efficienza della trascrizione e dello "splicing", superando, durante la traslazione, gli eventuali segnali di "fine codone". Le triplette di basi azotate corrispondenti a tali segnali possono presentarsi a caso, poichè l'integrazione del genoma virale che disorganizza le sequenze del DNA ospite, non avviene mai in un punto preciso.

Le proteine neoformate subiscono l'attacco di proteasi codificate dal virus, che le riducono in parti più piccole, riconoscibili nelle particelle virali mature.

Infine, nuove particelle virali sono assemblate e rilasciate all'esterno dalle cellule con meccanismo di esocitosi mentre la membrana della cellula ospite diventa, con alcune modifiche, la membrana esterna del neoformato virus.

Durante il ciclo vitale, il virus può manifestare un comportamento genetico bizzarro, andando incontro a frequenti delezioni, sostituzioni di nucleotidi e fenomeni di ricombinazione fra correlati e coinfettanti virus.

In particolare, l'abilità nel causare mutazioni è fondamentale per spiegare molte delle importanti interazioni fra il virus e l'ospite. L'esito delle mutazioni può essere recessivo e causare una perdita di qualche funzione dovuta alla alterazione della sequenza genica correlata, oppure dominante, esitando in un guadagno funzionale, dal punto di vista dell'adattamento all'ambiente e dell'evoluzione; in questi casi la mutazione avviene per stimolazione all'espressione genica di sequenze del DNA ospite adiacenti al sito di inserzione del DNA provirale.

A dispetto della unitarietà del loro ciclo vitale, le conseguenze fisiopatologiche dell'infezione da retrovirus sono varie. In alcuni casi essi non provocano effetti apparenti, anche se si riproducono attivamente. In altri casi potenziano la crescita di cellule in coltura o generano, in vivo, linee cellulari tumorali come nel caso della adult T-cell leukemia/lymphoma.

Pochi retrovirus hanno effetto citopatico e causano malattie distruttive, fra le quali la più importante per l'uomo è la sindrome da immunodeficienza acquisita.

L'HTLV-I ha uno spiccato tropismo per le cellule del sistema immunitario e del sistema nervoso centrale.

La capacità del DNA provirale di integrarsi nel DNA della cellula ospite, che almeno all'inizio sembra essere una cellula del sistema immunitario, si pensa possa trarre in inganno molti dei meccanismi di difesa specifici e non specifici dell'organismo infettato.

E' stato ipotizzato che la incontrastata diffusione del virus nel sangue, nel liquor e negli altri liquidi biologici che contengono cellule del sistema immunitario e anticorpi neutralizzanti, sia legata a un meccanismo chiamato suggestivamente "cavallo di Troia". Per eludere le difese dell'ospite, una cellula mobile, un monocito ad esempio, come è stato dimostrato nell'infezione da retrovirus "visna" nella pecora, nasconde il genoma virale, integrandolo nel proprio DNA, e lo trasporta nei vari compartimenti dell'organismo infettato, senza che possa essere individuato ed eventualmente eliminato dal sistema immunitario. L'ipotesi è avvalorata da esperimenti di trasmissione di malattie retrovirali mediante il trasferimento di monociti infettati dal virus e messi a contatto in precedenza con liquidi biologici contenenti alti titoli di anticorpi neutralizzanti.

Inoltre, una volta all'interno della cellula, il retrovirus integrato nel DNA ospite è in grado di rimanere quiescente per lunghi periodi di tempo, in uno stato di latenza.

Alcuni fattori potenziano la persistenza del virus nell'ospite e fra essi, la capacità di certi ceppi di non indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti oppure, se indotta, di farne produrre tipi a bassa affinità neutralizzante.

E' ben nota,infine, la possibilità da parte del virus di andare incontro a cambiamenti dell'assetto antigenico dell'involucro esterno durante l'infezione persistente. Tutto questo garantisce lunga sopravvivenza all'interno della cellula ospite immunocompetente.

Studi su modelli animali ed in particolare sull'infezione da retrovirus "visna" nella pecora hanno definito con chiarezza i modi e i tempi attraverso i quali questi virus eludono i sistemi di immunosorveglianza. La figura 3 esemplifica i concetti sopra esposti nel modello sperimentale con retrovirus "visna".

Nonostante tali conoscenze sul ciclo vitale dell'HTLV-I e dei retrovirus in generale, acquisite in un tempo relativamente breve, la patogenesi delle malattie da essi provocate rimane un enigma.

E' stato stabilito che la trasmissione virale da un ospite all'altro avviene in maniera "orizzontale", attraverso i fluidi biologici. L'HTLV-I, come gli altri retrovirus, non ha un ospite intermedio e non sopravvive bene nell'ambiente

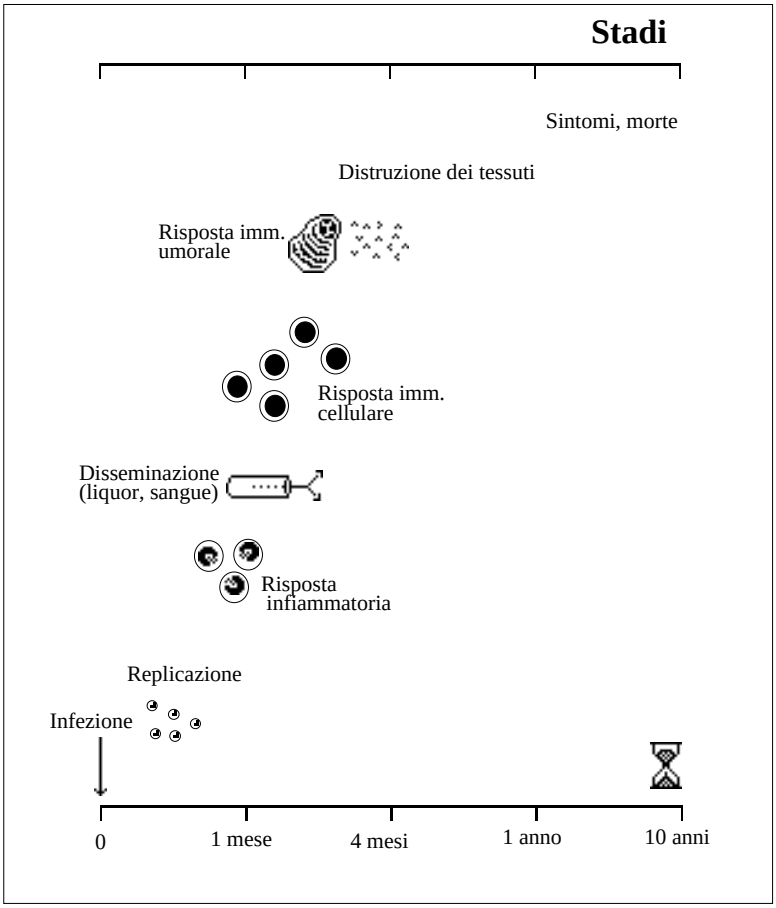



***Figura 3. Tempo di insorgenza e durata di segni e sintomi di infezione da retrovirus visna nell'animale.***

esterno. Feci ed urine sono solo raramente infettivi ed è rara anche la disseminazione virale sotto forma di aerosol, come è stato dimostrato in altre e più comuni infezioni virali delle vie respiratorie.

# Diagnosi virologica

La presenza del virus in colture cellulari viene messa in evidenza mediante la determinazione dell'attività della transcriptasi inversa, enzima espresso esclusivamente dai retrovirus. Le colture linfocitarie presumibilmente infettate vengono supplementate con fattori di crescita linfocitari, come l'interleuchina-2 e quindi il supernatante viene testato per la presenza di attività transcriptasica inversa.

Il metodo, poco maneggevole, viene praticato solo in laboratori specializzati e richiede dai 7 ai 21 giorni perchè si sviluppi una apprezzabile concentrazione dell'enzima. Per ulteriori informazioni si può far riferimento al lavoro di Ho (1984).

Sulle stesse cellule colturali si possono applicare metodiche di immunofluorescenza o immunoperossidasi impiegando anticorpi specifici.

Più semplicemente, la diagnosi di avvenuta infezione viene posta ricercando nel siero del paziente anticorpi specifici anti-HTLV-I con metodiche di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Il principio di base prevede che il fondo di appositi pozzetti sia stato ricoperto di antigeni virali ai quali si legano gli anticorpi anti-HTLV-I eventualmente presenti nel campione in esame. La presenza di tali anticorpi può essere svelata con un ELISA a legame diretto, nel quale il complesso antigene virale-anticorpo sierico viene riconosciuto da un anticorpo anti-IgG marcato con un enzima, oppure con un ELISA competitivo, nel quale gli anticorpi presenti nel campione competono con anticorpi marcati per legarsi agli antigeni virali.

L'ELISA a legame diretto è il test più diffuso (fig.4). Se nel campione in esame sono presenti anticorpi anti-HTLV-I, essi si fissano al fondo dei pozzetti. Dopo un accurato lavaggio, che rimuove le proteine sieriche e, soprattutto, gli anticorpi non legati, viene aggiunto un secondo anticorpo anti-IgG umane coniugato di solito all'enzima perossidasi. Tale anticorpo reagirà, quindi, con qualsiasi immunoglobulina legatasi al lisato virale adsorbito al fondo dei pozzetti.

Dopo un altro lavaggio, un sistema rivelatore della perossidasi viene pipettato

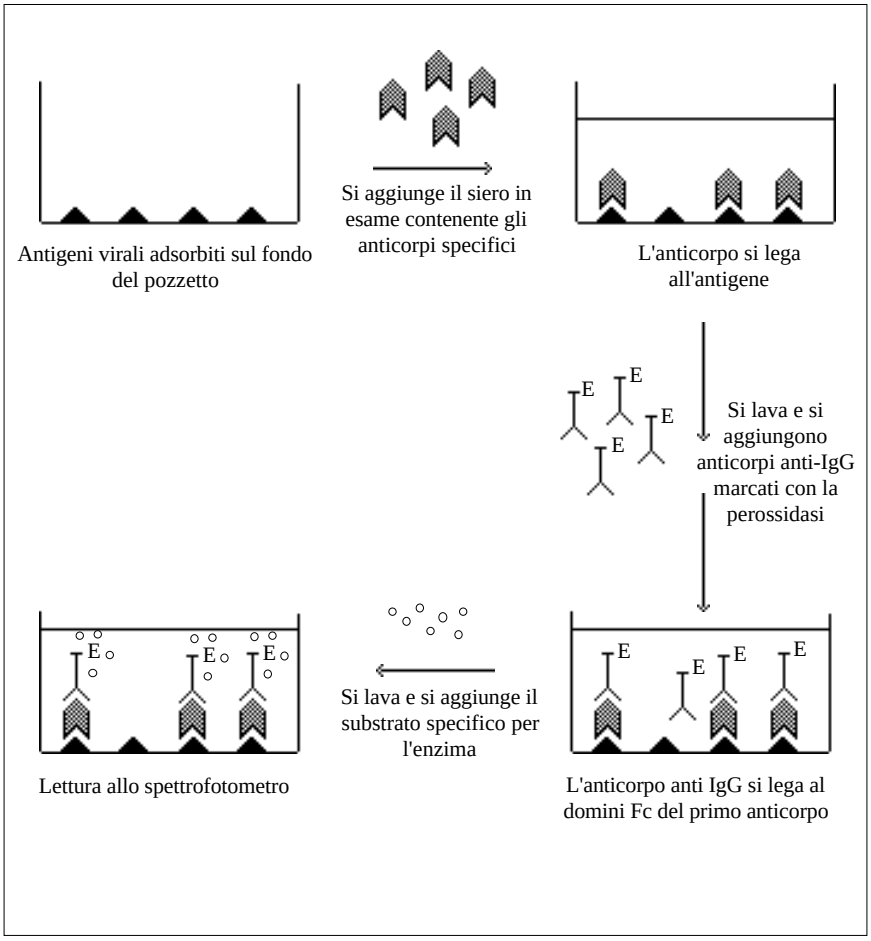



***Figura 4. Rappresentazione schematica delle principali fasi del test ELISA diretto.***

nei pozzetti, generando, dove trova l'enzima, un colore specifico, la cui densità ottica viene misurata mediante uno spettrofotometro: l'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi anti-HTLV-I presenti nel campione in esame.

Controlli positivi e negativi sono corredo indispensabile del test. I campioni in esame sono considerati positivi se sviluppano una densità ottica tre volte maggiore di quella media dei controlli negativi.

La sensibilità e la specificità del sistema ELISA, se correttamente eseguito, sono abbastanza alte.

E' utile ricordare che la sensibilità è definita come la frequenza di risultati positivi ottenuti su una popolazione di individui sieropositivi. La specificità è definita come la frequenza di risultati negativi in un campione di individui nei quali l'anticorpo è certamente assente.

Il tipo di ELISA illustrato privilegia la sensibilità e pertanto, per motivi discussi più avanti, può incappare in false positività. Più specifico risulta essere l'ELISA di tipo competitivo. Oggi comunque, grazie all'uso di antigeni virali puri ottenuti con la tecnica del DNA ricombinante, anche il test ELISA a legame diretto raggiunge una elevata specificità.

Il controllo di specificità dei risultati ottenuti viene solitamente effettuato mediante la metodica nota come Western blot. Il Western blot é considerato un test di conferma che deve necessariamente supportare l'eventuale dato positivo fornito dal test ELISA (test di screening). Altre tecniche similari per la ricerca di anticorpi sono la radioimmunoprecipitazione ed il test ELISA specifico per gli anticorpi diretti contro le proteine del "core" e dell' "envelope" dell'HTLV-I.

Il Western blot mette in evidenza la reattività dei sieri in esame nei confronti di proteine virali specifiche. Le proteine virali vengono separate in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide, in presenza di sodio dodecil-solfato (SDS). Sfruttando l'applicazione di un campo elettrico, le proteine vengono trasferite dal gel su strisce di nitrocellulosa (electroblotting). Il supporto di nitrocellulosa, una volta lavato e bloccato per eliminare l'interferenza di immunoglobuline non specifiche, è pronto per l'uso.

Il siero in esame viene incubato in presenza delle strisce. La formazione del complesso antigene-anticorpo, avrà luogo in presenza di anticorpi specifici diretti contro le differenti proteine virali.

Dopo i soliti lavaggi, viene aggiunto un anticorpo anti-IgG umane legato a biotina e, successivamente, la perossidasi legata all'avidina (sistema avidina-biotina).

Come substrato sono impiegate una soluzione contenente 4-cloro-1-naftolo e un'altra contenente perossido di idrogeno.

Un bandeggio brunato compare sulle strisce di nitrocellulosa in corrispondenza delle zone dove è avvenuta la reazione fra le proteine virali e gli anticorpi

presenti nel siero.

Controlli positivi e negativi sono, anche in questo caso, indispensabili. Il test è considerato positivo se sono presenti bande corrispondenti alle proteine virali p19 e p24 oppure alla proteina p19 ed ad altre rilevanti bande. Il risultato va letto confrontando la striscia testata con un bandeggio di riferimento, dove sono segnalati i punti di migrazione elettroforetica delle varie proteine virali. Rispetto al test ELISA, dunque, il Western blot presenta lo svantaggio di non essere sempre inequivocabilmente interpretabile.

False positività al test ELISA non sono infrequenti, soprattutto se si esaminano campioni biologici provenienti da pazienti affetti da malattie caratterizzate da una iperproduzione anticorpale come nel caso della sclerosi multipla e delle collagenopatie autoimmuni.

Proprio nel caso della sclerosi multipla, infatti, il ritrovamento di anticorpi anti-HTLV-I nel liquor e nel siero di pazienti affetti da questa malattia, ha orientato le ricerche sulla sua eziopatogenesi verso la famiglia dei retrovirus. In letteratura, fra gli autori che, dopo la segnalazione di Koprowski (1985), hanno ricercato la presenza di anticorpi anti-HTLV-I in pazienti con sclerosi multipla, molti hanno trovato positività al test ELISA e reperti negativi al Western blot

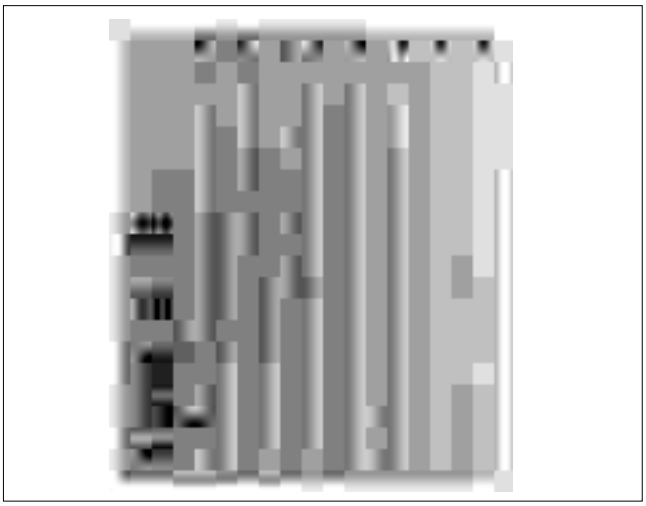


***Figura 5. Western blot per HTLV-I: A=controllo positivo, che reca a fianco le sigle delle proteine virali alle quali corrispondono le bande ottenute. B=controllo negativo. 1, 3, 5=LCS di pazienti con sclerosi multipla risultati positivi al test ELISA per l'HTLV-I. 2, 4, 6=Sieri degli stessi pazienti risultati positivi al test ELISA per l'HTLV-I.***

(fig.5). Sono state avanzate alcune ipotesi per spiegare questa discrepanza.

La preparazione del lisato virale al quale si legano gli anticorpi specifici, può essere contaminata dagli antigeni di istocompatibilità (HLA) derivanti dalle cellule umane, nelle quali il virus viene coltivato per essere utilizzato successivamente nell'allestimento del test. Anticorpi che reagiscono contro tali contaminanti sono presenti di frequente in sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni, da alcuni tumori maligni o da altre condizioni associate a disfunzioni del sistema immunitario.

Altra fonte di false positività si ritiene possa essere la presenza di anticorpi specifici cross-reattivi per determinanti antigenici comuni a retrovirus non patogeni, e ancora non identificati, e HTLV-I. La frequenza con la quale i retrovirus vanno incontro a mutazioni lascia spazio all'ipotesi che, affinando le tecniche di ricerca, il numero di retrovirus da identificare sia grande.

E' stata segnalata una insolita e inaspettata reattività per la proteina p24 dell'HTLV-I da parte di alcuni sieri di pazienti con sindrome di Guillain-Barrè e con meningite, oltre a sieri di individui apparentemente normali. Alcuni autori hanno riscontrato sieropositività per l'HTLV-I in pazienti con cefalea ed in individui donatori di sangue.

Comunque i sieri riscontrati positivi al test ELISA, sono risultati negativi al Western blot.

Anche la tecnica del "cell ELISA", che sarebbe in grado di dimostrare la produzione di anticorpi anti-HTLV-I da parte di cellule mononucleate del sangue e del liquor, non ha aggiunto dati a favore del coinvolgimento dell'HTLV-I nella eziopatogenesi della sclerosi multipla.

# Epidemiologia

Nel considerare la storia naturale dell'HTLV-I, l'aspetto che più colpisce è il carattere insulare della sua distribuzione geografica. Le isole con più alte percentuali di sieropositività, ubicate ai tropici, sono la Giamaica, Tumaco, la Martinica, le Seycelles e le isole meridionali del Giappone. La diffusione del virus, comunque, non risparmia le regioni continentali situate al centro e nel sud America, nell'India meridionale ed in Africa.
Questo insularismo potrebbe indicare la presenza di un habitat naturale e sociale particolarmente favorevole alla diffusione del virus e delle malattie ad esso correlate. Tutte le isole hanno un clima tropicale caratterizzato da stagioni caldo-umide che differiscono di poco fra loro durante l'arco dell'anno.
Entrano in contatto con il virus soprattutto gli individui appartenenti alle classi sociali più povere che in questi luoghi rappresentano la maggioranza della popolazione. Le condizioni igienico-sanitarie degli ambienti dove l'HTLV-I è presente sono tali da favorire l'endemia.
La promiscuità sessuale, caratteristica di queste popolazioni, oltre a favorire la diffusione del virus, rende difficile l'analisi dei dati epidemiologici.
In Giappone sembra che il virus sia stato introdotto dai Portoghesi intorno al 1500, durante la tratta degli schiavi. L'evidenza che nelle isole settentrionali del Giappone l'infezione da HTLV-I sia praticamente sconosciuta è stata messa in relazione con il fatto che i Portoghesi non si sono spinti fino a quelle latitudini.
Considerando la globalità dei casi in tutto il mondo, la razza negra è di gran lunga la più colpita dall'infezione.
L'Europa flagellata dall'HIV, sembra per il momento aver evitato l'invasione dell'HTLV-I. Il sempre più massiccio afflusso di individui provenienti dal terzo mondo potrebbe modificare la situazione.
In Italia, studi preliminari su tossico-dipendenti per via endovenosa a Roma e a Napoli segnalano circa il 10% di sieropositività per l'HTLV-I e percentuali intorno al 35% per l'HIV. Un cluster di sieropositività è stato messo in evidenza nella zona sud-occidentale della Puglia, dove il 9% degli individui apparentemente normali ha nel siero anticorpi anti-HTLV-I.

Questi dati sulla presenza di anticorpi anti-HTLV-I in Italia andrebbero rivalutati alla luce dei risultati falsamente positivi che le metodiche immunoenzimatiche possono fornire. Recentemente (Oksenberg, 1990; Nishimura, 1990), sono stati pubblicati studi che dimostrano l'assenza di pezzi di genoma del retrovirus HTLV-I, ricercati mediante polymerase chain reaction, in pazienti con slerosi multipla. Tali ricerche mettono in guardia dalla possibilità che una tecnica così sensibile possa dare facilmente falsi positivi. Per un approfondimento del problema si rimanda al capitolo sui retrovirus e la patogenesi della sclerosi multipla.

Un recente studio condotto dalla "American Red Cross" indica che su 40.000 donatori di sangue, 10 erano stati infettati dall'HTLV-I (0.025%). Sei di loro avevano fattori di rischio, come essere consumatori di droghe per via endovenosa o aver avuto rapporti sessuali con tossico-dipendenti o con persone provenienti da zone dove l'HTLV-I è endemico.

Infine, è stato stimato che il 75% degli individui che avevano ricevuto trasfusioni di sangue rivelatosi infetto con l'HTLV-I sono diventati sieropositivi.

# La paraparesi spastica tropicale

La paraparesi spastica tropicale (PST) è una mielopatia cronica ad andamento progressivo. L'eziologia sembra essere strettamente connessa all'infezione da HTLV-I. La malattia si inquadra in un più vasto panorama di mielopatie tropicali, delle quali già nel 1887 Strachan riportò 510 casi sotto la dizione di "neuriti multiple prevalenti nelle Indie Occidentali". Le mielopatie tropicali vengono oggi classificate in due forme: una denominata neuropatia tropicale atassica, con l'atassia come manifestazione clinica principale, l'altra nota, appunto, come PST, caratterizzata dalla paralisi spastica degli arti inferiori.

La malattia ha una distribuzione geografica definita, dalla quale prende origine il nome: casi clinici sono stati descritti in Colombia (Tumaco), Sejchelles, Sud Africa (Senegal,Zaire), Sud India e Caraibi (Martinica, Trinidad, Tobago).

Mentre la PST è stata chiaramente associata all'infezione da HTLV-I, dal momento che anticorpi specifici contro il virus sono stati messi in evidenza in circa il 75% dei pazienti affetti dalla malattia, la neuropatia tropicale atassica sembra sia causata da una cianotossina di provenienza alimentare.

Individui affetti da una forma spastica molto simile alle PST sono stati identificati nel sud del Giappone, dove la malattia è stata denominata mielopatia associata all'HTLV-I (HAM). Le differenze tra le due malattie sonoillustrate nella Tabella 2.

Si ritiene pertanto che le due malattie possano essere ricondotte alla stessa origine virale. Di notevole rilevanza è che il 16% della popolazione generale in Giappone ha nel siero anticorpi anti-HTLV-I.

Le manifestazioni cliniche della PST dipendono principalmente dalla grave compromissione del sistema piramidale e delle altre vie ascendenti e discendenti nei cordoni posteriori e laterali del midollo spinale.

Accanto alla classica paraparesi di tipo spastico, vanno annoverati disturbi della sensibilità come parestesie agli arti inferiori, ipopallestesia, dolore alle gambe e alla schiena, disfunzione degli sfinteri e impotenza nel maschio.

Con frequenza minore sono stati descritti disturbi visivi, disturbi correlati a

| Caratteristiche | PST | HAM |
|---|---|---|
| Zone colpite | isole (tropici) | isole (Giapp.) |
| Sesso (M/F) | 0.9 | 0.5 |
| Razza | negri | giapponesi |
| Età di esordio (media) | 42 anni | 37 anni |
| Durata di malattia (anni) | 8-10 | 15 |
| Segni piramidali | paraparesi spastica | paraparesi spastica |
| Segni sensitivi | colonne dorsali | prevalenti L1-L5 |
| Pleocitosi liquorale | infrequente | frequente |
| Risposta ai corticosteroidi | scarsa | buona |
| Anticorpi anti-HTLV-I (%) | 80 (siero) | 100 (siero) |
| | 70 (liquor) | 100 (liquor) |

***Tabella 2. Comparazione tra Paraparesi Spastica Tropicale (PST) e mielopatia associata all'HTLV-I (HAM).***

lesioni cerebellari e saltuari casi di neuropatia periferica.

La PST colpisce con maggior frequenza la razza negra e più le femmine che i maschi. L'insorgenza dei sintomi avviene fra i 30 e i 40 anni. La progressione della malattia è graduale.

I parametri bioumorali liquorali sono tutti normali, tranne l'aumento delle IgG, che si dispongono in bande oligoclonali alla separazione isoelettroforetica: è stato dimostrato che tali anticorpi sono specifici per l'HTLV-I. Mediante tecniche immunoistochimiche è stata messa in evidenza la presenza del virus nei linfociti ematici e liquorali. I linfociti, inoltre, hanno atipie morfologiche simili a quelle riscontrate nella adult T-cell leukemia / lymphoma.

Le lesioni anatomo-patologiche interessano i cordoni posteriori e laterali del midollo spinale e hanno le caratteristiche di un processo infiammatorio cronico, che colpisce soprattutto la sostanza bianca, con infiltrati linfocitari perivascolari, vasculite dei piccoli vasi, astrocitosi reattiva e leptomeningite .

Dal punto di vista epidemiologico, i casi di malattia si distinguono in aree geografiche definite, che hanno in comune particolari condizioni ambientali e sociali. La diffusione del virus in queste zone è endemica.

E' stata descritta la non frequente associazione tra la adult T-cell leukemia / lymphoma e la PST in alcuni casi caraibici.

La rarità dell'associazione tra la sindrome neurologica e la sindrome ematologica associate entrambe all'infezione da HTLV-I pone non pochi problemi interpretativi. A meno di clamorose scoperte, la tendenza attuale è di considerare entità a sé stanti e indipendenti la paraparesi spastica e la leucemia/linfoma associate all'HTLV-I. L'ipotesi di lavoro è che un altro o altri virus oltre all'HTLV-I possano intervenire nella patogenesi di queste due entità nosologiche. La soluzione di questo problema sta attualmente impegnando le migliori unità di ricerca in campo retrovirologico. Da essa potrà scaturire una migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici legati all'infezione da HTLV-I.

In Italia, nonostante il cluster di sieropositività presente nel sud-ovest della Puglia, è stato segnalato fino ad oggi soltanto un caso di paraparesi spastica associato all'infezione da HTLV-I. Non è escluso che gli attuali test ELISA non siano sufficientemente sensibili per rivelare bassi titoli anticorpali in quei casi di mielopatie cronico-progressive di origine, finora, sconosciuta.

Per quanto riguarda la possibilità di curare la mielopatia associata all'infezione da HTLV-I vanno segnalati casi di un moderato miglioramento della sintomatologia in seguito a trattamento steroideo. Sull'efficacia a lungo termine non si hanno ancora dati significativi. Si intravvedono buone prospettive legate all'uso di farmaci antiretrovirali specifici, come l'AZT (3'-Azido-2', 3'-Dideossitimidina), già sperimentati nell'infezione da HIV. Alcuni studi preliminari indicano che l'AZT è in grado di procurare un migloramento della sintomatologia. Anche in questo caso mancano studi di follow-up a lungo termine per la valutazione dell'efficacia del farmaco.

# Adult T-cell leukemia/lymphoma: la sindrome linfomatosa associata all'HTLV-I.

Oltre ad una sindrome neurologica demielinizzante, la paraparesi spastica tropicale, l'HTLV-I è stato associato alla adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), un linfoma maligno dei linfociti CD4+ (T-helper /inducer) maturi. L'importante scoperta è stata portata a termine grazie alle nuove possibilità di far crescere in vitro linfociti T, usando colture supplementate con "T-cell growth factor" purificato e con interleuchina-2, e mediante la recente messa a punto di metodiche in grado di rivelare basse concentrazioni di transcriptasi inversa, enzima prodotto solo dai retrovirus.

La ATLL fu riconosciuta per la prima volta dal punto di vista clinico nel 1970 in Giappone. La malattia colpisce individui adulti, con minima preferenza per i maschi rispetto alle femmine, e ha una distribuzione geografica quasi del tutto sovrapponibile a quella segnalata per la paraparesi spastica tropicale (Giappone meridionale, Caraibi, Seychelles, Africa Equatoriale, alcuni stati meridionali degli USA dove predilige la razza negra).

La ATLL si presenta come linfoma caratterizzato da una costante associazione di manifestazioni accessorie consistenti nella diffusione leucemica delle cellule tumorali, nell'ipercalcemia, nell'infiltrazione della cute e del midollo osseo. La malattia esordisce con una linfoadenopatia generalizzata e la leucemia caratteristicamente si manifesta in oltre i 2/3 dei casi.

Il decorso clinico colpisce per la rapida progressione e l'alta mortalità. Le masse linfomatose aumentano di volume in breve tempo e l'ipercalcemia, con le infezioni opportunistiche che si sovrappongono alla malattia di base, portano a morte i pazienti non trattati in pochi mesi dalla diagnosi.

In Giappone si segnala un 10-20% dei casi che sopravvivono senza terapia per anni; comunque, molti di loro, improvvisamente entrano in una fase più aggressiva di malattia, che progredisce verso l'exitus.

Le cellule maligne nel sangue periferico sono rappresentate da linfociti con caratteristici nuclei indentati o irregolari.

Anticorpi monoclonali specifici riconoscono il fenotipo CD4 presente sulle cellule circolanti e su quelle che infiltrano i linfonodi. I linfociti possono infiltrare

l'epidermide ed il derma, dando luogo a lesioni che vanno da noduli localizzati a "rashes" papulosi generalizzati, fino a quadri di eritema diffuso che ricordano la micosi fungoide.

L'ipercalcemia, grave e refrattaria al trattamento, non sembra legata all'infiltrato osseo, ma piuttosto alla secrezione di linfochine o altri fattori umorali da parte delle cellule linfomatose. Anticorpi anti-HTLV-I sono presenti nel 90% dei casi definiti con criteri clinico-anatomopatologici.

La Tabella 3 sintetizza le principali caratteristiche della sindrome linfomatosa associata all'infezione da HTLV-I.

| | | |
|---|---|---|
| Zone colpite | Regioni caraibiche<br>Giappone (Sud)<br>Sud america (regioni tropicali)<br>USA (Sud, razza negra)<br>Africa (regioni equatoriali)<br>Isole Seychelles | |
| Sesso (M/F) | 1.07 | |
| Età di esordio (media) | 40-45 anni (range: 15-84) | |
| Durata di malattia | variabile (forme aggressive, più frequenti, e forme indolenti) | |
| Caratteristiche cliniche | Linfadenopatia generaliz. | (80-90%) |
| | Leucemia | (50-85%) |
| | Ipercalcemia (50-60%) | |
| | Interessamento midollare | (50%) |
| | Epatosplenomegalia | (50%) |
| | Interessamento cutaneo | (20-45%) |
| | Lesioni osteolitiche | (15%) |
| Caratteristiche anatomo-patologiche | Fenotipo: Linfociti T maturi (CD4+ helper-infucer) | |
| | Morfologia: A cellularità media<br>A cellularità mista<br>A grandi cellule<br>Pleomorfico | |

***Tabella 3. Caratteristiche della sindrome linfomatosa associata all'infezione da HTLV-I.***

Nelle zone di endemia gli individui sieropositivi per il retrovirus hanno un rischio di contrarre l'ATLL 20 volte maggiore rispetto alla popolazione generale del luogo.

L'HTLV-I può essere isolato in coltura dai linfociti tumorali dei pazienti affetti da ATLL e sequenze specifiche di DNA provirale possono essere identificate nei nuclei delle stesse cellule.

E' interessante notare che il sito genico di integrazione delle sequenze virali nel DNA della cellula infettata è diverso per ciascun paziente e ciò indica una responsabilità diretta del virus nell'evento trasformante, escludendo la presenza di un oncogene adiacente al punto di integrazione.

Sia nella ATLL che nella paraparesi spastica tropicale è possibile isolare l'HTLV-I in pazienti sieronegativi per il virus, facendo ritenere che gli attuali tests ELISA non sono in grado di mettere in evidenza bassi titoli anticorpali specifici.

Sono in corso studi rivolti a definire in dettaglio i meccanismi patogenetici dell'HTLV-I nella ATLL tenendo presente che da essi potrebbero scaturire importanti notizie sul "come" i retrovirus causano malattie neurologiche.

# Considerazioni sul ruolo dell'HTLV-I e dei retrovirus nella patogenesi della sclerosi multipla.

L'ipotesi che un virus o un agente simil-virale possa essere implicato nell'eziologia della sclerosi multipla, trova a sua favore il riscontro dei dati epidemiologici riguardanti la distribuzione e la diffusione della malattia.

La sclerosi multipla colpisce individui con età compresa fra i 20 ed i 40 anni e ha una prevalenza nella popolazione generale che varia con la latitudine ( in Europa, le zone a Nord hanno un maggior numero di nuovi casi per anno rispetto a quelle situate più a Sud).

Ricerche condotte su popolazioni migranti indicano che chi si sposta da una zona ad alta incidenza a una zona a bassa incidenza dopo l'adolescenza conserva la percentuale di rischio di ammalarsi di sclerosi multipla propria del paese d'origine; ciò non succede se la migrazione avviene prima dell'adolescenza. Questo lascerebbe supporre che il contagio con l'agente causale o concausale possa avvenire nei primi anni di vita e che la malattia si manifesti nell'età adulta. I retrovirus, grazie alla capacità di integrarsi al genoma della cellula ospite e rimanere silenti per lungo tempo, ben si adatterebbero a tale modello patogenetico.

La dimostrazione dello spiccato neurotropismo dell'HTLV-I rafforzò l'ipotesi che un retrovirus poteva essere l'agente causale della sclerosi multipla.

Per quanto riguarda malattie diffuse negli animali simili alle malattie demielinizzanti nell'uomo, è noto da tempo che aspetti clinici e anatomopatologici omologhi caratterizzano la sclerosi multipla ed il "visna", una malattia neurologica cronico-progressiva della pecora causata da un retrovirus che strutturalmente si avvicina molto ai retrovirus umani. Oltre alle analogie cliniche sono da sottolineare altri due aspetti sovrapponibili nelle due malattie e che consistono nella presenza di aree di demielinizzazione nella sostanza bianca del sistema nervoso centrale e di una disposizione in bande oligoclonali delle immunoglobuline liquorali all'esame isoelettroforetico (fig. 6). Le bande oligoclonali rappresentano il prodotto di pochi cloni plasmacellulari in risposta alla stimolazione di pochi antigeni immunodominanti.

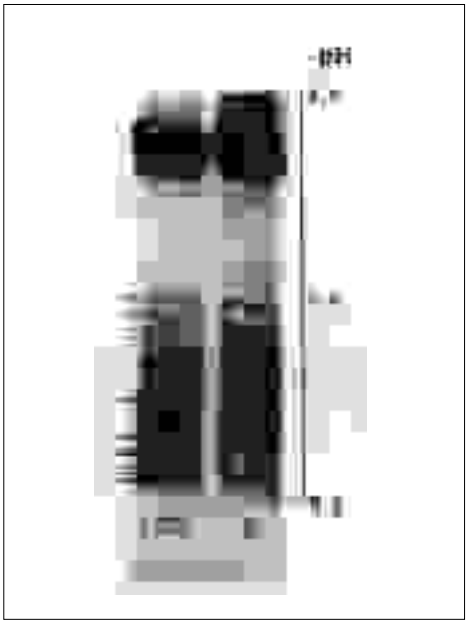


***Figura 6. Liquor (LCS) e siero (S) di un paziente affetto da sclerosi multipla. Le frecce indicano le bande oligoclonali. Isoelettrofocusing su agarosio (Isolab Inc./ Mascia Brunelli) e colorazione con nitrato d'argento.***

che i segni ed i sintomi di infezione virale sono molto scarsi e sono finora falliti i tentativi di isolare virus da materiale autoptico proveniente dal cervello di pazienti con sclerosi multipla.

E' possibile ipotizzare che siti antigenici di uno o più virus abbiano una struttura molecolare molto simile, se non identica, a quella di alcune componenti la mielina del sistema nervoso centrale. La risposta immunitaria diretta contro l'infezione virale non si arresterebbe dopo l'annientamento dell'agente esterno, ma continuerebbe la sua azione distruttiva contro i determinanti antigenici siti sulla mielina.

E' stato dimostrato, per esempio, che alcune sequenze polipeptidiche del virus del morbillo sono quasi identiche ad alcuni pezzi componenti la mielina umana normale. Una predisposizione genetica potrebbe contribuire alla manifestazione di meccanismi autoimmunitari come quello appena ipotizzato.

Uno degli aspetti più studiati nella sclerosi multipla, parallelamente alle ricerche virologiche, è il versante immunologico.

Come abbiamo già accennato a proposito del "visna", il più frequente riscontro di laboratorio nella sclerosi multipla è la produzione di immunoglobuline a ristretta eterogeneità (bande oligoclonali) nel distretto intratecale, che potrebbe essere correlata alla risposta immunitaria diretta contro un virus o contro un agente simil-virale.

Sono stati condotti numerosi studi per individuare una eventuale rilevanza patogenetica di questo dato. In breve, le conclusioni sono state :

1) gli anticorpi prodotti intratecalmente mostrano molte e differenti specificità ma nessuna singola specificità (ad esempio contro virus o contro componenti del "self") caratteristica di tutti i pazienti affetti dalla malattia;

2) non esiste alcuna relazione tra intensità e specificità della sintesi anticorpale intratecale ed il decorso clinico della malattia;

3) lo spettrotipo di immunoglobuline eluite da placche di demielinizzazione di un singolo paziente è unico per ciascuna placca, cioè tutte le IgG che si ritrovano in una placca sono omogenee e diverse da quelle che fanno parte di altre placche.

Sulla base delle osservazioni ai punti 1 e 2 nonostante quella al punto 3, è stato proposto che la produzione intratecale di immunoglobuline sia da considerarsi un epifenomeno della malattia, risultante dal casuale reclutamento di B-linfociti circolanti all'interno del sistema nervoso centrale, dove sono stimolati a produrre anticorpi da fattori mitogenici attivi localmente. Da ciò, la denominazione "non-sense" attribuita a tali anticorpi. Questa ipotesi, mal si concilia con l'ulteriore constatazione che, sotto il profilo qualitativo, il pattern anticorpale di sintesi intratecale si mantiene stabile e resta immodificato negli anni. In altre parole non esisterebbe motivo per cui se il "primum movens" agisce in maniera apparentemente casuale, ciò che ne deriva debba perpetrarsi immodificato, rispettando proporzioni quantitative e qualitative.

Rimane spazio per ipotizzare che una quota, seppur piccola, della produzione intratecale di immunoglobuline sia legata alla patogenesi della malattia.

La comunità scientifica era, dunque, alla ricerca di un virus o di un agente similvirale quale causa della sclerosi multipla, quando la dimostrazione del neurotropismo dei retrovirus orientò gli studi verso questa famiglia di virus.

Alcuni ricercatori riscontrarono la presenza di anticorpi anti-HTLV-I in pazienti con sclerosi multipla. Invero il titolo anticorpale era basso nel gruppo di pazienti provenienti da Key West, un'isola vicina alla Florida, e ancora più basso nel gruppo di pazienti svedesi.

Molti altri, in tutto il mondo, cercarono senza successo di confermare il dato. Soltanto dal Giappone, dove l'infezione da HTLV-I è endemica, venne una segnalazione positiva. Sulle pagine della prestigiosa rivista *Science* si aprì un dibattito fra il gruppo di Koprowski, che aveva per primo messo in evidenza gli

anticorpi anti-HTLV-I nei pazienti con sclerosi multipla, ed alcuni ricercatori, che non avevano riscontrato dati sovrapponibili.

Si tentò di spiegare le mancate conferme con il fatto che erano state impiegate differenti tecniche di rilevazione, non tutte in grado di mettere in evidenza bassi titoli anticorpali.

Intanto l'HTLV-I fu riconosciuto agente causale della paraparesi spastica tropicale che presenta sorprendenti omologie cliniche con la sclerosi multipla.

Recentemente su *Science* (27.I.89), sono stati pubblicati dati relativi alla presenza di sequenze di DNA provirale, appartenenti all'HTLV-I, all'interno del DNA di alcune cellule monocito-macrofagiche, prelevate dal sangue periferico di sei pazienti con sclerosi multipla clinicamente definita. Lo stesso studio è stato effettuato su venti individui "normali" di controllo e in uno di essi è stato riscontrato un identico reperto.

Si stima che brevi sequenze retrovirali, e il dato appena esposto lo conferma, siano presenti sporadicamente nel genoma umano e di ciò si deve tenere conto nella interpretazione di questi risultati condotti con moderne tecniche di biologia molecolare. A ulteriore commento, va precisato che le sequenze geniche trovate nel DNA della cellula ospite appartengono ai geni virali "gag" e "env" che sintetizzano le proteine del "core" e dell'involucro esterno, geni che vanno frequentemente incontro a mutazioni.

Una causa dell'alto tasso di mutazione dei retrovirus ) legata all'incapacità delle transcriptasi inverse finora studiate di riconoscere e correggere un loro errore, così come fanno le DNA polimerasi cellulari.

Rilevanza maggiore avrebbe avuto la scoperta della inserzione del gene "pol" , molto più stabile e, pertanto, specifico per l'HTLV-I. Gli stessi autori espongono i dati con molta cautela e in sede di discussione si dichiarano in attesa di ulteriori approfondimenti e conferme, prima di poter concludere che l'HTLV-I o retrovirus antigenicamente molto simili e ancora sconosciuti siano implicati nella eziopatogenesi della sclerosi multipla.

Il gruppo di Oksenberg e colleghi nel 1990 ha cercato la presenza di sequenze di DNA omologhe al gene "pol" dell'HTLV-I in linfociti prelevati dal sangue periferico di pazienti con sclerosi multipla e con altre malattie autoimmuni non neurologiche, e in campioni tissulati provenienti da placche di demielinizzazione prelevate da cervelli di pazienti con sclerosi multipla. La polymerase chain reaction è stata impiegata come tecnica di studio. I risultati sono stati negativi, in netto contrasto con i due precedenti lavori che suggerivano che l'HTLV-I, o un virus strettamente correlato all'HTLV-I, poteva essersi integrato nel genoma di pazienti con sclerosi multipla. Gli autori ricordano, in sede di discussione, i rischi di falsi positivi legati all'uso della polymerase chain reaction: di per se stesa creata per amplificare segnali virali di bassissima intensità, sotto forma di pezzi di genoma virale, e quindi tecnica ad alta sensibilità, può generare falsi positivi

quando fonti estranee al campione in esame forniscano un substrato alle cicliche amplificazioni. E questo problema ha maggiori probabilità di intervenire quando è richiesta una ulteriore amplificazione del campione dopo arricchimento mediante gel-elettroforesi.

Nel tentativo di unificare il significato dei dati fin qui esposti, si può ritenere che, nonostante la notevole separazione geografica che distingue le paraparesi spastiche tropicali, dalla mielopatia associata all'HTLV-I in Giappone e dalle forme che potremmo considerare malattie simil-sclerosi multipla segnalate in Florida e in Giappone, tutte queste entità nosologiche mostrano caratteristiche comuni e potrebbero rappresentare varianti cliniche di una unica mielopatia associata all'HTLV-I.

# Retrovirus ed oncogéni

Sono detti oncogeni quei geni che, sottoposti a mutazione o svincolati dal normale controllo della loro stessa espressione, possono indurre la cellula che normalmente li ospita verso una incontrollata proliferazione tumorale.

La scoperta degli oncogeni è strettamente e storicamente legata allo studio dei retrovirus. Come abbiamo visto, i retrovirus utilizzano l'enzima transcriptasi inversa per sintetizzare una nuova molecola di DNA a partire dal proprio genoma a RNA. Il risultante doppio filamento di DNA (DNA provirale) ha la capacità di integrarsi subdolamente nel genoma della cellula ospite, sottoponendosi al controllo dell'espressione genica come qualsiasi altro gene della cellula stessa.

Il DNA provirale può essere espresso subito (replicazione virale) oppure replicarsi, senza esprimersi, insieme al DNA dell'ospite. Questo stato di quiescenza temporanea può durare mesi e anni prima di dare inizio alla produzione di nuovi virus. Occasionalmente, tuttavia, l'integrazione del DNA provirale nel DNA della cellula ospite può risultare difettosa e possono andare perse alcune funzioni enzimatiche indispensabili per l'espressione e la replicazione virale. Il retrovirus sarà destinato a rimanere imprigionato senza possibilità di "fuga" nel DNA ospite, che, a sua volta, diventerà più complesso.

In ultima analisi, il retrovirus contribuirà a quella variabilità genetica, ipotizzata da C. Darwin, indispensabile per l'evoluzione della specie.

Negli anni '50 venne scoperto da Gross il primo virus che induceva una leucemia nel topo. A partire da questa data, un certo numero di retrovirus furono associati a tumori in alcune specie animali. Divenne subito evidente che alcuni tra questi virus necessitavano di una certa latenza prima che si manifestassero le potenzialità oncogene, altri inducevano la produzione del tumore dopo poco tempo (giorni o settimane) dall'infezione dell'animale da esperimento. Questi virus vennero definiti retrovirus oncogeni acuti, per distinguerli dai primi, retrovirus oncogeni lenti. I retrovirus oncogeni acuti, rispetto ai lenti, per la brevità del tempo intercorrente tra l'infezione e il tumore, meglio si prestavano agli studi di laboratorio sui meccanismi della oncogenicità. Sorprendentemente si scoprì che i retrovirus oncogeni acuti erano virus difettivi, cioè non erano in grado di replicarsi autonomamente, dipendendo per questa funzione dalla contemporanea presenza di un altro virus, detto ausiliario.Faceva eccezione, ma questo lo si capì più tardi, il virus del sarcoma di Rous, l'unico retrovirus oncogeno completo: infatti non aveva bisogno di un virus ausiliario per replicarsi. Il primo retrovirus studiato era dunque atipico e ciò finì per semplificare, almeno inizialmente l'interpretazione dei dati sperimentali.

I retrovirus oncogeni erano difettivi perchè alcune sequenze del genoma, deputate a funzioni relative alla replicazione, erano mancanti e risultavano sostituite da altre del tutto diverse, di natura non virale e a funzione sconosciuta.

Non si sapeva da dove questi pezzi di genoma provenissero, ma, seguendo una logica deduttiva, si associò la loro presenza con la proliferazione tumorale che colpiva la cellula infettata. Pertanto questi tratti di DNA non virale, inframmezzati apparentemente a caso al DNA provirale, furono chiamati oncogeni. Vennero individuati una ventina di oncogeni in varie specie animali, come l'oncogene "src" presente nel genoma del retrovirus del sarcoma di Rous che colpisce il pollo, l'oncogene "abl" del virus della leucemia murina, l'oncogene "fes" del virus del sarcoma del gatto e altri appartenenti a retrovirus infettanti il ratto, il tacchino, la scimmia lanosa. Successivamente si accertò la provenienza di questi tratti di DNA e fu inequivocabilmente dimostrato che appartenevano al genoma della cellula ospite. Nella fase di assemblaggio dell'RNA retrovirale, a partire dal DNA provirale integrato nel DNA dell'ospite, alcune sequenze del virus potevano andar perse. Al loro posto venivano integrate nel genoma virale pezzi di RNA messaggero presenti nel citoplasma della cellula infettata.

Pertanto, al momento della trascrizione inversa da RNA a DNA, il provirus risultante conteneva una porzione di DNA non virale e di provenienza cellulare che, casualmente, poteva rivelarsi un oncogene. Infatti, il retrovirus non era in grado di scegliersi, tra i tanti frammenti di RNA messaggero, quelli che avrebbero innescato la proliferazione tumorale. La maggior parte dei pezzi di RNA messaggero retrotrascritti non avrebbero procurato alcun vantaggio in termini evoluzionistici al retrovirus, poichè sarebbe rimasto un virus difettivo, dipendente da un virus ausiliario per replicarsi. Un vantaggio consistente avrebbe ottenuto quel retrovirus che fortuitamente incorporava una sequenza di RNA in grado, una volta trascritto in DNA, di aumentare la velocità di replicazione della cellula ospite. A più frequenti cicli replicativi di tale cellula corrispondeva una maggior produzione di forme virali, peraltro sempre supportata da un virus ausiliario. Dal punto di vista dell'evoluzione, quindi, il nuovo fortunato retrovirus non solo avrebbe migliorato il suo status nei confronti della forma difettiva, ma addirittura avrebbe superato le forme non difettive. I nuovi retrovirus erano pronti a portare a termine ulteriori e sempre più numerosi cicli infettivi. A metà degli anni '70, quindi, il mondo scientifico si trovò di fronte a un'apparente contraddizione: sequenze di RNA messaggero appartenenti alla cellula ospite potevano diventare oncogene una volta catturate da un retrovirus. Studiando il virus del sarcoma di Rous e il relativo oncogene, denominato "src", si scoprì che tali sequenze di RNA messaggero appartenevano a geni fondamentali per le funzioni vitali della cellula, come il ciclo riproduttivo. Pertanto, quelle sequenze di DNA diventate oncogene, normalmente non lo erano affatto, anzi erano indispensabili per la sopravvivenza stessa della cellula. Il retrovirus aveva isolato sequenze di DNA

capaci di una ben precisa funzione, più o meno quello che oggi nei laboratori di biologica molecolare si pratica sotto il nome di clonazione.

Da un punto di vista strettamente strutturale, fu interessante notare che i tratti di DNA oncogeni e quelli normali erano simili ma non identici. Infatti i vari RNA messaggeri erano costituiti soltanto da sequenze di DNA destinate alla trascrizione (esoni), mentre non comparivano quelle sequenze non destinate a tal fine (introni). L'assenza delle sequenze introniche di per se stessa poteva aiutare a comprendere la nascita di un oncogene (vedi Figura 7).

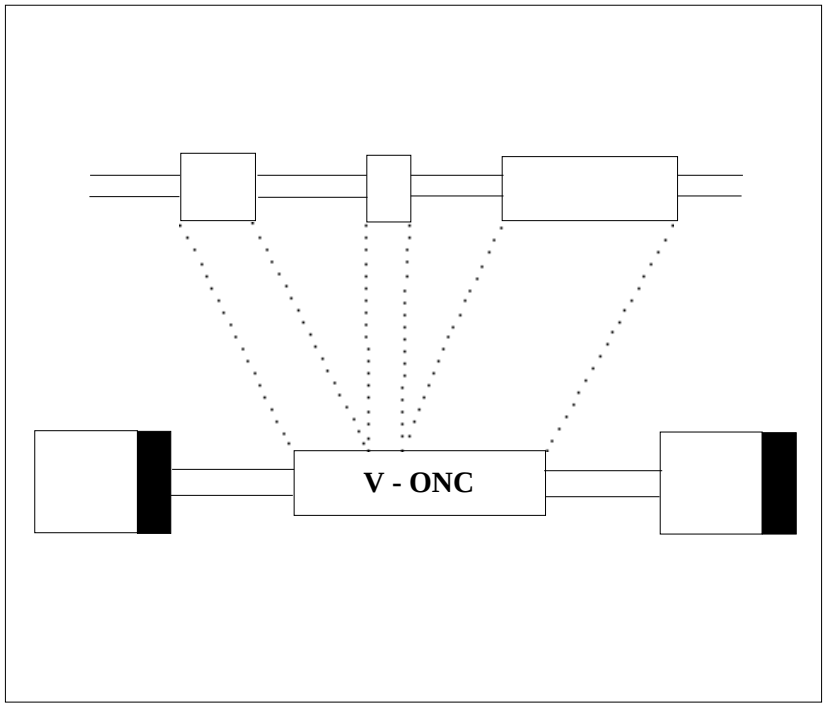



***Figura 7. La figura illustra come le sequenze di esoni appartenenti al DNA della cellula ospite (in alto) possono trasformarsi in oncogeni virali (v-onc) se vengono ad essere incorporate dal retrovirus (in basso) prive delle sequenze introniche. Tale fenomeno è reso possibile dall'enzima transcriptasi inversa che converte pezzi di RNA messaggero della cellula ospite in DNA provirale.***

Se si suppone che esse svolgano una funzione regolatrice ai fini della corretta espressione genica, la loro perdita poteva essere messa in relazione con la perdita del controllo di questa funzione. Una prima assunzione fu, quindi, che un gene con potenzialità oncogene normalmente presente in una cellula, che d'ora in avanti verrà definito protooncogene, può diventare oncogeno se svincolato dal rigido controllo della sua espressione. Fino ad allora era noto che una mutazione puntiforme all'interno del genoma poteva dare origine a un prodotto genico non funzionante, come per esempio nel caso delle emoglobinopatie, nelle quali la sostituzione di un solo aminoacido è sufficiente a causare il danno funzionale della molecola. L'alterazione era legata a una modificazione qualitativa del prodotto genico e quindi, nella maggior parte dei casi, all'attività enzimatica o alle proprietà strutturali di una proteina. Con i virus oncogeni, invece, il danno cellulare era provocato da una alterazione quantitativa del prodotto genico. In altre parole, i protooncogeni diventavano oncogeni quando si trovavano ad essere espressi in eccesso sotto il controllo del retrovirus e non più della cellula alla quale appartenevano.

Infatti, oltre alla possibilità della perdita delle funzioni regolatrici delle sequenze introniche, si scoprirono ulteriori meccanismi che conducevano la cellula alla proliferazione tumorale. Gli studi sui retrovirus, infatti, misero in evidenza che all'inizio e alla fine del genoma provirale erano presenti sequenze denominate "ltr" (long terminal repeat), che svolgono una funzione promuovente la trascrizione. Il virus se ne serviva per produrre un numero elevato di tratti di DNA adiacenti a tali sequenze. Il controllo dell'espressione genica in questi casi era completamente svincolato dall'intervento dei meccanismi della cellula ospite. Pertanto, un retrovirus poteva incorporare tratti di RNA messaggero della cellula ospite in una posizione adiacente alle sequenze "ltr".

Una volta trasformati in DNA grazie alla transcriptasi inversa, le sequenze della cellula ospite si trovavano ad essere espresse in eccesso rispetto alla norma. Era sufficiente, dunque, che fosse iperespresso un gene coinvolto nella replicazione della cellula ospite per dare origine ad alterazioni profonde dei suoi cicli vitali. Per esempio, un gene di norma espresso unicamente in una fase del ciclo mitotico, se fosse stato espresso incontrollatamente durante tutte le fasi del ciclo, poteva portare la cellula alle soglie della proliferazione tumorale.

Gli stessi effetti indesiderati potevano essere causati dall'attivazione di un gene, implicato nella replicazione cellulare, normalmente "messo a tacere" in un certo tipo di tessuto.

In conclusione, se è vero che ogni gene ha un'attivazione finalistica, qualunque perturbazione temporale o spaziale di questo finalismo esita in un'alterazione dell'omeostasi cellulare. Innoqui e allo stesso tempo indispensabili tratti di DNA all'interno di alcune cellule erano in grado di trasformarsi in potenti minacce per la sopravvivenza dell'organismo che di queste cellule era composto, a causa dell'infezione di un retrovirus.

Nella famiglia dei retrovirus, quindi, sono presenti virus patogeni per l'uomo, come l'HIV e l'HTLV-I, e virus non patogeni per l'uomo, circa una trentina, che infettano gli animali con potenzialità oncogene. Oggi sono anche conosciuti e studiati virus oncogeni a DNA che, a differenza dei retrovirus oncogeni, il cui oncogene appartiene alla stessa cellula infettata, esprimono un oncogene interamente virale, di origine non ancora definita. Anche i virus oncogeni a DNA, sorprendentemente, sembrano risparmiare il genere umano. Attraverso lo studio dei retrovirus oncogeni, in conclusione, la biologia molecolare ha compiuto importanti progressi. In particolare, la piena comprensione dei meccanismi coinvolti nella trasformazione di un gene in oncogene si ritiene possa contribuire alla risoluzione del problema della carcinogenesi. L'ingegneria genetica, inoltre, si è sviluppata fino al punto in cui si trova oggi grazie alla comprensione del meccanismo di cattura di un protooncogene, della regolazione dell'espressione genica, del ruolo di vettore di sequenze geniche potenzialmente svolto da questa famiglia di retrovirus.

# Conclusione

I retrovirus sono responsabili di infezioni “lente” negli animali e nell’uomo. Gli studi sugli animali ebbero carattere accademico, nel senso che si proponevano di approfondire gli aspetti patogenetici di questa nuova e originale classe di virus e di proporre parallelismi fra malattie animali e malattie croniche dell’uomo, come la sclerosi multipla e l’artrite reumatoide.

La scoperta dell’agente causale dell’AIDS impose urgenza e stimoli ben più importanti alle ricerche.

Come abbiamo sottolineato, le più importanti riviste scientifiche hanno riportato numerosi studi sia sull’HIV, sia sull’HTLV-I, negli aspetti riguardanti le mielopatie croniche tropicali (le “endemie nascoste”, come le ha definite con efficacia Roman), la rara sindrome linfoproliferativa ad esso associata ed il ruolo nella eziopatogenesi della sclerosi multipla.

Il recente lavoro che associa HTLV-I e sclerosi multipla, pubblicato dalla rivista *Science* , ha avuto vasta eco negli ambienti scientifici e, grazie ai mass-media, nella pubblica opinione, provocando non poco allarme.

Allo stato attuale delle conoscenze l’HTLV-I può causare, come si è detto, una forma di linfoma leucemizzante ed una malattia neurologica progressiva; si stima che solo il 3-4% degli individui infetti manifestano la malattia, dopo varie decadi.

Anche se è stato identificato nel 1980, si prevede che l’HTLV-I abbia cominciato ad infettare la popolazione generale 50-100 anni prima. Oggi non si sa quanti individui siano infetti, se il numero sia in aumento o in diminuzione e quale sia il grado di pericolosità dell’infezione per ciascuno di loro.

Al di là delle speculazioni teorico-scientifiche dibattute su riviste specializzate, c’è da chiedersi, come la “American Red Cross” e la “Food and Drug Administration” si sono chieste, se il sangue destinato alle trasfusioni debba essere testato per la presenza di anticorpi anti-HTLV-I. Il razionale è legato a misure di salute pubblica volte a prevenire la diffusione del virus. Per contro, il costo dell’operazione, in termini economici, non è di poco conto. L’orientamento sembra comunque quello di privilegiare la sicurezza del sangue da trasfusione e

quindi di testarlo per la presenza di anticorpi anti-HTLV-I.

Dalle considerazioni fatte nel capitolo dell'epidemiologia si evince che il rischio maggiore per la diffusione dell'HTLV-I nelle società più evolute possa provenire, come per l'HIV, dall'ingresso del virus nel circuito delle tossicodipendenze per via endovenosa e nel sangue destinato alle donazioni.

Le modalità di trasmissione dell'HTLV-I sembrano le stesse dell'HIV, sebbene il primo sia meno efficiente e si replichi in maniera più lenta nelle cellule infette. Comunque, i dati in tal senso sono ancora scarsi.

Indagini su famiglie con genitori sieropositivi fanno ritenere probabile la trasmissione attraverso il latte materno.

D'altronde, come l'HIV, l'HTLV-I non si trasmette attraverso i normali e casuali contatti sociali.

Mancano, per ora, studi prospettici che indichino con precisione la percentuale degli individui che venuti, a contatto con il virus, sviluppano la malattia e, anche se può sembrare strano, quale malattia. L'impressione è che la maggior parte di loro non si ammali dopo il contagio. Il momento dell'avvenuto contatto con il virus passa inosservato e, in seguito, resta difficile rilevarne la presenza, seppur indirettamente.

E' necessario considerare, infatti, che l'HTLV-I ha la caratteristica di integrarsi rapidamente nel genoma della cellula infettata e quindi, nella maggior parte dei casi, dà luogo a una risposta immunitaria che si esplica con bassi titoli anticorpali specifici. Ne deriva che false positività e false negatività al test ELISA sono frequenti (oltre a quelle dovute a cause già menzionate nella descrizione del test). Di qui la necessità di testare nuovamente i campioni e di confermare il dato con la tecnica del Western blot che, a sua volta, se il titolo anticorpale è molto basso, avrà problemi di soglia di rivelabilità.

Un'altra complicazione proviene dalla mancata discriminazione fra HTLV-I e HTLV-II da parte dei test ELISA. I due retrovirus esprimono sequenze proteiche molto simili ( ricordiamo che l'HTLV II è stato messo in correlazione con la hairy-T-cell leukemia, la leucemia a "cellule capellute", ma il numero dei casi è piccolo e l'evidenza che esso causi la malattia non è forte).

Studi epidemiologici più approfonditi su popolazioni di aree di endemia per l'HTLV-I e del resto del mondo sono necessari per definire nei dettagli il pattern di anormalità sierologica e liquorale.

Completa luce deve esser fatta sulle vie di trasmissione del virus (sessuale, parenterale ecc.) e sulla possibilità di una suscettibilità genetica all'infezione. Studi clinici supportati da risonanza magnetica nucleare, potenziali evocati, elettromiografia, indagini immunologiche e istopatologiche devono chiarire in maniera completa e definitiva i disordini neurologici che si associano all'infezione da HTLV-I.

# Bibliografia

De Rossi A, Gallo P, Tavolato B, et al. Search for HTLV-I and LAV-HTLV-III antibodies in serum and CSF of multiple sclerosis patients. Acta Neurol Scand 1986; 74: 161-1647

Franciotta DM, Martino GV, Bergamaschi R et al. Failure to detect antibodies to HTLV-I in serum and CSF of 50 multiple sclerosis patients. Acta Neurologica 1988; 10:331-334

Gallo RC, Sliski A, Wong-Staal F. Origin of human T-human leukemia/lymphoma virus. Lancet 1983; 2: 962-96

Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet 1985; 2: 407-410

Grimaldi LME, Roos RP, Devare SG, et al. HTLV-I-associated myelopathy: oligoclonal immunoglobulin G bands contain anti-HTLV-I p24 antibody. Ann Neurol 1988; 24:727-731

Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infection. Nature 1986; 322: 130-136

Ho DD, Rota TR, Hirsh MS. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. Proc Natl Acad Sci Usa 1984; 81: 7588-7590

Johnson RT. Viral aspects of multiple sclerosis. in: Koestier JC. ed Handbook of clinical Neurology. Demyelinating disease. New York: Elsevier, 1985: 319-336

Johnson RT, Mc Arthur JC. Myelopathies and retroviral infection. Ann Neurol 1987; 21: 113-116

Karpas A, Kampf U, Siden A, et al. Lack of evidence for involvement of human retrovirus in multiple sclerosis. Nature 1986; 322: 177-178

Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, et al. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. Nature 1985; 318: 154-160

Madden DL, Mundon FK, Tzan NR, et al. Antibody to human and simian retroviruses HTLV-I, HTLV-II, HIV, STLV-III and SRV-I are not increased in patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 1986; 23 (suppl): S171-S173

Montgomery RD. HTLV-I, visna and tropical spastic paraparesis. Lancet 1986; 2: 227-228

Nishimura M, Adachi A, Maeda M et al. Human T-lymphotropic virus type I may not be associated with multiple sclerosis in Japan. J Immunol 1990; 144: 1684-1688.

Ohta M, Ohta K, Mori F, et al. Sera from patients with multiple sclerosis react with “gag” proteins but not “env” proteins: Western blotting analysis. J Immunol 1986; 137: 3440-3443

Oksenberg JR, Mantegazza R, Sakai K et al. HTLV-I sequences are not detected in peripheral blood genomic DNA or in brain cDNA of multiple sclerosis patients. Ann Neurol 1990; 28: 574-577.

Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy: a new clinical entity. Lancet 1986 1031-1032

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 7415-7419.

Reddy EP, Sandberg-Wollheim M, Mettus RV, et al. Amplification and molecular cloning of HTLV-I sequences from DNA of multiple sclerosis patients. Science 1989; 243: 529-533

Rice GPA, Armstrong H, Patty DW, Ebers GC. Absence of antibodies to HTLV-I and HTLV-III in sera of patients with MS and chronic myelophaty. Neurology 1986; 36 (suppl 1): 184

Roman GC, Schoenberg BS, Madden DL et al. Human T-lymphotropic virus type I antibodies in the serum of patients with tropical spastic paraparesis in the Seychelles. Arch Neurol 1987; 44: 605-607.

Roman GC, Retrovirus-associated myelopaties. Arch Neurol 1987; 44: 659-663

Roman GC, Roman LN. Tropical spastic paraparesis. A clinical study of 50 patients from Tumaco (Colombia) and a review of the wordwide features of the syndrome. J Neurol Sci 1988; 87; 121-138

Roman GC, Spencer PS, Schoenberg BS. Tropical myeloneuropathies: the hidden endemias. Neurology 1985; 35: 1158-1170

Sarin PS. HTLV-I. Adult T-cell leukemia and tropical spastic paraparesis. Ann Neurol 1988; 23 (suppl): S181-S184

Shibasaki H, Endo C, Kuroda Y, et al. Clinical picture of HTLV-I associated myelophaty. J Neurol Scie 1988; 87: 15-24

Taguchi H. Origin of HTLV-I in Japan. Nature 1986; 323: 764

Varmus A. Retroviruses. Science 1988; 240: 1427-1432

Uchiyama T, Yodoi J, Sagaawa K et al. Adult T-cell leukemia: Clinical and haematologic features of 16 cases. Blood 1977; 50: 481-491.

Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. Nature 1985; 317:395-403

Yoshida M, Osame M, Usuku K, et al. Viruses detected in HTLV-I-associated and adult T-cell leukemia are identical on DNA blotting assay. Lancet 1987; 1: 1085-1086

Zaninovic V. Statistic paraparesis: a possible sexually transmitted myeloneuropathy. Lancet 1986; 2: 697

RINGRAZIAMENTI: Ringraziamo cordialmente la Sig. na Vera Sarchi per la battitura al computer del manoscritto e per la pazienza con la quale ha accolto le numerose modificazioni al testo.

# Indice


Istruzioni per gli Autori..... pag 2

Editoriale..... » 3

I retrovirus ..... » 5

HTLV-I (Human T-cell lymphotropic virus type I)..... » 8

Diagnosi virologica..... » 14

Epidemiologia ..... » 19

La paraparesi spastica tropicale ..... » 21

Adult T-cell leukemia/lymphoma: la sindrome linfomatosa associata all'HTLV-I ..... » 24

Considerazioni sul ruolo dell'HTLV-I e dei retrovirus nella patogenesi della sclerosi multipla ..... » 27

Retrovirus e oncogeni ..... » 32

Conclusioni..... » 37

Bibliografia ..... » 39

Indice ..... » 42

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio..... » 43

Concorso di Pittura..... » 45

Videoteca Medical Systems..... » 46

# Volumi pubblicati nella Collana Caleidoscopio

Medical Systems S.p.A.

TECNOLOGIA con AMORE

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia.* Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino.* Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi.* Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina.* Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino.* Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).* Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'.* Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.* Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1).* Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.* Gennaio'85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.* Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.* Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH.* Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La ß-endorfina plasmatica e liquorale.* Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1).* Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.* Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.* Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.* Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.* Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica.* Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma.* Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.* Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia.* Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.* Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche.* Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina.* Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea.* Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale.* Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche.* Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica.* Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali.* Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario.* Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*Neuroendocrinologia dello stress.* Marzo '88.

34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M.:** ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. **Piantino P., Pecchio F.:** ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. **Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.:** ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. **Sommariva D., Branchi A.:** ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. **Butturini U., Butturini A.:** ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. **Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.:** ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. **Palleschi G.:** ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. **Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.:** ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. **Fanetti G.:** ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. **Contu L., Arras M..:** ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. **Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.:** ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. **Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. :** ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. **Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. :** ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. **Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.:** ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. **Cappi F.:** ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. **Tortoli E., Simonetti M.T.:** ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. **Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.:** ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. **Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.:** ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. **Goracci E., Goracci G.:** ***Gli allergo-acari*****. Agosto '90.**
55. **Rizzetto M.:** ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.:** ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
57. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbrauio '91.**
59. **Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.:** ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. **Bedarida G., Lizioli A.:** ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. **Romano L.:** ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. **Dondero F. e Lenzi A.:** ***L'infertilità immunologica*****. Giugno '91.**
63. **Bologna M. Biordi L. Martinotti S.:** ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.:** ***Infezione-malattia da HIV in Africa*****. Agosto '91.**
65. **Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.** ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**

**Caleidoscopio**
***Collana monografica di Medicina***
anno 7, numero 43

**Direttore Responsabile**
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. Fax e Modem (079) 270464
user

**Consulenti di Redazione**
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**
Fiorella Gaggero

**Servizio Abbonamenti**
Elisabetta Ricci
Giuseppe Gambetta

**Editore**
**Medical Systems S.p.A.**
TECNOLOGIA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola-
Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica,
The Medical Systems Voice.

**Stampa**
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Giugno 1989; Ristampa Agosto 1991

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)